

ОПЫТ КОМПАНИИ «АЛКОР БИО» В СОЗДАНИИ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКИ



**Кочиш Л.Т.,
руководитель
лаборатории
аллергологии**

**ООО «Вега»
Группы компаний
«Алкор Био»,
Санкт-Петербург**

Нынешний 2012 год богат юбилейными датами для российской биотехнологической компании «Алкор Био», готовящейся отметить свое 20-летие, а также для целого

ряда ее подразделений, сформировавших самый крупный на Северо-Западе нашей страны биотехнологический кластер. Лаборатория аллергологии была создана в мае 2002 года, 5 лет назад она вошла в научно-исследовательское подразделение холдинга «Алкор Био» — компанию ООО «Вега», которая проводит разработки инновационных продуктов и технологий в области клинической лабораторной диагностики, а также занимается их внедрением в производство. В качестве основных задач для лаборатории аллергологии были определены разработка и получение аллергенов с целью использования для диагностики аллергических заболеваний как *in vitro*, так и *in vivo*. Важнейшим направлением деятельности коллектива лаборатории является создание и выпуск в необходимых количествах биотинилированных аллергенов с целью их использования в оригинальной тест-системе для определения иммуноглобулинов E, специфичных к различным аллергенам (sIgE). Особенности и основным итогом этой работы посвящена настоящая статья. Как в России, так и за рубежом до 40% населения страдают аллергическими заболеваниями, обусловленными преимущественно иммунными механизмами с участием sIgE [1, 2, 3, 5]. Эти антитела, связывая аллергены, приобретают способность стимулировать выделение базофилами вазоактивных веществ, которые во многом определяют развитие аллергической симптоматики. В 90-е годы прошлого века в Европе был разработан метод количественного определения sIgE, в котором использовалась твердая фаза с адсорбированными антителами, специфичными к IgE, и аллергены со специальной биотиновой меткой. В ходе иммуноферментного анализа биотинилированные аллергены проявляются на твердой фазе в составе иммунных комплексов с sIgE и конъюгатом, специфичным к биотину с пероксидазой хрена [2, 4, 5]. Применение иммуносорбентов, содержащих антитела к IgE, в отличие от нефиксированных на твердой фазе аллергенов, придает анализу гибкость, удобство в использовании, а также снижает неспецифические реакции.

В России развитие этого метода, названного реверсивным алергосорбентным тестом, получило в группе компаний «Алкор Био». В частности, он был реализован в оригинальном отечественном наборе «АллергоИФА-специфические IgE», в котором применяются разработанные нашей лабораторией биотинилированные аллергены [1]. Созданная тест-система для количественного определения sIgE в сыворотке крови предполагает базовый неизменный набор реагентов, а расширение диагностических возможностей набора происходит за счет избирательного использования широкого ассортимента биотинилированных

аллергенов. Поэтому применительно к рассматриваемой тест-системе «АллергоИФА-специфические IgE» перед лабораторией аллергологии ООО «Вега» были поставлены задачи разработки технологии получения и наработки достаточного количества биотинилированных аллергенов широкого спектра.

Отбор ассортимента аллергенов, включающего около 120 наименований, был осуществлен на основании анализа информации о частоте встречаемости аллергических заболеваний и спектре вызывающих их этиологических агентов. В их число вошли аэроаллергены (пыльцевые, бытовые, грибковые), пищевые, эпителиальные, инсектные и профессиональные аллергены. Было налажено производство биотинилированных аллергенов, наиболее востребованных в клинической практике. Среди пыльцевых аллергенов были выбраны аллергены деревьев: березы, ольхи серой, тополя, лещины, а также луговых и сорных трав: тимopheевки, ежи сборной, овсяницы луговой, полыни, амброзии, постенницы, которые имеют весьма широкий ареал произрастания. Пищевые аллергены включали коровье молоко, яичный белок, пшеничную муку, гречу, свинину, говядину, куриное мясо, всевозможные овощи, фрукты, морепродукты. Из бытовых аллергенов были отобраны шерсть кошки, собаки, домашняя пыль, клещи домашней пыли. Перечни биотинилированных аллергенов постепенно расширялись, что способствовало повышению диагностических возможностей тест-системы «АллергоИФА-специфические IgE».

