

Опыт применения современных лабораторных технологий в аллергологическом центре

Заведующий КДЛ - врач клинической лабораторной диагностики, к.м.н. Попкова Мария Игоревна

«Неделя детского здоровья – 2018», г. Нижний Новгород, 17 мая 2018 г.

Актуальность:

- В настоящее время около 30% населения планеты страдает аллергическими заболеваниями (данные ВОЗ).
- В России – частота аллергических заболеваний от 17,5% до 30% (данные Института Иммунологии), что значительно выше данных официальной статистики в России, по которым их распространенность на порядок ниже действительных, объективных данных.

В то же время 50-60%, так называемых, хронических «аллергических» проявлений являются результатом других болезней и нарушений, но не аллергических.

История аллергодиагностики:

1873

1967

1974

1988

1994

2000

2007

IN VIVO - АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА

IN VITRO - АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА

**КОМПОНЕНТНАЯ
АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА**

Цель работы:

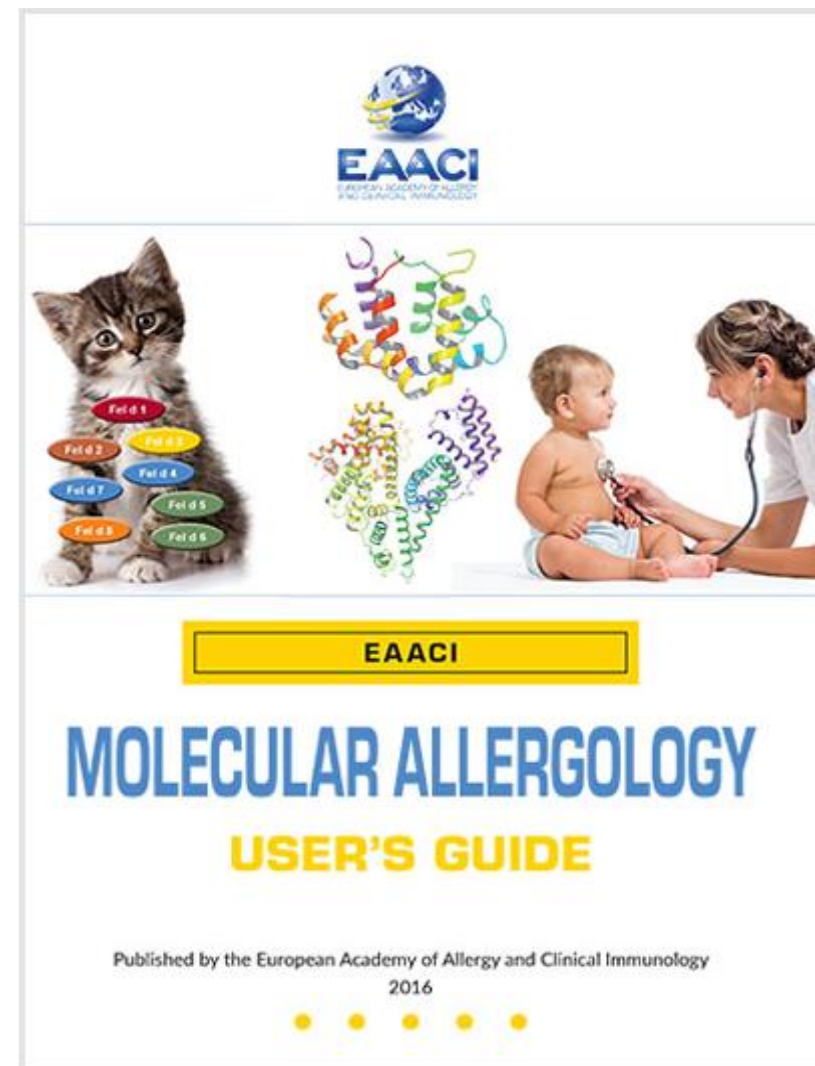
**совершенствование аллергодиагностики и
аллерготерапии на основе применения
современных лабораторных технологий**

Задачи аллергодиагностики:

- **Дифференцирование аллергических состояний от симптоматически сходных заболеваний;**
- **Ранняя диагностика аллергопатологии;**
- **Прогноз тяжести аллергического заболевания;**
- **Выявление причинного аллергена;**
- **Прогнозирование перекрестной реактивности;**
- **Подбор аллергенов для специфической иммунотерапии (АСИТ);**
- **Мониторинг и контроль результатов терапии и элиминационных мероприятий.**

Профессиональные организации и ассоциации:

- WHO
- WAO
- IUIS
- EAACI
- РААКИ



in vitro:

- **Общеклинические исследования (ОАК, цитология носового секрета, общий анализ мокроты, копрограмма)**
- **Иммунологические тесты (ЦИК, паразитарные, вирусные инфекции)**
- **Общий IgE**
- **Специфические IgE (sIgE)**
- **Специфические IgG/IgG4**
- **ЕСР (эозинофильный катионный белок)**
- **Триптаза**
- **Клеточные тесты (тест активации базофилов (CAST, FAST), Т-лимфоцитарная сенсibilизация)**

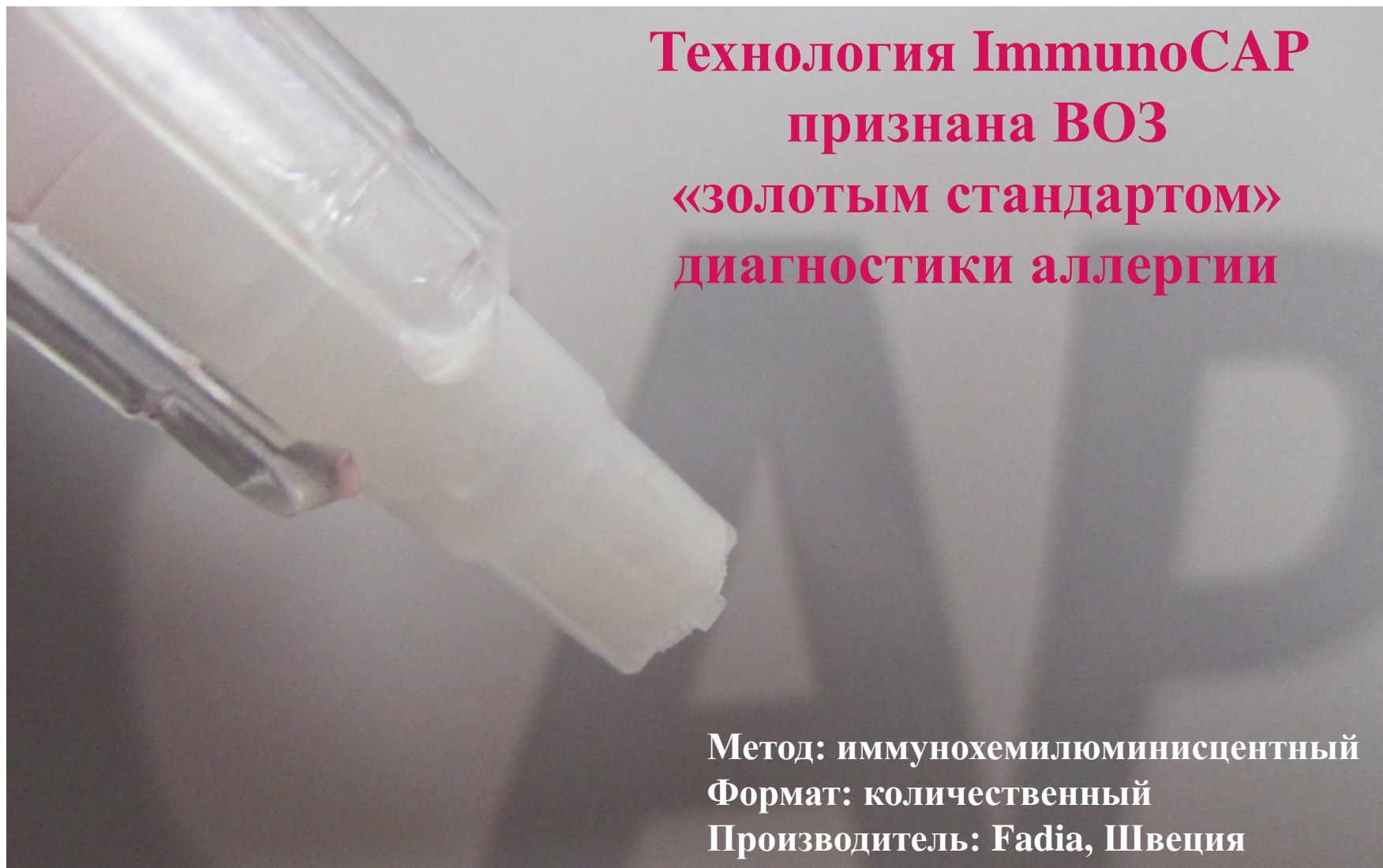
Эксперты США и Евросоюза представили заключение об отсутствии клинической информативности определения IgG и его субклассов (IgG4) при atopическом дерматите (2006 г.) и к пищевым аллергенам (2008 г.) Akdis C. et al Diagnosis and treatment of atopie dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/ - Allergy Clin Immunol., 2006; 118: 152-169.
Stapel S. et al Testing of IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. Ibid., 2008; 63: 793-796.

