

ЗАО «Вектор-Бест»

НАБОРЫ ЗАО ВЕКТОР-БЕСТ - АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА IN VITRO

Решетников С.С.
лаб. иммунохимии

Аллергия

- Специфическая повышенная чувствительность к антигенам (аллергенам) в результате неадекватной реакции иммунной системы
 - Гиперчувствительность немедленного типа, обусловленная иммунными механизмами
-

Распространенность аллергических заболеваний

(Р.М. Хаитов, И.С. Гуцин, 1998)

Западная Европа 25 - 30%

Отдельные экологически
неблагоприятные регионы 50 - 60%

Промышленные районы России 15 - 35%

Заболеваемость среди детей
в крупных промышленных городах 10 - 40%

Нозологические формы, преобладающие в структуре аллергических заболеваний (Л.В. Лусс и др.)

Заболевание	Распространённость в структуре аллергических заболеваний
Бронхиальная астма	23 - 60 %
Поллиноз: аллергический ринит, аллергический конъюнктивит	10 - 70%
Аллергодерматозы (атопический дерматит, острая крапивница и др.)	7 - 73 %
Лекарственная и пищевая аллергия	10 - 30%
Инсектная аллергия	0,5 - 3,5 %
Анафилактический шок	0,5 - 1,5%
Прочие аллергические заболевания	3,5 - 5,2 %

Специфическая диагностика
аллергических заболеваний -
это комплекс методов,
направленных на выявление
аллергена или группы
аллергенов, вызывающих
заболевание у данного
больного.

Аллергены вокруг нас



Пыльца растений



Шерсть, эпидермис, выделения животных



Домашняя пыль, клещи домашней пыли



Яды насекомых



Плесневые и дрожжеподобные грибы, бактерии и простейшие



Пищевые аллергены



Профессиональные аллергены



Лекарства



Ароматы парфюмерии, косметики,
ароматических свечей, порошков и т.д.



Покровы и выделения насекомых



ШЕСТЬ ВИДОВ АЛЛЕРГИИ

РЕСПИРАТОРНАЯ (ДЫХАТЕЛЬНАЯ) АЛЛЕРГИЯ.

КОЖНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ АЛЛЕРГИИ - АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ДЕРМАТОЗЫ.

АЛЛЕРГИЯ К ПИЩЕВЫМ ПРОДУКТАМ - ПИЩЕВАЯ АЛЛЕРГИЯ.

АЛЛЕРГИЯ НА НАСЕКОМЫХ - ИНСЕКТНАЯ АЛЛЕРГИЯ.

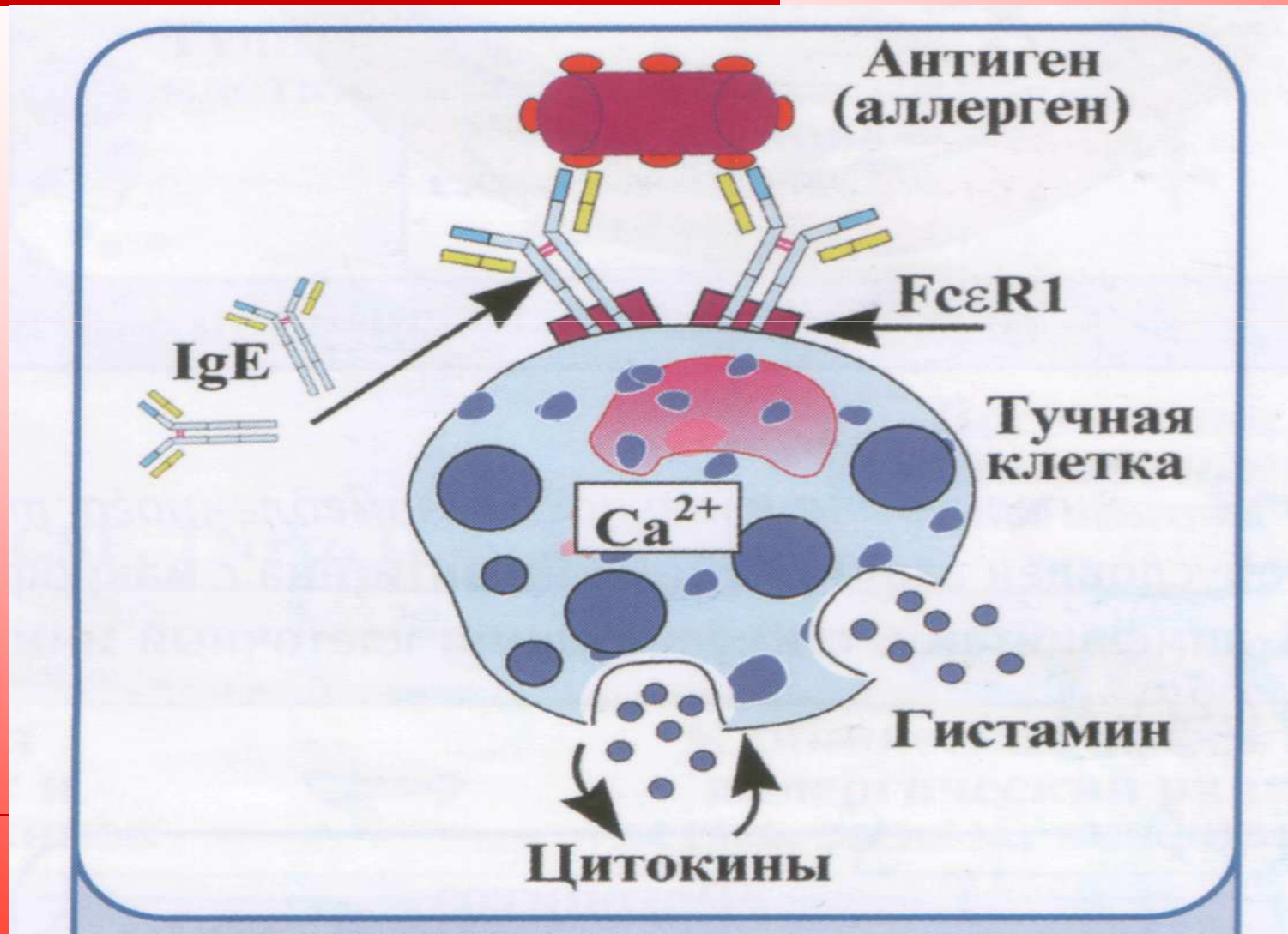
ЛЕКАРСТВЕННАЯ АЛЛЕРГИЯ.

ИНФЕКЦИОННАЯ АЛЛЕРГИЯ.

