

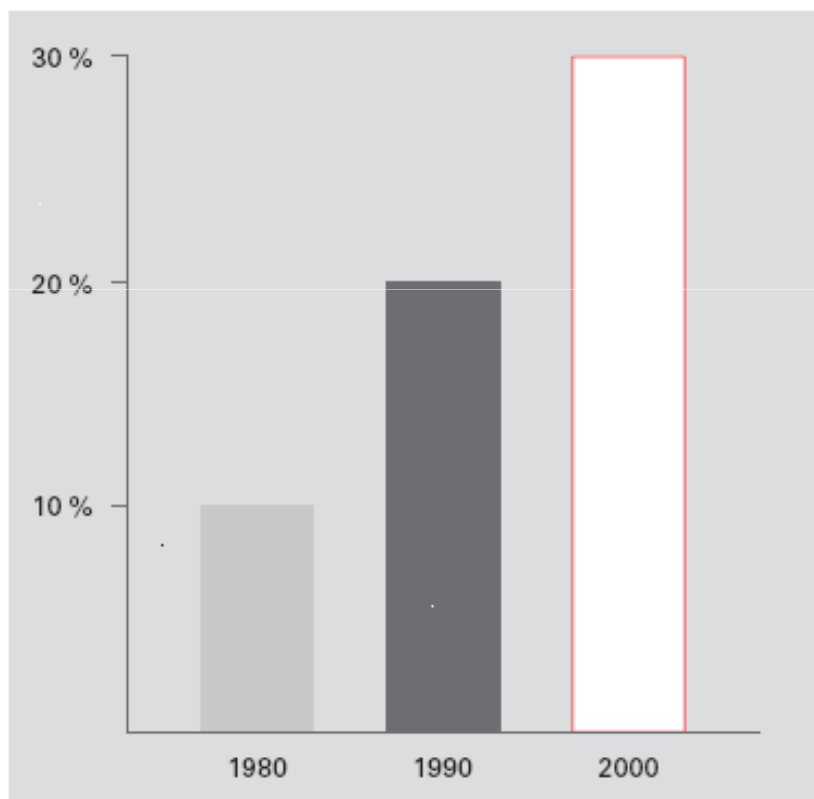
Применение методов ИФА и иммуноблоттинга в аллергодиагностике *in vitro*

к.х.н. Бланк Константин Иванович
ЗАО «АНАЛИТИКА», Москва



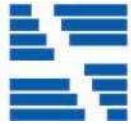
Аллергические заболевания

в лабораторной диагностике с 1989 года



*Всемирная аллергологическая организация (WAO).
Белая книга аллергий 2010*

- Распространенность : 30-40% жителей индустриальных стран (2010 г.)
- Прогноз Института иммунологии ФМБА: 50% населения РФ к 2015 г.
- Ежегодное увеличение частоты респираторных проявлений:
 - аллергический ринит - 10-15%
 - бронхиальная астма - 5-10%
- Усиление тяжести проявлений, нередко – угроза жизни
- Все чаще встречается у детей.



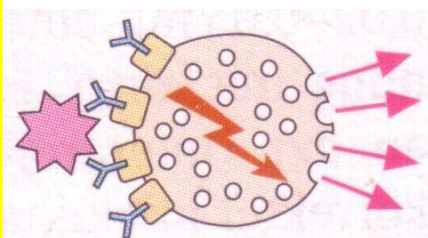
Аллергия:

Реакция гиперчувствительности,
опосредованная иммунологическими
механизмами – как клеточными, так
и гуморальными

Различные типы аллергических реакций (Coombs & Gell, 1963)

в лабораторной диагностике с 1989 года

Тип I



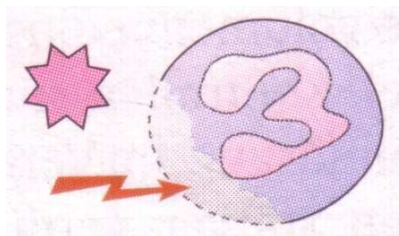
**Реакция
немедленного
типа**

Дегрануляция
тучных клеток,
опосредованная IgE

Минуты

Сенная лихорадка

Тип II



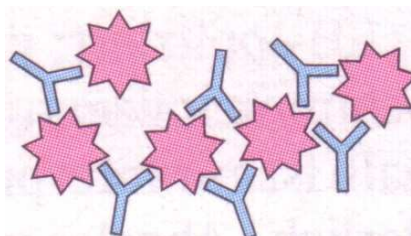
**Цитотоксическая
реакция**

Разрушение клеток
крови, опосредованное
IgG/IgM

Часы - дни

Лекарственная
аллергия

Тип III



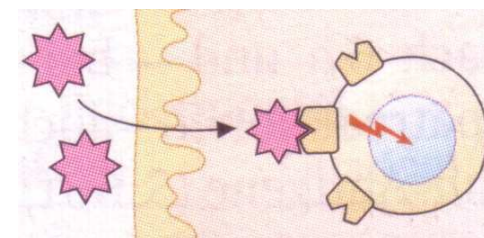
**Реакция с
образованием
иммунных
комплексов**

Персистирующие
IgG/IgM иммунные
комплексы

Часы – дни

Аллергический
альвеолит («легкое
фермера»

Тип IV



**Клеточная
реакция**

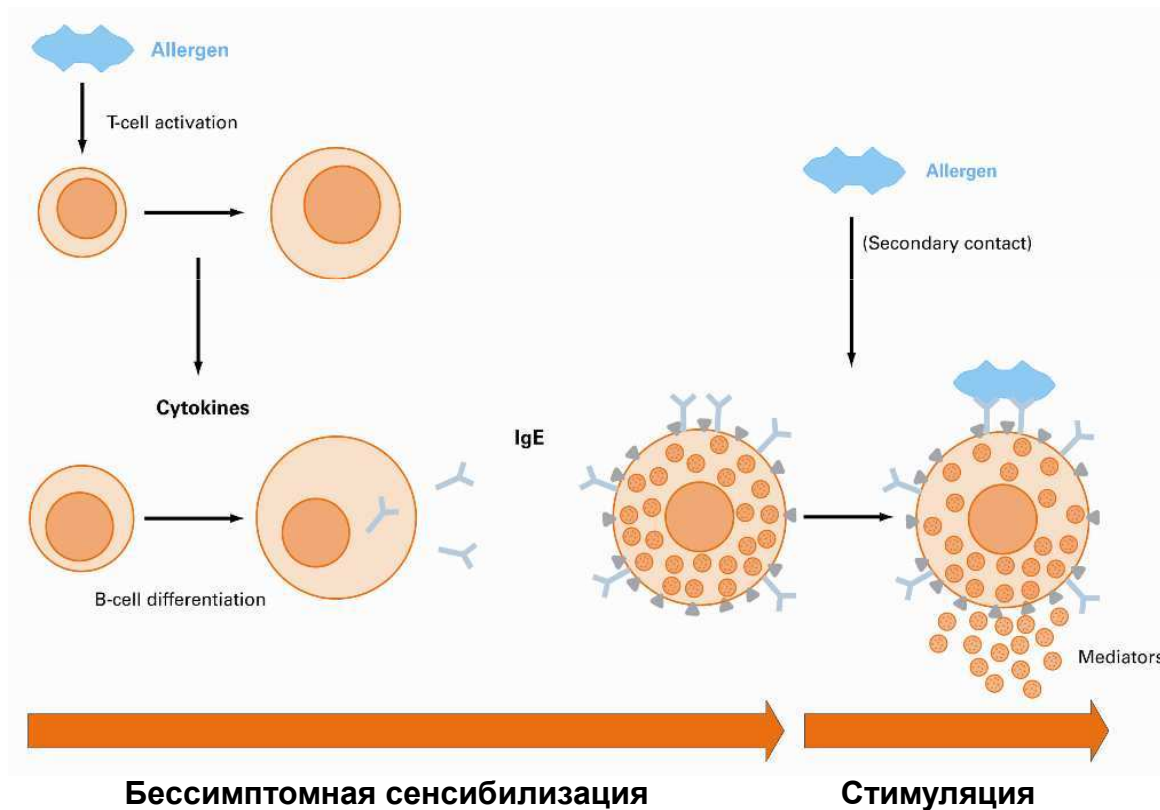
Реакция,
опосредованная
Т-клетками

12 часов – недели

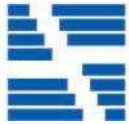
Контактные
аллергии (Ni)

Аллергия I типа

в лабораторной диагностике с 1989 года



- Контакт с аллергеном – активация Т-клеток и В-клеток
- Продукция специфических IgE – результат взаимодействия активированных Т- и В-клеток
- В-клетки выделяют молекулы IgE, связывающиеся с тучными клетками через рецепторы IgE
- Вторичный контакт с аллергеном: взаимодействие аллергена с IgE, высвобождение медиаторов (гистамин, триптаза, лейкотриены), определяющих основные симптомы



Основные симптомы:

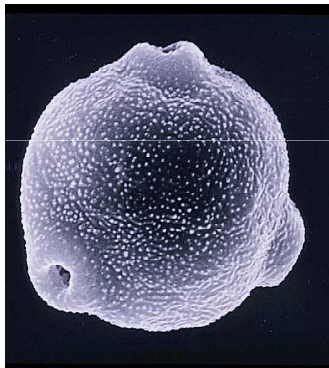
- **Атопические заболевания**
 - ринит
 - синусит
 - астма
 - атопический дерматит
- **Анафилактические реакции**
 - после введения аллергена (лекарства, яды насекомых)
 - пищевые (орехи, рыба и др.)

Классификация аллергенов

в лабораторной диагностике с 1989 года

Ингаляционные аллергены:

- пыльца
- пылевые клещи
- плесневые грибы/дрожжи
- роговой эпителий
- различная пыль



Классификация аллергенов

в лабораторной диагностике с 1989 года

Пищевые аллергены:

- молоко и молочные продукты
- куриные яйца
- рыба
- орехи
- ОВОЩИ И Т.Д.