Показания для определения sIgE in vitro:

- безопасность для больного,
- ранний детский возраст (до 3-х лет),
- беременность и лактация,
- пациенты с высокой степенью сенсibilизации,
- обострение основного заболевания,
- декомпенсированные состояния болезни сердца, печени, почек, системы крови,
- на фоне приема антигистаминных препаратов,
- изменения реактивности кожи,
- полисенсibilизация, значительно более широкий спектр аллергенов,
- возможность тестирования одновременно к большому числу аллергенов,
- количественное определение sIgE на основе стандартизированных методов

Лабораторные методы определения sIgE:

- РИА
- ИФА
- Иммуноблотинг
иммунохроматография
- ИХЛА
- Microarray-based
assay



**Технология ImmunoCAP
признана ВОЗ
«золотым стандартом»
диагностики аллергии**

Метод: иммунохемилюминисцентный
Формат: количественный
Производитель: Fadia, Швеция

Критерии стандартизации количественного определения sIgE:

Руководство Clinical Laboratory Standards Institute, CSLI

по созданию, аналитической производительности, стандартизации, контролю качества и клиническому применению лабораторных тестов для определения уровня IgE-антител человека к специфическим аллергенам.

Калибровка: референс-образец иммуноглобулина E из сыворотки крови человека ВОЗ - **WHO 75/502**

Единицы измерения: **kUa/l (или IU/ml)**

Пороговое значение: норма sIgE < **0,35 kUa/l** (52-5291-EN/05)

АЛЛЕРГЕНЫ В СМЕСЯХ ОЦЕНИВАЮТ КАЧЕСТВЕННО

Новая концепция sIgE 0-100 : норма sIgE < 0,1 kUa/l (52-5205-EN/17)



Традиционный подход к аллергодиагностике:

- **Сбор аллергологического анамнеза (70% диагностической информации)**
- **Общее клинико-лабораторное обследование**
- **Специфическая клиническая аллергодиагностика (in vivo)**
- **Специфическая лабораторная аллергодиагностика (in vitro)**

Алгоритм специфической аллергодиагностики *in vitro*:

I уровень – скрининговый

**II уровень – подтверждающий (выявление
индивидуального аллергена)**

**III уровень – молекулярный (исследование
аллергокомпонентов)**



I этап тестирования СКРИНИНГОВЫЕ ТЕСТЫ НА АЛЛЕРГИЮ

= дифференциальная диагностика аллергических и неаллергических заболеваний

СМЕСЬ:

береза бородавчатая t3, тимофеевка луговая g6,
полынь w6, амброзия высокая w1, кошка
(перхоть) e1, собака (перхоть) e5, лошадь
(перхоть) e3, D. pteronyssinus d1, D. farinae d2,
Alternaria alternata m6, Cladosporium herbarum m2

+ Белок яйца f1, молоко f2, рыба f3,
пшеница f4, арахис f13, соя f14

Чувствительность – 98%
Специфичность – 89%

Phadiator infant

для детей до 4 лет

Phadiator

старше 4 лет

СМЕСЬ:

береза бородавчатая t3, тимофеевка луговая g6,
полынь w6, амброзия высокая w1, кошка
(перхоть) e1, собака (перхоть) e5, лошадь
(перхоть) e3, D. pteronyssinus d1, D. farinae d2,
Alternaria alternata m6, Cladosporium herbarum m2

Чувствительность – 93%
Специфичность – 89%

РЕЗУЛЬТАТ

(измерение суммарно sIgE, входящих в состав смеси аллергенов)

отрицательный

≤ 0,35 РАИ/л < ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

Симптомы с большой вероятностью не
вызываются IgE-опосредованной аллергией

С наибольшей вероятностью симптомы
вызваны IgE-опосредованной аллергией

40 мкл сыворотки
(капиллярной или
венозной)

Результаты апробации sIgE-ИФА-тест-систем по сравнению с референс-методом:

ImmunoCap ИФА-1

Аллерген 1

1,75	1,25
2,35	2,79
0,39	0,34
10,5	11,06
>100	>100
98	84,1
Аллерген 2	
0,45	0,34
0,5	0,47
96	>100
37,8	>100
17,0	48,8
1,88	3,07

ImmunoCap ИФА-2

Аллерген 1

37,7	8,3
76,3	7,6
59,2	21,6
0,1	0,0
51,8	9,8
Аллерген 2	
>100	1,8
>100	7,3
>100	8,1
>100	1,9
>100	3,6

Оценка результатов определения sIgE

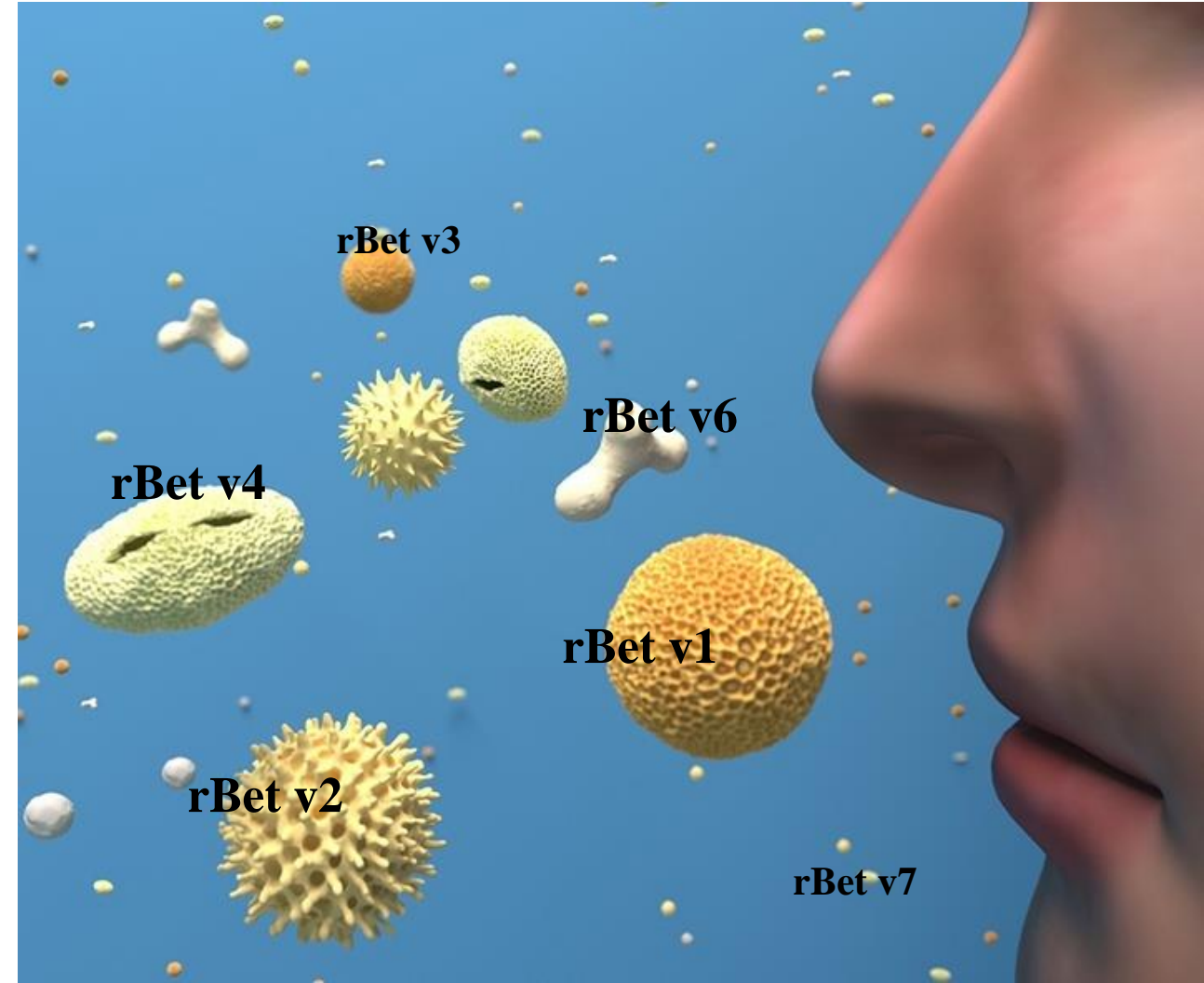
Класс реакции	Концентрация sIgE, кUa/l Референс-метод	Концентрация sIgE, МЕ/мл ИФА-набор (Россия)	Специфические IgE (интерпретация)
0	0 – 0,34	0 - 0,35	Отсутствует сенсibilизация
I	0,35 – 0,69	0,36 – 0,5 - 1,0	Слабая сенсibilизация/низкий уровень Клиническая значимость мало вероятна
II	0,7 – 3,49	1,1 – 5,0	Слабая сенсibilизация/ средний уровень Клиническая значимость возможна
III	3,5 – 17,5	5,1 - 25	Умеренная сенсibilизация/ высокий уровень Клиническая значимость вероятна
IV	17,5 – 50	25,1 - 75	Сильная сенсibilизация/очень высокий Клиническая значимость очень вероятна
V	50 – 100	>75	Очень сильная сенсibilизация/ исключительно высокий Клиническая значимость очень вероятна
VI	>100	-----	Очень сильная сенсibilизация Клиническая значимость практически абсолютна