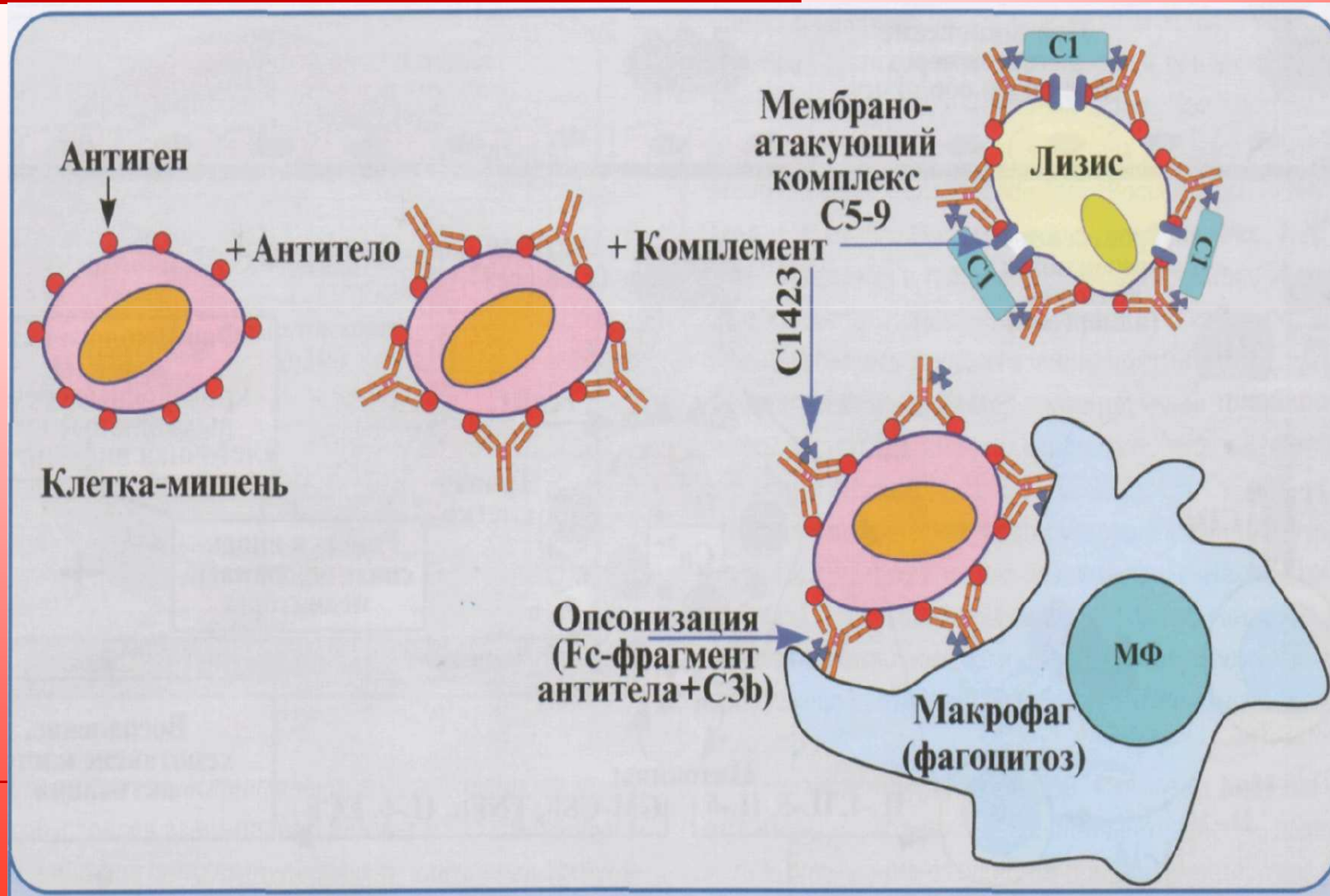
Типы аллергии

- I тип – реактивный (IgE, тучные клетки, гистамин и др. медиаторы воспаления)
 - II тип – цитотоксический (IgG, IgM, комплемент, макрофаги)
 - III – иммунокомплексный (ИК, в осн. с участием IgG, комплемент, нейтрофилы и др. клетки воспаления)
-

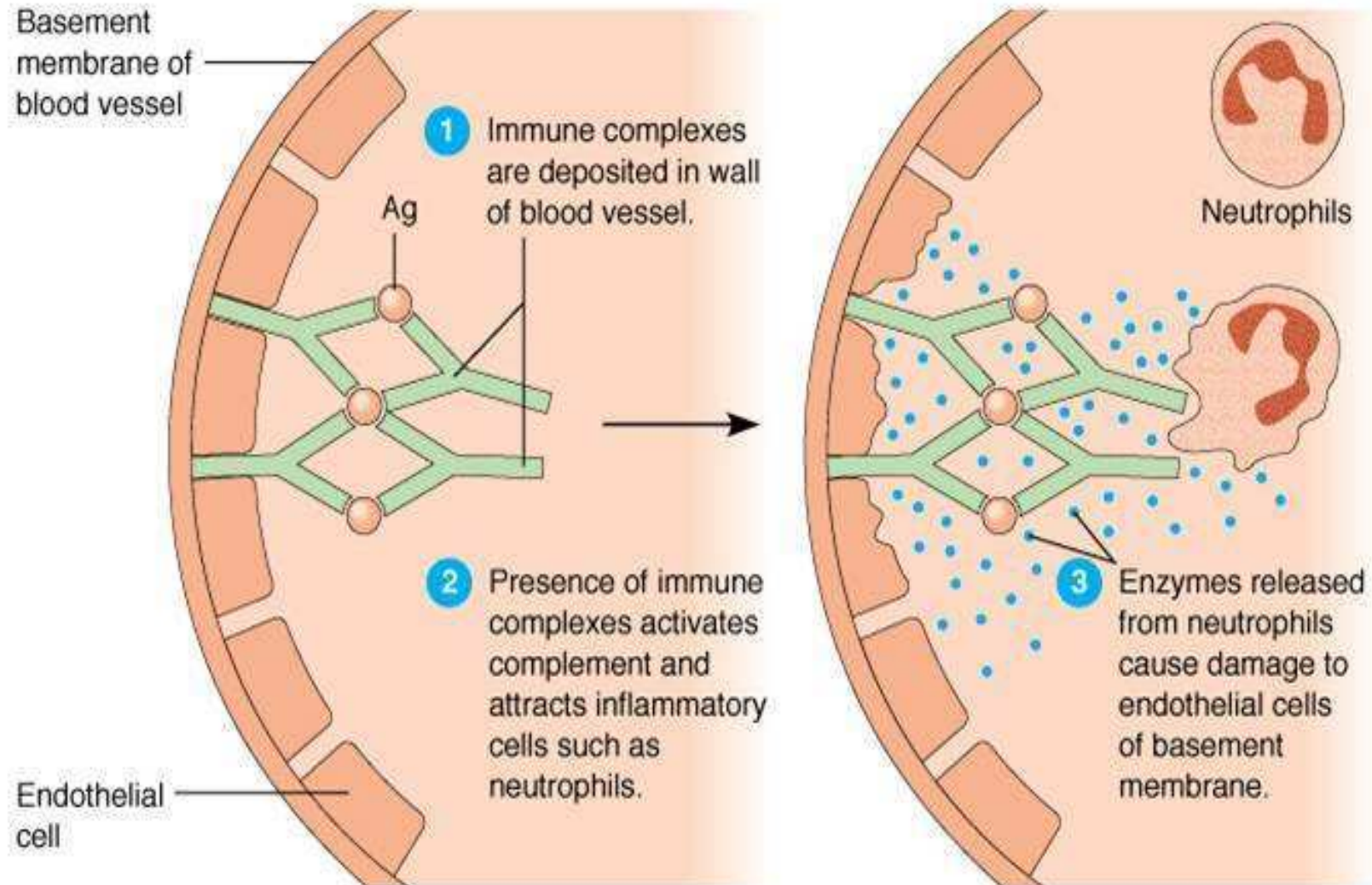
Тип I (реагиновый)



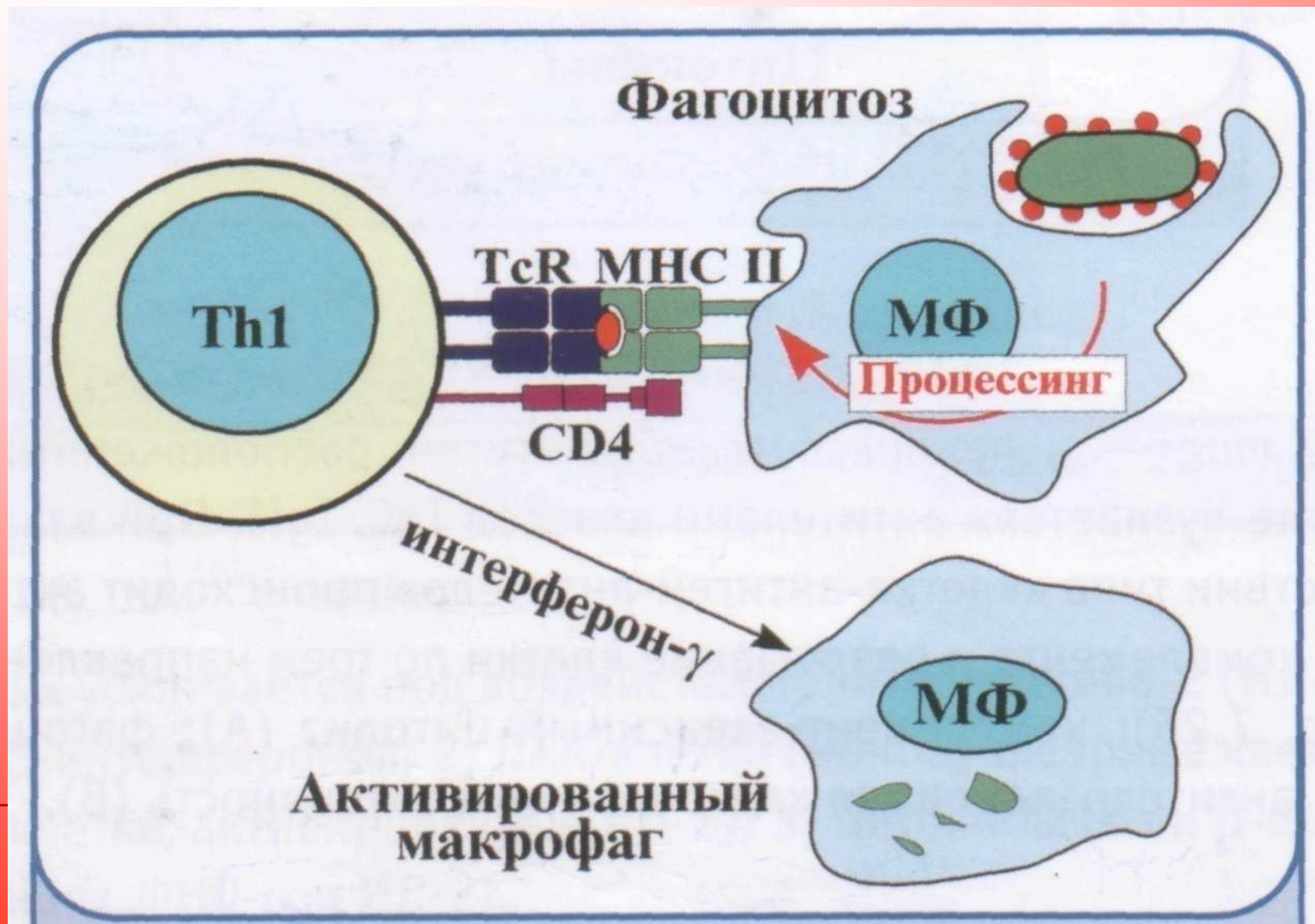
Тип II (цитотоксический)

