

ВЫБОР ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ ЛАТЕКСНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ В ПЛАЩЕЧНОМ ФОРМАТЕ

**Е.В. Волкова, аспирант, А.Д. Лукашевич, аспирант, *И.С. Левачева,
научный сотрудник, *С.М. Левачев, доцент, **С.А. Гусев, заведующий
лабораторией, И.А. Грицкова, профессор**

кафедра Химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С.С. Медведева

МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

**Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия*

***лаборатория Морфологии НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, 119435*

e-mail: ekaterina.vl.volkova@gmail.com

Показано, что при создании латексного диагностикума для проведения полуколичественного анализа в плащечном формате требуются знания о седиментационной неустойчивости дисперсных систем в гравитационном поле. Создана теоретическая модель движения полимерного носителя внутри лунки, которая продемонстрировала, что формирование сетки зацепления из полимерных микросфер при протекании реакции латексной агглютинации в V-образных лунках происходит не в объеме, а на поверхности дна лунки.

Ключевые слова: реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция латексной агглютинации (РЛА), полимерные микросферы.

При проведении серологических исследований для идентификации различного рода заболеваний широко используются диагностические тест-системы, работающие по принципу реакции агглютинации [1, 2]. Работа таких диагностикумов основана на иммунохимической реакции между фиксированными на поверхность носителя антигенами (антителами) и специфичными к ним антителами (антигенами), содержащимися в исследуемых образцах. Первоначально в качестве носителей биологандов в таких диагностикумах использовали эритроциты различных видов млекопитающих и птиц [3–5]. Реакция агглютинации, в которой в качестве носителя биологанда используют эритроциты, получила название реакции гемагглютинации.

В 50-х годах прошлого столетия Д. Зингер и Ш. Плотц предложили вместо эритроцитов использовать частицы полистирольных латексов, и такая реакция стала называться реакцией латексной агглютинации [6, 7]. С тех пор было получено большое количество экспресс-диагностикумов, использующих в качестве носителей биологандов полимерные частицы, отличающиеся природой, размерами и свойствами поверхности [1, 2, 8, 9]. Несомненными достоинствами латексных экспресс-тестов является короткое время постановки реакции (от 2 до 10 минут) и отсутствие необходимости в специальном оборудовании. Недостатком является их использование только для проведения качественного анализа.

Несмотря на большое количество проведенных исследований, во многих странах до сих пор продолжают применять диагностические тест-системы, использующие в качестве носителей биологандов эритроциты различных

видов. Это, в основном, относится к серологическим исследованиям, проводимым в плащечном формате. В России производят гемагглютинационные тесты (на основе реакции пассивной гемагглютинации, или РПГА-тесты) для диагностики таких заболеваний, как дифтерия, столбняк, сифилис, дизентерия, коклюш, бруцеллез, брюшной тиф и др.

Производство РПГА-тест-систем и обеспечение их устойчивости во время хранения сопряжено с рядом трудностей, вызванных применением в качестве носителей биологандов эритроцитов. Эритроциты получают из крови млекопитающих или птиц, содержание которых на специализированных фермах является трудоемким и дорогостоящим. Являясь биологическим материалом, эритроциты трудно поддаются стандартизации при изготовлении диагностикумов.

Современным решением всех проблем, связанных с использованием эритроцитов, является применение в качестве носителей биологандов полимерных микросфер.

Трудность замены эритроцитов на полимерные микросферы в таких диагностикумах определяется рядом причин, в первую очередь, особенностью регистрации результатов реакции в V-образных лунках иммунологического планшета. Учет результатов серологической реакции проводят по виду преципитата, формирующегося после осаждения частиц носителя биологанда на дно лунки. Поэтому разработка латексного диагностикума для постановки серологического исследования в иммунологическом планшете требует определения не только оптимального количества иммобилизуемого на поверхность полимерного носителя биологанда, но и нахождения оптимальных свойств и раз-

мера частиц самого носителя. Кроме того, необходимы знания о седиментационной неустойчивости дисперсных систем в гравитационном поле и создание теоретической модели движения полимерного носителя внутри лунки. Только такой комплексный подход позволит создать эффективные латексные диагностикумы для проведения полуколичественного анализа в плащечном формате.