Классификация аллергенов

в лабораторной диагностике с 1989 года

Яды насекомых

- пчела
- оса
- шершень



Лекарства:

- пенициллин и другие антибиотики
- внутривенные анестетики
- аспирин
- нестероидные противовоспалительные средства
- рентгеноконтрастные вещества
- и многие другие



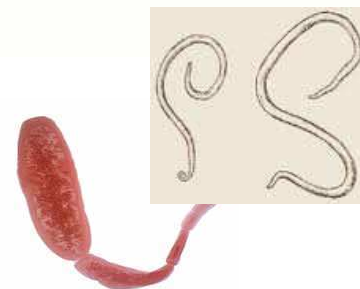


Классификация аллергенов

в лабораторной диагностике с 1989 года

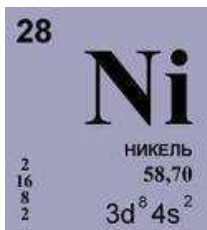
Паразиты

- аскариды
- эхинококк и проч.



Контактные аллергены:

- соли металлов
- резиновые изделия
- синтетика
- красители
- косметика
- консерванты
- компоненты растений или продукты растительного происхождения
- и прочее





Методы диагностики аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года

1. Анамнез



2. *In vivo*: кожные тесты



4. *In vitro*: лабораторные тесты



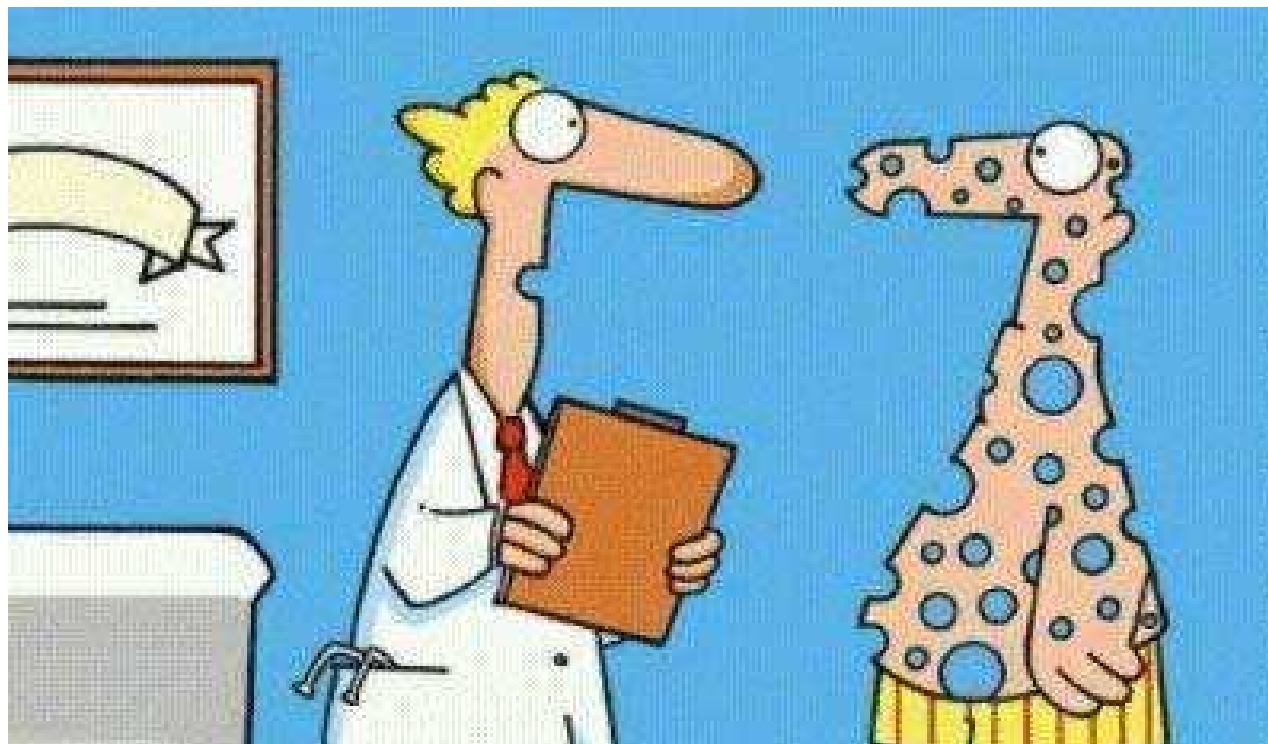
3. *In vivo*: провокационные пробы



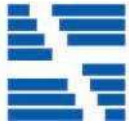


Методы диагностики аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года



*Говорите, сыр ? Швейцарский?
Нет-нет, давайте-ка проверим...*



Методы диагностики аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года

Тесты *in-vivo*

Кожные пробы

- Капельные пробы
- Аппликационные пробы
- Прик-тест (укол)
- Скарификационный тест (царапина)
- Внутрикожная проба: очень чувствительный тест

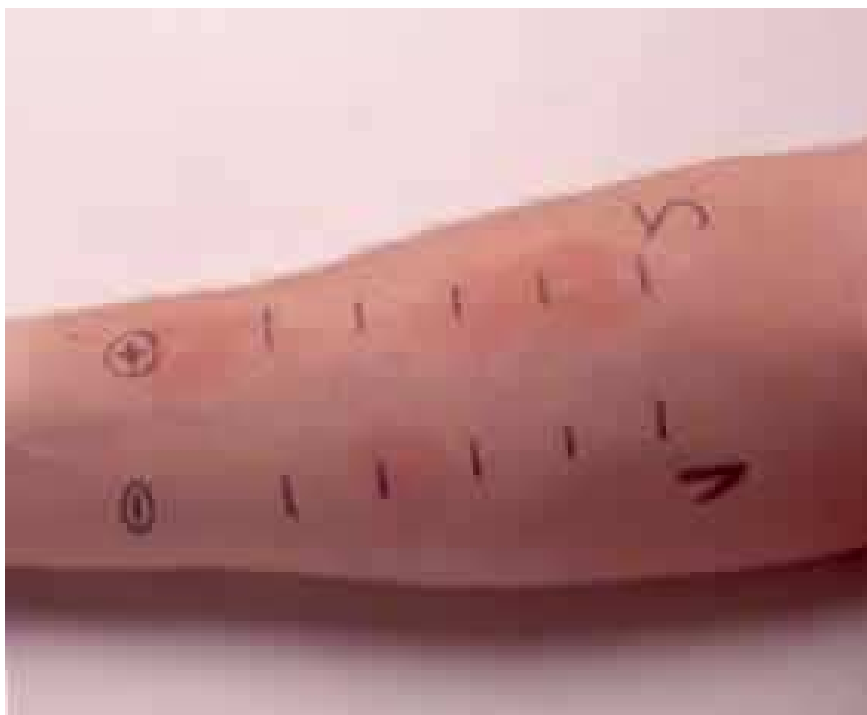
Провокационные пробы

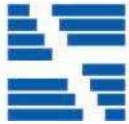


Методы диагностики аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года

Тесты *in vivo*: кожные пробы





Методы диагностики аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года

Кожные пробы: преимущества

- Быстрое получение результата
- Высокая чувствительность
(внутрикожные пробы)
- Низкая стоимость



Методы диагностики аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года

Кожные пробы: противопоказания

Метод не может быть назначен следующим группам пациентов:

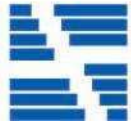
- имеющим в анамнезе анафилактический шок;
- больным с обострением аллергических заболеваний, а также хронических болезней, включая психические и нервные расстройства;
- при заболеваниях кожи
- пациентам, прошедшим длительную гормональную терапию.
- беременным и кормящим женщинам;
- детям до 3 лет
- не рекомендован пожилым людям старше 60-ти лет

Методы диагностики аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года

Кожные пробы: недостатки

- Риск сенсibilизации
- Риск обострения уже имеющегося аллергического заболевания
- Необходим временный отказ от антигистаминных препаратов
- Не применяются у детей до 3 лет
- Сниженная чувствительность у детей до 10 лет
- Ограниченное число аллергенов за одно исследование
- Отсутствие единых стандартов
- Субъективность интерпретации результатов



Серологическая диагностика аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года

- Суммарный уровень IgE
- Специфические IgE
- Специфические IgG

Серологическая диагностика аллергии

в лабораторной диагностике с 1989 года

Тесты *in vitro*: выявление аллергенспецифических антител

- Радиоиммунологический анализ (РИА)
- Иммунохемилюминисцентный анализ
- Иммуноферментный анализ (ИФА)
- Иммуноблот

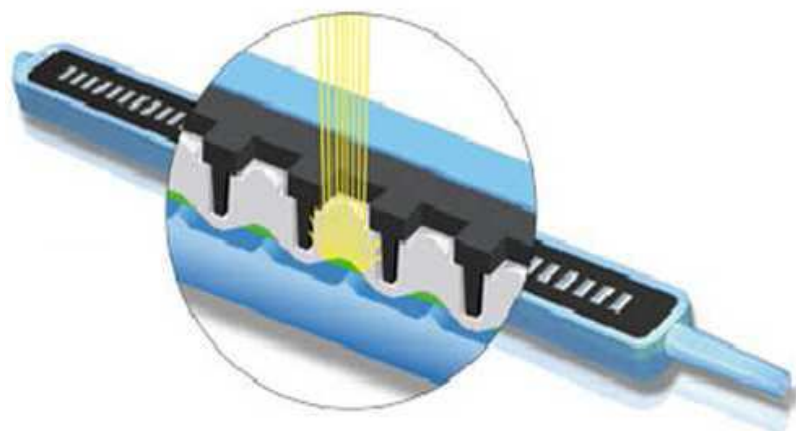


Тесты *in vitro*: ИММУНОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

в лабораторной диагностике с 1989 года

Тест-система Optigen® (Hitachi)