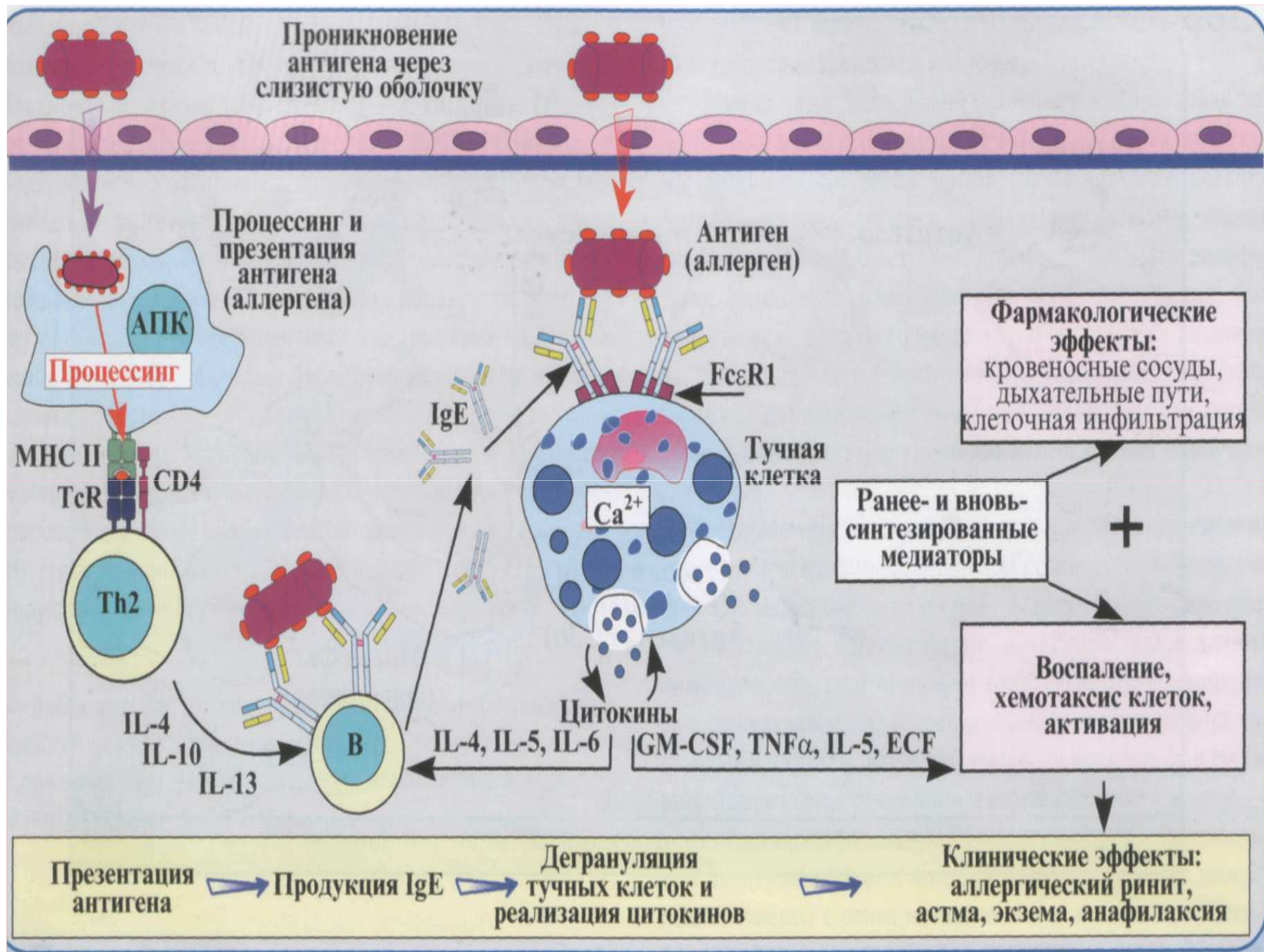


Тип III (иммунокомплексный)



Тип IV (без участия антител)





Классический алгоритм аллергодиагностики

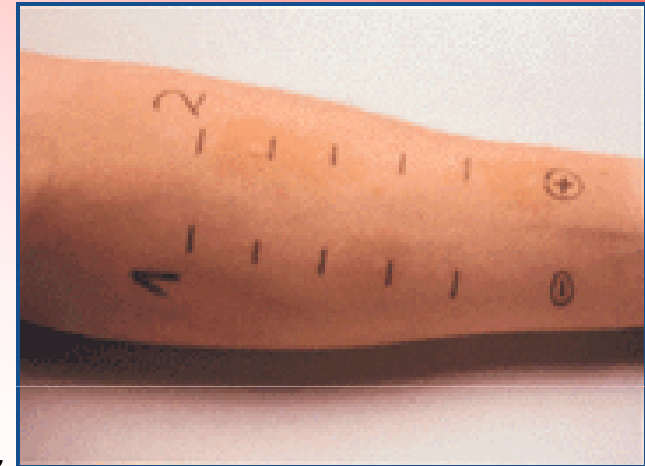
- Сбор анамнеза острой клиники и ремиссии;
 - постановка кожных аллергических проб;
 - проведение провокационных тестов;
 - проведение специфической аллергодиагностики *in vitro*.
-

Диагностика in vivo

- Кожные пробы (аппликационные, скарификационные, внутрикожные)
 - Провокационные тесты конъюнктивальный, назальный, ингаляционный, сублингвальный, лейкоцитопенический, холодовой, тепловой
 - Элиминационный метод
-

Диагностика *In vivo*:

- Кожные пробы (аппликационные, скарификационные, внутрикожные)
- Провокационные тесты конъюнктивальный, назальный, ингаляционный, сублингвальный лейкоцитопенический, холодовой, тепловой
- Элиминационный метод



Диагностика *In vitro*:

- ❑ Общий IgE
- ❑ Специфический IgE
- ❑ Специфический IgG (IgG4)
- ❑ *Гистамин, сульфолейкотриены и другие медиаторы аллергических реакций, цитокины и ферменты воспаления*
- ❑ *Уровень экспрессии трансмембранных белков-маркеров активации иммунокомпетентных клеток*
- ❑ *Различные субпопуляции лимфоцитов, участвующие в иммунном ответе, и их функциональная активность*

In vitro

- Общий IgE**
 - Специфический IgE**
 - Специфические IgG (IgG4)**
 - ECP
 - Триптаза
 - BDT
 - CAST
 - CIE
 - CRIE
 - Иммунодиффузия
-

Преимущества использования тестов *In vitro*

- - Нет противопоказаний к обследованию.
 - - Не вызывают дополнительной сенсibilизации, нет риска анафилактических реакций.
 - - Нет возрастных ограничений, возможно проводить в самом раннем возрасте.
 - - Любое число тестируемых аллергенов, выявление поливалентной сенсibilизации.
 - - Использование сыворотки для исследования в любой лаборатории (тесты на расстоянии).
-

Показания к определению общего IgE

1. Первичная диагностика атопии.
2. Первичная и вторичная профилактика аллергии.
3. При первичных иммунодефицитных состояниях.
4. При IgE-миеломе.
5. Вспомогательный метод диагностики гельминтозов.

Показания к определению специфических IgE

- ❑ Необходимость уточнения причинно-значимого аллергена во всех случаях, особенно при сомнительных результатах кожного тестирования
 - ❑ Дифференциальная диагностика аллергических и неаллергических (псевдоаллергических) заболеваний
 - ❑ Выявление скрытой (субклинической) сенсibilизации – обнаружение высоких уровней специфических IgE-антител при отсутствии клинических проявлений свидетельствует о повышенном риске возникновения аллергических реакций на данные аллергены.
-

