

RELATIE DERIVATA DIN ECUATIA LUI BECKER CU APLICATII LA DOZAREA CANTITATIVA A IMUNOGLOBULINELOR SERICE

dr. A. Cojocaru, A. Schiopu, N. Voloc

Progresele recente realizate în metodologia studiului proteinelor plasmatice inclusiv al imunoglobulinelor se datoresc aplicării consecvente a metodelor fizico-chimice și matematice de analiză în cercetarea biologică.

Dozarea proteinelor plasmatice (2, 4, 6, 8) inclusiv a imunoglobulinelor prin imunodifuziune se face prin trei procedee: a) difuziune simplă descrisă de Oudin (11), b) dubla difuziune după Outchterlony (10) și c) imunodifuziunea radială simplă introdusă în 1965 independent de Mancini, Carbonara și Heremans (7) și respectiv de către Fahey și McKelvey (3) — testul de imunodifuziune radială directă.

Determinarea cantitativă a Ig serice umane cu procedeul imunodifuziunii radiale comportă pentru laboratoarele nespécializate dificultăți datorită serurilor etalon care diferă de la un laborator la altul, condițiilor eterogene de execuție tehnică și exprimării în unități de măsură diferite a rezultatelor.

Intrucât etalonul de referință internațional OMS nu este accesibil majorității laboratoarelor din țară, în lucrarea de față ne-am pus problema obținerii unui ser standard propriu, testării acestuia, verificării acurateței tehnicii de determinare în condițiile date și a ameliorării procedurii de calcul.

Material și metodă

Cercetările au fost efectuate pe 135 donatori de sînge sănătoși, repartizați în 3 loturi, cu metoda clasică Mancini cu unele adaptări proprii, rezultatele fiind prelucrate cu un computer Olivetti. S-au utilizat imunoplăci cu Ø de 52 mm, în care s-a turnat agarul Noble-Difco 1,25 % în tampon veronal/medinal/Tris la pH 8,6 $\mu = 0,05$ în cantitate de 3 ml/immunoplacă. Antiserurile specifice au fost în prealabil incluse în agar în cantități definite pentru aceeași imunoplacă, respectiv același lot investigat. Cu micropipeta Partigen s-a pipetat în godeuri al căror diametru era de 2,4 mm câte 3 μ l de ser.

Pentru testarea IgG, serurile (standard și de cercetat) se diluează 1/10, pentru dozarea IgA și IgM se utilizează ser integral. Ca reactanți imunitari s-au folosit serurile imune monospecifice anti-IgA, anti-IgG și anti-IgM livrate de Institutul Cantacuzino, serul uman standard preparat

de noi prin amestecul în cantități egale al serurilor de donatori, serul standard Behring precum și serurile individuale ale persoanelor testate. Atît serul standard cît și serurile de cercetat au fost introduse în godeurile aceleiași imunoplăci. După 50 de ore pentru IgA și IgG, respectiv după 72 de ore pentru IgM se citesc prin proiecție și separat cu rigla Partigen diametrele discurilor de precipitare. Datele obținute sînt prelucrate statistic utilizîndu-se testul „t” al lui Student.

Rezultate și discuții

Procedeeul descris de Mancini și colab. pe care l-am aplicat în laboratorul nostru se bazează în principiu pe relația dintre suprafața inelului de precipitare și timpul de difuziune — mărimea suprafeței fiind dependentă de rădăcina patrată a timpului.

Particularitatea caracteristică a acestui procedeeu rezidă în faptul că unul din reacfanții imunitari difuzează radial în gelul care încorporează celălalt reactant. Se produce astfel de la începutul difuziunii antigenului, introdus în godeu, un complex antigen-anticorp care se solubilizează, reacția decurgînd în zona excesului de antigen, atingîndu-se ulterior după un timp suficient în zona de echivalență punctul final al difuziunii.

În acest moment, suprafața inelului de precipitare este proporțională cu concentrația antigenului, ceea ce rezultă din ecuația empirică a lui Mancini:

$$\pi R^2 = K_1 Q_{Ag} + S_{o1} \quad (1)$$

unde K_1 este o constantă de proporționalitate, Q — concentrația de antigen, iar S_{o1} — suprafața godeului (πr^2).