- Три панели по 36 аллергенов
- Анализ занимает 5 часов
- Необходим специальный люминометр
- Большой объем образца (1,2 мл)



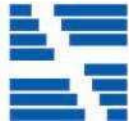
Тесты *in vitro*

в лабораторной диагностике с 1989 года

ImmunoCAP (Pharmacia)

- Используется в специализированных лабораториях
- Высокая стоимость тестов





Тесты *in vitro*: ИФА

в лабораторной диагностике с 1989 года

- Использование биотинилированных аллергенов (ИФА «capture»-типа)
- Использование типа нитроцеллюлозных дисков с иммобилизованными аллергенами

ИФА тест-система для определения специфических IgE и IgG

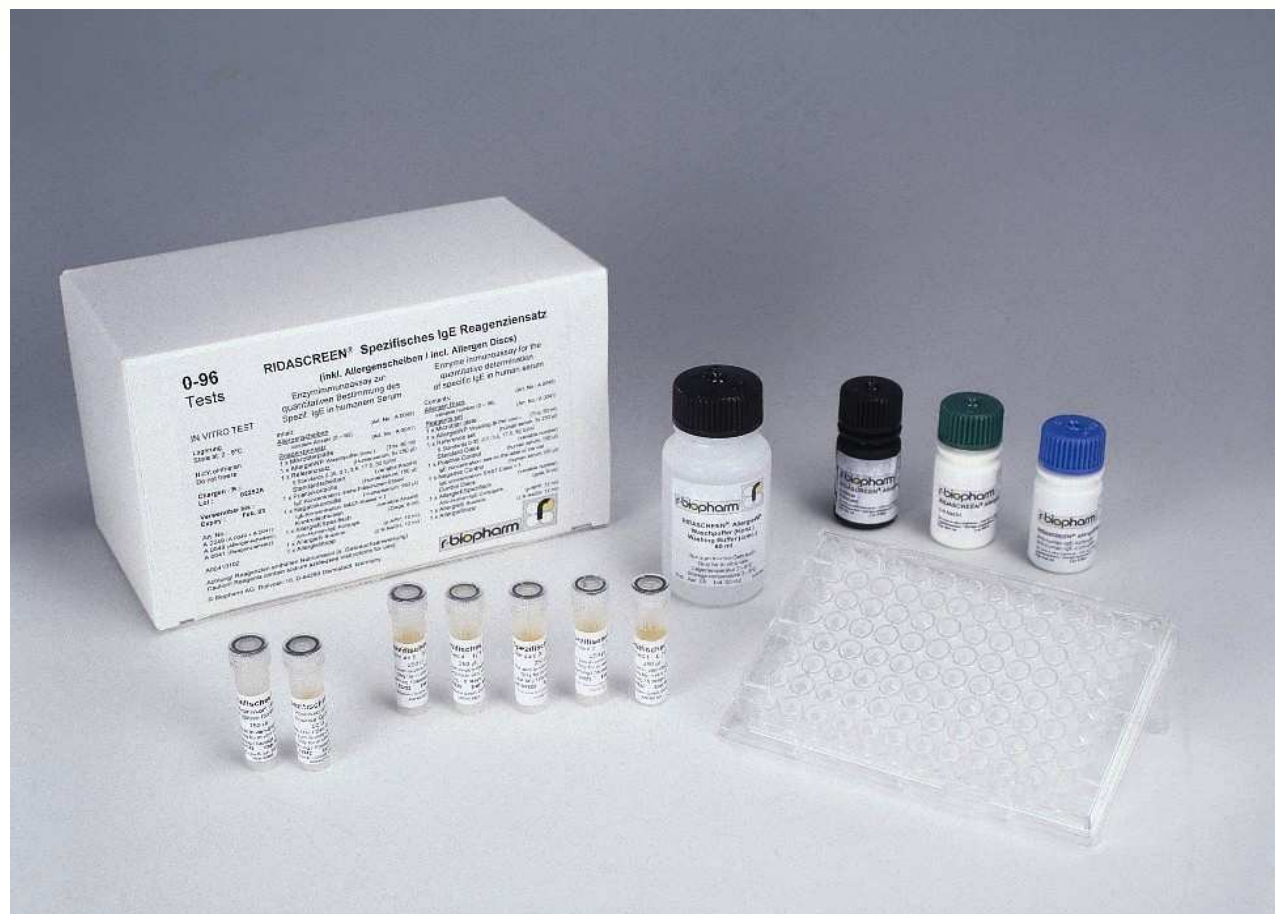
- Аллергены иммобилизованы на дисках из целлюлозы
- Диски поставляются уже разложенными по стрипам



ИФА RIDASCREEN® (R-Biopharm)

