

Юпатова З.Г.¹, Пархомчук О.Ю.², Борабанова Н.М.¹, Доценко Э.А.¹, Фомина Е.Г.², Гурина Н.С.¹, Бержец В.М.³

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE К РЕГИОНАЛЬНЫМ АЛЛЕРГЕНАМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИА-ТЕСТА

¹Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

²Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Минск

³Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, г. Москва, Российская федерация

Аннотация. Для определения специфических иммуноглобулинов Е к аллергенам березы в качестве альтернативы коммерческим тест-полоскам использованы нитроцеллюлозные мембраны с сорбированным пыльцевым экстрактом, полученным из пыльцы березы повислой. Исследование проведено методом иммуноферментного анализа, результаты свидетельствуют о высокой специфической активности пыльцевого экстракта, полученного из регионального сырья, и возможности использования его в качестве тест-аллергена.

Ключевые слова. Поллиноз, аллергия, специфические иммуноглобулины Е, экстракт пыльцы.

Введение. Во всем мире наблюдается рост числа аллергических заболеваний. Растительный состав регионов планеты отличается в зависимости от местности, климата, экологии [1]. Для верификации диагноза «поллиноз» целесообразно определять специфические иммуноглобулины Е непосредственно к аллергенам пыльцы региональных растений. В настоящий момент в Республике Беларусь не производятся диагностические и лечебные аллергены региональных растений. Определение специфических иммуноглобулинов Е проводится с помощью импортных тестов, также как аллергенспецифическая иммунотерапия выполняется с использованием импортных растворов аллергенов. Для отечественной аллергологии перспективна разработка собственных аллергенов. Методика получения собственных экстрактов пыльцевых аллергенов позволяет получать экстракты из региональных видов, в том числе новых инвазивных, для которых не существует стандартных аллергопанелей.

Цель. Сравнение специфичности полученного экстракта пыльцы березы повислой с коммерческим тестом для диагностики поллиноза.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили сыворотки пациентов, разделенных на три группы: группа 1, с доказанной аллергией к пыльце березы – 30 пациентов (исследуемая группа), из которых 15 женщины и 15 мужчины, средний возраст 31 год, в группу атопического контроля (группа 2) включали сыворотки пациентов с доказанной аллергией, без сенсibilизации к пыльце березы – 15 пациентов, из которых 8 женщины, 7 мужчины, средний возраст 33 года, а в группу неатопического контроля (группа 3) включали сыворотки пациентов с доказанным отсутствием аллергии – 15 пациентов, 8 мужчины, 7 женщины, средний возраст 36 лет.

Методом водно-солевой экстракции получен нативный экстракт пыльцы березы повислой (*Betula pendula*). Пыльца собиралась на территории Республики Беларусь.

Для подтверждения специфичности полученного пыльцевого экстракта применен модифицированный коммерческий тест, который представляет иммуноферментный анализ на нитроцеллюлозной мембране (иммуноблот/лиа-тест) для выявления аллерген-специфических иммуноглобулинов Е (IgE-антител) в сыворотке и плазме человека. Вместо коммерческой тестовой мембраны, покрытой материалом аллергенов, используется нитроцеллюлозная мембрана, где в качестве антигена выступает сорбированный экстракт пыльцы березы,

полученный методом водно-солевой экстракции. В качестве контрольной полоски для контроля работы тестовой мембраны была сорбирована сыворотка человека с высоким содержанием IgE (далее – положительный контроль).

Нитроцеллюлозные мембраны с сорбированным аллергеном помещали в лунки пластикового планшета. Далее, в соответствии с инструкцией к коммерческому набору для иммуноферментного анализа RIDA qLine® Allergy фирмы R-Biopharm AG и с использованием реагентов данного набора проводили исследование с собственными тест-полосками (мембранами).