Ulterior Becker (1), plecînd de la definiția titrului antiserului confirmă observațiile lui Mancini și obține ecuația care stabilește relația dintre diametrul inelului de precipitare și concentrația de antigen:

$$D^2 = \frac{4 V_{Ag}}{PT \pi h} C_{Ag} + d^2 \quad (2)$$

în care D — diametrul precipitatului (mm); V_{Ag} — volumul de antigen utilizat (μ l); P — % de antiser în gel (ml/100 ml); T — titrul anticorpului, exprimat prin raportul $T = \frac{Q_{As}}{V_{As}}$ unde Q_{As} este cantitatea de antigen

(mg) iar V_{As} — volumul de antiser (ml); titrul exprimă astfel cantitatea de antigen în mg care este precipitată de un volum dat de antiser; h — înălțimea gelului (mm); C_{Ag} — concentrația de antigen (mg/100 ml); d = diametrul godeului (mm).

Intrucît produsul PT din ecuația stabilită de Becker este expresia matematică a concentrației de anticorpi (mg/100 ml agar) am introdus acest parametru în ecuația respectivă. Relația (2) se poate scrie atunci sub forma:

$$D^2 = \frac{4V_{Ag}}{\pi h} \cdot \frac{1}{C_{Ac}} (C_{Ag} + d)^2 \quad (3) \quad \text{sau} \quad D^2 - d^2 = \frac{4V_{Ag}}{\pi h} \cdot \frac{1}{C_{Ac}} \cdot C_{Ag} \quad (4)$$

Deoarece relația lui Becker este valabilă atît pentru serul standard cît și pentru serul de cercetat, dat fiind identitatea condițiilor experimentale de imunodifuziune, putem scrie:

$$D_s^2 - d^2 = \frac{4 V_{As}}{\pi h} \cdot \frac{1}{C_A} \cdot C_{As}$$

$$D_p^2 - d^2 = \frac{4 V_{Ap}}{\pi h} \cdot \frac{1}{C_{Ap}} \cdot C_{Asp}$$

unde D_s și C_{As} reprezintă diametrul inelului de precipitare respectiv concentrația imunoglobulinelor din proba standard, iar D_p și C_{Ap} diametrul corespunzător respectiv concentrația imunoglobulinelor din proba de cercetat.

Făcînd raportul celor două relații membru cu membru obținem:

$$C_{Asp} = \frac{D_p^2 - d^2}{D_s^2 - d^2} \cdot C_{As} \quad (5)$$

C_{As} poate fi concentrația de imunoglobulină a unui standard OMS, Behring, a altui standard internațional a etalonului convențional obținut în laboratoarele proprii prin amestecul serurilor donatorilor sănătoși sau a unei probe cunoscute determinată față de un standard internațional.

Considerînd concentrația fiecărui izotop din serul etalon, obținut de noi, egală cu 100 de unități convenționale (U) relația (5) devine:

$$C_{Asp} = \frac{D_p^2 - d^2}{D_s^2 - d^2} \cdot 100 \text{ U} \quad (6)$$

Intrucît expresia $D^2 - d^2$ se poate calcula pentru fiecare valoare a lui D (d fiind constant), concentrațiile de Ig ale serului de cercetat exprimate în U pot fi redată pe baza relației deduse de noi din ecuația lui Becker sub formă de tabel.

Exprimarea convențională a rezultatelor în unități prezintă un deosebit interes practic. De fapt, pentru a controla rigoarea exprimării în mg a Ig, centrul de referință al OMS a solicitat unui număr de 10 laboratoare de prestigiu internațional să dozeze Ig unui ser selecționat utilizînd propriile lor etaloane. Studiul a relevat existența unor diferențe mari între valorile obținute, raportul între valorile cele mai joase și cele mai ridicate fiind de 2,2 pentru IgG, 3,2 pentru IgA și 5,0 pentru IgM. Utilizînd etalonul de referință internațional stabilit de OMS (actualmente serul 67/86 al OMS) raportul respectiv tinde către unitate (1,36 pentru IgG, 1,17 pentru IgA și 1,31 pentru IgM).