в лабораторной диагностике с 1989 года

Состав набора

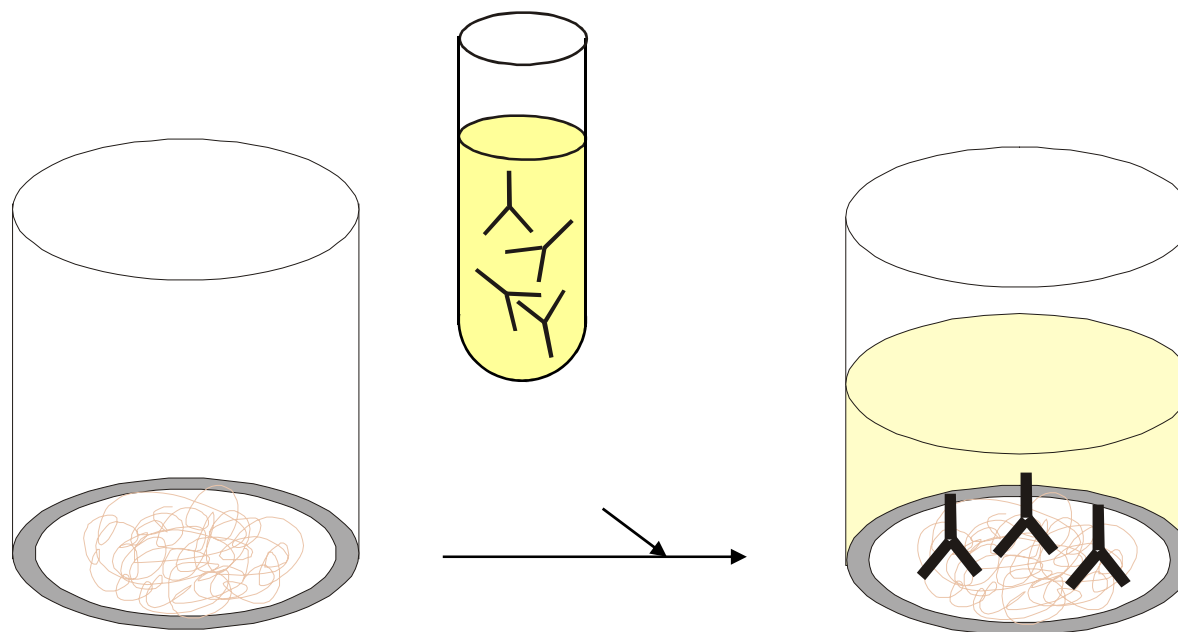




ИФА RIDASCREEN®

в лабораторной диагностике с 1989 года

Метод EAST

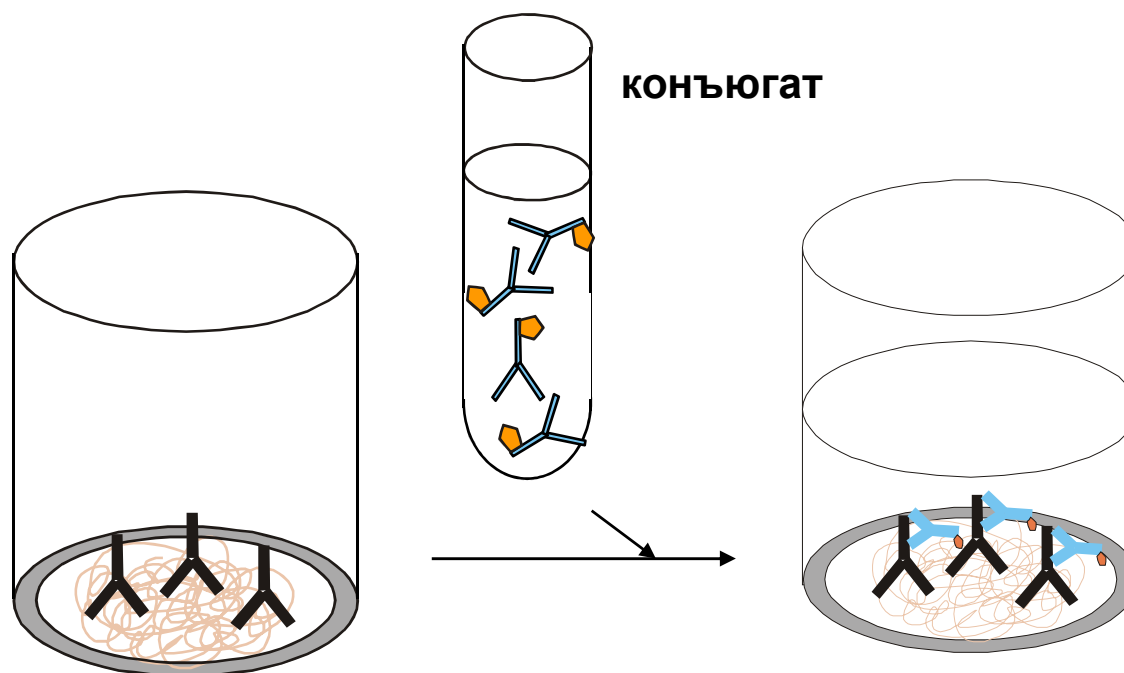




ИФА RIDASCREEN®

в лабораторной диагностике с 1989 года

Метод EAST

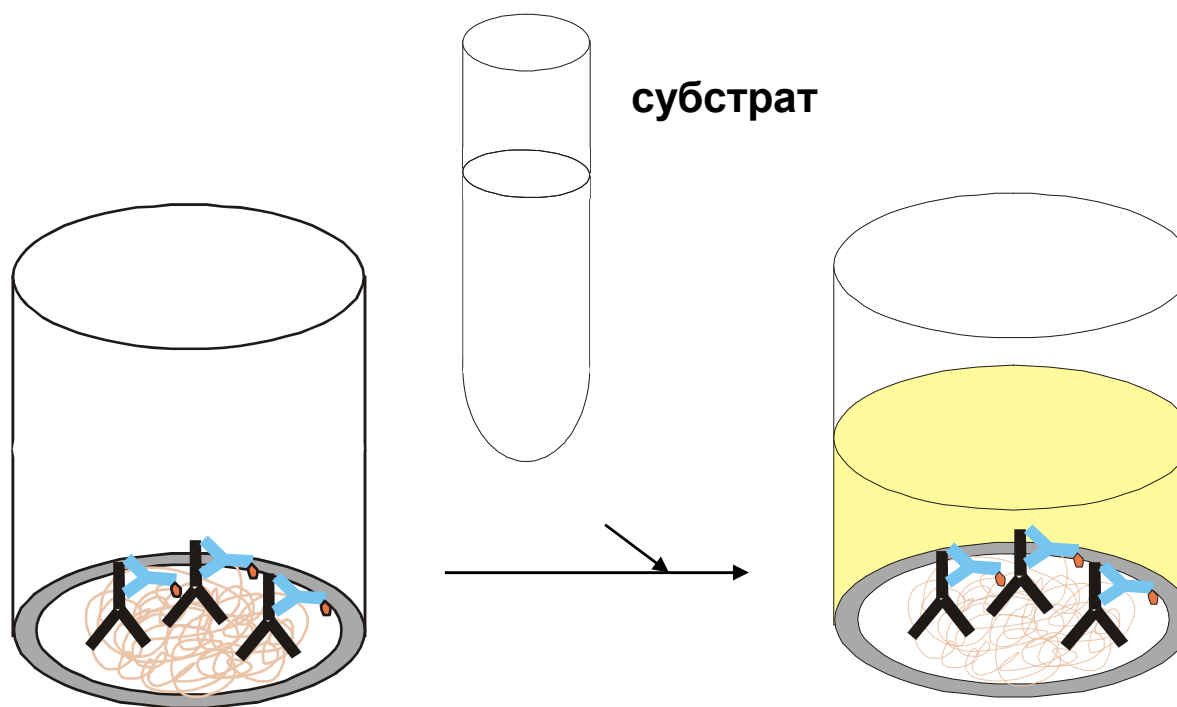




ИФА RIDASCREEN®

в лабораторной диагностике с 1989 года

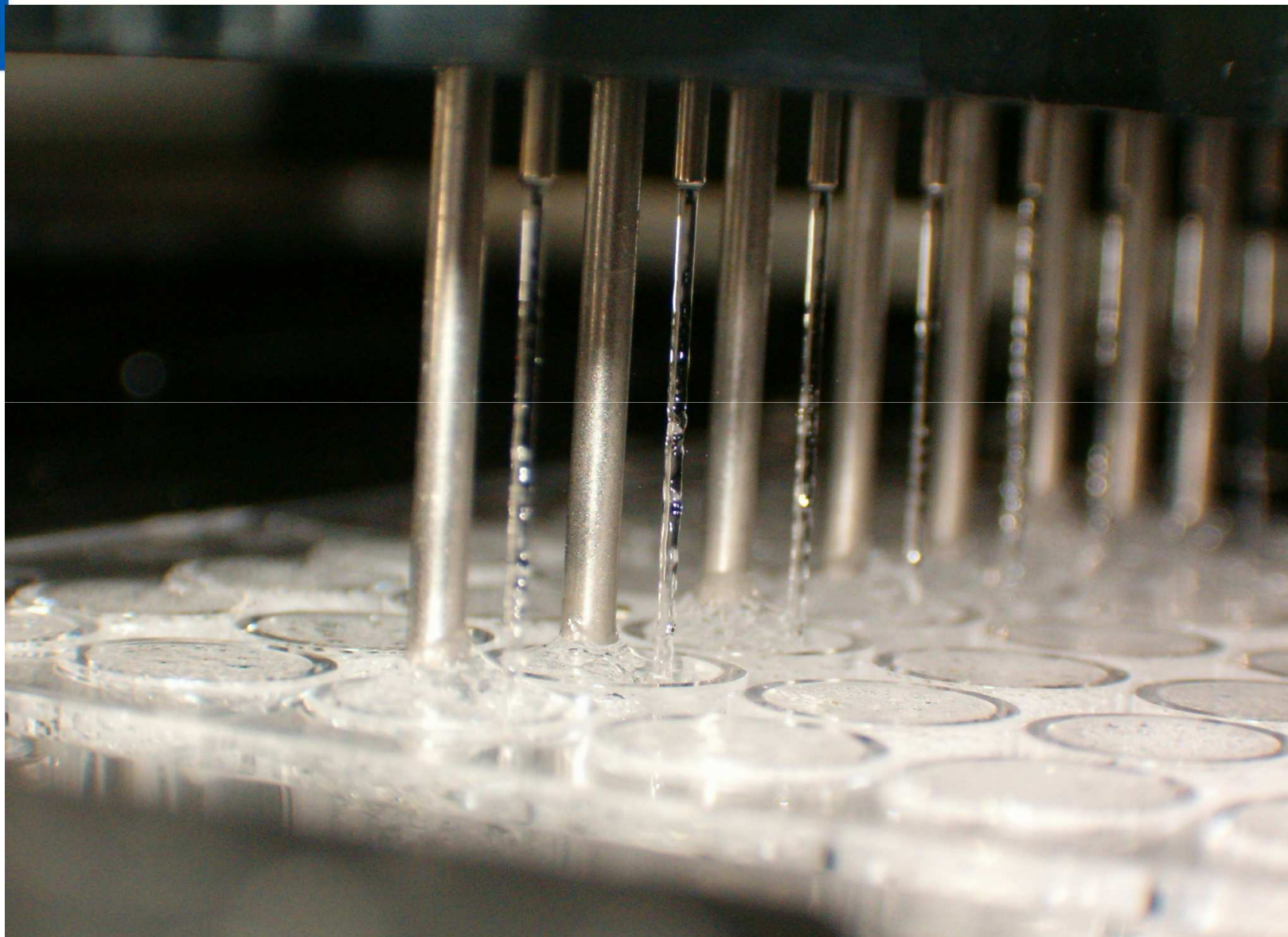
Метод EAST



Оценка и интерпретация результатов

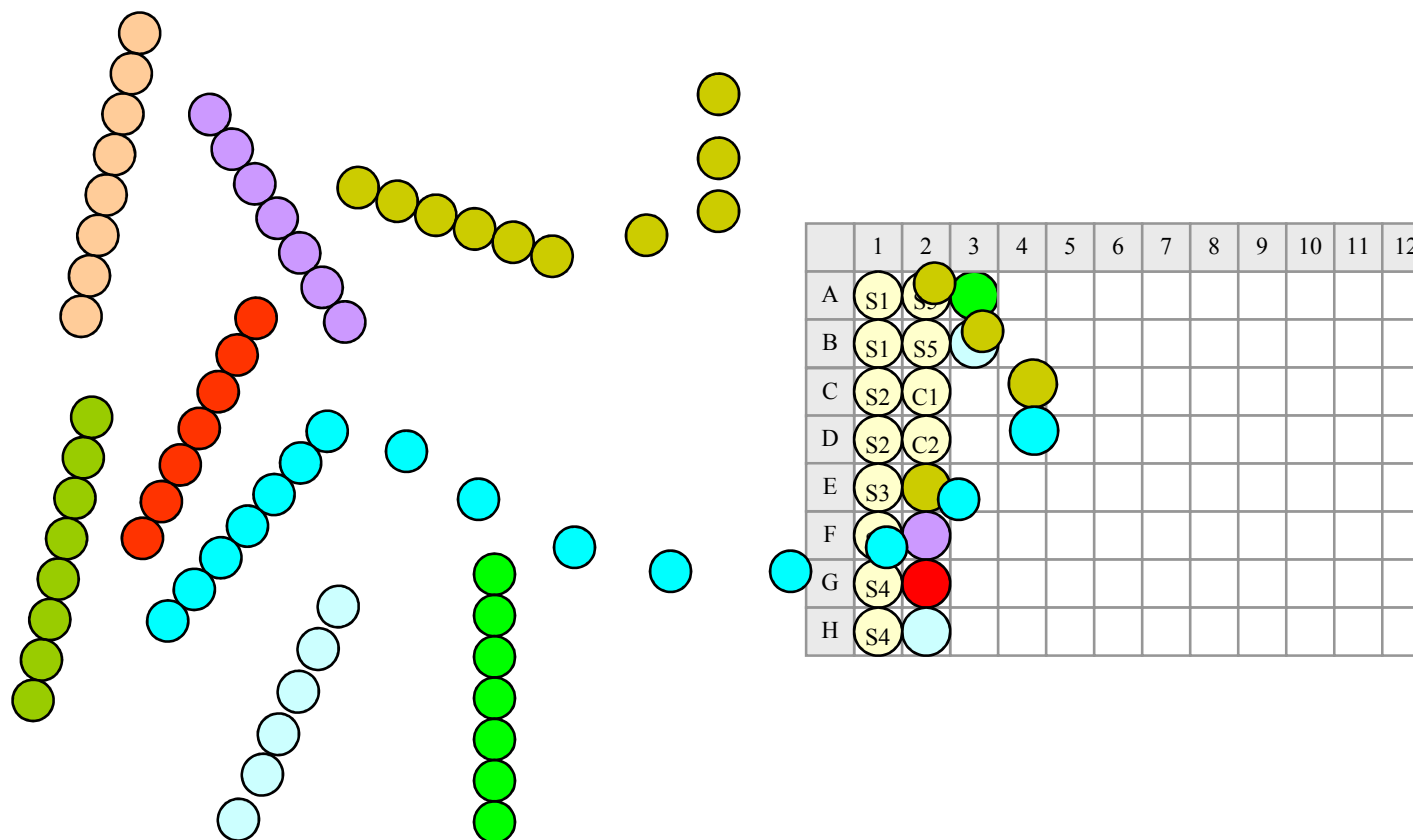
<i>МЕ / мл</i>	<i>Класс EAST</i>	<i>Количество IgE, специфичного к исследуемому аллергену</i>
0.00 – 0.34	0 (0.0 – 0.9)	отсутствует или не может быть определен
0.35 – 0.69	1 (1.0 – 1.9)	на уровне нижнего порога чувствительности
0.70 – 3.49	2 (2.0 – 2.9)	слегка увеличен
3.50 – 17.49	3 (3.0 – 3.9)	значительно увеличен
17.50 – 49.99	4 (4.0 – 4.9)	высокое содержание
50.00 – 99.99	5 (5.0 – 5.9)	очень высокое содержание
≥ 100.00 *	6 (≥ 6.0) *	чрезвычайно высокое содержание *

