
II Klinika Ginekologii Operacyjnej, Instytut Położnictwa i Chorób Kobietych.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Jerzy Jakowicki

Elżbieta SZALECKA

**Badania nad taninowaniem erytrocytów w serologicznym teście ciążowym
w układzie: gonadotropina kosmówkowa (HCG) — surowica królicza
anty-HCG**

Исследование разведения эритроцитов в серологическом тесте беременности
в системе: хориновый гонадотропин (HCG) против кроличьей сыворотке HCG

An Investigation on the Treatment of Erythrocytes with Tannic Acid in a Serological
Pregnancy Test in the System: Chorionic Gonadotropin (HCG) — Anti-HCG Rabbit
Serum

Własności antygenowe gonadotropiny kosmówkowej (HCG), wykazane przez Leathema i Rakoffa (cyt. wg 6, 7) w r. 1944, dały podstawę do opracowania równoległe przez autorów polskich: Świerczyńską i Samochowca (10) oraz badaczy szwedzkich: Wide i Gemzella (5) serologicznego testu ciążowego, opartego na wytwarzaniu przez króliki immunizowane ludzką gonadotropiną kosmówkową homologicznych przeciwciał reagujących w odczynach aglutynacyjnych ze wspomnianym hormonem produkowanym w ciąży przez kosmówkę.

W reakcji hamowania hemaglutynacji biernej, czyli przeciwdziałania aglutynacji opłaszczonych, antygenem czerwonych krwinek w obecności swoistej surowicy odpornościowej, jednym z bardzo istotnych problemów w serologicznym teście ciążowym, jest odpowiednie przygotowanie erytrocytów, bezwładnych cząstek-nośników HCG, które w celu zwiększenia miejsc wiązania egzogenego hormonu poddawane są nadtrawianiu kwasem taninowym po uprzednim formalinowaniu.

W odczynie hamowania hemaglutynacji biernej używa się najczęściej krwinek barana (2), próbując także stosować krwinki ludzkie grupy 0 lub krwinki innych gatunków zwierząt, np. królików i koni (2, 3).

Wpływ kwasu taninowego na błonę komórkową erytrocytu nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Pierwsze doniesienia na temat nadtrawiania powierzchni erytrocytów, czyli taninowania, przedstawił Boyden (1) w r. 1951, ustalając stan-

dardowe warunki działania kwasu taninowego na krwinki formalinowane. Dalsze badania prowadzili Weinbach (11) i Woerner (12).

Stężenie kwasu taninowego, powodujące zmiany na powierzchni erytrocytów, może być różne. Proponowane przez Cooka, Fishera, Hjorta oraz Scheibela (cyt. wg 4) stężenia kwasu taninowego używane w technice hemaglutynacji biernej krwinek wahają się w granicach od 1:20 000 do 1:40 000. Proces taninowania erytrocytów przygotowujący powierzchnię erytrocytu do połączenia z antygenem uważany jest za jedyną znaną metodę zapewniającą stabilność zawiesiny krwinkowej.

Badania Shamardina i Karalnika (8) wykazały, że w warunkach optymalnych jeden erytrocyt może związać 1,5 mln. cząsteczek białka. Odczyn biernej hemaglutynacji z użyciem krwinek formalinowanych oraz nadtrawionych kwasem taninowym, według techniki Boydena, zastosowano w przypadku oznaczania enzymów proteazy i elastazy wytworzonej przez *Pseudomonas aeruginosa* oraz w zmodyfikowanym teście elektroforetycznej ruchliwości makrofagów (9).

Celem pracy było ustalenie optymalnego stężenia kwasu taninowego użytego do nadtrawiania erytrocytów barana w teście, w którym użyto następujących składników: HCG — surowica anty-HCG produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie, dających przy użyciu standardowego stężenia 1 : 10 000 wartości stężenia HCG niższe od spotykanych w piśmiennictwie.