Показания к определению специфических IgE

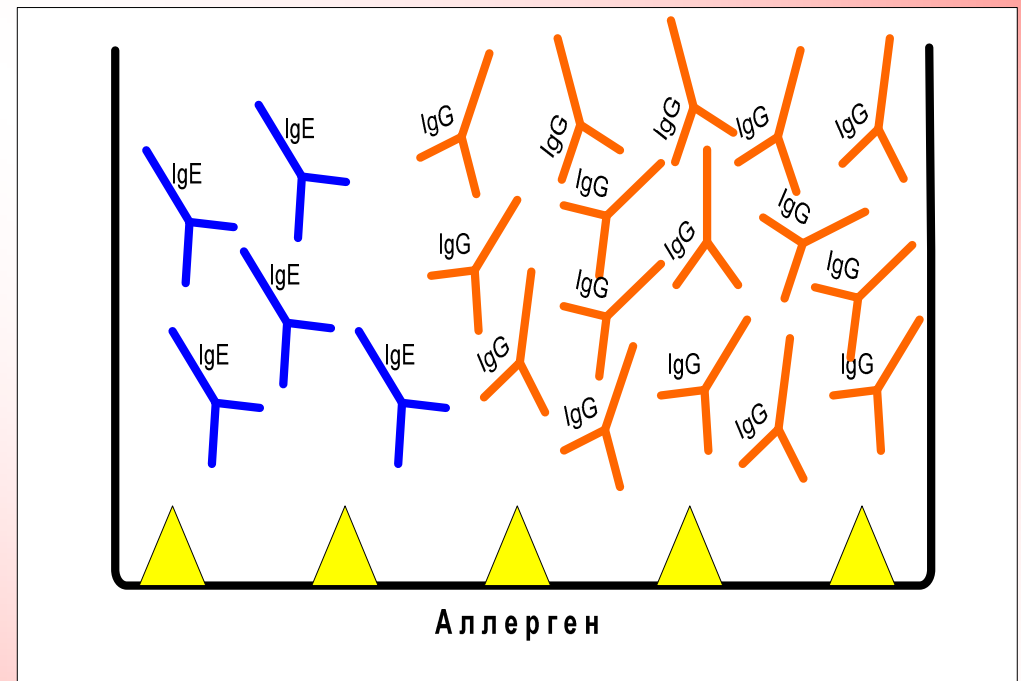
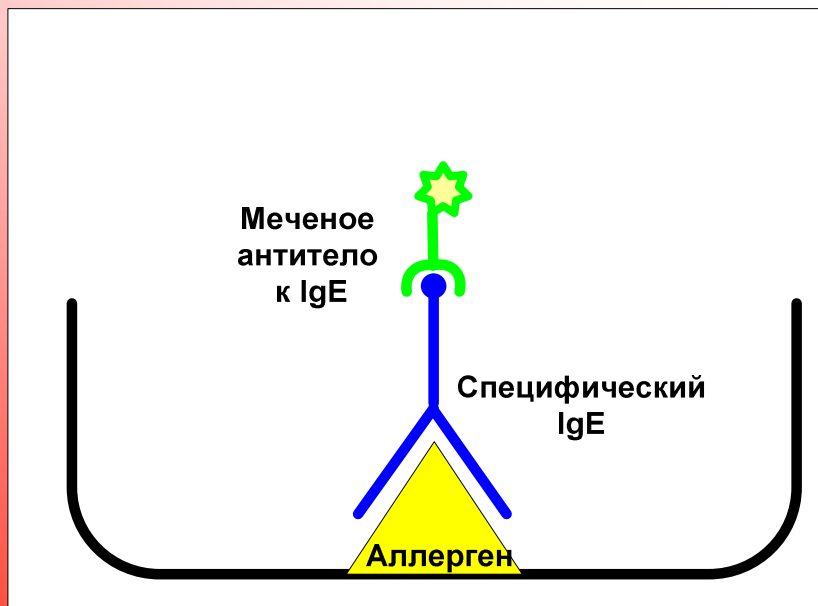
- Мониторинг концентрации IgE при проведении специфической иммунотерапии.
 - Затруднение или невозможность проведения тестов *in vivo*:
 - ранний детский возраст;
 - пациенты с высокой степенью сенсibilизации;
 - обострение основного заболевания;
 - декомпенсированные состояния болезней сердца, печени, почек и системы крови;
 - период после острой аллергической реакции;
 - невозможность отмены антигистаминных, гормональных и других препаратов;
 - измененная реактивность кожи;
 - исследование с большим количеством аллергенов одновременно.
-

Классификация тест-систем по принципу анализа

- аллергосорбентный тест
- реверсивный аллергосорбентный тест
(«capture» метод)

Аллергосорбентный тест

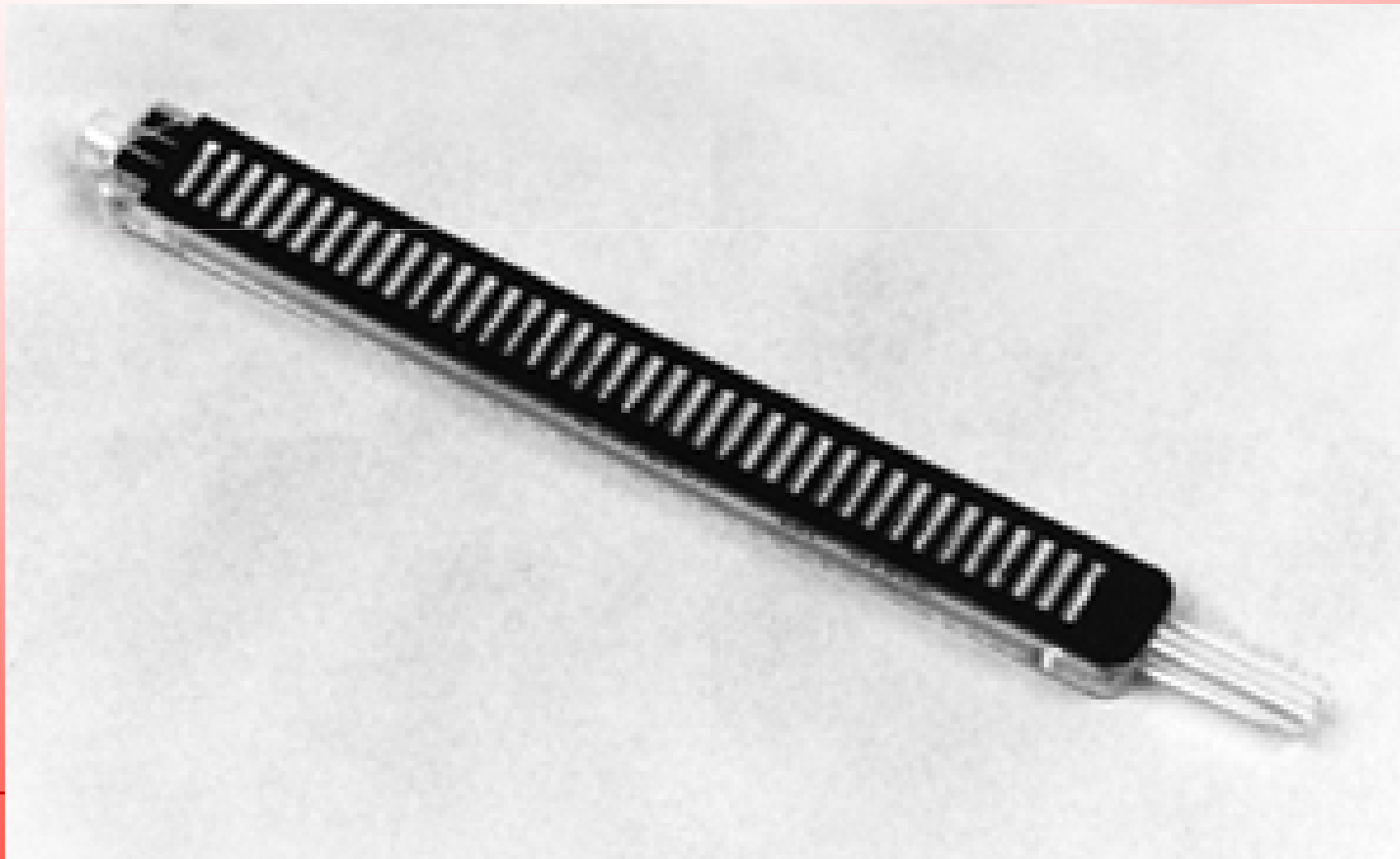
Аллергены иммобилизованы на твердой фазе
(лунка, бумажный диск, нитроцеллюлозная мембрана
или нить)



Особенности аллергосорбентных тест-систем

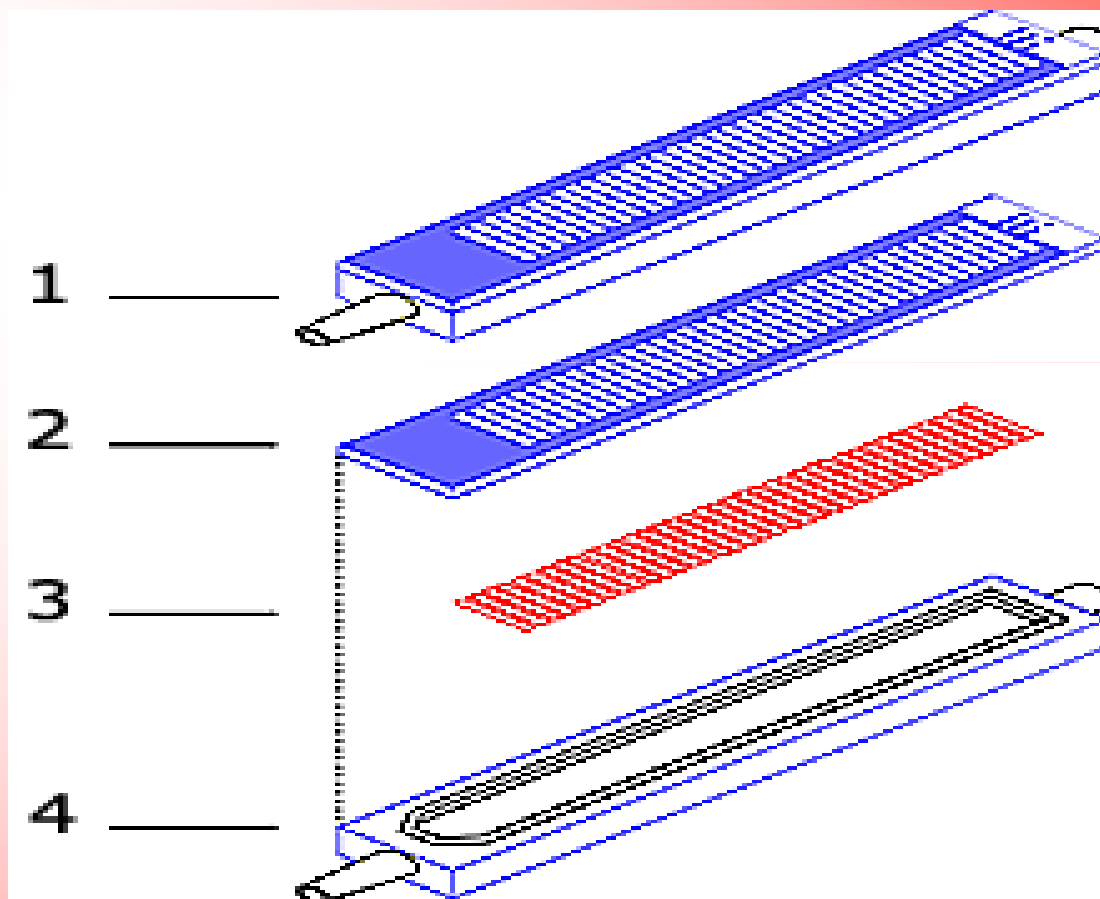
- Высокие требования к сорбционной ёмкости
твёрдой фазы.
- Фиксированные наборы аллергенов на носителе
(лунки планшета, мембранные полоски).
- Для тест-систем на дисках: большая
трудоёмкость, невозможность полной
автоматизации.
- Количественный или полуколичественный
результат.

