

Descriere:

Invenția se referă la domeniul medicinei clinice și este destinată sporirii eficienței examinării bolnavilor.

Determinarea factorului reumatoid reprezintă o caracteristică diagnostică importantă a artritei reumatoide. Este cunoscută metoda de depistare a acestui factor, bazată pe capacitatea factorului reumatoid să reacționeze cu fragmentul Fc al imunoglobulinei de iepure din clasa G, metoda fiind numită Vaaler-Rose. Esența metodei constă în tratarea eritrocitelor native de berbec cu ser antieritocitar de iepure într-o doză de subaglutinare. De obicei pentru aceasta se folosește ser hemolitic [1]. În acest caz anticorpii antieritocitari ai imunoglobulinei din clasa G reacționează cu antigen eritocitar prin intermediul fragmentului său Fab, modificând conformația sa spațială astfel, încât în fragmentul Fc se deschide un receptor pentru factorul reumatoid, care a fost anterior inaccesibil. Prezenta reacție este una din cele mai specifice metode de determinare a factorului reumatoid.

Adițional, antigenul de diagnostic Vaaler-Rose prezintă un șir de dezavantaje esențiale, limitând domeniul de utilizare a acestuia în laboratoarele clinice. Dezavantajele sunt următoarele:

1) Utilizarea eritrocitelor native de berbec, fapt care necesită o întreținere specială a animalului, respectarea regulilor de asepsie în procesul prelevării sângelui și păstrării lui la etapa de pregătire pentru obținerea antigenului de diagnostic. Antigenul de diagnostic obținut nu este durabil și se păstrează cel mult 24 ore.

2) Disocierea complexurilor receptor-anticorp nefixate și spălarea cu timpul a anticorpilor antieritocitari în spațiul intercelular, chiar dacă este posibilă păstrarea îndelungată a eritrocitelor native. Acest fapt conduce la reducerea esențială a sensibilității antigenului de diagnostic.

3) În metoda originală nu se înlătură serul hemolitic de iepure de pe eritrocitele supuse sensibilizării. În acest caz în soluție se păstrează complexurile imune existente în ser, imunoglobulinele și agregatele lor, nefixate de eritrocite. Aceste componente sunt susceptibile ele însuși să intre în reacție cu factorul reumatoid, să-l fixeze și, drept consecință, să reducă sensibilitatea metodei.

4) Polimorfismul larg al componentelor factorului reumatoid. În acest caz sunt prezente astfel de variante ale acestuia care, nereacționând cu fragmentul Fc al imunoglobulinelor de iepure, simultan intră în reacție cu gamaglobulina umană agregată, fapt care reduce sensibilitatea antigenului de diagnostic Vaaler-Rose.

5) Necesitatea încălzirii serului înainte de a stabili reacția, pentru inactivarea complementului și prevenirea lizei imune a eritrocitelor native.

Problema invenției constă în mărirea termenelor de păstrare, sporirea sensibilității și simplificarea utilizării antigenului de diagnostic pentru determinarea factorului reumatoid.

Problema menționată se rezolvă prin substituirea eritrocitelor native de berbec cu eritrocite conservate în formalină de 0,5-1,0%, având o durată mai mare de păstrare, tratarea acestor eritrocite cu un agent bifuncțional, sensibilizarea ulterioară cu un amestec, conținând ser hemolitic și gamaglobulină umană agregată și înlăturarea prin intermediul tamponului fosfatic-salin a componentelor nefixate.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea sensibilității antigenului de diagnostic și mărirea termenelor de păstrare.

Conservarea eritrocitelor în soluții de formalină, fixarea biomoleculilor pe suprafață prin tratare prealabilă cu agenți bifuncționali, înlăturarea factorilor concurenți din mediul intercelular, toate aceste metode sunt cunoscute, însă aplicarea lor în scopul obținerii antigenului de diagnostic pentru factorul reumatoid se sugerează pentru prima dată.