MATERIAŁ I METODYKA

Test hamowania hemaglutynacji biernej wykonano w liczbie 5750 badań, w tym 350 było oznaczeniami ilościowymi w grupie 650 pacjentek w ciąży od 6 do 14 tyg. oraz w V i VI miesiącu ciąży. Ponadto wykonano ocenę miana surowicy z krwinkami opłaszczonymi hormonem HCG (1000 oznaczeń) i ocenę czułości testu (1250 oznaczeń). Krew pobieraną od barana odwłókniano, wirowano, a następnie erytrocyty formalinowano 3% roztworem formaliny i poddawano procesowi taninowania. Taninowanie krwinek przeprowadzano według techniki Boydena (1) oraz Świerczyńskiej i Samochowca (10), stosując pięć różnych stężeń kwasu taninowego 1:1000, 1:5000, 1:10 000, 1:20 000, 1:40 000. Następnie taninowane erytrocyty każdej grupy stężeń opaszczano hormonem (HCG) — Biogonadył, produkcji Wytw. Sur. i Szczep. w Lublinie o aktywności 2000 IU HCG i 5000 IU HCG w 1 ampułce.

Reakcja immunologiczna w pierwszym etapie służyła do oznaczania miana surowicy anty-HCG produkcji Wytw. Sur. i Szczep. w Lublinie oraz oznaczania czułości testu przy zastosowaniu standardu firmy Wellcome o aktywności 50 IU w 1 mg. Za najbardziej przydatne robocze rozcieńczenie surowicy wiążące hormon uznano stężenie 2500 IU/l moczu.

Zasadniczym etapem badań była ocena jakościowa i ilościowa poziomu HCG w moczu kobiet ciężarnych będących w ciąży od 6 Hbd do 14 Hbd oraz w V i VI miesiącu ciąży, przy zastosowaniu w teście erytrocytów barana taninowanych pięcioma różnymi stężeniami kwasu taninowego. Próba zastosowania stężenia większego niż 1:1000 powodowała hemaglutynację erytrocytów w fazie taninowania. Badania wykonano według techniki opisanej przez Świerczyńską i Samochowca (10).

W następnym etapie badań, w którym zastosowano krwinki taniowane dwoma stężeniami kwasu taninowego 1:1000 i 1:10 000, zakłócano przebieg reakcji hemaglutynacji biernej przez dodanie do moczu ciężarnych:

- 1) różnych stężeń glukozy (2,5—10%);
- 2) albuminy ludzkiej dodawanej do moczu w stężeniu 5—20%;
- 3) detergentu (proszku Ixi) w stężeniu 0,25—1,5%.

Ponadto wprowadzono różny czas taniowania krwinek przez skrócenie i wydłużenie procesu o 15 min. Analiza statystyczna wyników wykonana została przy zastosowaniu testu wariancji dwuczynnikowej przy użyciu dwóch źródeł zmienności, przeprowadzona systemem Tukeya.

WYNIKI BADAŃ

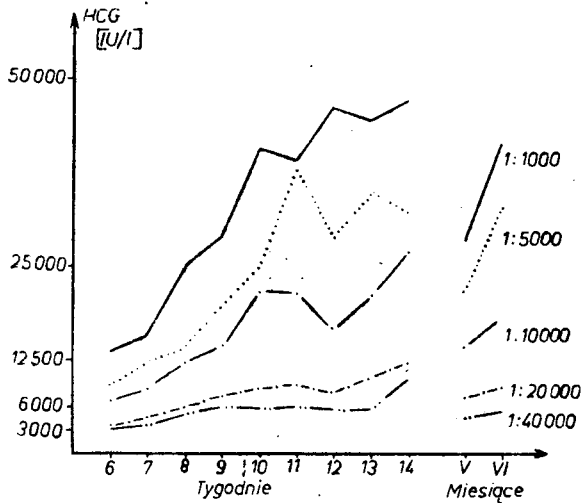
Najwyższą czułość i wiarygodność testu stwierdzono w przypadku użycia do nadtrawiania erytrocytów kwasu taninowego w stężeniu 1 : 1000, potwierdzoną uzyskiwaniem najwyższych wartości HCG w moczu kobiet będących w różnym okresie ciąży (ryc. 1). Potwierdzono optymalny czas nadtrawiania erytrocytów baranich (30 min.) przy użyciu rozcieńczenia kwasu taninowego 1 : 1000 w stosunku 1 : 10 000.