Limitele de variație fiziologică ale Ig găsite de noi și intervalele de siguranță ale concentrației medii de Ig serice teoretic posibile la indivizii normali sînt prezentate în tabelele nr. 1 și 2.

Datele obținute în laboratorul nostru concordă cu valorile exprimate în mg% publicate în literatura din ultimul deceniu de 22 de autori diferiți și al căror comentariu critic a fost făcut de Grabner și colab. (5).

Tabelul nr. 1

Limitele fiziologice ale concentrației imunoglobulinelor serice la donatori sănătoși (U/100 ml)

Ig	P	X_i
IgA	0,05	72,46 < X_i < 128,38
IgG	0,05	80,87 < X_i < 119,27
IgM	0,05	56,39 < X_i < 145,41

Tabelul nr. 2

Intervalele de siguranță ale concentrației medii a imunoglobulinelor serice la donatori sănătoși (U/100 ml)

Ig	GL	P	\bar{x}_p
IgA	132	0,05	97,97 < \bar{x}_p < 102,87
IgG	129	0,05	98,37 < \bar{x}_p < 101,77
IgM	134	0,05	97,04 < \bar{x}_p < 104,77

Intervalele de siguranță menționate sînt o expresie a stabilității statistice a mediilor izotipurilor studiate la scara întregii populații și atestă veridicitatea limitelor de variație fiziologică ale Ig la indivizii testați.

Etalonarea serului utilizat de noi ca sistem de referință printr-un standard internațional, permite stabilirea factorului de conversiune, compararea și interpretarea datelor privind modificările patologice ale concentrației serice de imunoglobuline.

Concluzii

1. Serul uman standard preparat de noi în laborator din amestecul în cantități egale al serurilor de donatori sănătoși, poate fi utilizat în determinarea cantitativă cu procedeul Mancini a Ig serice cu rezultate reproductibile, avînd avantajul deosebit al accesibilității sale.

2. Substituirea în ecuația lui Becker a produsului PT cu C_{Ac} și obținerea unei ecuații derivate prin considerarea diferenței patratelor diametrelor și a raportului dintre ele, permite calculul concentrației de Ig în condițiile unor antiseruri cu titruri diferite.

3. Exprimarea rezultatelor în unități convenționale (U) facilitează evaluarea, vehicularea și interpretarea datelor privind modificările fiziologice și patologice ale concentrației serice de imunoglobuline.

Sosit la redacție: 26 iulie 1977.

Bibliografie

1. Becker W.: Immunochemistry, Pergamon Press, vol. 6 (1969);
2. Becker W., Störiko K.: Progr. Immunobiol. Standard. (1970), 4, 129;
3. Fahey J. L., McKelvey M.: J. Immunol. (1965), 94, 84;
4. Grabar P., Williams C. A.: Biochim. Biophys. Acta (1953), 10, 193;
5. Grabner W., Berg-

ner D., Sailer D., Berg C.: Clin. Chim. Acta (1972), 39, 59; 6. Harboe M.: Allerg. et. Immunol. (1972), 1, 12; 7. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F.: Immunochem (1965), 2, 235; 8. Schultze H. E., Heremans J. F.: Molecular biology of human proteins I. Nature and metabolism of extracellular proteins, vol. I. Elsevier Publishing Company, 1966; 9. Schwick H. G., Störiko K.: Cahiers de Laboratoire pour le diagnostic médical, Institut Behring, 1972, 3; 10. Ouchterlony O.: Acta pathol. microbiol. scand. (1948), 25, 186; 11. Oudin J.: C. R. Acad. Sci (Paris), (1946), 222, 115;

RELATION DERIVED FROM BECKER'S EQUATION USED IN THE QUANTITATIVE ASSAY OF SERUM IMMUNOGLOBULINS

The standard human serum prepared by the authors in laboratory from the pooled sera in equal amounts from healthy donors may be used in the quantitative determination of serum Ig by Mancini's method with reproducible results, having the special advantage of its accessibility. The substitution of product PT with C_{Ac} and the new equation derived by considering the difference of the squares of diameters and the ratio between them allows Ig calculation under the conditions of certain antisera with different titres. The formulation of the results in conventional units (U) facilitates the evaluation and interpretation of the data concerning the physiological and pathological modifications in the serum concentration of immunoglobulins.