Множественный аллергосорбентный тест
(МАСТ-панели)
RIDA AllergyScreen (R-Biopharm)



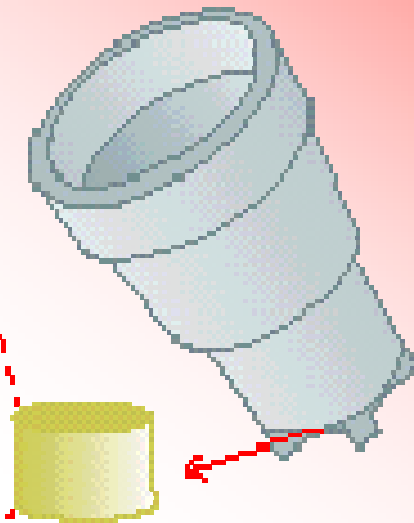
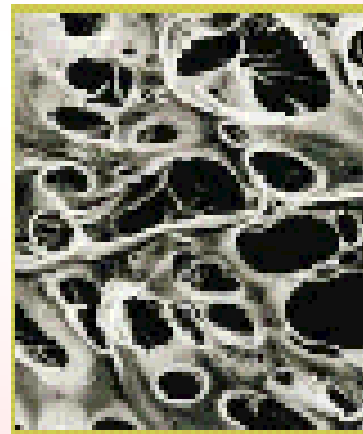
Устройство МАСТ-панели

- 1- панель в сборе
- 2 – крышка
- 3 – основа с пс-нитями с нанесёнными аллергенами
- 4 – корпус панели



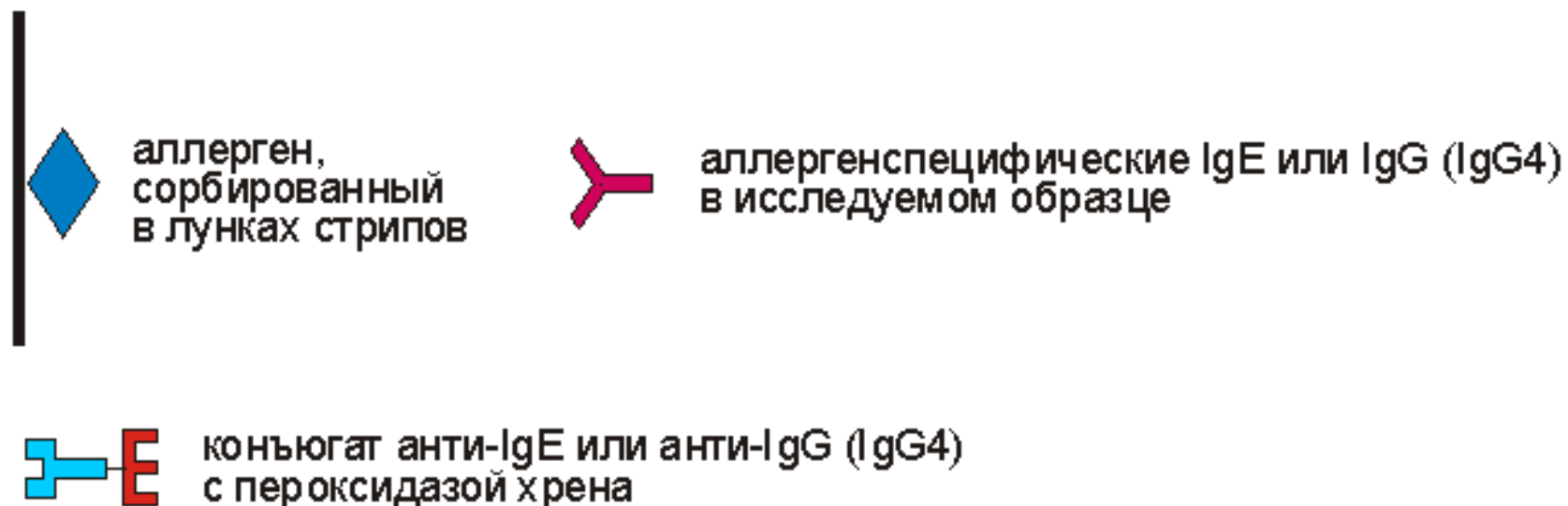
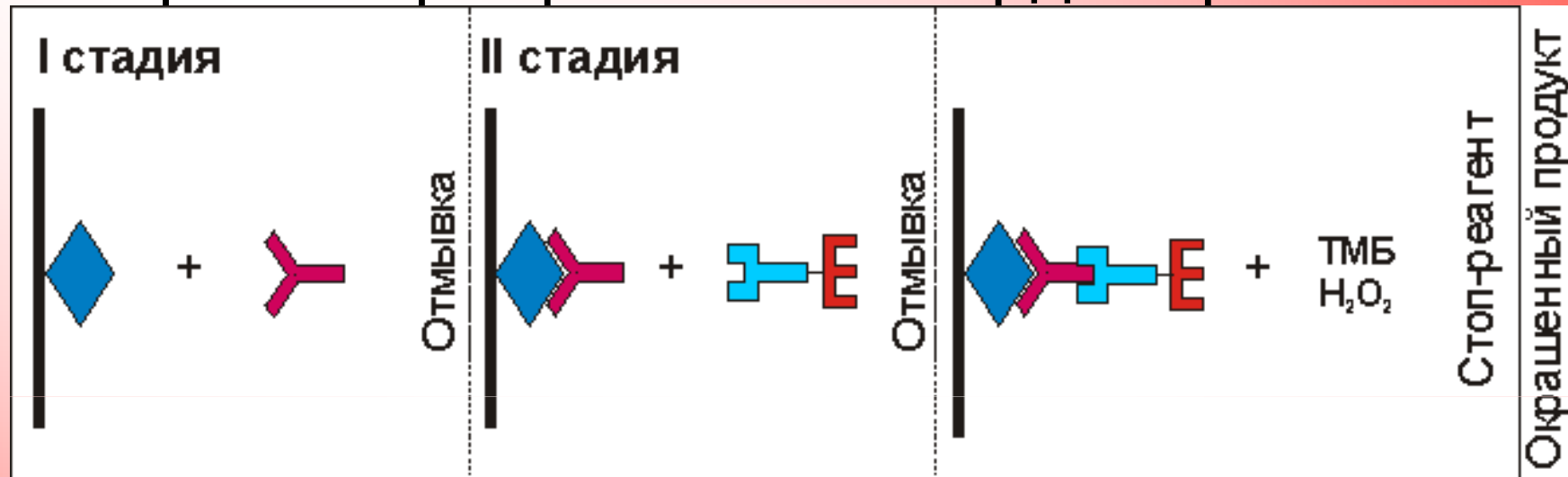
ImmunoCAP

Аллерген сорбирован на пористой основе



ИФА аллергенспецифических IgE или IgG (IgG4)

Аллерген сорбирован на твердой фазе



Недостатки варианта (1)

- ❑ Аллерген может быть экранирован от специфического IgE специфическими IgG, которых в сыворотке крови обычно намного больше.
 - ❑ Таким образом можно пропустить IgE-зависимый компонент заболевания.
-

Недостатки варианта

- ❑ Зависимость от носителя - при сорбции на твёрдой фазе аллерген может изменить свою конформацию или др. свойства.
 - ❑ В результате может возрасти фон, может снизиться специфичность реакции, может увеличиться процент ложноотрицательных и, особенно, ложноположительных реакций
-