W przypadku obciążenia próbki badanego moczu albuminą ludzkiego osocza otrzymano znaczne obniżenie czułości testu przy zastosowaniu krwinek nadtrawionych kwasem taninowym w rozcieńczeniu 1 : 1000 przy stężeniu 15%, natomiast przy rozcieńczeniu 1 : 10 000 dopiero przy 20% stężeniu albuminy (ryc. 2). Obciążenie prób badanego moczu glukozą w stężeniach 2,5—10% pozostawało bez wpływu zarówno na ocenę ilościową i jakościową stężenia HCG w moczu ciężarnych. Jednakże i ta grupa badań potwierdziła wyższą czułość i wiarygodność testu w odniesieniu do stężenia kwasu taninowego 1 : 1000 używanego do nadtrawiania powierzchni poprzez uzyskanie wyższych wartości HCG w moczu (ryc. 3).

Obecność detergentów (proszku Ixi) wywiera wpływ zarówno na ocenę ilościową, jak i jakościową stężenia HCG w moczu kobiet ciężarnych. Niezależnie od użytego stężenia kwasu taninowego (1 : 1000 i 1 : 10 000) dodanie proszku Ixi do stężenia 1% hamowało całkowicie reakcję immunologiczną. W tej części doświadczalnej wykazano również wyższą czułość testu w odniesieniu do stężenia kwasu taninowego 1 : 1000 poprzez uzyskanie w tej grupie badań wyższych wartości HCG w moczu w różnym wieku ciąży (ryc. 4).

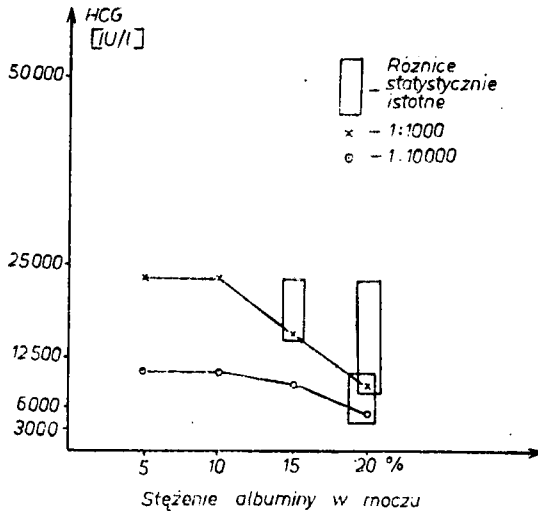
DYSKUSJA

W reakcji immunologicznej hamowania hemaglutynacji biernej w układzie: gonadotropina kosmówkowa HCG — surowica królicza anty-HCG bardzo istotną rolę odgrywa część bierna zestawu testu serologiczne-



Ryc. 1. Stężenie HCG w moczu kobiet ciężarnych w zależności od użytego stężenia kwasu taninowego

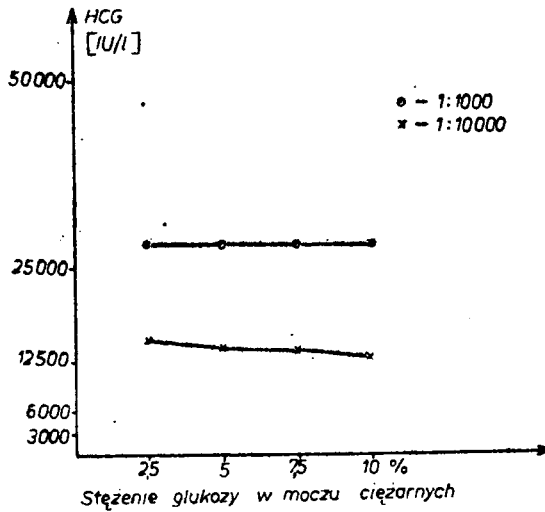
Effect of the concentration of tannic acid on the concentration of HCG in the urine of the pregnant women



