

УДК 616-097.1-074/-079

А.С. Прилуцкий, Л.В. Кузнецова,
Д.А. Лесниченко, А.П. Назаренко,
Б.Г. Борзенко, А.К. Фролов

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE К РАЗЛИЧНЫМ АЛЛЕРГЕНАМ

Донецкий национальный медицинский университет
имени М. Горького,
Национальная медицинская академия
последипломного образования имени П.Л. Шупика,
Клиника иммунологии и аллергологии "Форпост"
(Киев)
Запорожский национальный университет

Последние десятилетия характеризуются бурным ростом частоты аллергических заболеваний во всем мире. В исследованиях динамики распространенности аллергических заболеваний за последние 30 лет показано, что каждые 10 лет число лиц, страдающих аллергией удваивается [1]. Причинами резкого нарастания аллергических болезней можно назвать серьезные изменения экологии, использование в пищевых продуктах различных химических соединений и др. Учитывая повсеместный ежегодный рост аллергопатологии (каждый третий житель планеты страдает аллергическим ринитом и каждый десятый — бронхиальной астмой), можно говорить о пандемии аллергии, которая с конца прошлого века охватила большинство стран мира.

Частота регистрации аллергических заболеваний в Украине в настоящее время составляет в среднем до 30% населения в зависимости от экологии, климата, развития производства в определенных регионах [2].

При этом эффективные лечебно-профилактические мероприятия у пациентов с аллергическими заболеваниями возможны только с учетом достоверной информации о том, на какие конкретно аллергены имеет место сенсibilизация у больного [3]. Широко распространенные на сегодняшний день *in vivo* методы специфической аллергодиагностики имеют ряд противопоказаний. В связи с этим особую актуальность приобретает достоверная специфическая диагностика

аллергии *in vitro* с определением причинных аллергенов в каждом конкретном случае.

Следует указать, что международными консенсусами определена необходимость диагностики аллергии к различным продуктам и другим аллергенам путём определения концентрации специфических IgE антител [4,5]. Однако в Украине до настоящего времени не производились тест-системы для специфической аллергодиагностики. Импортные же тест-системы характеризуются очень высокой дороговизной. Кроме того перечень выявляемых аллергенов в данных тест-системах не содержит ряд распространенных в Украине продуктов, бытовых аллергенов и др.

Целью исследования была разработка первых отечественных иммуноферментных (ИФА) тест-систем IV поколения для определения в сыворотке крови концентрации специфических IgE к продуктам питания, бытовым и другим аллергенам, сравнение их с продукцией одного из ведущих мировых производителей тест-систем для диагностики аллергии.

При разработке ИФА тест-систем ставились следующие задачи: диагностика клинически значимого количественного содержания специфических IgE, а не только выявление положительной сенсibilизации; возможность постоянного контроля эффективности противоаллергических мер, а также ранней диагностики возможных осложнений и/или рецидивов заболевания; используя малые объемы крови, необходимой для анализа (до 2–3 мл при выполнении 20–30 анализов); высокая специфичность и чувствительность анализа; простота и быстрая выполнимость методики (3–4 часа); безопасность для обследуемого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы сыворотки 72 пациентов, в которых определялось содержание специфических IgE к одному из 7 аллергенов: казеину коровьего молока, сое, клещам домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssimus* и *Dermatophagoides farinae*, грибкам *Alternaria alternata*, *Aspergillus Fumigatu* и *Candida albicans*. Определение антител к указанным аллергенам проводилось как с использованием тест-систем (ImmunoCAP)

**Характеристика иммуноферментных
тест-систем производства ООО “Укрмед Дон”
для определения содержания специфических IgE**

Параметры	Характеристика
Принцип метода	Твердофазный, ИФА
Общее время анализа	3 ч 30 мин
Диапазон измерений, МЕ/мл	0–100
Оптическая плотность диапазона	0,04–3,50
Чувствительность, МЕ/мл	0,1
Коэффициент вариации	не >5%
Объем сыворотки для исследования в дублях	100 мкл