Неудобства метода

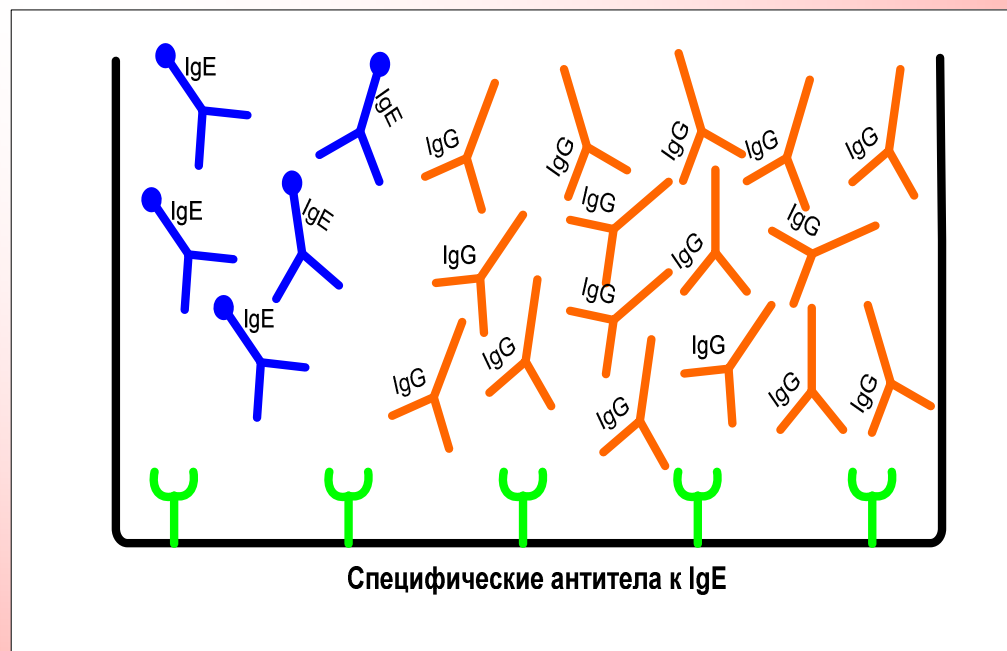
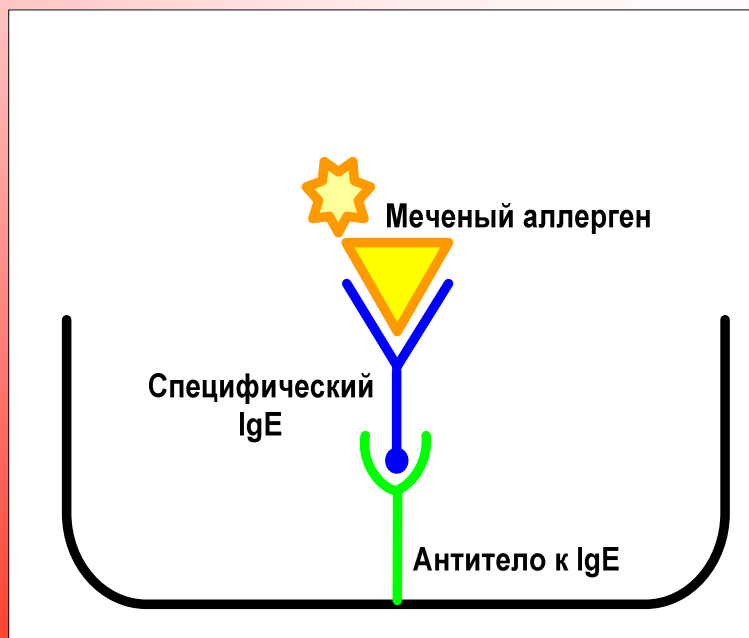
- ❑ Для 8-луночного цельного стрипа с одним иммобилизованным аллергеном, нужно накопить сразу 8 образцов сыворотки
 - ❑ На стрипе с набором из 8 аллергенов часть из них почти всегда остаётся невостребованной
 - ❑ Оперативные возможности индивидуального подбора аллергенов на стрипах ограничены
-

Экономические ограничения

- в импортных наборах стрип с аллергеном на 8 анализов стоит примерно столько же, сколько стоит комплект аллергодисков на 24 анализа или флакон жидких аллергенов на те же 24 анализа
-

Реверсивный аллергосорбентный тест («capture», REAST)

- Используются жидкие биотинилированные аллергены
- На твёрдой фазе иммобилизованы антитела к IgE

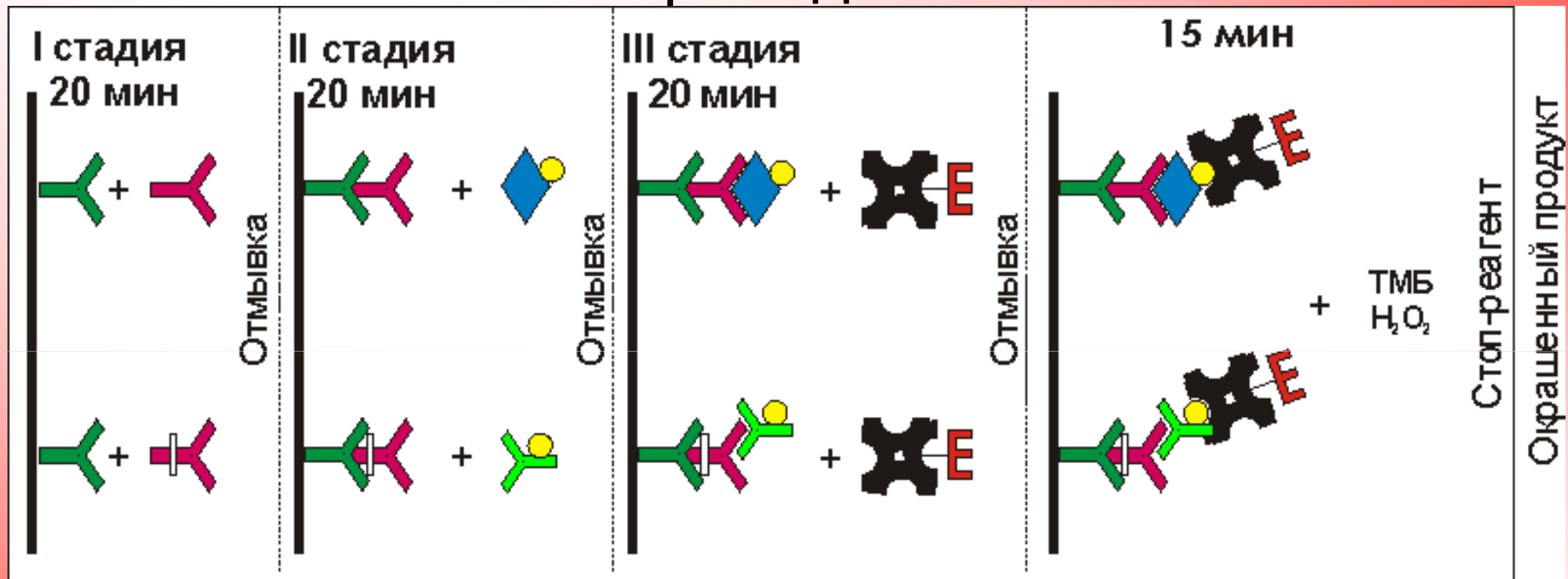



Особенности реверсивных аллергосорбентных тест-систем

- Емкость и другие свойства твердой фазы имеют меньшее значение.
- Нет фиксированных панелей аллергенов – свободный выбор аллергенов в каждом анализе.
- Облегчается постановка анализа на автоматах.
- Количественный результат.

“IgE-Аллергоскрин-ИФА-Бест”


Схема проведения ИФА




 МКАТ к IgE сорбированные в лунках стрипов

 аллергенспецифический IgE в исследуемом образце

 меченный биотином аллерген

 стрептавидин с пероксидазой хрена (конъюгат №2)

 IgE в калибраторах

 меченные биотином антитела к IgE (конъюгат №1)

Комплектация набора:

- ❑ Планшет с моноклональными АТ к IgE
- ❑ Конъюгат 1 (монокл. АТ к IgE с биотином)
- ❑ Конъюгат 2 (стрептавидин с пероксидазой хрена)
- ❑ Калибраторы IgE от 0 до 100 МЕ/мл
- ❑ КС, содержащая специфич. IgE, и 2 контрольных аллергена с биотином для проверки работоспособности набора
- ❑ Все остальные необходимые компоненты

Некоторые характеристики набора

- Высокая специфичность и чувствительность
- Количественная оценка результатов в МЕ/мл или в классах (от 0 до 6)
- объём исследуемого образца – 50 мкл (на каждый аллерген)
- расход аллергена на анализ – 20 мкл
- срок годности набора – 12 месяцев
- С набором могут использоваться жидкие биотинилированные аллергены некоторых других производителей (например, Dr. Fooke, Radim)

Режим проведения анализа

- Анализ осуществляется в ручном режиме или на автомате, например, типа «Лазурит» в 3 стадии, общее время анализа – 1 час 15 мин (20+20+20+15мин).
-

Аллергены

- ❑ Необходимые для исследования жидкие биотинилированные аллергены заказываются отдельно.
 - ❑ В каталог фирмы Вектор-Бест включены около 400 жидких микстов и индивидуальных аллергенов, вероятно этот список будет увеличиваться и далее.
 - ❑ Набор адаптирован для работы с жидкими аллергенами некоторых других фирм, например, с аллергенами фирм "Dr. Fooke" и "Radim".
-