Компонентная алергодиагностика

Аллергенный экстракт



Аллергенные компоненты



Береза (t3): рекомендуемый профиль тестов по расшифровке аллергии и подбору стратегии лечения

Bet v 1	Bet v 2	Bet v 4	Bet v 6
ОСНОВНЫЕ АЛЛЕРГЕНЫ	МИНОРНЫЕ АЛЛЕРГЕНЫ ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ		
<ul style="list-style-type: none"> • Белок PR10 • Специфичен для березы (95%) • Перекрестно реактивный • Чувствителен к нагреванию и расщеплению • Индикатор для СИТ аллергии к пыльце березы 	<ul style="list-style-type: none"> • Профилин • Перекрестно-реактивный • Редко встречается как единственный сенсibilизирующий агент у пациентов с клиническими симптомами (15-30%) • Чувствителен к нагреванию и расщеплению 	<ul style="list-style-type: none"> • Полкальцин • Перекрестно-реактивный • Редко встречается как единственный сенсibilизирующий агент у пациентов с клиническими симптомами (≈10%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Изофлавоно-редуктаза • Перекрестно-реактивный • Редко встречается как единственный сенсibilизирующий агент у пациентов с клиническими симптомами

Клинический случай 1:

- Мальчик, 9 лет
- Анамнез: с 5 лет сезонный конъюнктивит легкой или средней степени тяжести.
- Клиническая картина: тяжелая форма риноконъюнктивита. Оральный аллергический синдром при употреблении яблок, персиков, арахиса.
- АСИТ по просьбе родителей

Результаты специфической диагностики:

	Прик-тест	ImmunoCap, kUa/l	Аллергокомпоненты
Травяные смеси	1+	положительный	
Смесь деревьев		положительный	
Тимофеевка		1,61	rPhl p5=0,24, rPhl p12=0,45
Береза	2+	14,3	rBet v1 =11,6, rBet v2 <0,1
Яблоко	1+	3,2	
Персик	1+	4,9	

Диагноз: аллергия к березе

Лечение: АСИТ против пыльцы деревьев

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКТИВНОСТИ

Продукты, содержащие Vet v1-подобные (PR-10) белки:

Деревья	Фрукты	Орехи	Овощи
Берёза	Яблоко	Лесной орех	Морковь
Ольха	Груша	Грецкий орех	Сельдерей
Бук	Персик	Миндаль	Петрушка
Каштан	Вишня	Арахис	Спаржа
Орешник	Киви	Соя	Картофель
Граб	Абрикос	Фасоль	
Дуб	Клубника	Горох	

Клинический случай 2:

- Мальчик, 8 лет
- Анамнез: последние 3 года получает АСИТ к пыльце березы препаратом «Фосталь». Из данных истории болезни: прик-тест к березе 2+, t3= 9,8 МЕ/мл.
- Жалобы: появление симптомов риноконъюнктивита средней степени тяжести в мае текущего года на фоне АСИТ
- Дополнительные назначения: компонентная аллергодиагностика к пыльце березы
- Результаты (ImmunoCap): rBet v1= 8,9 kUa/l, rBet v2=6,7 kUa/l

Прогноз эффективности АСИТ аллергеном пыльцы березы:

ТЕСТ	ВЫСОКАЯ	СРЕДНЯЯ	НИЗКАЯ
МАЖОРНЫЙ АЛЛЕРГЕН rBet v1	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
МИНОРНЫЙ АЛЛЕРГЕН rBetv2, rBetv4	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ

Определение

Аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) – один из основных методов патогенетического лечения аллергических заболеваний, связанных с IgE-опосредованным механизмом аллергии, заключающийся во введении в организм пациента возрастающих доз аллергена, ответственного за клинические проявления заболевания у данного больного.

Компонентные маркеры тяжести аллергических реакций на пищу:

slgE-антитела к компонентам

- rTri a19 - омега-5 глиадин (пшеница)
- rPru p3 LTP (персик)
- nGly m4 (соя)
- rCor a8 (фундук)
- nBos d8 – казеин (молоко)
- nGal d1 – овомукоид (яйцо)
- rGad c1 – парвальбумин (рыба)
- rAra h1, rAra h2, rAra h3 (арахис)



Клинический случай 3:

- Мальчик, 5 лет
- Анамнез: отек Квинке на белок перепелиного яйца
- Диагноз: Атопический дерматит, распространенный, средней степени тяжести, подострое течение. Острый ринит. Аллергия на куриный белок. Нейтропения.
- Прик-прик тест: белок куриного яйца: ++++
- Результаты МА: nGal d2 Овальбумин(яйцо) = 1,73 kUa/l;
nGal d1 Овомукоид (яйцо) = 7,40 kUa/l

ЯЙЦО: рекомендуемый профиль тестов по расшифровке аллергии и подбору стратегии лечения

Полные экстракты	Компоненты			
Яичный белок	Овомукоид	Овальбумин	Кональбумин	Лизоцим
f1	Gal d1	Gal d2	Gal d3	Gal d4
<p>Высокий уровень IgE-антител к яичному белку может предсказать вероятность чувствительности, но не может прогнозировать реакцию на обработанные яйца или длительность аллергии.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Устойчив к тепловой денатурации • ВЫСОКИЙ РИСК реакции на все формы яйца • Маловероятно, что пациент «перерастет» аллергию 	<ul style="list-style-type: none"> • Чувствителен к тепловой денатурации • ВЫСОКИЙ РИСК реакции на сырые яйца или некоторые вакцины • НИЗКИЙ РИСК реакции на приготовленные яйца • Пациент скорее всего «перерастет» аллергию 	<ul style="list-style-type: none"> • Термолабильный • Дополняет информацию о сенсибилизации к яйцу • Риск клинической реакции на сырые яйца 	<ul style="list-style-type: none"> • Риск клинической реакции на сырые яйца • Лизоцим используется в качестве добавки в некоторых фармацевтических и пищевых продуктах
Яичный желток f75	Дальнейший поиск: куриное мясо f83 (возможен синдром «курица-яйцо»)			

in vitro – аллергодиагностика при тяжелых острых реакциях:

Наиболее частые причинные аллергены:

- лекарственные,
- яд перепончатокрылых,
- некоторые пищевые

В острую фазу

После перенесенной реакции

(15 мин – 3 часа) 6 часов
триптаза

△-Триптаза $\geq 20\%$ от индивидуального базового уровня Триптазы + 2 мкг/л

6 недель 6 месяцев
in vivo- тесты
in-vitro тесты

*«... В настоящее время золотым стандартом для диагностики **лекарственной аллергии** является проведение провокационных тестов in vivo. Результат диагностики in vivo всегда остается приоритетным по сравнению с лабораторными данными...»*



Лекарственная аллергия. Методические рекомендации для врачей. Под ред. академика РАН и РАМН Р.М. Хаитова. Москва, 2012.

ИННОВАЦИОННЫЕ РЕШЕНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКЕ

NEW!

Аллергочип



- Самый современный инструмент для определения профиля sIgE антител пациента;
- Это первый мультиплексный тест in vitro диагностики, который основан исключительно на аллерген-компонентах;
- Панель включает 112 аллергокомпонентов из 51 источника (пищевые, пыльцевые, эпидермальные аллергены, аллергены насекомых и плесневых грибов);
- Одновременно полуколичественное определение антител к каждому аллергокомпоненту за одно исследование (стандартные единицы ISAC, ISU-E);
- Малый объем образца – всего 30 мкл сыворотки (капиллярная или венозная кровь);
- Уменьшение затрат времени и ресурсов на аллергодиагностику;
- Результаты представлены в удобном структурированном отчете, включая комментарии;
- Результаты дают информацию об истинной и кросс-реактивной сенсibilизации, помогая оценить риск развития клинической реакции;
- Обоснование тактики ведения пациента.

Сравнение ISAC и ImmunoCap

Преимущества

Недостатки

ISAC

- 30 мкл сыворотки крови или плазмы(капиллярная или венозная)
- Параллельное исследование 112 аллергенов
- Натуральные и рекомбинантные белки
- Требуется меньше аллергена (примерно в 100 тыс. раз, пкг вместо мкг) на 1 исследование
- Отсутствие интерференции даже с очень высокими уровнями общего IgE

- Ручной метод
- Полуколичественный анализ
- Меньшая чувствительность
- Большая вариабельность для ряда аллергенов в пределах одного исследования
- Большой коэффициент вариации

ImmunoCap

- Автоматический метод
- Количественное определение
- Высокая чувствительность
- Коэффициент вариации ниже
- Натуральные , рекомбинантные белки иои неочищенные экстракты
- Подходит для мониторинга сенсibilизации