производства фирмы Phadia AB (Швеция) так и с помощью первых отечественных ИФА тест-систем IV поколения для определения специфических IgE разработанных специалистами ООО “Укрмед-Дон”, Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького (г. Донецк, Украина). Характеристика иммуноферментных тест-систем, созданных в Украине, представлена в табл. 1. В наборы включена калибровочная кривая, позволяющая определять содержание специфического IgE в МЕ/мл. Оптическая плотность образцов подсчитывалась с помощью ИФА анализатора А-СК01 на базе сканера Scanjet G4050 фирмы Hewlett-Packard, разработанного специалистами ООО “Укрмед Дон”. Сыворотки интерпретировались как “отрицательные” при содержании специфических IgE ≤ 0,35 МЕ/мл, и как “положительные” при содержании специфических IgE > 0,35 МЕ/мл. Результаты и их обсуждение.

Установлено, что разработанная тест-система характеризуется линейностью калибровочной кривой, высокой чувствительностью (0,1 МЕ/мл) и широким диапазоном оптической плотности кривой и исследуемых образцов (оптическая плотность стандарта 100 МЕ/мл достигает 6,000 ед. и выше), что обуславливает, при необходимости, продление срока ее эксплуатации до 4–5 лет с сохранением экстинкции верхней точки не ниже 2,000 ед.

В настоящее время с помощью тест-системы ООО “Укрмед Дон” возможно определение уровня специфического IgE к более чем 200 аллергенам. Среди них широко представлены мясо-

молочные, морепродукты (табл. 2), а также различные овощи и фрукты (табл. 3). Следует особо подчеркнуть, что в перечень аллергенов, на которые возможно выявление сенсибилизации с помощью предлагаемых систем, включен ряд молочных продуктов, более характерных для употребления в Украине (творог, брынза, кефир, ряженка). Также широко представлены виды рыб, используемых для питания в Украине том числе толстолобик, пеленгас, анчоус, килька, речной рак. Кроме того, для ряда овощей и фруктов (капуста, смородина, черешня, яблоки, виноград) предусмотрено определение аллергии на их отдельные сорта, произрастающие на территории Украины. Исследование аллергии к ним невозможно при использовании других тест-систем.

Таблица 2

**Перечень мясной и молочной продукции, морепродуктов,
к которым возможно определение специфических IgE тест-системами ООО “Укрмед Дон”**

Молочные продукты	Мясо	Рыба и морепродукты	
йогурт	говядина	каarp	сом
кефир	кролик	сельдь	хек
сыр	свинина	скупбрия	щука
брынза	конина	минтай	пеленгас
творог	баранина	икра красная	бычок
козье молоко	телятина	семга	судак
коровье молоко	курица	кета	анчоус
казеин молока	индейка	угорь	килька
	гусь	камбала	кальмар
	утка	ледяная рыба	креветки
	яйцо перепелиное	форель	рак
	яйцо перепелиное желток	минтай	краб
	яйцо перепелиное белок	ставрида	морской
	яйцо куриное желток	толстолобик	гребешок
	яйцо куриное белок		

Перечень овощей, фруктов и ягод, к которым возможно определение содержания специфических IgE тест-системами ООО “Укрмед Дон”

Овощи, пряности	Фрукты и ягоды	
тыква	банан	нектарин (персик-яблоко)
кабачок	яблоко общий	нектарин (персик-манго)
огурец	яблоко антоновка	нектарин (персик-инжир)
перец сладкий	яблоко джонатан	малина
баклажан	яблоко айдаред	клубника
соя	яблоко голден (яблоко-груша)	черника
картофель морковь	яблоко чемпион	виноград белый
капуста белокач.	яблоко лигольд	виноград красный
капуста вареная	груша	черешня
капуста брюссельская	киви	черешня желтая
капуста брокколи	крыжовник	черешня розовая
капуста китайская	арбуз	черешня красная
капуста красная	дыня	смородина черная
капуста цветная	лимон	смородина красная
сельдерей	апельсин	смородина белая
фасоль	грейпфрут	слива
горох	мандарин	манго
томат	абрикос	шиповник
репчатый лук	хурма	финики
лук порей	персик	гранат
цуккини	персик желтый персик розовый	оливки
свекла	персик красный	
петрушка		
укроп		
салат, зеленый чеснок, шавель		
лавровый лист, гвоздика, мята		