Особые усилия и наиболее продолжительное время потребовалось для решения задачи по разработке технологии получения и очистки биотинилированных аллергенов, а также способов контроля их качества. Аллерген является по своей природе не просто белком, а сложной многокомпонентной смесью, обладающей своими уникальными характеристиками. Поэтому разработка и получение аллергенов основаны, прежде всего, на изучении их физико-химических, биохимических и иммунологических свойств. Технология получения биотинилированных аллергенов состоит из выделения высокоактивной аллергенной фракции, очистки от примесей и доведения белкового экстракта до готовой биотинилированной формы.

Качество аллергена, например степень его очистки или правильность подбора концентрации в растворе, во многом определяют специфичность и чувствительность диагностической процедуры у пациентов с аллергопатологией. Поэтому, несмотря на единство методик получения биотинилированных аллергенов, сотрудникам лаборатории аллергологии приходится работать отдельно с каждым аллергеном, проходя весь путь от исходного сырья до конечного продукта.

Компонентный состав выделяемых аллергенных экстрактов оценивали с использованием методики SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, которая позволяет контролировать наличие главных аллергенных компонентов в экстракте. На примере аллергенов из пыльцы березы бородавчатой и клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* можно проследить наличие мажорных (основных аллергенных) и минорных (дополнительных) белков в смеси (Рисунок 1, 2). Известно, что наибольшей IgE-связывающей активностью у аллергена березы обладают Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4 и Bet v 6, а у клеща домашней

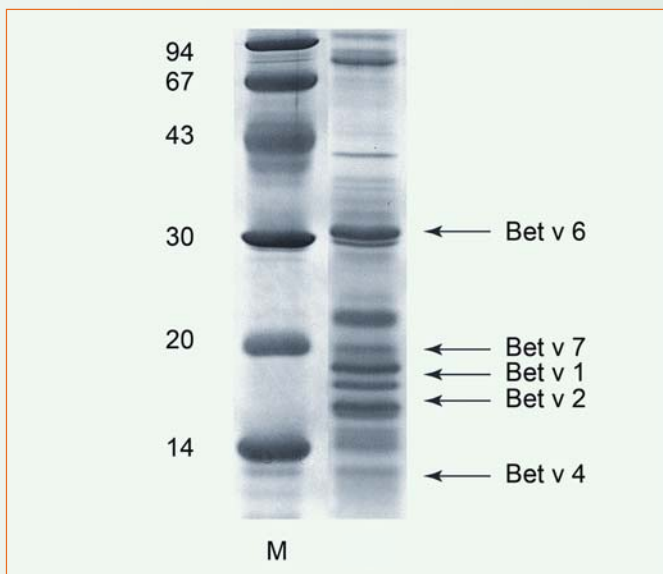


Рисунок 1. SDS-электрофорез (15% ПААГ) аллергена пыльцы березы.