Индивидуальные аллергены

- D-6102 Аллерген шерсти кошки
 - D-6203 Аллерген дафнии
 - D-6307 Аллерген домового грибка
 - D-6403 Аллерген описторхиса
 - D-6605 Аллерген клёна
ясенелистного
 - D-6901 Аллерген трески
 - D-6937 Аллерген биодобавки E 322
(лецитин)
-



Миксты аллергенов

Эпидермальные и белки
животного происхождения

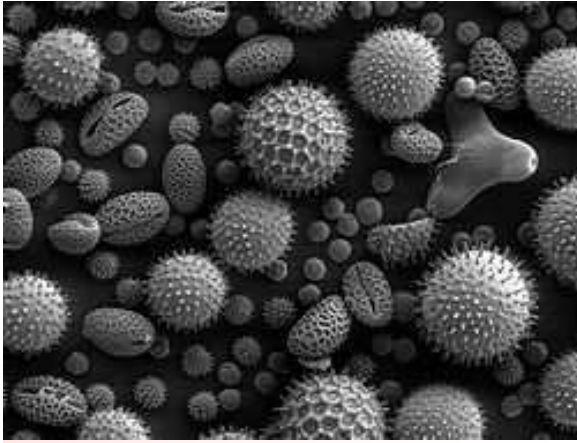
- 1. D-6197 Аллерген «Грызуны микст 5» Состав: морская свинка, кролик, золотистый хомячок (шерсть), мышь, крыса (эпителий)
- 2. D-6198 Аллерген «Перо микст 6» Состав: голубь, гусь, курица, утка (оперение)
- 3. D-6199 Аллерген «Животные микст 17» Состав: кошка, лошадь, корова, собака, овца (все – эпителий), гусь, курица (оперение)



Миксты аллергенов

Бытовые аллергены, насекомые и яды

- 4. D-6296 Аллерген «Клеши домашней пыли микст 4» Состав: Dermatophagoides pteronyssinus (d1), Dermatophagoides farinae (d2)
- 5. D-6297 Аллерген «Бытовые аллергены микст М» Состав: кошка, собака (эпителий), Dermatophagoides pteronyssinus (d1), Dermatophagoides farinae (d2), Cladosporium spp., Aspergillus fumigatus
- 6. D-6298 Аллерген «Бытовые аллергены микст Н3» Состав: Dermatophagoides pteronyssinus (d1), Dermatophagoides farinae (d2), рыжий таракан (пруссак), Penicilium notatum, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Alternaria tenius
- 7. D-6299 Аллерген «Пыль микст 5» Состав: пыль от молотьбы, сенная пыль, соломенная пыль, пыль от молотьбы пшеницы
-



Миксты аллергенов

- ❑ Грибковые D-6399 Аллерген «Плесневые грибы микст 14»
Состав: *Penicilium notatum*, *Cladosporium* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Mucor racemosus*, *Candida albicans*
- ❑ Пыльцевые D-6699 Аллерген «Сорные травы микст 27»
Состав: амброзия полыннолистная, полынь обыкновенная (чернобыльник), нивяник обыкновенный (поповник), одуванчик лекарственный
- ❑ Пищевые D-6995 Аллерген «Цитрусовые микст 19»
Состав: лимон, апельсин, мандарин, грейпфрут

Сравнение С КОНСТРУКТИВНЫМИ аналогами

время анализа: **«Вектор-Бест» - 1 час 15 мин., 3 стадии;**
“Radim” и «Алкор Био» - 1 час 45 мин., 2 стадии;
“Dr. Fooke” - 3 часа, 3 стадии.

- наш набор **включает полный комплект** необходимых реагентов, в т.ч. **калибровочные образцы, контрольную сыворотку (КС), содержащую аллергенспецифические IgE, и два контрольных аллергена;** у “Radim” и “Dr. Fooke” эти реагенты предлагается только за отдельную плату; у «Алкор Био» КС в наборе содержит общий IgE, а специфическая КС и контр. аллергены также предлагаются только за отдельную плату.

- **стоимость оптимального комплекта реагентов и стоимость аллергенов у Вектор-Бест существенно ниже, чем у “Radim” и “Dr. Fooke”**

- **расход биотинилированных аллергенов для анализа в нашем наборе в 5-6 раз ниже чем у «Алкор Био», “Radim” или “Dr. Fooke”**

Сравнение с аналогами (1)

Компоненты для анализа	«Вектор-Бест»	«Алкор Био»	“Radim”	“Dr. Fooke”
Набор реагентов 96 опр.	2 996 руб.	3155 руб.	5073 руб.	4200 руб.
Калибраторы IgE	Входят в состав набора	Входят в состав набора	4002 руб. (по заказу)	2 870 руб. (по заказу)
КС с аллерген-специфич. IgE и с контрольными аллергенами	Входит в состав набора	3221 руб. (по заказу)	786 руб. (по заказу)	824 руб. (по заказу)
КС с общими IgE	По заказу	Входит в состав набора	Не предусмотрена	Не предусмотрена

Сравнение с аналогами (2)

Компоненты	«Вектор-Бест»	«Алкор Био»	“Radim”	“Dr. Fooke”
Контрольные аллергены и спец. контрольная сыворотка	2 контрольных аллергена и спец. КС входят в состав набора	Не входят в состав набора, необходимо приобретать отдельно	Не входят в состав набора, необходимо приобретать отдельно	Не входят в состав набора, необходимо приобретать отдельно
Цена оптимального комплекта	2 996 руб.	3155 руб. (6376 руб. со спец. контр. сывороткой)	9861 руб.	7894 руб.
Аллергены, цена одного флакона	478 руб. 24 анализа	626 руб. 24 анализа Хватит на 150 анализов с набором Вектор-Бест	1628 руб 24 анализа Хватит на 150 анализов с набором Вектор-Бест	1 540 руб 20 анализов Хватит на 140 анализов с набором Вектор-Бест

Критерии оценки уровня специфических IgE

Концентрация специфических IgE	Класс	Оценка уровня специфических IgE
$\leq 0,5$ МЕ/мл	0	отсутствует или не поддается определению
0,51-1,0 МЕ/мл	1	низкий
1,1-5,0 МЕ/мл	2	средний
5,1-25,0 МЕ/мл	3	высокий
25,1-75,0 МЕ/мл	4	очень высокий
$> 75,1$ МЕ/мл	5	исключительно высокий

Типы аллергии

- I – реагиновый (IgE, тучные клетки, гистамин и др. медиаторы воспаления)
- II – цитотоксический (IgG, IgM, комплемент, макрофаги)
- III – иммунокомплексный (ИК, в основном с участием IgG1 и IgG3, комплемент, нейтрофилы и др. клетки воспаления)
- IV – гиперчувствительность замедленного типа (Т-клетки, без участия иммуноглобулинов)

Клинические проявления реакций II типа

Со II типом гиперчувствительности ассоциированы иммунные цитопении (поражение клеток крови, например, аутоиммунная гемолитическая анемия), синдром Гудпасчера (поражение лёгких и почек), злокачественная миастения, вульгарная пузырчатка, гемолитическая болезнь новорожденных, острое отторжение трансплантата (поражение питающих капилляров из-за наличия антител к сосудистому эндотелию) и др.

Клинические проявления реакций III типа

С III типом гиперчувствительности ассоциированы: экзогенный аллергический альвеолит («лёгкое фермера, птицевода, работника солодовой промышленности» и др.), системная красная волчанка, ревматоидный артрит, васкулиты, гломерулонефрит, некоторые виды пищевой и лекарственной непереносимости и т.д.

В качестве аллергенов, провоцирующих IgG-зависимые реакции II и III типа чаще всего выступают лекарственные, пищевые и профессиональные антигены. Обычно это антигены, с которыми человек может сталкиваться в довольно больших дозах, постоянно или продолжительное время. Среди профессиональных аллергенов наибольшее клиническое значение имеют экзоантигены, вдыхаемые как пыль или аэрозоль на рабочем месте (бактерии, споры и частички грибков, экскременты, химикаты, мука и др.).