После помещения в лунки планшета мембраны промывали промывочным буфером, после чего в каждую из 60 лунок с мембранами были нанесены по 1 образцу исследуемой сыворотки, с последующей инкубацией в течение 30 минут на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20-25 °С). Лунки вновь промывали промывочным буфером, наносили проявляющие антитела и вновь инкубировали при прежних условиях, после чего лунки промывали промывочным буфером. Затем в лунки добавляли конъюгат и мембраны в третий раз инкубировали в течение 20 минут в тех же условиях. После третьей инкубации лунки опустошали, трехкратно промывали промывочным буфером и добавляли субстрат для окрашивания, с которым мембраны инкубировали в течение 15 минут при тех же условиях. Результаты оценивались на следующий день после полного высыхания мембран.

Результаты исследования. Иммуноферментный тест показал специфическую активность полученного регионального экстракта пыльцы березы повислой.

У всех 30 пациентов первой группы обнаружены специфические IgE к пыльце березы повислой, по результатам окрашивания верхней полоски на тестовой мембране, где был сорбирован пыльцевой экстракт (Рис.1). Контрольная нижняя полоска (положительный контроль) окрасилась на всех 60 тестовых мембранах. На мембранах, куда наносили сыворотки пациентов группы атопического (группа 2) и неатопического контроля (группа 3), верхняя полоска не давала окрашивания, что подтверждает отсутствие специфических IgE к пыльце березы у пациентов 2 и 3 групп.

На рисунке 1 представлены образцы тестовых мембран для каждой из трех групп пациентов. На каждую из представленных мембран в процессе анализа наносили один образец сыворотки крови. Среди представленных образцов на трех мембранах для группы 1 произошло окрашивание двух полосок, что доказывает наличие специфических IgE к пыльце березы повислой, в то время как на мембранах для групп 2 и 3 произошло окрашивание только положительного контроля, что свидетельствует о работоспособности системы.

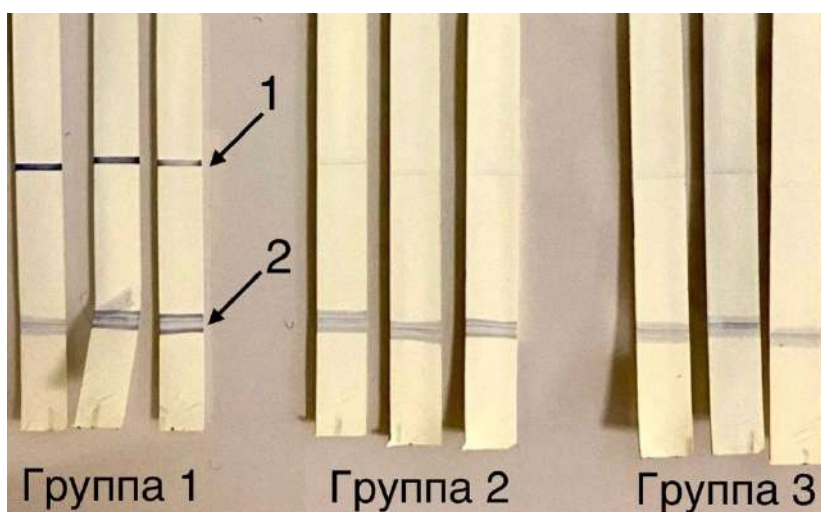


Рисунок 1. Некоторые из тестовых мембран, с 1 – сорбированным экстрактом пыльцы березы повислой, 2 – положительным контролем

Заключение. Полученный экстракт пыльцы березы повислой может быть использован для диагностики поллиноза в качестве тест-аллергена. Изготовление собственных экстрактов пыльцевых аллергенов позволяет провести оценку распространенности аллергии у жителей Республики Беларусь к региональным растениям, в том числе новым инвазивным видам.

Список литературы:

1. Пыльцевая аллергия в Республике Беларусь / Н. С. Гурина, И. В. Семенова, И. М. Прищепа [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015. – № 3. – С. 99–107.