Pentru prima dată se recomandă efectuarea sensibilizării unor și acelorași eritrocite simultan cu anticorpi antieritocitari de iepure și cu gamaglobulină umană agregată.

Alegând metoda de conservare a eritrocitelor pentru antigenul de diagnostic recomandat, este deosebit de importantă durata de menținere a activității serologice a determinanților antigenici ai membranelor eritrocitare cu care intră în reacție anticorpii antieritocitari. În cazul distrugerii determinanților în cauză se micșorează numărul anticorpilor antieritocitari fixați și, drept consecință, se reduce sensibilitatea reacției. Cea mai simplă, sigură, accesibilă și avantajoasă metodă este metoda de conservare a eritrocitelor în soluții neutre de formalină. Concentrația minimă preferențială de formalină constituie 0,5-1,0%, deoarece dacă conținutul de formalină este mai scăzut, nu se realizează efectul de conservare, iar dacă conținutul de formalină este mai înalt, se produce inactivarea exteroreceptorilor. Modul de determinare a concentrației necesare de formalină este următorul. Câteva porții egale de eritrocite native de berbec curățate se conservă în formalină cu concentrații variate. În urma conservării eritrocitele obținute se supun testării pentru determinarea termenului de menținere a activității serologice în reacția de hemaglutinare (RHA) cu serul hemolitic de iepure contra eritrocitelor de berbec.

Astfel, în cazul concentrației de 0,5-1,0% a formalinei se păstrează complet activitatea serologică a eritrocitelor conservate și în investigațiile ulterioare se utilizează anume aceste preparate.

În scopul rezolvării problemei în vederea disocierii anticorpilor antieritocitari din complexurile eritrocit-anticorp și, respectiv, în vederea mării termenului de valabilitate a antigenului de diagnostic finit, este necesară elaborarea unei metode de fixare a acestor anticorpi pe suprafața eritrocitelor. Concomitent, aceasta rezolvă problema privind fixarea gamaglobulinei umane agregate cu suprafața eritrocitelor în cauză, și mărește termenul de păstrare a eritrocitelor propriu zise pe baza stabilizării adiționale a proteinelor cu membrană ale lor. Cele mai simple sunt metodele cu folosirea agenților bifuncționali. Există două variante de fixare a proteinelor pe purtător prin intermediul agenților bifuncționali, ele fiind următoarele: monostadială și bistadială. În metoda monostadială se amestecă împreună eritrocite, un agent bifuncțional și un amestec de proteine. Însă în acest caz proteinele reacționează și între ele, fapt care conduce la formarea complexurilor variate și, ceea ce este foarte important, reduce activitatea de anticorpi a imunoglobulinelor. Drept consecință, este preferabilă varianta bistadială care prevede, mai întâi, tratarea eritrocitelor, înlăturarea surplusului agentului bifuncțional, iar apoi, în scopul fixării, introducerea proteinelor.

În calitate de agent bifuncțional de fixare se examinează soluțiile apoase de aldehidă glutarică (AGL) cu concentrații variate. În acest caz este necesar de ales o astfel de concentrație maximă a aldehidei glutarice, care să asigure aglutinarea maximă a anticorpilor și, concomitent, să nu provoace hemaglutinarea spontană a eritrocitelor, adică o concentrație de subaglutinare. Aceasta se obține prin tratarea eritrocitelor de berbec cu soluții apoase de aldehidă glutarică cu concentrații variate, timp de 30 min., la temperatura de 4°C. După o spălare dublă eritrocitele se diluează cu o soluție fiziologică până la obținerea concentrației de 0,5%, se introduc în godeurile platoului titratorului Taccacci, unde se examinează caracterul precipitatului eritocitar depus. Pentru fiecare serie concretă de eritrocite este necesară o selectare individuală a concentrației.