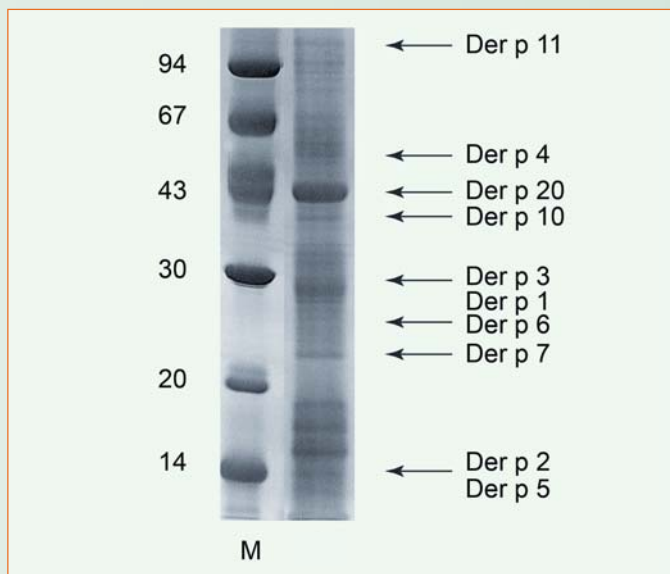


Рисунок 2. SDS-электрофорез (15% ПААГ) аллергена клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*.

пыли — соответственно Der p 1, Der p 2, Der p 3 и Der p 4, имеющие определенную молекулярную массу.

С помощью метода изоэлектрофокусирования определяли изоэлектрические точки белков (pI), основная часть которых должна находиться в кислой области ($pH < 7,0$). Известно, что именно эти компоненты в наибольшей степени обладают IgE-связывающей активностью. У аллергенов из пыльцы березы и клеща домашней пыли pI большинства аллергенных компонентов находятся как раз в пределах pH от 4,5 до 7,0.

Контроль иммунологической активности аллергенов пыльцы березы и клеща домашней пыли проверяли методом иммуноблоттинга. При этом аллергены разделяли с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, а затем переносили их на нитроцеллюлозную мембрану. Далее, используя положительную пуловую сыворотку крови от пациентов с аллергическими заболеваниями и подтвержденной сенсибилизацией к данным аллергенам, выявляли посредством иммуноферментного анализа IgE-связывающую активность белков аллергенного экстракта. В качестве контроля применяли отрицательную пуловую сыворотку от практически здоровых людей без аллергопатологии. Как видно на представленных иллюстрациях (Рисунок 3, 4), наличие темных полос при использовании положительных образцов пуловой сыворотки и отсутствие таковых в случаях применения отрицательных образцов свидетельствует о присутствии в смеси главных белков, обладающих наибольшей IgE-связывающей активностью. Особый контроль проводили для оценки стабильности полученных аллергенов. Для этого оценивали степень их аллергенной активности (в %) в режиме реального времени. На примере аллергена пыльцы березы видно, что через 2 года хранения его активность сохранялась на 85,2% (Рисунок 5). Этого вполне достаточно для использования в лабораторной практике, так как снижение активности биотинилированных аллергенов для проведения иммуноферментного анализа допускается до 70%. Таким образом, разработанный технологический процесс обеспечил получение биотинилированных аллергенов, обладающих необходимыми биохимическими, электрофоретическими и иммунохимическими характеристиками. Однако основными критериями, по которым оценивается работа аллергенов в тест-системе, являются их специфичность и чувствительность.

Чем выше специфичность и чувствительность биотинилированного аллергена, тем с большей точностью можно определить какой аллерген у пациента вызывает аллергическую реакцию. Поэтому весьма желательно, чтобы эти важнейшие показатели были не ниже 90%. Именно к этому стремился коллектив лаборатории аллергологии, для этого постоянно проводилось изучение аналитических и диагностических характеристик тест-системы «АллергоИФА — специфические IgE» со всеми разрабатываемыми аллергенами. В качестве референтной была выбрана тест-система «ImmunoCAP» шведской фирмы «Phadia», которая по праву признана «золотым стандартом» иммуноферментного анализа для определения sIgE.

Кроме того, выполнялись дополнительные исследования сравнения результатов иммуноферментной тест-системы с данными кожных скарификационных проб. Последние считаются более точными, но являются инвазивными, что накладывает на их проведение ряд ограничений.