В связи с этим целью данного исследования являлось определение оптимальных характеристик полимерных дисперсий (природы полимерного материала, размера полимерных микросфер, рабочей концентрации полимерной дисперсии, количества полимерного материала в одной пробе), определяющих возможность их применения в качестве носителей биоллигандов при проведении реакции латексной агглютинации в плащечном формате.

Результаты и их обсуждение

Замена эритроцитов на полимерные носители при разработке диагностических тест-систем, работающих по принципу реакции агглютинации, требует оценки оптимального размера и плотности используемых полимерных частиц.

Выбор полимерного материала и размера полимерного носителя непосредственно зависит от требуемых скоростей оседания полимерных частиц, значения которых определяются способом постановки реакции латексной агглютинации. Эти скорости можно определить, изучая оседание эритроцитов, которые используются в качестве носителей биомолекул в РПГА-тестах. При постановке РПГА в плащечном формате время от момента постановки реакции до момента регистрации результатов проводимого анализа может колебаться от 1 до 3 ч в зависимости от используемых эритроцитов. Наибольшее применение при разработке РПГА-тестов нашли эритроциты барана, имеющие округлую форму и средний диаметр 4.3 мкм, и кур, имеющие овальную форму и средний размер 7.5×12.0 мкм. Из литературных данных известно, что плотность эритроцитов млекопитающих варьирует в диапазоне $\rho = 1.11\text{--}1.13$ г/мл. Для теоретического расчета скорости оседания таких эритроцитов в воде (с плотностью $\rho_0 = 1000$ г/л и вязкостью $\eta = 0.001$ Па·с) может быть использована формула (1), согласно которой скорость оседания эритроцитов барана составляет 3.3 мм/ч, а эритроцитов кур – 7.9 мм/ч:

$$v = \frac{gd^2}{18\eta}(\rho - \rho_0) \quad (1)$$

где g – ускорение свободного падения; d – диаметр частиц; η – вязкость среды; ρ – плотность частиц; ρ_0 – плотность среды.

Таким образом, значения скоростей оседания полимерных частиц должны находиться в

пределах 3–8 мм/ч. Применение в качестве носителей биоллигандов полимерных частиц, седиментирующих со скоростью более 8 мм/ч, может повлиять на чувствительность диагностической тест-системы, так как при высокой скорости седиментации носителя не успевает протекать реакция аффинного связывания антиген–антитело. Если же полимерные частицы носителя биоллигандов будут седиментировать со скоростью менее 3 мм/ч, то это будет приводить к значительному увеличению времени от момента постановки реакции до момента считывания результатов.

На рис. 1 представлена область допустимых значений плотностей и соответствующих им размеров полимерных микросфер, удовлетворяющих данному требованию, которая показывает, что при замене эритроцитов млекопитающих, например, на полистирольные частицы с плотностью 1.050 г/мл их диаметр должен колебаться в интервале от $d_1 = 5.5$ мкм до $d_2 = 9.0$ мкм.

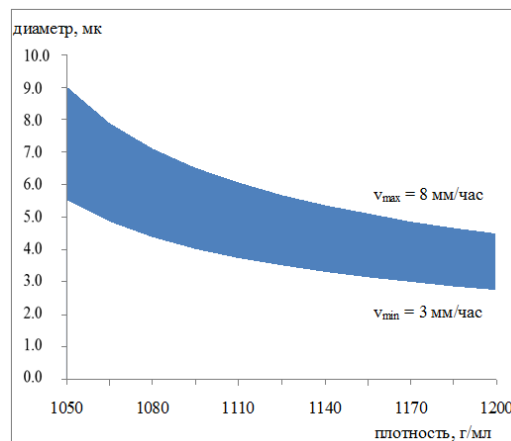


Рис. 1. Диапазон значений диаметров и плотностей полимерных частиц, обеспечивающий скорость седиментации от 3 до 8 мм/ч.

