



# Молекулярна діагностика – новий погляд на діагностику алергії

**Т. В. Бездітко**, д. мед. н., професор  
Харківський національний медичний університет





**Macro Array Diagnostics GmbH**


**ANTI-GEN ARRAY**  
with the European Patent Office (EPO)  
on 30 March 2016,  
No. 16162859.9.



Переможець конкурсу Best of Biotech 2017  
Крайній Start - up 2017









Алергенні екстракти або молекулярні алергени, які пов'язані з наночастинками, розташовані на твердій основі, що утворює макроскопічну решітку.

Після процедури лабораторного тестування виконується збір і аналіз зображень з використанням пристрою ImageXplorer. Результати випробувань аналізуються за допомогою програмного забезпечення Raptor Analysis від MADx і повідомляються в одиницях відповіді IgE (kU/L). Загальні результати IgE повідомляються в одиницях відповіді IgE (Ku/L).





[macroarraydx.com.ua](http://macroarraydx.com.ua)

Алергени,  
хто вони?



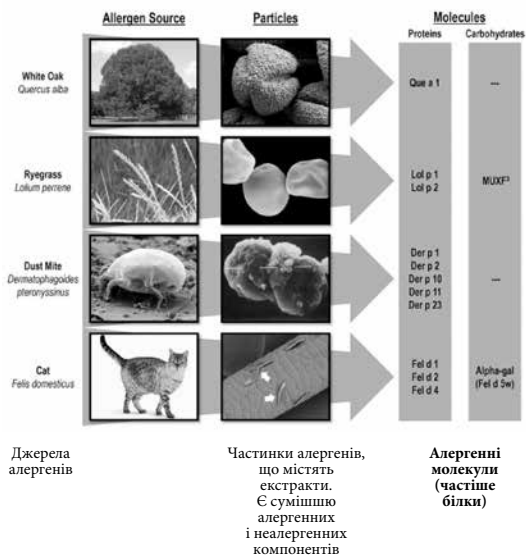
## Визначення алергенів

- **Істинний алерген** (*genuine allergen*) спричиняє специфічну сенсibiliзацію до відповідного джерела алергену;
- **Первинний алерген** (*primary allergen*) – тригерна сенсibiliзуюча молекула;
- **Головні алергени** (*major*) – ті, що зв'язуються із IgE у 50 % чи більше пацієнтів із алергією до одного і того ж джерела
- **Міnorні алергени** – розпізнаються менш ніж у 20 % пацієнтів

## Алергени, хто вони?

- Зазвичай білки, часто глікопротеїни з молекулярною масою 10–70 кДа.
- Можуть також бути ліпопротеїнами, а також гаптенами – неповними антигенами, що потребують носія.
- Алергени є Т-клітинними антигенами. Т-клітинні епітопи – короткі пептидні фрагменти, в межах 12–13 амінокислотних залишків, тоді як В-клітинні епітопи – специфічні послідовності амінокислотних залишків, що визначають тривимірну конфігурацію молекули.
- Перехресна антигенна активність обумовлена структурною гомологією молекул алергенів різного походження.
- Можуть мати дуже різноманітне походження: продукти тварин, рослин, мікроорганізмів.
- Походження алергену часто є важливим для класифікації.

## Від джерела алергену до екстракту та молекули



## Розвиток наукових знань вимагав перегляду систематики алергенів

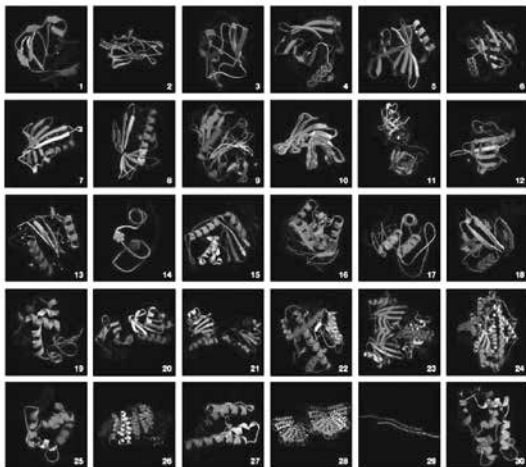
768 ALLERGEN NOMENCLATURE

Table 1. Examples of the nomenclature for some highly purified allergens

Source	New nomenclature	Old nomenclature	Source	New nomenclature	Old nomenclature
<b>Grass pollens:</b>					
<i>Lolium perenne</i> (perennial ryegrass)	Lol p I Lol p II Lol p III Lol p IV Lol p X	Group I (Rye I) Group II Group III HMBs (GpI-V7) Cytochrome c	<b>Non-biting midges (Chironomus spp.):</b>		
<i>Phleum pratense</i> (timothy)	Phl p V Phl p VI Phl p VII Phl p VIII	Ag25 Ag19 Ag30 Ag3	<i>C. thummi thummi</i>	CN I 1	Haemoglobin <sup>a</sup>
<i>Dactylis glomerata</i> (orchard or cocksfoot)	Dac p I	Dg1	<b>Animal danders:</b>		
<i>Poa pratensis</i> (Kentucky blue; June)	Poa p X	Cytochrome c	<i>Felis domesticus</i> (cat)	Fel d I	Cat I (Ag4)
<b>Weed pollens:</b>					
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (short ragweed)	Amb a I Amb a II Amb a IV Amb a V Amb a VI	AgE AgC Ra4(BPA-R) Ra5 Ra6	<i>Equus caballus</i> (horse)	Equ c I Equ c II Equ c III	Ag6 Ag7 Ag11
<i>Ambrosia trifida</i> (giant ragweed)	Amb t V	HaG	<i>Bos domesticus</i> (domestic cattle)	Bos d I Bos d II Bos d III	Ag1 Ag3 Ag8
<i>Salsola vermiculata</i> (Russian thistle)	Sel p I	RT <sub>1</sub> /RT <sub>2</sub>	<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	Rat r I Rat r II	ovalbumin <sup>a</sup> <sub>2</sub> /globulin
<b>Tree pollens:</b>					
<i>Alnus incana</i> (alder)	Aln t I	A14	<b>Fungal spores:</b>		
<i>Betula verrucosa</i> (silver birch)	Ber v I	Ag23(BV45?)	<i>Alternaria alternata</i>	Alt a 1 <sup>a</sup>	Alt-I(Ag1)
<i>Corylus avellana</i> (hazel)	Cor t I	Ha	<i>Cladosporium herbarum</i>	Clh h 1 <sup>a</sup> Clh h 2 <sup>a</sup>	Ag32 Ag34
<i>Cryptomeria japonica</i> (Japanese cedar)	Cry j I	SBP	<b>Hymenoptera venoms:</b>		
<i>Apis mellifera</i> (honey bee)					
<i>D. pteronyssinus</i>	Der p I	P(Ag42)	<i>Apis mellifera</i>	Api m I	Phospholipase A <sub>2</sub>
<i>D. farinosa</i>	Der f I	Ag11(Ag6)	<i>Dufourea</i> (honey bee)	Api m II Api m III Api m IV Api m V	Hyaluronidase Mastin Acid phosphatase Allergen C
<i>D. micropora</i>	Der m I	Ag6	<i>Vespa germanica</i> (yellow jacket)	Ves g I Ves g II Ves g V	Phospholipase A <sub>2</sub> /B Hyaluronidase Ag5
<b>House dust mites (Dermatophagoides spp.):</b>					
<i>D. pteronyssinus</i>	Der p I	P(Ag42)	<i>Polluxia annularis</i> (wasp)	Pol a I Pol a II Pol a V	Phospholipase A <sub>2</sub> /B Hyaluronidase Ag5
<i>D. farinosa</i>	Der f I	Ag11(Ag6)	<b>Ingestants:</b>		
<i>D. micropora</i>	Der m I	Ag6	<i>Gadus callarias</i> (cod)	Gaf c I	M (seralbumin)
			<i>Gallus domesticus</i> (chicken; egg white)	Gaf d I Gaf d II Gaf d III	Ovomucoid Ovalbumin Conalbumin
			<i>Acacia sum</i>	Asc s I	Asc-I

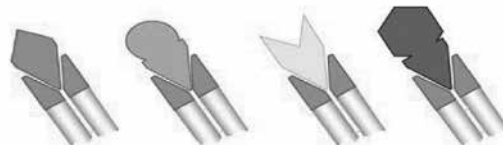
У 1984 році було створено основу сучасної номенклатури алергенів, засновану на конкретному систематичному положенні джерела алергену

### Просторова структура алергену

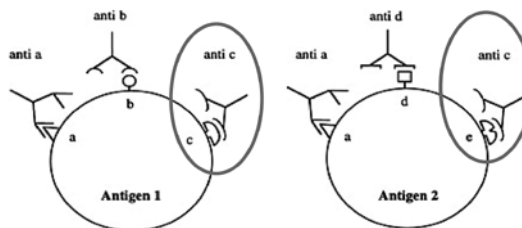


Вивчення тривимірної (просторової) структури алергенів дозволяє визначити розташування на молекулі **епітопів** (місць, де відбувається зв'язування антитіл). Визначення просторової структури дозволяє спрогнозувати **перехресну реактивність**

### Природа перехресної реактивності



Конформаційні епітопи мають «співпасти» із сайтом зв'язування, щоб спричинити каскад реакцій



Але буває, що епітопи мають подібну конформацію

Антитіла С реагують із епітопом «с» алергену 1, але дають крос-реакцію із епітопом «е» алергену 2

### Лабільні та стабільні алергени: оцінка ризику



Належність алергену до певної алергенної родини допомагає визначити його алергенний потенціал

## Родини білків за здатністю викликати тяжкі реакції та спричиняти перехресні реакції

<b>Storage proteins (Білки запасу)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Алергени горіхів та насіння</li> <li>• Є стабільними за термічної обробки</li> <li>• Асоційовані із тяжкими системними реакціями</li> <li>• <b>Низький ступінь перехресних реакцій</b></li> </ul> 	<b>Парвальбуміни</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Алергени риби та амфібій</li> <li>• Є стабільними за термічної обробки</li> <li>• Асоційовані із тяжкими реакціями</li> <li>• <b>Високий ступінь перехресних реакцій із альбумінами сироватки</b></li> </ul> 
<b>LTP (неспецифічні білки – переносники ліпідів)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Алергени фруктів, овочів, горіхів, пилку (напр., Pru p3)</li> <li>• Є стабільними за термічної обробки</li> <li>• Часто асоційовані із тяжкими системними реакціями</li> <li>• <b>Ступінь перехресних реакцій є варіабельним</b></li> </ul> 	<b>Serum albumins (альбуміни сироватки)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Алергени тварин (кров, епітелій, молоко) напр., Fel d2</li> <li>• Чутливі до нагрівання і травлення</li> <li>• <b>Високий ступінь перехресних реакцій</b></li> </ul> 
<b>Тропоміозини</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Алергени морепродуктів</li> <li>• Є стабільними за термічної обробки</li> <li>• Як харчові алергени асоційовані із тяжкими реакціями</li> <li>• <b>Високий ступінь перехресту в родині</b></li> </ul> 	<b>PR-10 білки (Bet v1 гомологи)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Алергени пилку, фруктів, овочів, горіхів</li> <li>• Чутливі до нагрівання і травлення</li> <li>• Асоційовані із локальними симптомами – оральний синдром</li> <li>• <b>Ступінь перехресту варіабельний</b></li> </ul> 
<b>Ліпокаліни</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Алергени тварин</li> <li>• <b>Ступінь перехресних реакцій є варіабельним</b></li> </ul> 	<b>Полкальцини (Са-зв'язуючі)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Алергени бур'янів, пилку трав і дерев, напр. Bet v4</li> <li>• <b>Високий ступінь перехресних реакцій</b></li> </ul> 

## Родини білків за здатністю викликати тяжкі реакції та спричиняти перехресні реакції

### Профіліни

- Алергени рослинної їжі, латексу, пилку дерев, трав, бур'янів
- Чутливі до нагрівання і травлення
- Рідко асоційовані із клінічними симптомами
- У деяких пацієнтів викликають тяжкі реакції
- **Високий ступінь перехресних реакцій із альбумінами сироватки**

### CCD (карбогідратні детермінанти)

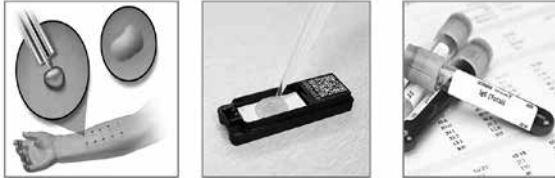
- Є у пилку, рослинній їжі, комах
- Рідко асоційовані із клінічними симптомами
- **Маркер сенсibiliзації до CCD**
- **Надвисокий ступінь перехресних реакцій**

## Проламіни/nsLTPs (переносники ліпідів)

МОЛЕКУЛА	ДЖЕРЕЛО
Art v3	Полин пилок
Par j2	Настінниця лікарська пилок
Vit v1	Виноград
Act d10	Ківи
Cor a8	Фундук
Ara h9	Арахіс
Api g2, g6	Цибуля
Sola l6	Помідор
Mal d3	Яблуко
Pru d3	Персик

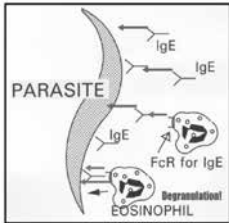


## Методи визначення IgE. Характеристика, клінічне значення, клінічні можливості



## Молекулярну алергодіагностику доцільно використовувати

- Для виявлення сенсibiлізації до алергенів;
- У пацієнтів з полісенсibiлізацією;
- Для диференційної діагностики істинної та перехресної сенсibiлізації;
- Для підбору компонентів АСИТ і прогнозу ефективності АСИТ, а також при її неефективності
- Для прогнозування тяжких системних алергічних реакцій на харчові продукти;
- Для призначення дієтичних рекомендацій та елімінаційних заходів



## IgE - основний провідник алергій

- У нормі:**
- важлива складова протипаразитарного імунітету;
  - специфічний месенджер запалення

## Загальний IgE

### Переваги

- Є важливим критерієм алергізації;
- Виявляє алергію незалежно від її джерела;
- Може бути маркером загальної алергенної реактивності організму.

### Недоліки

- Може лишатись у межах норми, коли виявляються специфічні IgE;
- Не надає інформації, що саме є джерелом алергії;
- Підвищення може бути викликано не алергією



- Переваги**
- Дозволяють визначити джерело алергії
- Недоліки**
- Зазвичай велика кількість алергенів ускладнює діагностичний пошук

## Специфічні IgE

**ALEX**  
ALLERGY EXPLORER



- Повний кількісний аналіз sIgE
- Кількісний tIgE одночасно
- Діагностика алергії без CCD
- Єдина система з інтегрованою здатністю блокування антитіл до CCD
- Зручна система інтерпретації:
- За допомогою програмного забезпечення ALEX
- Алергени поділені на 20 груп

Це нове покоління сучасних тестів для діагностики (in vitro) алергічних реакцій 1 типу.  
Мультиплексна панель 282 алергенів (160 екстрактів алергенів і 122 алергени молекули і загальний IgE), охоплює більше 99% усіх стандартних діагностичних тестів

## Рутинний клінічний алгоритм

Clinical history and extract-based diagnostics	IgE cross-reactivity or co-sensitization?	Component-resolved diagnostics	Allergen immunotherapy												
 Case history Rhinoconjunctivitis in late summer	 Ragweed <i>Ambrosia artemisiifolia</i> Flowering season: July to September	 Amb a 1 Genuine marker for ragweed sensitization	 Immunotherapy using allergen extracts												
 Skin prick test using inhalant allergen extracts SPT: ragweed and mugwort positive	 Mugwort <i>Artemisia vulgaris</i> Flowering season: July to September Primary sensitizer is difficult to identify	 Art v 1 Genuine marker for mugwort sensitization Identification of primary sensitizer is feasible	<table border="1"> <tr> <td>Amb a 1</td> <td>Art v 1</td> <td>Therapeutics</td> </tr> <tr> <td>+</td> <td>-</td> <td>Ragweed</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>+</td> <td>Mugwort</td> </tr> <tr> <td>+</td> <td>+</td> <td>Ragweed and mugwort</td> </tr> </table> Selection of relevant extracts for AIT	Amb a 1	Art v 1	Therapeutics	+	-	Ragweed	-	+	Mugwort	+	+	Ragweed and mugwort
Amb a 1	Art v 1	Therapeutics													
+	-	Ragweed													
-	+	Mugwort													
+	+	Ragweed and mugwort													