ИФА RIDASCREEN®



Форматы поставки аллергодисков для определения специфических IgE и IgG

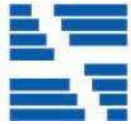
- **Стандартный вариант:**
диски с аллергеном помещены в разделяемые на лунки 8-луночные стрипы
- **Дополнительный вариант:**
панели из 8 дисков с различными аллергенами в стрипах, разделяемых на лунки



ИФА RIDASCREEN®

Стандартный вариант





Стандартный вариант

Преимущества:

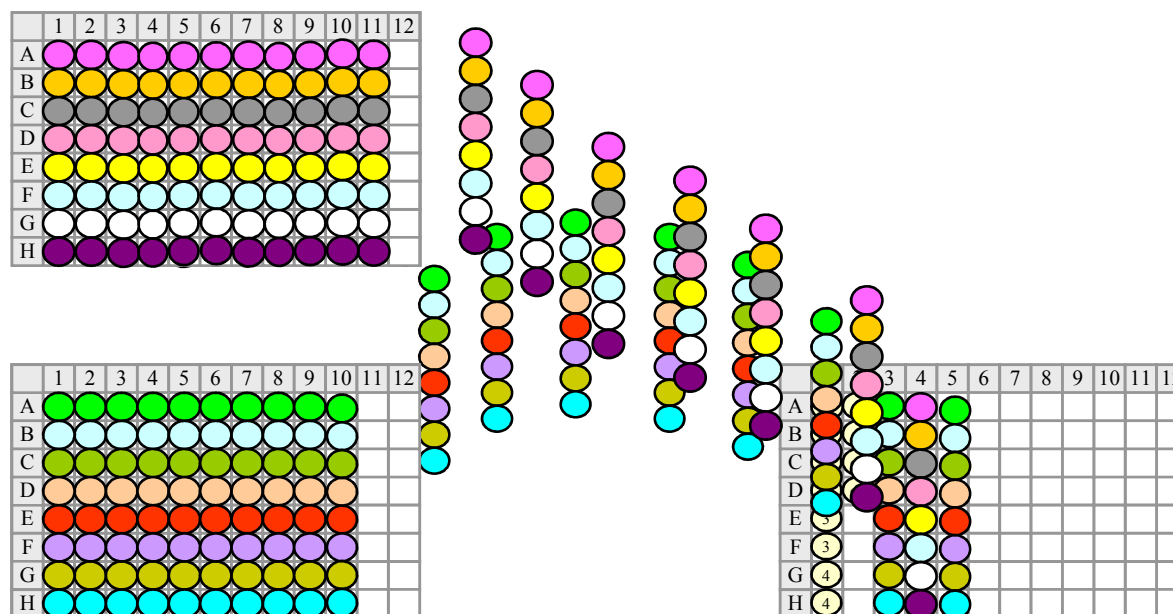
- Широкие возможности при выборе аллергенов
- Гибкость при выборе количества аллергенов для одного пациента
- Более 700 аллергенов и смесей аллергенов
- Принцип аналогичен другим подобным тест-системам



ИФА RIDASCREEN®

в лабораторной диагностике с 1989 года

Дополнительный вариант





ИФА RIDASCREEN®

в лабораторной диагностике с 1989 года

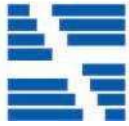
Дополнительный вариант



Дополнительный вариант

Преимущества:

- Требуемые аллергены подбираются из небольшого числа предварительно составленных Вами панелей, а не из огромного списка (> 700 аллергенов)
- Можно комбинировать панели с отдельными аллергенами



Лайн-блот (стрипы)

- Аллергены сгруппированы в определенном порядке на полоске нитроцеллюлозной мембраны
- Стандартный формат стрипа
- Стандартная процедура иммуноблоттинга
- Пример: **EUROLINE** (EUROIMMUN)

Лайн-блот (корпусированные стрипы)

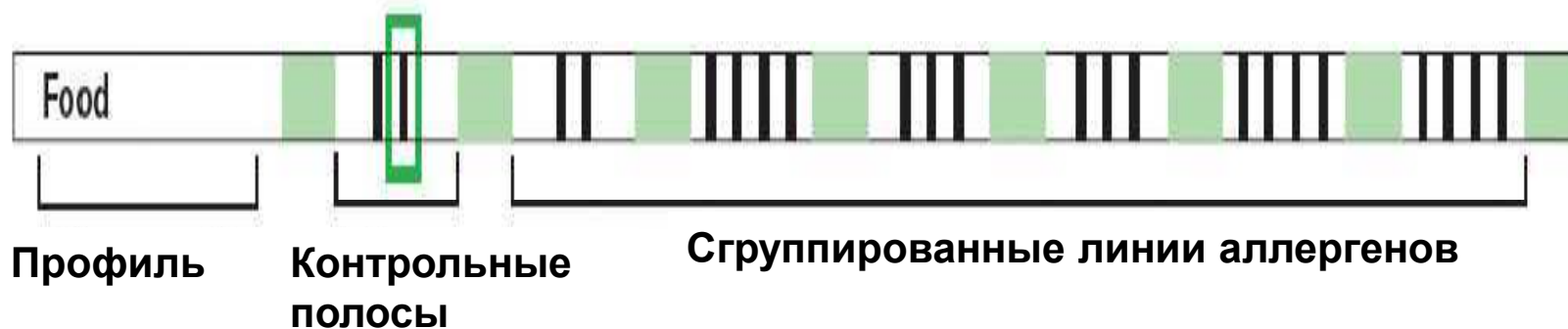
- Миниформат стрипа
- Стрипы вклеены в корпус-кювету
- Пример: **RIDA® AllergyScreen** (R-Biopharm)