Для расчета максимальной концентрации суспензии, позволяющей избежать спонтанной агрегации частиц в объеме реакционной системы, заполняющей лунку планшета, то есть сохранять индивидуальность каждой из полимерных частиц в указанный период времени, можно использовать уравнение Смолуховского:

$$t_{1/2} = \frac{1}{kN} \quad \left(k = \frac{4k_B T}{3\eta}\right), \quad (2)$$

где N – численная концентрация частиц; k_B – константа Больцмана; T – температура; η – вязкость раствора.

На рис. 2 представлена зависимость времени сохранения индивидуальности частиц от их количества в системе, рассчитанная по уравнению Смолуховского, для полистирольных частиц двух диаметров: $d_1 = 5.5$ мкм и $d_2 = 9.0$ мкм.

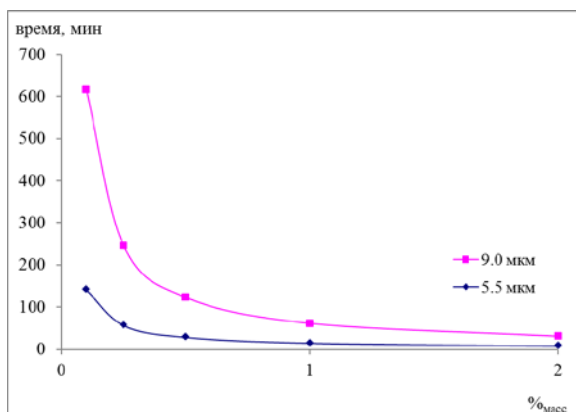


Рис. 2. Зависимость полупериода коагуляции полистирольных частиц диаметром $d_1 = 5.5$ мкм и $d_2 = 9.0$ мкм от их массовой концентрации в суспензии.

Расчетные данные показывают, что суспензия полистирольных частиц со средним диаметром $d_2 = 9.0$ мкм сохраняет устойчивость в течение не менее 120 мин, если массовая доля частиц в единице объема суспензии не превышает 0.5% мас., а суспензия полистирольных частиц со средним диаметром $d_1 = 5.5$ мкм – 0.1% мас.

Для определения объема полимерной суспензии с заданной концентрацией для внесения в лунку иммунологического планшета при проведении реакции латексной агглютинации следует рассмотреть процессы, протекающие в лунке от момента постановки реакции до момента считывания результатов. Постановку реакции агглютинации проводят в иммунологических планшетах с V-образными лунками. По заявляемым техническим характеристикам, соответствующим статистически достоверным проведенным измерениям используемых образцов планшетов, диаметр таких лунок равен 6 мм, угол наклона дна лунки 45° , объем лунки ~0.220 мл. Движение частицы носителя в такой лунке можно разложить на две составляющие: седimentацию в объеме жидкости и движение по наклонной поверхности дна лунки.

Предположим, что частицы полимерного

носителя, сенсibilизированные молекулами антигена, вносят в образец, содержащий искомые антитела. Вследствие большого размера полимерные частицы будут поступательно перемещаться в объеме жидкости под действием силы тяжести. Данный процесс будет сопровождаться аффинным связыванием молекул антигена, расположенных на поверхности носителя, и молекул антитела, находящихся в исследуемом образце.

При соблюдении рассчитанного по уравнению Смолуховского предельного значения концентрации полимерной суспензии, полимерные частицы будут седиментировать в реакционном объеме одиночно, поэтому седimentацию полимерных частиц в гравитационном поле будет сопровождать только образование комплексов антиген–антитело на поверхности носителя.

Для обеспечения условий эффективного взаимодействия антигена с антителом, реакционная система должна подвергаться инкубированию в течение не менее 30 мин. Это время необходимо для диффузии антитела к поверхности полимерной микросферы, на которой иммобилизован антиген, ориентации антитела в пространстве для обеспечения иммунологической реакции и для самого взаимодействия антитела с антигеном.

Тогда образование сетки зацепления между частицами будет происходить во время движения таких частиц по дну лунки. Сформировавшийся таким образом слой агглютината, равномерно распределенный по дну лунки («зонтик» – рис. 3), свидетельствует о протекании реакции латексной агглютинации.

В том случае, если частицы полимерного носителя, сенсibilизированные молекулами антигена, вносят в образец, не содержащий специфичные антитела, формирование сетки зацепления между частицами не протекает, и в центре дна лунки формируется компактный осадок на чистом фоне («пуговка» – рис. 3).