În scopul excluderii reacției dintre proteinele și anticorpii serului, eritrocitele mai întâi se supun tratării, după care ele se curăță de aldehida glutarică nefixată, și apoi se supun tratării cu un amestec de ser hemolitic, luat într-o doză de subaglutinare, și

gamaglobulină umană agregată (concentrația este selectată individual pentru fiecare serie de eritrocite și gamaglobulină). În urma incubării timp de 30 minute la temperatura de 4°C, fiind permanent amestecate, eritrocitele sensibilizate se supun repetat curățării duble într-un tampon fosfatic-salin cu pH-ul 7,4 și se trec repetat în suspensie până la concentrația de 0,5% într-o soluție de 0,25% de albumină serică de taur cu azotură de sodiu și mertiolat.

Activitatea preparatelor obținute se verifică prin intermediul serurilor contra globulinelor de iepure și umane și reactivului specific asupra fragmentului Fc al imunoglobulinelor din clasa G- stafilococic- agentului, conținând proteina A produsă la Institutul Paster din Sankt-Petersburg. În scopul comparării se realizează reacția cu antigenul de diagnostic obținut prin metoda clasică.

Concentrația de 0,3% a aldehidei glutarice s-a dovedit a fi optimă pentru eritrocitele în cauză, asigurând cea mai înaltă sensibilitate la testarea prin trei metode și evitând provocarea aglutinării lor spontane.

Reacția de aglutinare a antigenului de diagnostic neprelucrat cu aldehidă glutarică, conținând ser antiuman, se caracterizează prin caracterul său specific insuficient de înalt, fapt care provoacă reacții încrucișate cu imunoglobulinele de iepure.

În continuare se examinează influența tratării prealabile a eritrocitelor de berbec cu aldehidă glutarică asupra termenului de valabilitate a antigenului de diagnostic obținut. Ea se apreciază conform disocierii anticorpilor antieritrocitari de pe suprafața eritrocitelor și se determină conform titrului reacției de hemaglutinare cu serul contra globulinelor de iepure, globulinelor umane, agentul stafilococic, conținând proteina A și serul bolnavului, având un rezultat pozitiv în reacția clasică Vaaler-Rose, și conform latex-testului. Reacția se realizează cu un interval săptămânal prin metoda tradițională cu antigenul de diagnostic obținut conform invenției și cu antigenul de diagnostic obținut prin metoda clasică.

În fine, s-a constatat că antigenul de diagnostic obținut prin metoda clasică devine nevalabil deja peste două săptămâni, din cauza hemolizei eritrocitelor ce se produce. Antigenul de diagnostic, conform invenției, în care anticorpii și gamaglobulina umană agregată sunt fixate de aldehida glutarică, își menține activitatea timp de 12 săptămâni de observare. Peste 16 săptămâni titrul antigenului de diagnostic începe să scadă. Astfel termenul de valabilitate a antigenului de diagnostic, conform invenției, depășește considerabil indicele analogic din cel mai apropiat analog.

Antigenul de diagnostic, conform invenției, depășește analogul cel mai apropiat și în ce privește sensibilitatea. Astfel titrul reacției cu serul bolnavului N., suferind de reumatism și având la testarea preliminară prin reacția de latex-aglutinare titrul 1:1280, constituie cu antigenul de diagnostic, conform invenției, 1:1024, iar cu cel mai apropiat analog - doar 1:256. Acest caz reprezintă un exemplu elocvent al polimorfismului factorului reumatoid. Prezentul factor la bolnavul examinat este orientat, în cea mai mare măsură, contra gamaglobulinei umane, fapt care explică titrul înalt al latex-testului, și, în cea mai mică măsură, contra fragmentului Fc al imunoglobulinei G de iepure, fapt care explică titrul scăzut al antigenului de diagnostic obținut prin metoda clasică Vaaler-Rose. Titrul înalt al antigenului de diagnostic, conform invenției, se explică prin fixarea factorului reumatoid cu gamaglobulina umană, care intră în componența antigenului de diagnostic. Exemplul expus confirmă adițional importanța testării simultane a factorului reumatoid prin intermediul imunoglobulinei din clasa G de proveniență variată și diverse stări conformaționale, fapt care se realizează prin utilizarea antigenului de diagnostic prezentat.