Для оценки специфичности и чувствительности аллергенов пыльцы березы и клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*, которые рассматриваются в качестве примеров, был использован биоматериал, предоставленный клиникой детских болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и ГУЗ «Детская городская больница №1». Для сравнительного анализа были отобраны две панели сывороток крови пациентов. В основную группу вошли сыворотки больных, страдающих атопическими заболеваниями с клиническими проявлениями и подтвержденными результатами тестов *in vivo*. В контрольную группу вошли сыворотки практически здоровых лиц с отрицательными результатами кожных тестов.

ИФА-анализ с тест-системой «ImmunoCAP» дал 90 положительных и 86 отрицательных результатов на эти аллергены. При использовании наших биотинилированных аллергенов с набором реагентов «АллергоИФА — специфические IgE» были установлены высокие показатели специфичности и чувствительности по отношению к сравниваемой тест-системе «ImmunoCAP». Так, для клеща домашней пыли специфичность была равна 95%, тогда как для аллергена березы этот показатель составил 100%. Чувствительность изученных аллергенов составила 95% и 98%, соответственно, что также

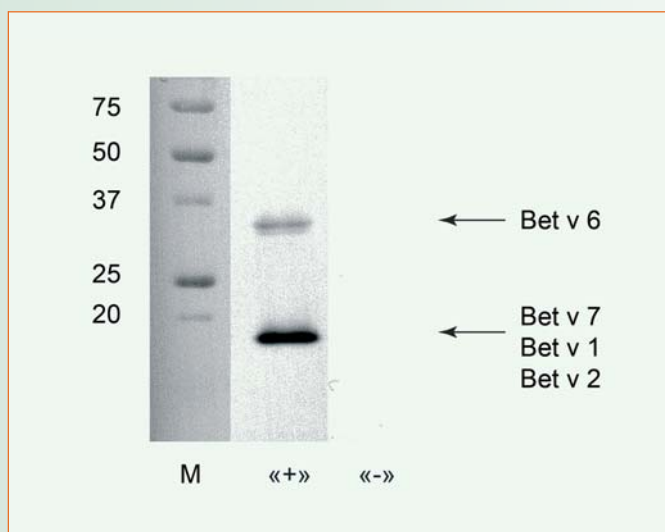


Рисунок 3. Иммуноблот аллергена пыльцы березы с «+» и «-» пулами sIgE сывороток. М — маркер.

свидетельствует о высокой диагностической эффективности используемого теста.

Для проведения сравнительного анализа результатов использования тест-системы «АллергоИФА — специфические IgE» с показателями кожных скарификационных проб были отобраны 48 образцов сывороток крови пациентов, у которых были отмечены 42 положительных и 6 отрицательных кожных реакций на аллергены березы (24 образца) и клеща домашней пыли (24 образца). У тест-системы «АллергоИФА — специфические IgE» для аллергена березы частота совпадений результатов определения sIgE с кожными скарификационными пробами составила 72%, а для аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus* — 71%. У референсной тест-системы «ImmunoCAP» аналогичный показатель был равен соответственно 79% и 75%. Незначительная разница в значениях этого показателя свидетельствует о высокой диагностической ценности тест-системы «АллергоИФА — специфические IgE» и, соответственно, подтверждает хорошее качество полученных биотинилированных аллергенов.

Таким образом, разработанная нами технология получения биотинилированных аллергенов доказала свою эффективность и обеспечила достаточно высокую диагностическую ценность отечественной тест-системе «АллергоИФА — специфические IgE». На протяжении двух лет получено около 130 биотинилированных аллергенов, характеризующихся высокой чувствительностью, специфичностью и хорошей стабильностью, предназначенных для использования в тест-системе «АллергоИФА — специфические IgE». Указанная тест-система и аллергены к ней имеют регистрационное удостоверение Росздравнадзора РФ и разрешены к использованию на территории России. Коллектив лаборатории аллергологии планирует в будущем увеличить список биотинилированных аллергенов до 300 наименований. При этом расширение номенклатуры будет проводиться за счет аллергенов, достаточно редко востребованных клинической практикой. В этом, очевидно, нет коммерческой выгоды для компании «Алкор Био», однако разработка и доведение до готовой формы большого числа аллергенов безусловно расширит возможности аллергодиагностики и будет способствовать более успешной борьбе с аллергическими заболеваниями в нашей стране.