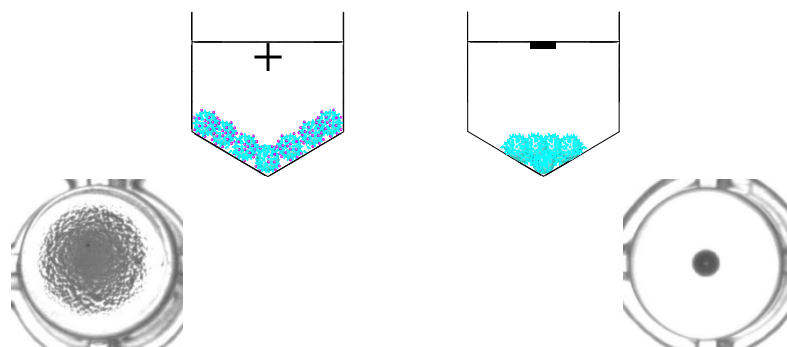


Рис. 3. Расположение полимерных микросфер при положительном (слева) и отрицательном (справа) результатах реакции латексной агглютинации.

Для удобства и однозначности регистрации «отрицательных» результатов реакции латексной агглютинации диаметр формирующейся пуговки не

должен быть меньше 1 мм. Таким образом, минимальное количество полимерного материала, находящегося в лунке при постановке реакции

латексной агглютинации, определяется минимальным размером визуально детектируемой «пуговки», формирующейся при отрицательной реакции латексной агглютинации.

Объем формирующейся пуговки диаметром 1 мм, рассчитанный по формуле объема конуса с диаметром основания 1 мм и высотой 0.5 мм, составляет $V = 1.31 \cdot 10^8$ мкм³. С учетом того, что максимальная плотность упаковки шаров в пространстве не превышает 74%, то объем пуговки, занятый частицами, составит: $V = 9.69 \cdot 10^7$ мкм³.

При плотности полистирола 1.050 г/мл, данный объем соответствует массе частиц $m = 0.102$ мг.

При внесении данного количества полимерного материала в лунку иммунологического планшета с исследуемым образцом, содержащим искомые антитела, на дне лунки будет формироваться сетка зацепления из полимерных микросфер. Учитывая площадь дна лунки, можно определить количество формирующихся в данном случае слоев.

Площадь дна лунки, рассчитанная по формуле площади боковой поверхности конуса, составляет $S = 4 \cdot 10^7$ мкм². Площадь поверхности, занятой плотноупакованными частицами, составляет 90.69%, поэтому площадь дна V-образной лунки, на которой будут расположены частицы, составит: $S = 3.63 \cdot 10^7$ мкм².

Площадь, приходящаяся на одну частицу, можно вычислить как площадь круга: $S_{(d1 = 5.5 \text{ мкм})} = 23.7$ мкм² и $S_{(d2 = 9.0 \text{ мкм})} = 63.6$ мкм². Рассчитанное минимальное количество частиц занимает площадь: $S_{(d1 = 5.5 \text{ мкм})} = 2.34 \cdot 10^7$ мкм² и $S_{(d2 = 9.0 \text{ мкм})} = 1.61 \cdot 10^7$ мкм². Сравнение полученных площадей с площадью дна лунки показывает, что при данном количестве частиц в положительной реакции латексной агглютинации на дне лунки формируется монослой частиц.

Объединяя полученные расчеты, можно

сделать вывод, что объем полистирольной суспензии со средним диаметром частиц, например, 5.5 мкм в лунке иммунологического планшета должно составлять не менее 100 мкл 0.1% суспензии. При содержании в лунке иммунологического планшета полистирольных частиц в меньшем количестве будет затруднена интерпретация результатов реакции латексной агглютинации, так как уменьшение количества полимерного носителя приведет к уменьшению размеров «пуговки» и, как следствие, трудности различия невооруженным глазом результатов положительной реакции латексной агглютинации («зонтика») и отрицательной («пуговки»).

При внесении рассчитанного количества полимерного носителя, сенсibilизированного антигеном (антителом), в исследуемый образец, содержащий антитела (антигены), агглютинация полимерных частиц в объеме лунки будет исключена, а реакция латексной агглютинации будет протекать на поверхности дна лунки, сопровождаясь образованием на дне лунки монослойной сетки зацепления из полимерных микросфер.

При внесении рассчитанного количества полимерного материала в исследуемый образец, не содержащий искомые антитела (антигены), будет происходить образование легко регистрируемого осадка диаметром 1 мм, соответствующего отрицательному результату реакции латексной агглютинации.

Таким образом, в работе проведен поиск критериальных значений параметров реакционной системы, относящихся к характеристикам полимерного носителя биологандов. Данные рассуждения представлены на примере полистирольных микросфер известной плотности и могут быть использованы для полимерных микросфер другой природы при учете их плотности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Walory J., Grzesiowski P., Hryniewicz W. Comparison of four serological methods for the detection of diphtheria anti-toxin antibody // J. Immunol. Methods. 2000. V. 245. P. 55–65.
2. Watkins-Riedel T., Stanek G., Daxboeck F. Comparison of SeroMP IgA with four other commercial assays for serodiagnosis of *Mycoplasma pneumonia* // Diagn. Microbiol. & Infect. Dis. 2001. V. 40. P. 21–25.
3. Hirst G.K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination // J. Exp. Medicine. 1942. V. 75. P. 49–64.
4. Svartz N., Schlossmann K. The hemagglutination test with sensitized sheep cells in rheumatoid arthritis and some other disease // Acta Med. Scandinav. 1952. V. 142. P. 420–432.
5. Rathlev T. Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis // Brit. J. Vener. Dis. 1967. V. 43. P. 181–185.
6. Singer J.M., Plotz C.M. The latex fixation test: I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis // Am. J. Med. 1956. V. 21. P. 888–892.
7. Plotz C.M., Singer J.M. The latex fixation test: II. Results in rheumatoid arthritis // Am. J. Med. 1956. V. 21. P. 893–896.
8. Abdoel T.H., Smits H.L. Rapid latex agglutination test for the serodiagnosis of human brucellosis // Diagn. Microbiol. & Infect. Dis. 2007. V. 57. P. 123–128.

9. Станишевский Я.М., Грицкова И.А., Прокопов Н.А., Кравцов Э.Г., Волина Е.Г., Лобанов А.Н., Григорьевская И.И. Получение антительных диагностических тест-систем заданной специфичности // Биотехнология. 2003. № 3. С. 81–85.

CHOOSING POLYMER MICROSPHERES FOR CARRYING OUT THE LATEX AGGLUTINATION REACTION IN PLATES

E.V. Volkova[@], A.D. Lukashevich, I.S. Levacheva*, S.M. Levachev*, S.A. Gusev, I.A. Gritskova**

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571, Russia

**Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 11991 Russia*

***Laboratory of Morphology, Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435 Russia*

[@]Corresponding author e-mail: ekaterina.vl.volkova@gmail.com

Serological tests based on an agglutination reaction are commonly applied in clinical laboratories for the diagnosis of various infectious diseases. There is a wide selection of microsphere-based diagnostic agglutination tests (yes/no results) and assays (quantitative results) worldwide. However, due to rapidity and no need for special equipment passive hemagglutination tests are still the most frequently used routine tests in Russia. These hemagglutination tests are run in 96-well microplates with V-shaped bottoms. The substitution of red blood cells for polymer microspheres in such semi-quantitative tests is difficult due to a number of reasons. When choosing the appropriate microspheres for rapid passive latex agglutination tests, it is important to consider such variables as their size (and size distribution), density and colloidal stability.

In our study we showed the development of rapid (1-3 hours) passive latex agglutination tests based on the knowledge of sedimentation stability of polymer suspensions. We studied sedimentation rates of sheep and chicken erythrocytes used in passive hemagglutination tests and identified the required intervals of sedimentation rate for polymer microspheres. Based on these dates a theoretical model of polymer microsphere motion within a V-shaped well was proposed, which revealed that the formation of a lattice in the passive latex agglutination reaction takes place not in the volume of the well, but on the surface of the well bottom.

Key words: *passive hemagglutination reaction, passive latex agglutination reaction, polymer microspheres.*