Antigenul de diagnostic elaborat a fost supus liofilizării. S-a constatat că termenul de valabilitate a antigenului în stare liofilizată durează timp de un an (termenul de observare).

Pentru compararea sensibilității antigenului de diagnostic prezentat cu cel mai apropiat analog și cu latex-testul au fost examinate 14 seruri ale bolnavilor reumatici. Rezultatele sunt prezentate în tabel.

Tabel

Analizele comparative ale serurilor bolnavilor reumatici cu antigen de diagnostic variat pentru factorul reumatoid

Nr. de ordine	Nr. serului	1:Titrul în latex-test	1:Titrul antigenului de diagnostic propus	1:Titrul Vaaler-Rose
1	2	1280	512	512
2	4	160	256	256
3	7	160	256	128
4	8	1280	1024	256
5	9	640	128	256
6	10	1280	512	128
7	85	320	256	64
8	86	64	64	16
9	88	640	512	128
10	12	640	256	64
11	13	320	256	32
12	14	64	64	8
13	66	16	128	64
14	101	8	256	128

Conform tabelului, sensibilitatea latex-testului și antigenului de diagnostic recomandat practic sunt identice și nu depășesc limitele unei diluări (eroarea acestei metode). Concomitent, în două cazuri latex-testul are un rezultat negativ, iar antigenul de diagnostic recomandat și cel mai apropiat analog produc o reacție pozitivă. În acest caz s-a manifestat factorul reumatoid orientat spre fragmentul Fc al imunoglobulinei de iepure. Spre deosebire de cel mai apropiat analog, antigenul de diagnostic recomandat reprezintă o sensibilitate considerabilă.

De asemenea este important faptul că antigenul de diagnostic recomandat face posibilă simplificarea considerabilă a realizării reacției. În cazul utilizării eritrocitelor native în cel mai apropiat analog este absolut necesară încălzirea serurilor examinate la temperatura de 56°C timp de 30 min, pentru inactivarea complementului, în caz contrar se produce hemoliza eritrocitelor. În

antigenul de diagnostic recomandat se utilizează eritrocite conservate, care nu se lizează astfel, și etapa îndelungată de încălzire devine inutilă.

Adițional, în cel mai apropiat analog și metoda unificată de determinare a factorului reumatoid se utilizează macrovariante în care reacția se efectuează în eprubete. Aceasta necesită o cantitate considerabilă de reactivi și o perioadă durabilă (18 h) de supraveghere a reacției. S-a elaborat o metodă de realizare a microvariantei reacției, utilizând titratorul Taccacci (v. exemplul 3). Aceasta face posibilă reducerea consumului de reactivi de 20 ori și a timpului de evidență a rezultatelor reacției de 10 ori.

Complexitatea cazurilor prezentate indică faptul că, spre deosebire de cel mai apropiat analog, antigenul recomandat este mai eficient. Aceasta se realizează prin următoarele.

1) Mărirea considerabilă a termenului de păstrare prin folosirea eritrocitelor conservate, fixarea ireversibilă a anticorpilor anti-eritrocitari și gamaglobulinei umane și posibilitatea de liofilizare a eritrocitelor formolate.

2) Sporirea sensibilității, fapt care se realizează prin doi factori, cum ar fi supraîncărcarea ireversibilă a suprafeței eritrocitelor cu gamaglobulină umană agregată și înlăturarea din lichidul intercelular a anticorpilor nefixați, a complexurilor imune și a agregatelor globulinice care pot să inhibeze reacția.

3) Simplificarea efectuării reacției prin înlăturarea etapei de inactivare a complementului.