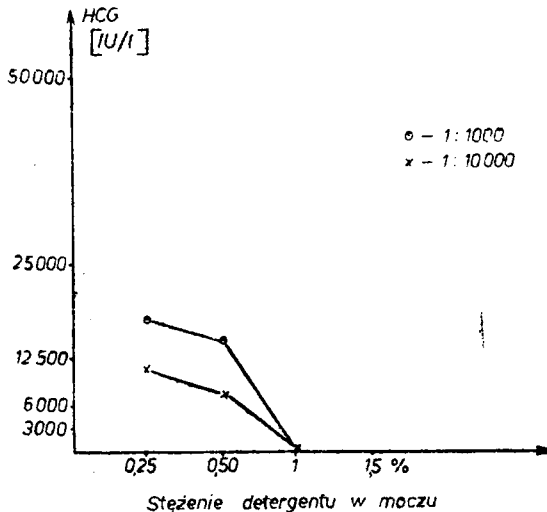
Ryc. 2. Wpływ egzogennej albuminy w moczu ciężarnych na stężenie HCG przy użyciu dwu stężeń kwasu taninowego (1:1000 i 1:10 000)

Effect of exogenic albumin in the urine of the pregnant women on the HCG concentration after using two tannic acid dilutions (1:1000 and 1:10,000)

go, a mianowicie kompetycyjny antygen osadzony na erytrocycie lub cząsteczce lateksu. Ponieważ antygen połączony z nośnikiem współzawodniczy z cząsteczką HCG w moczu kobiety ciężarnej, stąd liczba egzogen-



Ryc. 3. Wpływ egzogennej glukozy w moczu kobiet ciężarnych na stężenie HCG przy zastosowaniu dwu stężeń kwasu taninowego (1:1000 i 1:10 000)
Effect of the exogenic glucose in urine of the pregnant women on the HCG concentration after using two tannic acid dilutions (1:1000 and 1:10,000)



Ryc. 4. Wpływ detergentu (Ixi) na stężenie HCG w moczu ciężarnych kobiet
Effect of the detergent (Ixi) on the HCG concentration in the urine of the pregnant women

nych cząsteczek hormonu powinna być maksymalnie duża. Warunki takie stwarza powierzchnia erythrocytu, która poddana działaniu roztworu kwasu taninowego zwiększa liczbę miejsc wiążących, a więc możliwość zgrupowania cząsteczek gonadotropiny kosmówkowej.

Na podstawie około 7-letniego doświadczenia naszego laboratorium

stwierdziliśmy wartości stężenia HCG w przebiegu ciąży na niższym poziomie od spotykanych w piśmiennictwie światowym. Hamburger, Mathijsen, van Hell i wsp. (cyt. wg 7, 10), Diczfalusy, Plunket (cyt. wg 6, 10) w wynikach badań podawali wartości HCG, które kształtowały się na poziomie 50 000—100 000 IU/l, szczególnie w pierwszym trymestrze ciąży, podczas gdy w naszym laboratorium otrzymywaliśmy tylko wartości HCG na poziomie 12 500—25 000 IU/l w moczu kobiet ciężarnych. Było to powodem zastosowania w próbnej serii jeszcze wyższych stężeń kwasu taninowego do nadtrawiania krwinek czerwonych. Przeprowadzone badania wstępne wykazały istotnie, że zastosowanie 100 mg% roztworu kwasu taninowego (1 : 1000) dawało średnio wyniki wyższe o jeden przedział rozcieńczenia niż przy zastosowaniu standardowego stężenia roztworu taniny.