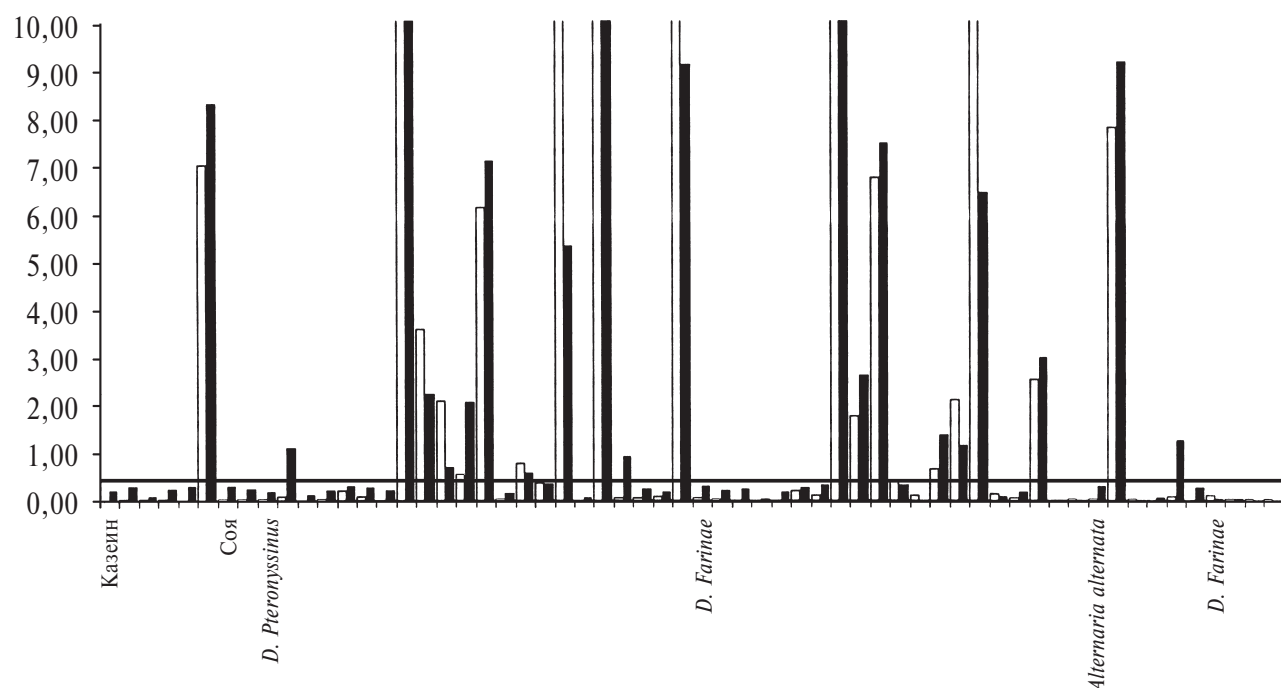


Рис. Сравнение результатов исследования сывороток на уровни специфических IgE к различным аллергенам с помощью ИФА тест-систем Phadia AB и ООО “Укрмед-Дон” (горизонтальная линия — отсекающий уровень 0,35 МЕ/мл): □ — Швеция; ■ — Украина

В результате проведенного сравнения было получено совпадение интерпретации результатов в 66 случаях, что составило $91,7 \pm 3,3\%$ (рис.). При этом, в 4 сыворотках ($5,5 \pm 2,7\%$), уровень специфического IgE в которых, по данным тест-систем Phadia AB (Швеция), не превышал $0,35$ МЕ/мл, при постановке на ИФА наборах отечественного производства с аналогичными экстрактами аллергенов были выявлены положительные результаты ($\geq 0,35$ МЕ/мл). Кроме того, тестирование 2 сывороток ($2,8 \pm 1,9\%$) диагностированных методом ImmunoCAP как “положительные”, тест-системами ООО “Укрмед-Дон” не выявило диагностически значимых уровней IgE антител ($> 0,35$ МЕ/мл).