Иммуноблот

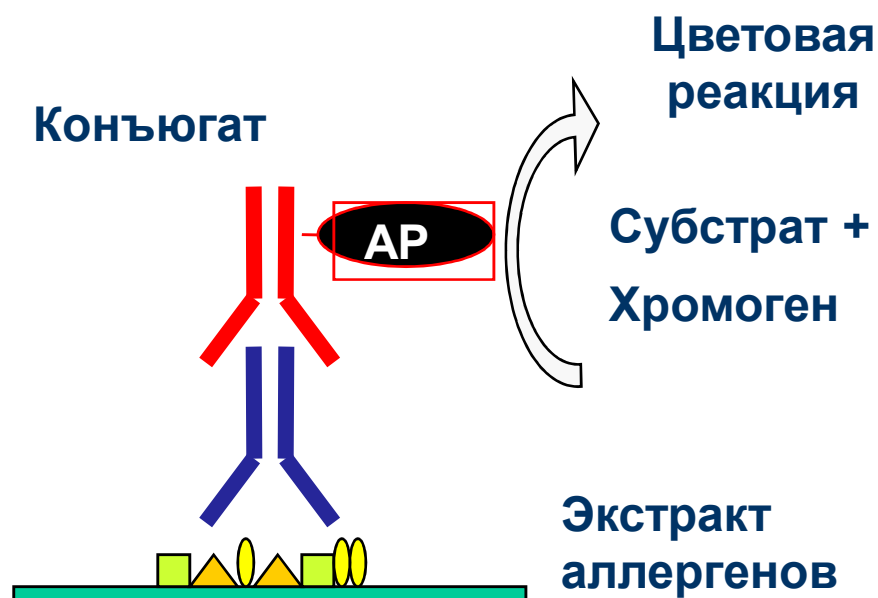
в лабораторной диагностике с 1989 года

EUROLINE



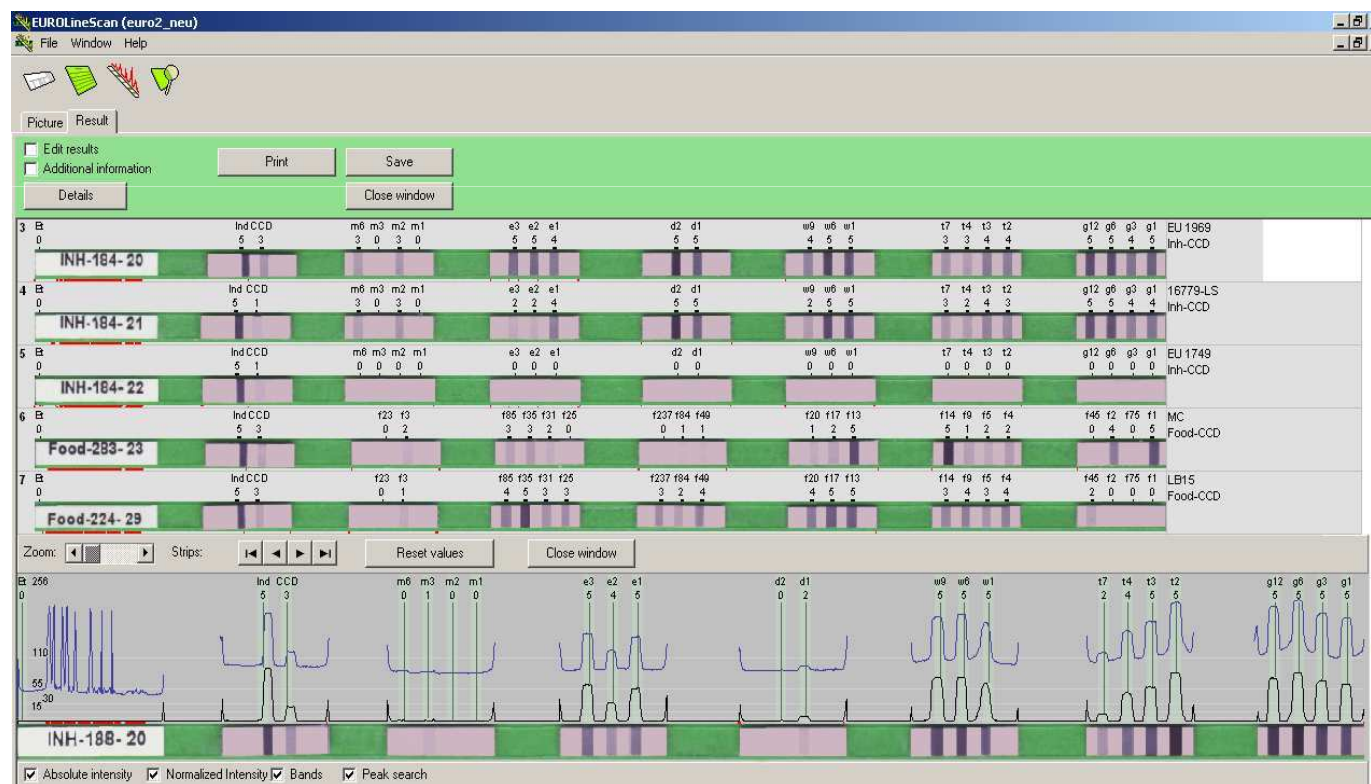
- Мультипараметровый тест: до 36 аллергенов на одном стрипе
- Простой, быстрый и экономичный тест
- Возможна автоматизация
- Полуколичественная интерпретация результатов (классы EAST)

EAST class	Concentration [kU/I]
0	< 0.35
1	0.35 - 0.7
2	0.7 - 3.5
3	3.5 - 17.5
4	17.5 - 50
5	50 - 100
6	> 100



Результат: визуальная или инструментальная оценка

Сканирование стрипов и интерпретация результатов



Иммуноблот

в лабораторной диагностике с 1989 года

EUROBlotMaster: автоматический процессор



- Полная автоматизация всех этапов анализа после внесения стрипов и образцов
- Стандартизация анализов: высокая точность и воспроизводимость
- До 30 стрипов в одной загрузке
- Возможность комбинировать различные наборы и конъюгаты в одной постановке анализа



RIDA® AllergyScreen (R-Biopharm)

в лабораторной диагностике с 1989 года

RIDA®AllergyScreen: панели для полуколичественного и/или количественного определения IgE в сыворотке



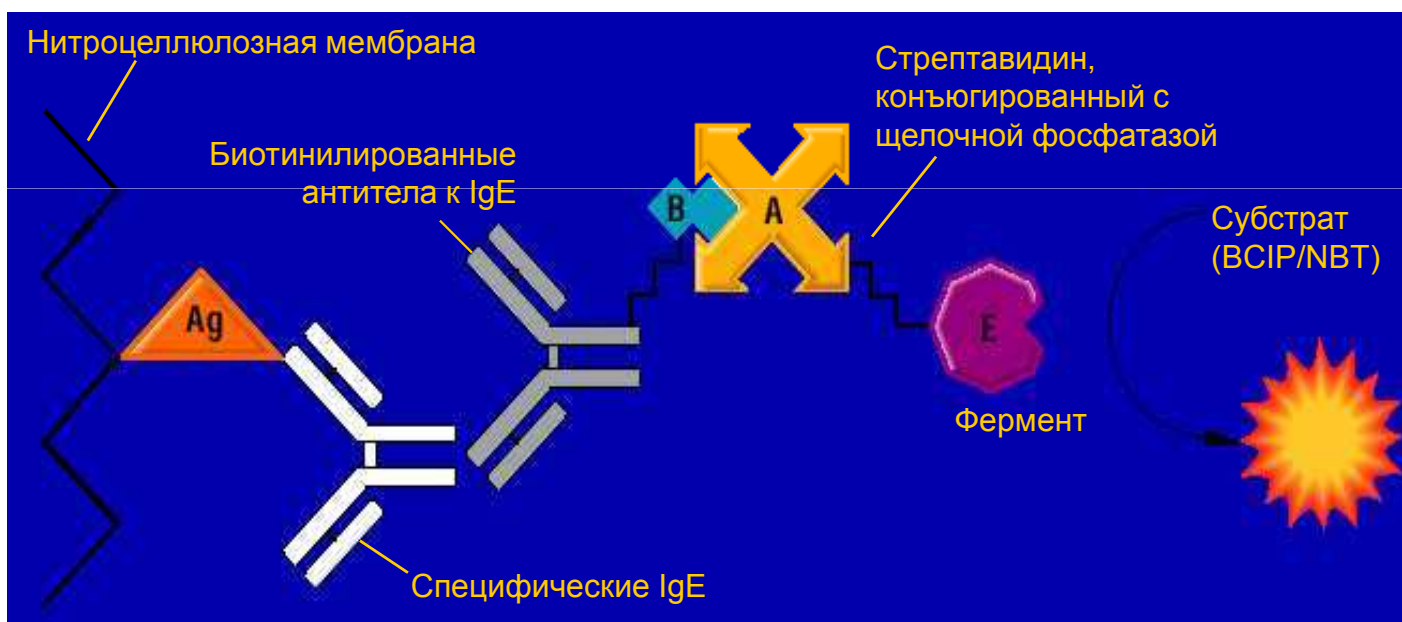
- Стандартные панели 1-4
- Панели А и В

Оценка результатов:

- Качественный или полуколичественный анализ по цветовому шаблону
- Количественный анализ с помощью прибора RIDA® X-Screen



Принцип RIDA® AllergyScreen



Время исследования: не более 2,5 часов

RIDA® AllergyScreen

в лабораторной диагностике с 1989 года

Каждый набор содержит
10 стрипов с одной
панелью аллергенов
(например, с
респираторной панелью)



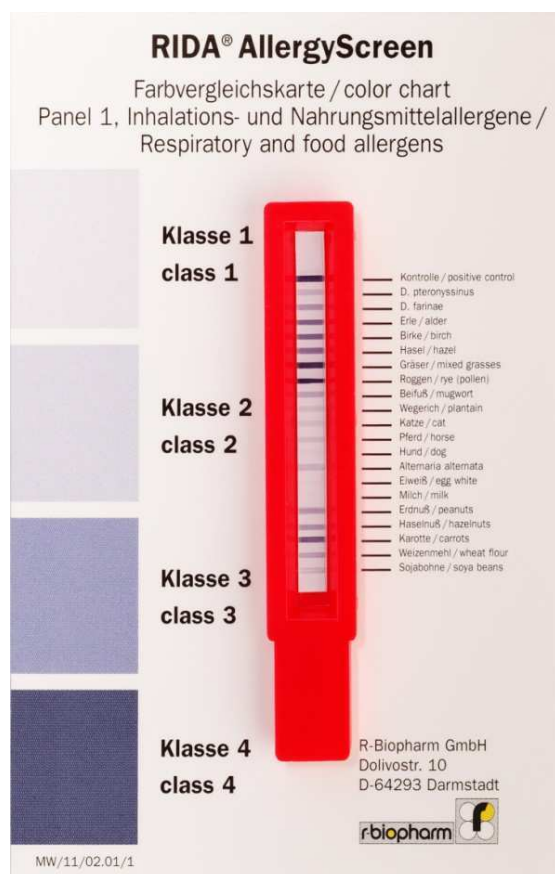
Состав панели аллергенов
кодируется цветом
пластикового корпуса:

1. Смешанная (респираторная / пищевая) - красная
2. Респираторная - голубая
3. Пищевая - зеленая
4. Педиатрическая - белая





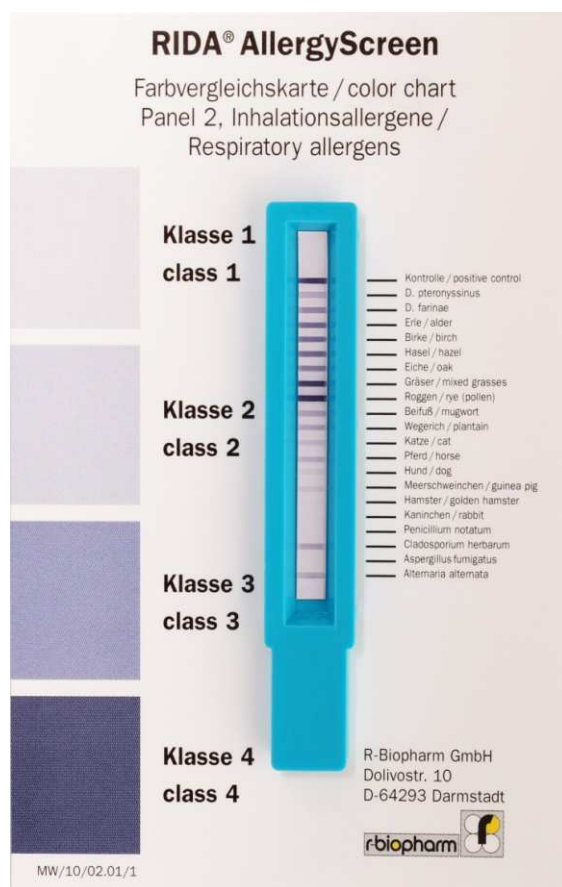
Смешанная панель: 13 респираторных + 7 пищевых аллергенов