**«IgG – АллергоСкрин-
ИФА-БЕСТ»**

**«IgG4 – АллергоСкрин-
ИФА-БЕСТ»**

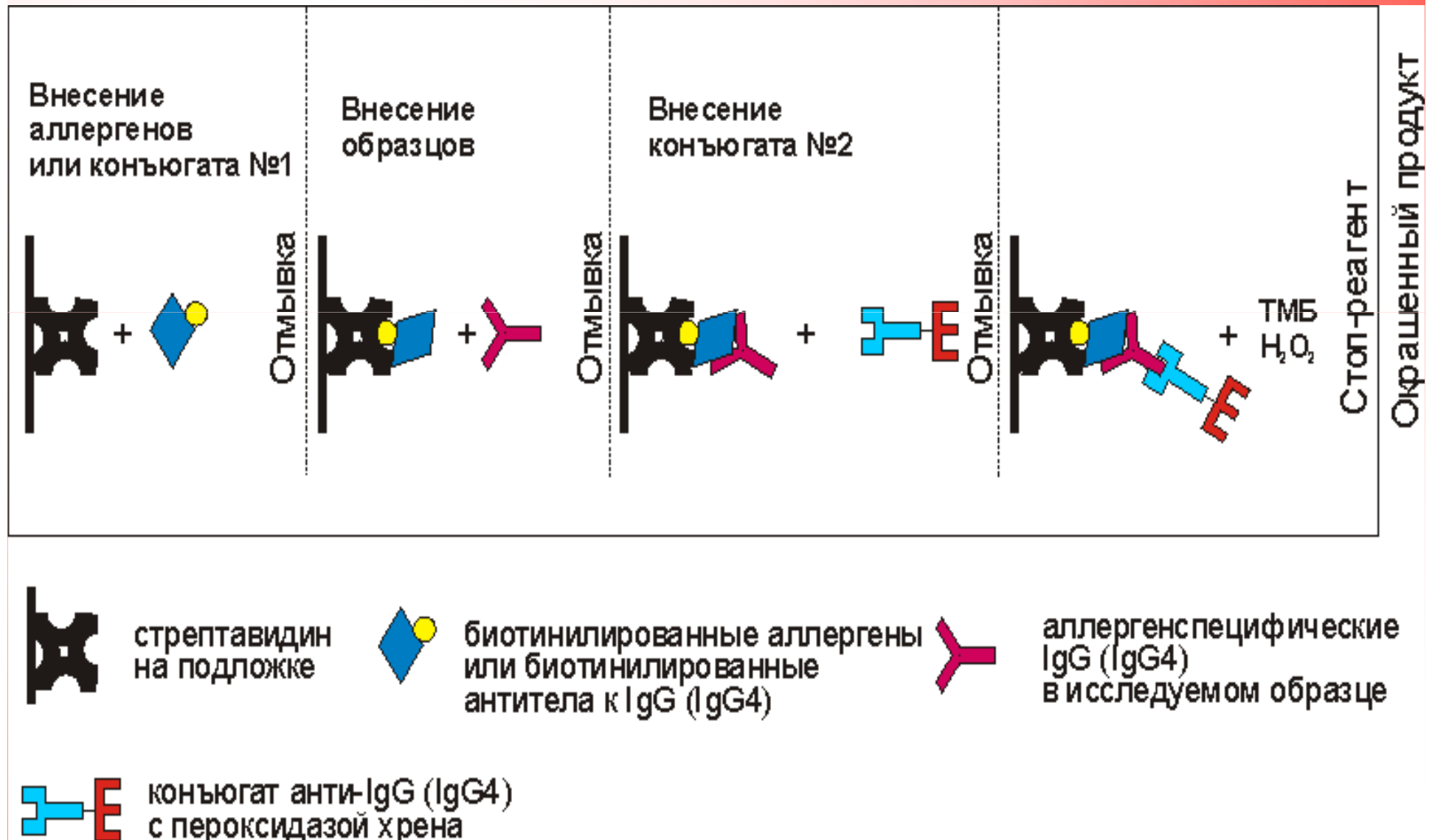
Критерии оценки уровня специфических IgG в сыворотке (плазме) крови

Концентрация специфических IgG	Класс	Оценка уровня специфических IgG
$\leq 1,0$ мкг/мл	0	не имеющий значения
1,1 – 2,5 мкг/мл	1	низкий
2,5 – 5,0 мкг/мл	2	высокий
$> 5,0$ мкг/мл	3	очень высокий

ИФА аллергенспецифических IgG (IgG4)

с жидкими аллергенами

Универсальная подложка со стрептавидином



Тип теста

- Аллергосорбентный тест, в котором влияние твердой фазы на аллерген максимально нивелировано и стандартизовано благодаря цепочке молекул-посредников (стрептавидин-биотин)
-

Преимущества

- Возможность использования одной и той же стандартной формы аллергена для анализа любого класса аллергенспецифических иммуноглобулинов (IgE, IgG, IgG4, IgM, IgA)
 - Гибкость в выборе аллергенов при постановке анализа
 - Широкий выбор (более 800) и доступность жидких биотинилированных аллергенов на рынке
-

Ещё один положительный момент

Макс. приближенный (IgE-IgG/IgG4) или идентичный (IgG-IgG4) протокол анализа при использовании наборов

«IgE – АллергоСкрин-ИФА-БЕСТ»

«IgG – АллергоСкрин-ИФА-БЕСТ»

«IgG4 – АллергоСкрин-ИФА-БЕСТ»

даёт преимущества как при ручной постановке, так и при постановке на автоматах

Классический алгоритм аллергодиагностики – сначала *in vivo*!

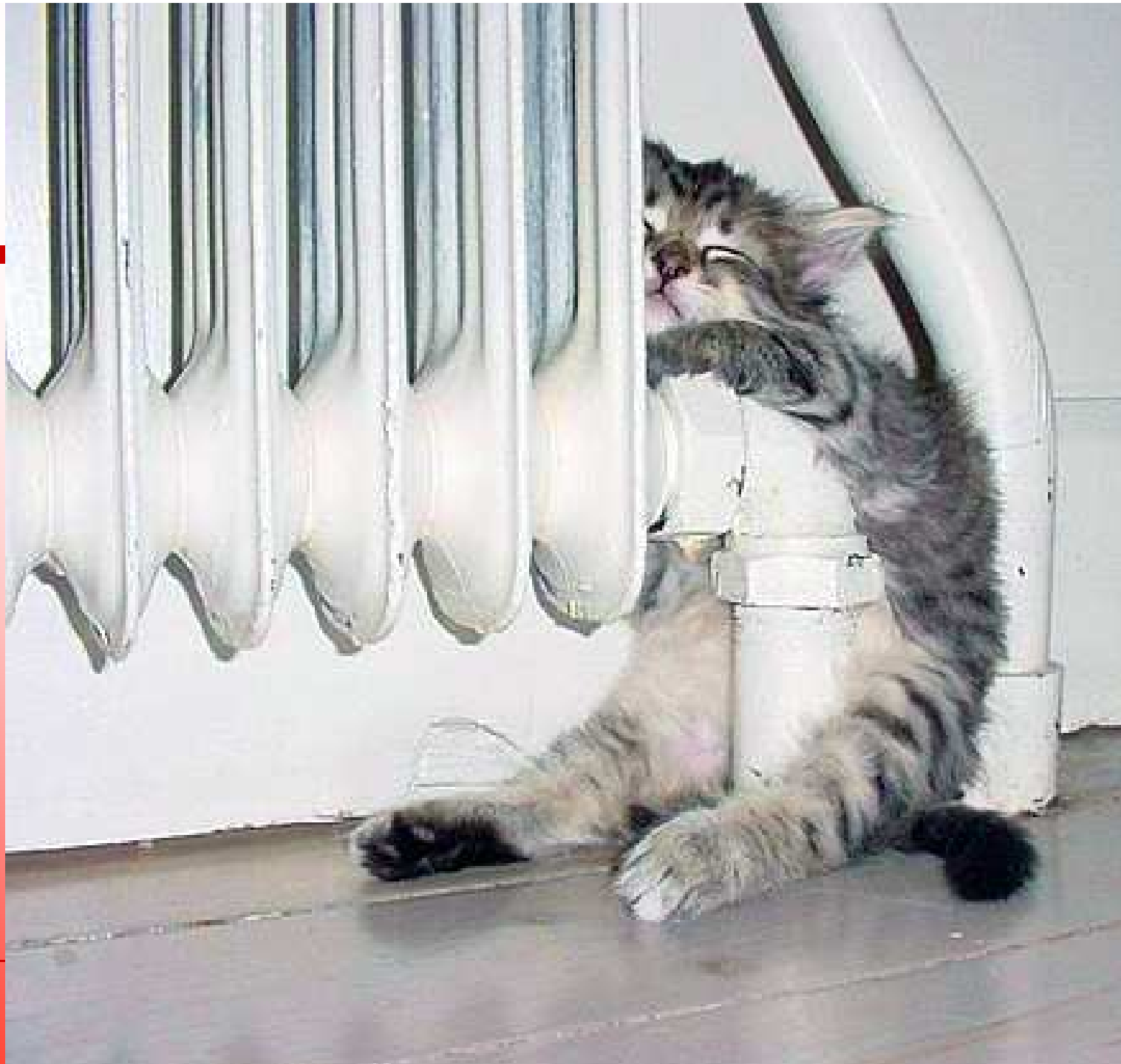
- ❑ Сбор анамнеза острой клиники и ремиссии;
- ❑ постановка кожных аллергических проб;
- ❑ проведение провокационных тестов;
- ❑ верификация выявления клинически значимого аллергена - проведение специфической аллергодиагностики *in vitro*.

Рекомендуемый алгоритм выявления значимого аллергена - сначала *in vitro*!

- ❑ Сбор анамнеза;
- ❑ ИФА (IgE и (или) IgG4, IgG) с использованием микстов аллергенов из групп, выбранных по результатам анамнеза;
- ❑ ИФА (IgE и (или) IgG4, IgG) с использованием индивидуальных аллергенов из групп, выбранных по результатам анализа микстов;
- ❑ Верификация выявления клинически значимого аллергена – тесты *in vivo* (кожные пробы и др.).

Благодарю за внимание!





ИФА аллергенспецифических IgE или IgG (IgG4) с жидкими аллергенами

Универсальная подложка со стрептавидином