Таким образом, впервые на Украине разработаны иммуноферментные тест-системы для определения специфических IgE антител, отличающиеся высокой чувствительностью, характеризующиеся линейной калибровочной кривой и длительным сроком эксплуатации. В перечень аллергенов, к которым возможно выявление сенсибилизации с помощью предлагаемой тест-системы, включен ряд продуктов, используемых для питания в Украине. Сравнение результатов, полученных с помощью разработанных тест-систем с результатами наборов производства Phadia AB (Швеция) показало высокую степень идентичности результатов исследований. В то же время в $8,3\%$ случаев полученные результаты не совпали, что, по всей видимости, связано с отличиями в конструкции сравниваемых тест-систем, особенностями экстракции аллергенов, изготовления твердой фазы, конъюгатов.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны первые отечественные иммуноферментные тест-системы IV поколения для определения аллерген-специфических IgE антител с уникальным, необходимым для Украины перечнем аллергенов.

2. Показано, что результаты исследования концентраций аллергенспецифических IgE антител иммуноферментными тест-системами IV поколения производства ООО “Укрмед-Дон” в $91,7 \pm 3,3\%$ случаев совпадают с данными, полученными наборами ImmunoCAP — одного из ведущих мировых производителей (Phadia AB, Швеция) тест-систем для аллергодиагностики.

3. Полученные результаты свидетельствуют о возможности и целесообразности использования первых отечественных тест-систем для

специфической аллергодиагностики *in vitro* в Украине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лусс Л.В. *Этиология, патогенез, проблемы диагностики и лечения аллергического ринита* / Л.В. Лусс // *Рос. мед. журнал.* — 2003. — Т. 11, № 12. — С. 718–729.
2. Пухлик Б. *Аллергия государственного масштаба* // *Еженедельник 2000.* — 2007. — № 8 (355). — С. 2.
3. Garcia-Ara M.C. *Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants* / M.C. Garcia-Ara, M.T. Boyano-Martinez, J.M Diaz-Pena et al. // *Clin Exp Allergy.* — 2004. — Vol. 34. — P. 866–870.
4. Bindels J.G. *Allergens: latest developments, newest techniques* / J.G. Bindels, M. Hoijer // *Bull Int. Dairy Fed.* — 2000. — Vol. 351. — P. 31–32.
5. Sampson H.A. *Food allergy* / H.A. Sampson // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* — 2003. — Vol. 111, № 2. — P. 540–547.

ДОСВІД РОЗРОБКИ ІФА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОГО IgE ДО РІЗНИХ АЛЕРГЕНІВ

О.С. Прилуцкий, Л.В. Кузнецова, Д.О. Лесниченко,
О.П. Назаренко, Б.Г. Борзенко, О.К. Фролов

Представлені дані щодо розробки перших вітчизняних імуноферментних тест-систем для визначення специфічного IgE. Тест-системи характеризуються високою чутливістю, лінійною калібрувальною кривою, тривалим терміном експлуатації і мають високу частоту (більше 90%) збігу результатів в порівнянні з наборами ImmunoCAP (Phadia AB, Швеція). Можливо визначення алергії до ряду продуктів, що вживаються в Україні.

EXPERIENCE IN DEVELOPING ELISA TEST KITS FOR THE DETERMINATION OF SPECIFIC IgE TO DIFFERENT ALLERGENS

A.S. Prilutsky, L.V. Kuznetsova, D.A. Lesnichenko,
A.P. Nazarenko, B.G. Borzenko, A.K. Frolov

The data on the development of the first domestic ELISA test kits for the determination of specific IgE. Test systems are characterized by high sensitivity, linear calibration curve, long life and have a high frequency (90%) matches the results in comparison with sets of ImmunoCAP (Phadia AB, Sweden). Perhaps the definition of an allergy to a number of products used in the Ukraine.