	Положительный контроль
1	Клещ <i>Derm. pteronyssinus</i>
2	Клещ <i>Derm. farinae</i>
3	Ольха
4	Береза
5	Лещина
6	Смесь трав
7	Рожь (пыльца)
8	Полынь
9	Подорожник
10	Кошка
11	Лошадь
12	Собака
13	<i>Alternaria alternata</i>
14	Белок
15	Молоко
16	Арахис
17	Лесной орех
18	Морковь
19	Пшеничная мука
20	Соевые бобы



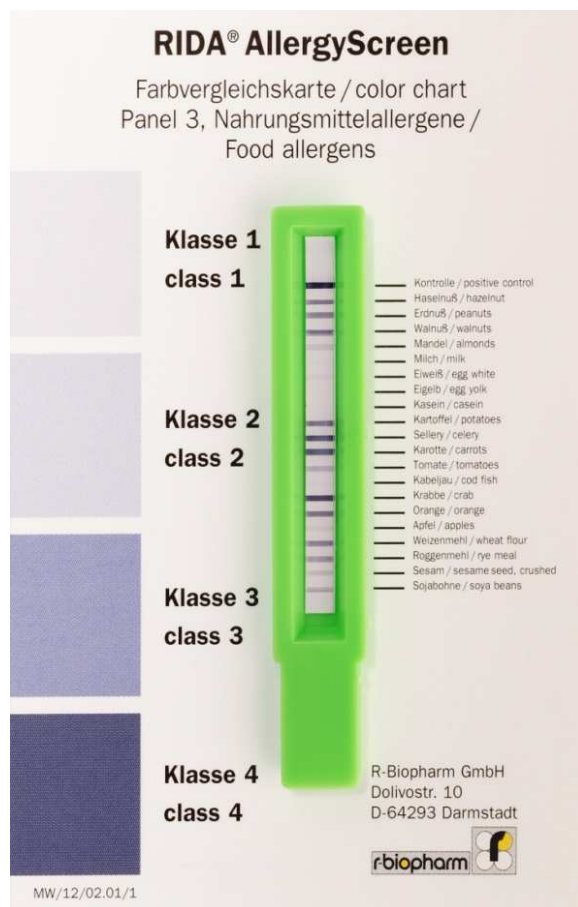
Респираторная панель



	Положительный контроль
1	Клещ <i>Derm. pteronyssinus</i>
2	Клещ <i>Derm. farinae</i>
3	Ольха
4	Береза
5	Лещина
6	Дуб
7	Смесь трав
8	Рожь (пыльца)
9	Полынь
10	Подорожник
11	Кошка
12	Лошадь
13	Собака
14	Морская свинка
15	Хомячок
16	Кролик
17	<i>Penicillium notatum</i>
18	<i>Cladosporium herbarum</i>
19	<i>Aspergillus fumigatus</i>
20	<i>Alternaria alternata</i>

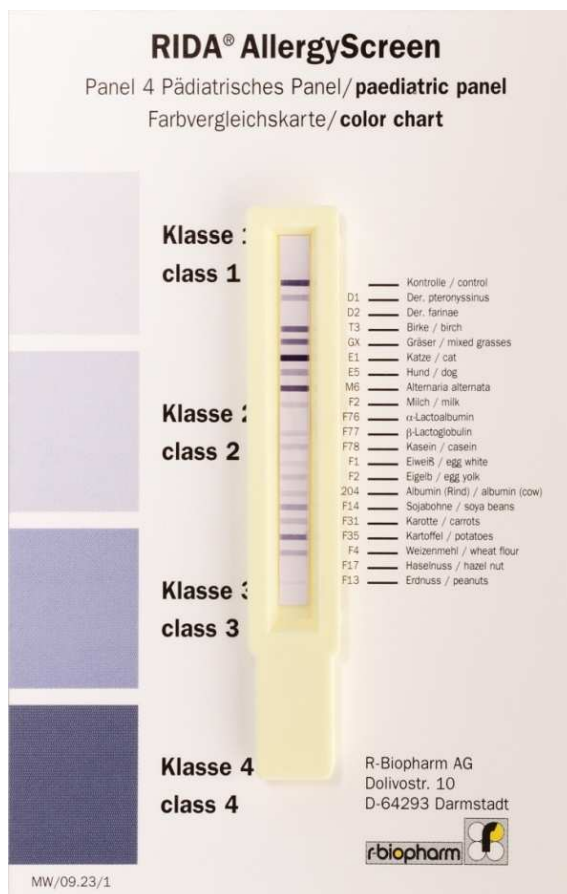


Пищевая панель



	Положительный контроль
1	Лесной орех
2	Арахис
3	Грецкий орех
4	Миндаль
5	Молоко
6	Яичный белок
7	Яичный желток
8	Казеин
9	Картофель
10	Сельдерей
11	Морковь
12	Томаты
13	Треска
14	Краб
15	Апельсин
16	Яблоко
17	Пшеничная мука
18	Ржаная мука
19	Кунжутное семя
20	Соевые бобы

Педиатрическая панель



	Положительный контроль
1	Клещ <i>Derm. pteronyssinus</i>
2	Клещ <i>Derm. farinae</i>
3	Береза
4	Смесь трав
5	Кошка
6	Собака
7	<i>Alternaria alternata</i>
8	Молоко
9	α-лактальбумин
10	β-лактоглобулин
11	Казеин
12	Яичный белок
13	Яичный желток
14	Бычий сывороточный альбумин
15	Соевые бобы
16	Морковь
17	Картофель
18	Пшеничная мука
19	Лесной орех
20	Арахис

Панели А и В

- 10 аллергенов плюс контроль
- Оценка с помощью цветового шаблона
- Только качественный или полуколичественный анализ



RIDA® AllergyScreen

в лабораторной диагностике с 1989 года

Предварительная
промывка стрипов

Убедитесь, что
мембраны полностью
смочены промывочным
буфером





RIDA® AllergyScreen

в лабораторной диагностике с 1989 года

По окончании промывки удалите остатки жидкости, постукивая перевернутыми кассетами по чистому листу бумажного полотенца



RIDA® AllergyScreen

в лабораторной диагностике с 1989 года

Внесите пипеткой в углубление каждой кассеты по 250 мкл сыворотки пациента.

Используйте для каждого образца индивидуальный наконечник пипетки.





RIDA® AllergyScreen

в лабораторной диагностике с 1989 года

Инкубируйте стрипы в течение 45 мин. на рокерном шейкере (30 качаний в минуту) при комнатной температуре





RIDA® AllergyScreen

в лабораторной диагностике с 1989 года

Промойте стрипы
промывочным буфером, держа
планшет с кассетами в
вертикальном положении.
Избегайте попадания
сывороток с одних кассет на
другие



Последняя инкубация (20 мин. на рокерном шейкере) должна проводиться в темноте при комнатной температуре. Используйте пенал для инкубации

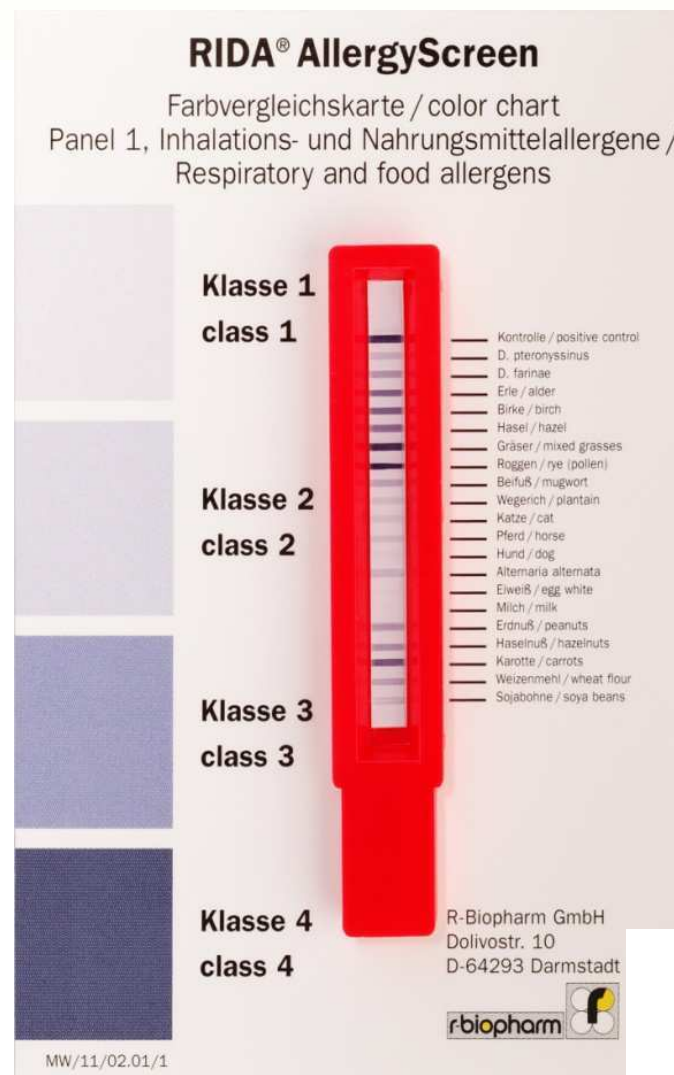
Обязательно: **высушить стрипы перед измерением**



RIDA® AllergyScreen

в лабораторной диагностике с 1989 года

Оценка результатов
может быть также
проведена визуально, с
помощью цветового
шаблона, вложенного в
набор