Analizując czas prowadzenia taninowania na materiale klinicznym kobiet będących w różnym okresie ciąży potwierdzono jednoznacznie przy stężeniu 1 : 1000, a przy stężeniu 1 : 10 000 w większości analizowanych grup pacjentek, że optymalnym czasem taninowania jest okres 30 min., powszechnie używany w laboratoriach. Potwierdzając jako optymalny czas inkubacji 30 min. stwierdzono wyższe stężenie HCG w oznaczeniu ilościowym przy użyciu kwasu taninowego w stężeniu 1 : 1000 występujące w obu grupach badanych. Na podstawie uzyskanych w tej części doświadczenia wyników należy zatem zwrócić szczególną uwagę na czas taninowania, co podkreślają szczególnie Boyden (1), Świerczyńska i Samochowiec (10), Gałązka (4) oraz inni, ponieważ nawet niewielkie odchylenie czasowe może wpływać na zmniejszenie czułości testu. Próba zakłócenia reakcji immunologicznej dokonywana była przy użyciu moczu ciężarnych z różnych okresów wczesnej ciąży, głównie pomiędzy 8 a 11 tygodniem, przy czym do każdej próbki moczu dodawane były wzrastające stężenia substancji kontaminujących. Dodawanie glukozy do uzyskiwania różnych stężeń 2,5—10% nie powodowało istotnych zakłóceń, w reakcji hamowania aglutynacji biernej w obydwu grupach badanych z użyciem dwu odmiennych stężeń kwasu taninowego. Należy także podkreślić, że ilościowe wartości HCG również i w tym przypadku były wyższe przy użyciu stężenia kwasu taninowego 1 : 1000. Wyniki powyższe potwierdzają opinie Rozmiłowskiego (6), opracowane na różnych seriach surowicy anty-HCG. Obciążenie prób albuminą ludzkiego osocza wykazało większe zmiany w grupie z użyciem kwasu taninowego 1 : 1000. W tej grupie badanych próbek moczu stężenie rzędu 15% powodowało obniżenie czułości testu przez wykazanie istotnie niższych wartości HCG w stosunku do grupy kontrolnej, podczas gdy przy stężeniu 1 : 10 000 zmiana czułości testu występowała dopiero przy 20% albuminy.

Opierając się na doświadczeniach Rozmiłowskiego (6), który

nie wykazał wpływu stężenia egzogenego białka klasy albumin na reakcję immunologiczną w układzie HCG — surowica anty-HCG, zastosowano znacznie wyższe stężenia albuminy, uzyskując zakłócenie reakcji dopiero przy bardzo wysokich stężeniach egzogenego białka w badanym moczu, co ma niezwykle istotne znaczenie kliniczne w przypadku białkomoczu u kobiet ciężarnych, szczególnie w pierwszym trymestrze ciąży.

Wzorując się na wspomnianych wyżej badaniach Rozmiłowski (6), przeprowadzono zakłócenie reakcji immunologicznej różnymi stężeniami detergentów używanych powszechnie do mycia szkła laboratoryjnego, a więc związków chemicznych używanych także do mycia pojemników szklanych, w których pacjentki dostarczały mocz do badań. Całkowite zablokowanie reakcji immunologicznej osiągnęto przy stężeniach 1% proszku Ixi, natomiast istotne obniżenie czułości reakcji występowało przy stężeniu 0,5% i było niezależne od stężenia taniny użytego do nadtrawiania powierzchni erytrocytów.

Ta część doświadczalna badań potwierdziła również wyższą czułość i wiarygodność testu w odniesieniu do stężenia kwasu taninowego 1 : 1000, używanego do nadtrawiania powierzchni erytrocytów poprzez otrzymanie wyższych wartości HCG w moczu przy użyciu tego stężenia kwasu taninowego. Przeprowadzone badania nie miały na celu podważenia wartości dotyczących przygotowywania komponentów testu immunologicznego, ustalonych przez wiele ośrodków naukowych. Dociekania wynikały z faktu występowania w naszym laboratorium wyników zaniżonych wartości HCG w stosunku do danych prezentowanych w literaturze światowej (Troen, Diczfalusy, Plunkett, cyt. wg 7). Badania wykazały, jak duże znaczenie ma użycie i zastosowanie odpowiedniego stężenia kwasu taninowego do nadtrawiania powierzchni erytrocytów w celu zwiększenia liczby miejsc wiązania cząsteczek antygeny.