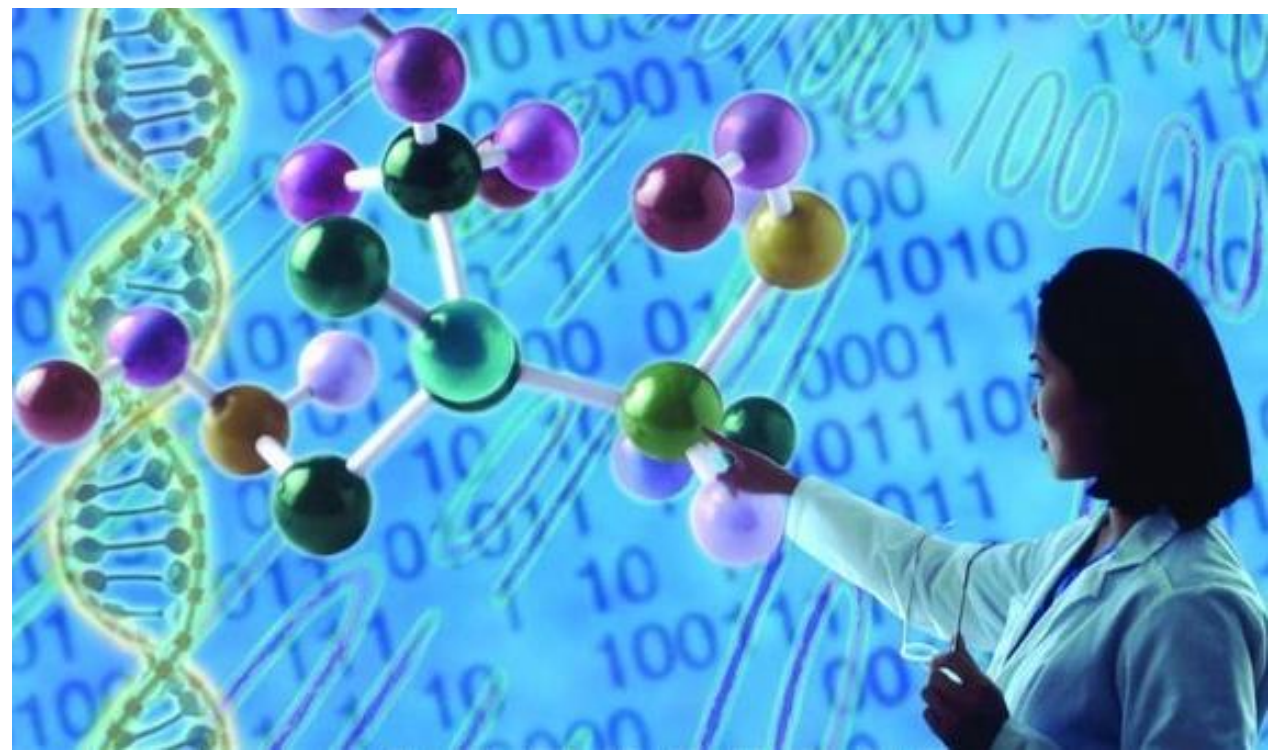
- Не включены некоторые источники аллергенов
- Возможна интерференция между IgE и другими изотипами, прежде всего IgG
- Один аллерген на исследование
- Обнаружение низкоаффинных антител, имеющих невысокое клиническое значение

**Современная
концепция
молекулярной
аллергологии —
диагностика и
лечение
пациентов с
аллергией на
абсолютно
новом уровне**

The transition from allergen extracts to molecules for the diagnostic work-up of IgE mediated reactions/diseases has great potential, but requires detailed knowledge and intelligent interpretation

Diagnostic algorithms traditionally start with the history (“top-down”), followed by skin tests, then IgE assays adding allergen molecules for “component-resolved diagnosis” (CRD)

Novel diagnostics invert the test order (“bottom-up”) and start with a multiplex (i.e. microarray-based) IgE assay and many components. Then the history is reviewed for concordance to establish a broad CRD



Лаборатории и партнёры

Лаборатории

Австрия

Vienna Challenge Chamber

Азербайджан

StarLab

Россия

Федеральные лабораторные сети

Медицинская лаборатория
"Ситилаб"

Медицинская лаборатория
"Гемотест"

СМ-клиника

ТАФИ-Диагностика

Центр аллергии и астмы
"Парацельс"

Ника Спринг

Научно-исследовательские
клинические институты

ГНЦ Институт иммунологии
ФМБА России

Научно-исследовательский
клинический институт педиатрии
имени академика Ю.Е.
Вельтищева

Центр астмы и аллергии
"АллергоДон"



Информационно-образовательный русскоязычный ресурс для врачей-клиницистов, преподавателей медицинских ВУЗов и факультетов последипломного образования, полностью посвященный молекулярной аллергологии и иммунологии

Образование, Наука, События, Новости, Публикации, Гранты и многое другое...

Простая процедура регистрации предоставит Вам доступ к публикациям, лекционным материалам и презентациям на русском языке

www.inunimai.org

Спасибо за внимание!



ООО «НИКА СПРИНГ НН»

г. Нижний Новгород

8 (831) 26-00-226 (многоканальный)

e.mail: lab@nika-nn.ru

[www. lab.nikann.ru](http://www.lab.nikann.ru)