RIDA® AllergyScreen

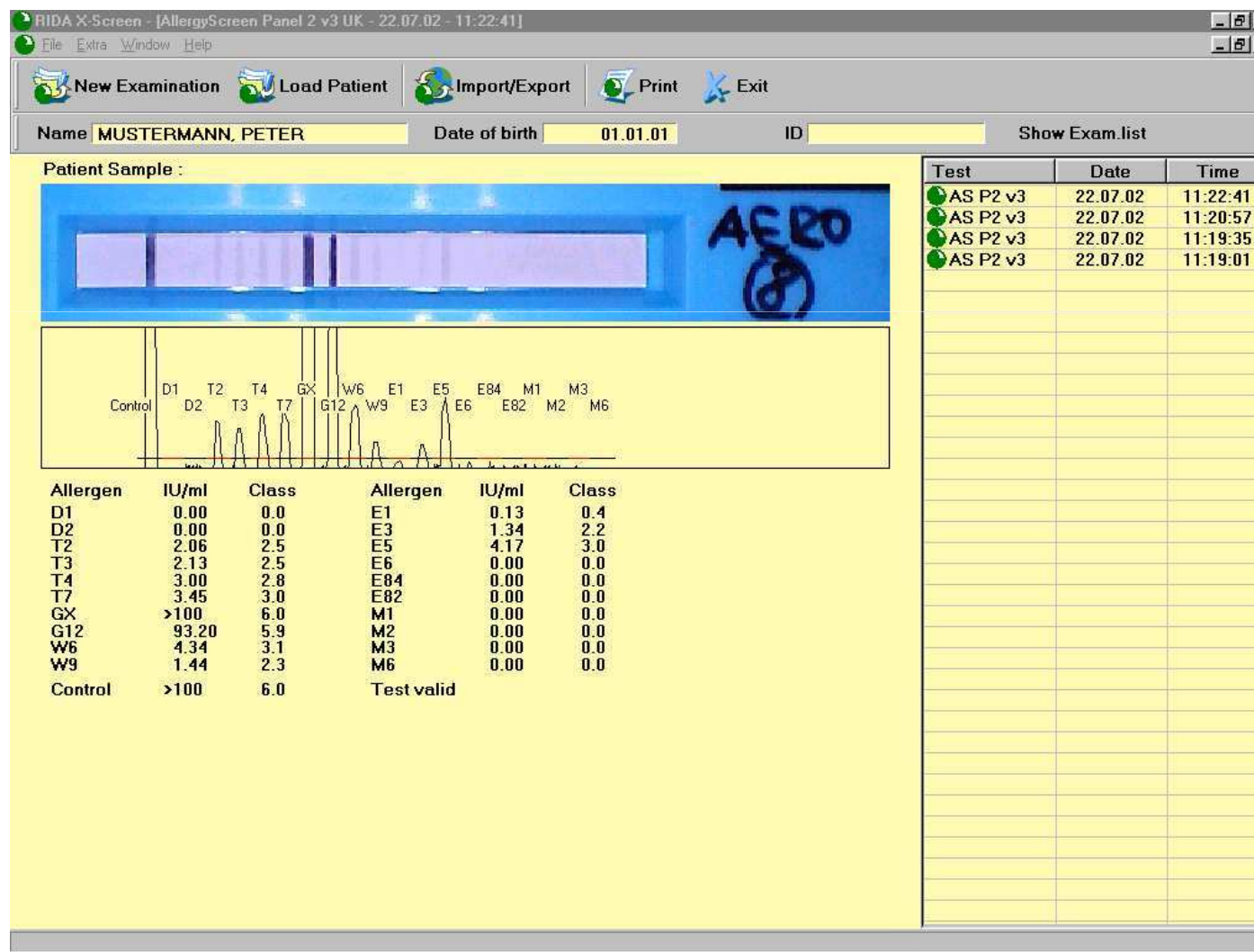
в лабораторной диагностике с 1989 года

Количественный анализ проводится с использованием экспресс-фотометра RIDA® X-Screen и соответствующего программного обеспечения





Результаты выражены в МЕ/мл или в единицах шкалы аллергореактивности (с точностью до 0,1)
Возможен экспорт результатов в текстовые файлы



RIDA® X-Screen

Распечатка результатов анализа



Assay Report

AllergyScreen Panel 1 v4 RUS

RIDA®

X-Screen

created by

created for

ДГП №121ЮАО ЦЛД иммунодефицитных состояний и оппортунистических инфекций

POZDEEV, IV.

П№

Б№

DOB

Gender

Date

59-6.10.05

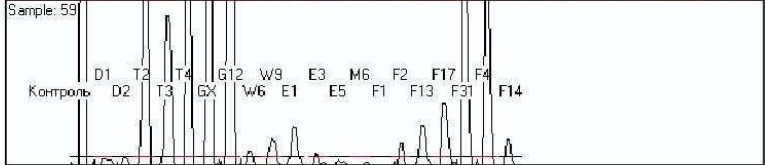
06.09.1999

male

10.10.2005 - 14:20:45

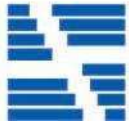


Sample: 59



Allergen Code	Allergen Name	IU/ml	Class	Valuation
D1	Клещ D.Pteronyssinus	0.23	0.6	Отсутствуют или ниже порога
D2	Клещ D.Farinae	0.00	0.0	Отсутствуют или ниже порога
T2	Ольха - пыльца	6.86	3.2	Значительно увеличенный уровень
T3	Береза - пыльца	4.72	3.0	Значительно увеличенный уровень
T4	Лещина - пыльца	6.66	3.2	Значительно увеличенный уровень
GX	Смесь трав - пыльца	6.30	3.2	Значительно увеличенный уровень
G12	Рожь - пыльца	17.32	3.9	Значительно увеличенный уровень
W6	Полынь - пыльца	0.29	0.8	Отсутствуют или ниже порога
W9	Подорожник - пыльца	0.81	2.0	Умеренно увеличенный уровень
E1	Кошка - эпителий и шерсть	1.11	2.1	Умеренно увеличенный уровень
E3	Лошадь - эпителий и шерсть	0.19	0.5	Отсутствуют или ниже порога
E5	Собака - эпителий и шерсть	0.00	0.0	Отсутствуют или ниже порога
M6	Грибок Alternaria	0.00	0.0	Отсутствуют или ниже порога
F1	Яйцо - белок	0.00	0.0	Отсутствуют или ниже порога
F2	Молоко	0.16	0.4	Отсутствуют или ниже порога
F13	Арахис	0.93	2.0	Умеренно увеличенный уровень
F17	Лесной орех - фундук	1.37	2.2	Умеренно увеличенный уровень
F31	Морковь	6.75	3.2	Значительно увеличенный уровень
F4	Пшеница - мука	3.86	3.0	Значительно увеличенный уровень
F14	Соя - бобы	0.47	1.3	Пороговый уровень
Контроль		>100	6.0	Test valid

врач



Сравнение AllergyScreen с ImmunoCAP и кожными пробами

- Вид исследования: ретроспективное сравнение результатов внутрикожной пробы, анализа CAP-FEIA и AllergyScreen для ингаляционных аллергенов.
- Аллергены: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, березовая пыльца, травяная пыльца, полынь; шерсть и эпителий кошки, лошади и собаки; *Alternaria*
- Оценивали: чувствительность и специфичность разных тестов относительно друг друга
- Образцы : 142 сыворотки больных с клиническими симптомами аллергии
- 737 пар данных (по разным аллергенам): кожные пробы против RIDA® AllergyScreen.
- 881 пар данных: RIDA® AllergyScreen против ImmunoCAP

Чувствительность

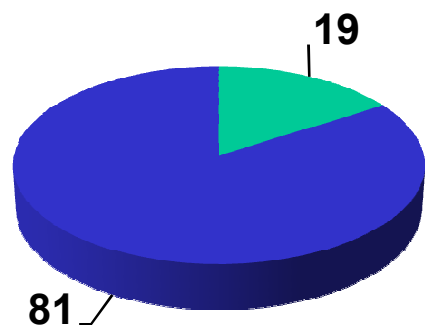
	Кожные пробы	CAP
Клещ <i>Der. pteronissinus</i>	97,8	83,9
Клещ <i>Der. farinae</i>	91,8	86,5
Пыльца березы	98,3	88,2
Пыльца трав	98,6	91,1
Полынь	88,5	94,4
Кошка	95,4	74,2
Лошадь	100	73,7
Собака	94,4	73,3
<i>Alternaria alternata</i>	90,9	93,3
Среднее значение	95,1	84,3

Специфичность

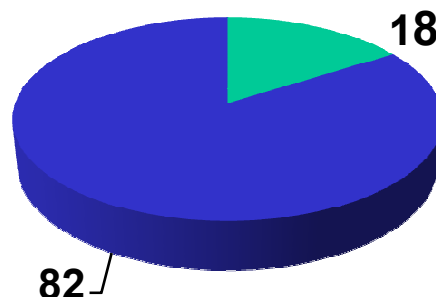
	Кожные пробы	CAP
Клещ <i>Der. pteronissinus</i>	83,5	98,7
Клещ <i>Der. farinae</i>	84,0	90,7
Пыльца березы	87,1	96,9
Пыльца трав	82,6	88,7
Полынь	82,1	94,6
Кошка	50,0	98,7
Лошадь	77,8	97,5
Собака	78,9	89,5
<i>Alternaria alternata</i>	96,3	100,0
Среднее значение	80,2	95,0



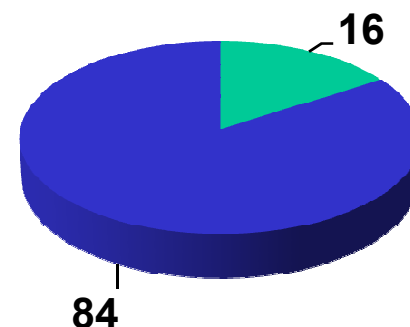
AllergyScreen – ImmunoCAP – Advia-Centaur



AS – CAP



AS – AC



CAP-AC

Совпадение результатов: 81,25 – 83,75%



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !