

## ЭКСПРЕСС-ПОСТАНОВКА РЕАКЦИЙ АГГЛЮТИНАЦИИ В ПОЛЕ СТОЯЧЕЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВОЛНЫ

© 1996, Н.Н.Князьков

*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

Поступила в редакцию 11.12.96

Представлены результаты исследований по снижению длительности постановки реакций агглютинации в планшетах для микротитрования. Показано, что постановка этих реакций в периодически создаваемом поле стоячей ультразвуковой волны существенно снижает их длительность без уменьшения чувствительности анализа по сравнению с традиционным методом.

### Введение

Данная работа посвящена снижению длительности постановки реакций агглютинации в планшетах для микротитрования. Эти методы постановки реакций появились в 60-х годах [1,2] и прочно вошли в арсенал традиционных методов иммунохимического анализа. Они находят широкое применение в биомедицинских исследованиях, биотехнологии, клинической практике, контроле окружающей среды. Привлекает в них простота реализации. Обычная схема постановки реакций представляет собой трехстадийный процесс, включающий дозирование ингредиентов реакций в лунки планшета, инкубирование, учет результатов реакций по виду осадков, образованных на дне лунок по общепринятой 4-х плюсовой системе [3]. Наиболее продолжительной стадией, в основном и определяющей длительность процесса постановки, является стадия инкубирования, во время которой взвешенные частицы седиментируют на дно лунок, и, при положительной реакции, агглютинируют. Длительность этой стадии может достигать нескольких часов, что ограничивает использование метода для решения задач оперативного контроля.

### Принцип

Наложим на ингредиенты, помещенные в лунки планшета, ультразвуковое (УЗ) поле. За счет интерференции падающих и отраженных волн в лунках устанавливаются поля стоячих УЗ волн. Под действием сил радиационного давления УЗ, взве-

шенные частицы собираются в слои, отстоящие друг от друга на половину длины волны.

Снимем УЗ поле. Слои седиментируют и при этом размываются. До размывания слои ускоренно (по сравнению с отдельными частицами) проходят некоторое расстояние.

Повторим операции наложения и снятия УЗ поля до тех пор, пока частицы, первоначально образующие верхний слой, не седиментируют на дно лунок.

После образования осадков произведем учет результатов реакции по общепринятой 4-х плюсовой системе.

### Результат исследования

Для реализации ускоренной постановки реакций агглютинации создано устройство УЗ облучения планшетов для микротитрования, позволяющее периодически создавать в лунках планшета поле стоячей УЗ волны с плотностью энергии 1 Дж/м<sup>3</sup> и частотой УЗ колебаний 3 МГц, а также изменять длительность импульсов УЗ облучения и пауз между ними от единиц до десятков секунд.

В исследованиях использовали отечественные планшеты для микротитрования на 96-лунок с U-образным дном. Дозирование ингредиентов осуществляли пипеточными полуавтоматическими дозаторами П-1 (0,1 и 0,05 мл). Плотность энергии УЗ поля определяли калориметрическим методом. Контроль температуры осуществляли контактным термометром. Время постановки реакций определяли секундомером.

Использовали следующие реактивы, взятые в

рабочем разведении, выполненном в соответствии с инструкциями по их применению: антительный овальбуминовый эритроцитарный диагностикум (1,5% взвесь); антигенный эритроцитарный диагностикум из Шигелл флекснера (1,5% взвесь); раствор овальбумина (рабочее разведение 1:123); сыворотка к Шигеллам флекснера (рабочее разведение 1:256); сыворотка к Шигеллам ньюкестл (рабочее разведение 1:640).

На первом этапе визуально наблюдали за поведением взвесей эритроцитарных диагностикумов, смешанных с различными сыворотками, при наложении и УЗ поля и оценивали длительность импульсов и пауз, необходимых для реализации ускоренной постановки реакций агглютинации.

При наложении на взвеси, помещенные в лунки планшета, УЗ поля, через две-три секунды взвеси просветлялись вследствие образования слоев эритроцитами диагностикумов. Дальнейшее действие УЗ приводило к некоторому уплотнению слоев.

При снятии УЗ поля наблюдали процесс седиментации эритроцитов диагностикумов, в котором выделялись три последовательные фазы.

Первая — слои эритроцитов неподвижны. Длительность этой фазы достигала двух секунд.

Вторая — слои распались на крупные комплексы (фрагменты), которые ускоренно седиментируют и при этом размываются, обуславливая помутнение взвеси. Примерная оценка общей длительности этой фазы составила несколько десятков секунд (точную оценку визуальным наблюдением дать трудно из-за помутнения взвеси). В то же время минимальная длительность может быть оценена в одну-две секунды, так как за это время комплексы заведомо проходят расстояние, равное четверти длины УЗ волны, соответствующее периоду инверсии направления сил радиационного давления УЗ поля, что принципиально необходимо для реализации исследуемой методики.

Третья фаза — крупные комплексы размывты и ускоренная седиментация не наблюдается.

На основе приведенных наблюдений сделаны следующие оценки. Длительность УЗ импульсов должна быть более трех секунд, а длительность пауз более четырех.

Оценки получены для условий эксперимента, однако существует возможность их использования и при изменении условий, например параметров УЗ поля. Для этого может быть использовано соотношение, связывающее время расслаивания взвесей (длительность УЗ импульса) с параметрами УЗ поля и характеристиками взвеси.

$$\tau_y \geq k \frac{r\lambda^2}{a^2 E |\varphi|} \quad (1)$$

$$\text{где: } \varphi = \frac{\rho_0 + \frac{2}{3}(\rho_0 - \rho)}{2\rho_0 + \rho} - \frac{\rho U^2}{3\rho_0 U_0^2}$$

$\tau_y$  — длительность УЗ импульсов;

$a$  — радиус частиц диагностикума;

$E$  — средняя плотность энергии поля стоячей УЗ волны;

$\rho, \rho_0$  — плотность жидкой среды и частиц;

$U, U_0$  — скорость УЗ в жидкой среде и материале частиц;

$\eta$  — вязкость;

$k$  — эмпирический коэффициент;

$\lambda$  — длина УЗ-волны.

Соотношение (1) получено из условия, что в процессе расслаивания взвесей, на частицы действуют две противоположно направленные группы сил — силы радиационного давления УЗ [4] и силы давления и трения, описываемые формулой Стокса.

Следующий этап исследований был посвящен определению параметров периодического УЗ облучения планшетов, обеспечивающих минимальную длительность постановки реакций при получении осадков, внешний вид которых аналогичен традиционным и позволяет учитывать результаты реакций по общепринятой 4-х плюсовой системе.

Для этого в лунки планшета, установленного в устройство УЗ облучения, дозировали 0,1 мл сыворотки и 0,05 мл диагностикума и перемешивали ингредиенты реакции плавным пипетированием. Включали устройство УЗ облучения и секундомер. Наблюдали за образованием осадка по прозрачности надосадочной жидкости. После образования осадка устройство УЗ облучения и секундомер выключали. Регистрировали длительность постановки реакции и оценивали соответствие внешнего вида осадка, осадку, образованному теми же ингредиентами при традиционной постановке реакции (референтный метод). Повторяли эксперимент, изменив длительность УЗ импульсов или пауз. Изменение длительностей импульсов и пауз осуществляли в диапазонах 3—60 секунд. Повторяли эксперименты для следующей пары сыворотка—диагностикум.

Было установлено, что сопоставимый с референтным осадок образуется при длительности УЗ импульсов от 3 до 40 секунд и пауз более 10 секунд. Увеличение длительности УЗ импульсов

## ОЦЕНКА ДЛИТЕЛЬНОСТИ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИЙ

Ингредиенты реакции	Оценка результата реакции		Длительность постановки реакции (мин)	
	УЗ облучение	Референтный метод	УЗ облучение	Референтный метод
Раствор овальбумина; антигальный овальбуминовый диагностикум	"3+" - "4+"	"3+" - "4+"	15	110
Раствор овальбумина; антигенный эритроцитарный диагностикум из Шигелл флекснера	"-"	"-"	13	125
Сыворотка к Шигеллам флекснера; антигенный эритроцитарный диагностикум из Шигелл флекснера	"4+"	"4+"	7	100
Сыворотка к Шигеллам ньюкестл; антигенный эритроцитарный диагностикум из Шигелл флекснера	"-"	"-"	12	120

более 40 секунд приводило к снижению качества осадков положительных реакций до "2+". Это снижение качества может быть связано с чрезмерным уплотнением слоев при длительном действии УЗ поля и седиментацией уплотненных комплексов без существенного размывания. Уменьшение длительности пауз менее 10 секунд также приводило к снижению качества осадков при положительных реакциях. Это может быть связано с недостаточным размыванием комплексов при коротких паузах.

Наиболее оптимальное сочетание длительности постановки реакций и качества осадков достигалось при длительности УЗ импульсов и пауз в диапазоне 20-30 секунд. В таблице приведены данные по длительности постановки некоторых реакций при УЗ импульсах и паузах в 30 секунд.

Из представленных результатов следует, что постановка реакций агглютинации в периодически создаваемом поле стоячей УЗ волны снижает их длительность в 7-14 раз по сравнению с референт-

ным методом получения осадков, аналогичных по внешнему виду. Последнее позволяет учитывать результаты реакции по общепринятой 4-х плюсовой системе, а также свидетельствует о сохранении чувствительности анализа при постановке реакций исследованным методом.

## Литература

1. Sever V.L.: Application of a microtechnique to vival serological investigations. // J.Immun. 88:320, 1962.
2. Wegmann T.G. and O.Smithies. A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. Transfusion 6:67. 1966.
3. Никитин В.М. Справочник серологических реакций. Штеница, Кишинев, 1977, с.102-112.
4. Горьков Л.П. Силы, возникающие в бегущей и стоячей ультразвуковой волне. // Докл. АН СССР, — 1961, т.140, вып.1, с.88-91.

## EXPRESS SETTING OF AGGLUTINATION REACTIONS IN THE ULTRASONIC STANDING WAVE FIELD

N.N. Knyaz'kov

*Institute for Analytical Instrumentation RAS, St.Petersburg*

The results of the investigations on decreasing the setting-time of agglutination reactions in microplates are presented. It is shown that setting these reactions in the periodically created field of standing ultrasonic wave lets to decrease the time of reaction without loosing the analysis sensitivity in comparison with traditional methods.