PIŚMIENNICTWO

1. Boyden S. V.: I. Exp. Med. **93**, 107—124, 1951.
2. Butler W.: J. Immunol. **90**, 663—681, 1968.
3. Gałązka A.: Post. Hig. Med. Dośw. **26**, 363—390, 1972.
4. Gałązka A. i wsp.: Wyd. Met. PZH **1**, 363—390, 1972.
5. Gemzell C. A. i wsp.: Z. Immun. Forsch. **142**, 351—362, 1971.
6. Rozmiłowski J.: Praca doktorska. Biblioteka Akad. Roln., Lublin 1975.
7. Samochowiec E.: Gin. Pol. **35**, 39—43, 1964.
8. Shamardin V. A. i wsp.: Mikr. Epid. Immunol. **6**, 78—94, 1976.
9. Shenton E. K. i wsp.: I. Immunol. Met. **14**, 123—131, 1977.
10. Świerczyńska Z. i wsp.: Pol. Tyg. Lek. **15**, 12—20, 1960.
11. Weinbach R.: Schweiz. Z. Pat. Bakt. **21**, 1043—1072, 1958.
12. Woerner H.: Zbl. Bakt. Orig. **166**, 100—132, 1956.

РЕЗЮМЕ

Целью настоящей работы являлась попытка увеличения чувствительности иммунологического теста реакции HCG-сыворотки против HCG, опираясь на сыворотку и гормон Биогонадил, изготовленные Фабрикой сывороток и вакцин в Люблине, так как полученные величины оказались ниже по сравнению с данными, представленными в мировой литературе.

В начальной фазе исследований применялось разведение клеточной мембраны овциных эритроцитов галлодубильной кислоты в пяти разных концентрациях (1:1000; 1:5000; 1:10 000; 1:20 000; 1:40 000). Исследования показали, что концентрация 1:1000 дает наибольшую чувствительность теста, подтвержденную получением самых больших величин HCG в моче беременных с разной продолжительностью беременности, особенно по отношению к стандартно применяемой до сих пор концентрации 1:10 000.

Было подтверждено оптимальное время разведения красных кровяных телец, т.е. 30 минут для обеих групп исследуемых концентраций галлодубильной кислоты 1:1000 и 1:10 000. Кроме того не обнаружили влияния глюкозы на качественную и количественную оценки HCG в моче. Альбумин плазмы крови человека, прибавленный к испытанию, не оказывает влияния на качественную оценку, но уменьшает чувствительность теста в количественной оценке. Прибавление к испытанию детергента концентрацией 1% полностью тормозит иммунологическую реакцию.

Проведенные исследования показали значение правильной концентрации галлодубильной кислоты, применяемой для разведения эритроцитов в иммунологической реакции.

SUMMARY

The purpose of this paper was an attempt to obtain the increasing of the immunological test sensitivity HCG — Anti-HCG serum, based on the serum and the hormone "Biogonadyl" produced by the Serum and Vaccine Factory in Lublin, because the results obtained earlier were lower than those presented in the literature.

At the first stage of the investigation the sheep erythrocytes were treated with five different dilutions of tannic acid 1:1000, 1:5000, 1:10,000, 1:20,000, 1:40,000. It was found out that the dilution 1:1000 gives the highest sensitivity of the test, and this was confirmed by the highest amounts of urinary HCG measured at various stages of pregnancy.

The best time for the red cell treatment with the two different dilutions of tannic acid 1:1000, 1:10,000 was confirmed to be 30 m. No effect of glucose on qualitative and quantitative determinations of HCG in the urine was found. The exogenous human serum albumine in high concentration, however, does not affect the immunological pregnancy qualitative test but it reduces its sensitivity. The immunological test was completely inhibited by 1 per cent detergent added to the test.

The investigation revealed that the proper concentration of tannic acid, used in the red cells pretreatment, was very important for the sensitivity of the immunological reaction.