Еще одним перспективным направлением, по которому ведется исследовательская работа, является разработка и включение в тест-систему «АллергоИФА-специфические IgE» рекомбинантных аллергенов. Это специальные аллергенные молекулы, полученные

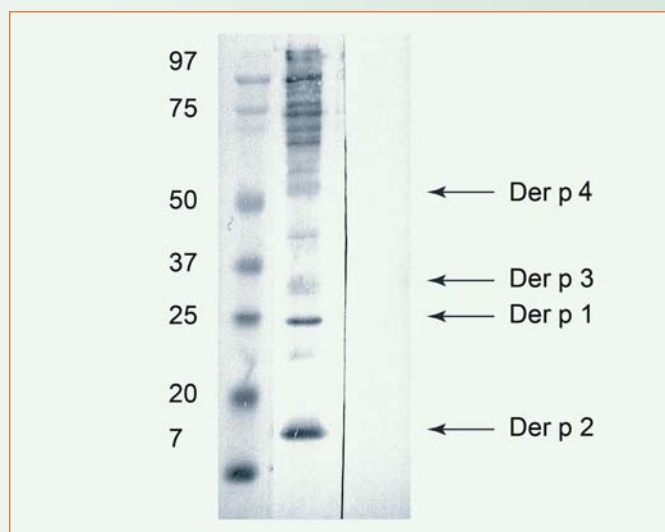


Рисунок 4. Иммуноблот аллергена клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* с «+» и «-» пулами sIgE сывороток.

методом генной инженерии, но первоначально выделенные из аллергенного экстракта. Современные технологии позволяют не только определить структуру важнейших аллергенных белков, но и получить их в больших количествах с помощью генной инженерии. Использование рекомбинантных аллергенов в иммуноферментных тестах откроет новые возможности для *in vitro* диагностики IgE опосредованных аллергических реакций. В частности, применение тестов на отдельные компоненты аллергенов поможет клиницистам получить более детальную информацию об аллергических заболеваниях у пациентов. Кроме того, рекомбинантные аллергены весьма перспективны для выявления перекрестных реакций к различным аллергенам. Их использование обеспечит проведение высокоточной лабораторной диагностики, с помощью которой возможно получение необходимых данных для назначения эффективной аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ).

Коллектив лаборатории аллергологии с уверенностью и оптимизмом смотрит в будущее, надеясь успешно продолжить работу по дальнейшему совершенствованию оригинальной тест-системы компании «Алкор Био» «АллергоИФА-специфические IgE» и расширению спектра наименований биотинилированных аллергенов.

Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высылаются по просьбе читателей.

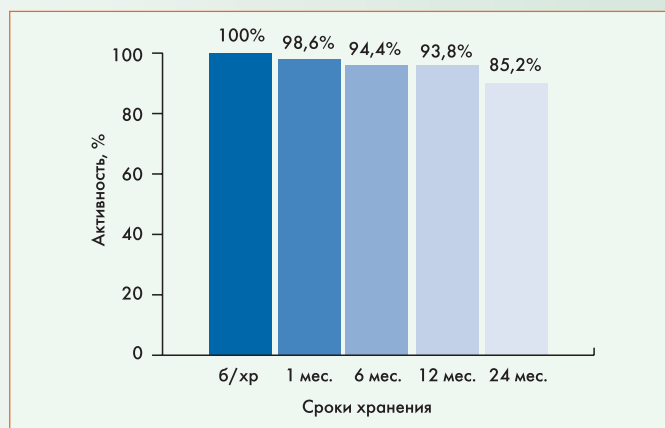


Рисунок 5. Динамика стабильности аллергена пыльцы березы в режиме реального времени.