4) Reducerea considerabilă a cantității reactivilor necesari și a timpului de evidență a rezultatelor reacției, folosind titratorul Taccacci. Acest fapt conduce la sporirea calității, reducerea valorii investigațiilor clinice de laborator și la îmbunătățirea asistenței medicale.

Exemplul 1. Prepararea eritrocitelor de berbec conservate în formalină. 500 ml de sânge de berbec se spală de trei ori în doi litri de tampon fosfatic-salin 0,01M cu pH-ul 7,4 și se trec repetat în suspensie în același tampon până se obține o suspensie de 16%. Se adaugă atent o soluție izotonică neutră de formalină până la obținerea concentrației lui finale de 1%. Se ține la macerat la temperatura de 37°C, fiind amestecată în primele 8 h. Peste 24 ore se obțin eritrocitele conservate finite, care se păstrează în aceeași soluție de formalină la temperatura de 4°C timp de un an și jumătate. Eritrocitele obținute și antigenul de diagnostic preparat ulterior pot fi liofilizate într-o umplutură, conținând o soluție de 5% de albumină serică de taur și zaharoză de 10%, fără a-și pierde caracteristicile.

Exemplul 2. Prepararea antigenului de diagnostic. 5 ml de suspensie de 16% eritrocitară formolată de berbec se spală de două ori în 10 ml de tampon fosfatic-salin și se trece repetat în suspensie în 5 ml din același tampon. Se răcește până la temperatura de 4°C și se adaugă, amestecându-se, 5 ml de aldehydă glutarică rece de 0,3%, procesul fiind realizat într-un tampon fosfatic-salin. Se supune incubării timp de 30 min la temperatura de 4°C și se spală de două ori în 10 l de tampon fosfatic-salin.

Prin metodă standardă se stabilește diluarea de subaglutinare a serului hemolitic. Preparatul comercial de gamaglobulină umană se încălzește în prealabil într-o baie de aburi, timp de 30 min la temperatura de 56°C, și se folosește cu concentrația finală de 13 mg/ml. La 5 ml de eritrocite glutarizate se adaugă cu amestecare permanentă 5 ml de amestec, compus dintr-un ser hemolitic în diluare de subaglutinare și gamaglobulină agregată. Se supune incubării timp de o oră la temperatura de 37°C, fiind permanent amestecate. Se spală de două ori cu tampon fosfatic-salin și se trece repetat în suspensie până la obținerea concentrației de 1% în 80 ml de soluție de 0,25% de albumină serică de taur, procesul fiind realizat în tamponul fosfatic-salin, adăugând azotură de sodiu și mertiolat într-o concentrație de 1:1000.

Exemplul 3. Determinarea factorului reumatoid în serul bolnavului prin intermediul antigenului de diagnostic prezentat. Dimineața pe nemâncate din vena cubitală a bolnavului se prelevează 1-2 ml de sânge. Eprubeta se ține la macerat timp de 30 min la temperatura de 37°C și timp de o oră la temperatura de 4°C, în scopul retracției cheagului și obținerii serului.

În godeurile platoului titratorului Taccacci, împreună cu cele din urmă se introduce câte 25 μl de tampon fosfatic-salin. În godeurile din primele rânduri se introduce câte 25 μl din serurile examinate. Prin acțiune dublă se efectuează diluarea serurilor. În fiecare godeu se introduce câte 25 μl de antigen de diagnostic și se incubează timp de o oră la temperatura camerei. Pentru verificare servește godeul cu tampon fosfatic-salin. Rezultatele reacției sunt evaluate conform sistemului standard de patru puncte, chiar dacă în procesul verificării eritrocitele au un rezultat negativ precis, adică se depun în formă de punct.

Examinarea a 44 de seruri obținute de la persoane practic sănătoase demonstrează că titrele reacției la oameni sănătoși constituie de la 1:2 până la 1:34. Titrele mai înalte se consideră rezultate pozitive.