

Актуальность использования иммуноферментного анализа для характеристики аллергенной нагрузки жилых помещений

Ахапкина И. Г., канд. биол. наук, НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. РАМН, Москва, 105064, Москва, пер. Малый Казенный, 5а

Необходимость определения аллергенной нагрузки помещений, обусловленной пылью различных растений, сохраняется в течение всего года, несмотря на известную сезонность процесса пыления. Применение обратного ИФА с использованием поликлональных антисывороток, полученных против стандартного аллергенного экстракта, в частности пыльцы березы (*Betula pendula*), является эффективным и доступным для скрининговых исследований пыли помещений. Показано, что визуальный подсчет пыльцевых зерен в пыли помещений не позволяет получать данные об аллергенной нагрузке. При исследовании 78 образцов пыли квартир г. Москвы концентрация аллергена пыльцы березы в 42 образцах составляла более 300 мкг/г пыли, в остальных образцах в среднем $165,95 \pm 60,46$ мкг/г пыли.

Ключевые слова: ИФА, скрининговые исследования, аллерген, пыльца березы (*Betula pendula*).

В последнее время наблюдается неуклонный рост числа людей с аллергопатологией. Комфортность жизни таких людей зависит от аллергенной и пирогенной нагрузок помещений, в которых аллергики проводят значительное время. Источниками названных соединений являются тараканы, клещи домашней пыли, микромицеты, бактерии, пыльца различных растений. Наиболее широко в нашей стране для определения количества аллергенов (АЛ) в окружающей среде используются методы, которые скорее следует называть косвенными. Потому что обычно проводят визуальный подсчет источников аллергенов, а не самих аллергенов, например, собирают пыль с постельных принадлежностей и подсчитывают количество клещей домашней пыли. Так можно определить содержание клещей, но известно, что источниками клещевых АЛ являются также личинки шкурки и фекалии клещей, последние, естественно, невозможно определить визуально. Таким же образом проводят визуальный подсчет зерен пыльцы различных растений. В этом случае отрицательной стороной метода является невозможность оценить количество фрагментарных остатков пыльцевых зерен. Но уже давно известно, что источниками АЛ являются не только целые зерна, но и разрушенные [8]. Более того, пыльца растений, как, впрочем, клещи домашней пыли и тараканы, привносятся в помещения другие источники АЛ – мицелиальные и дрожжеподобные грибы. Ранее нами было показано, что пыльца березы (*Betula pendula*) несет на себе несколько видов дрожжей, в среднем 10^4 КОЕ/г

пыльцы [1]. Несмотря на небольшое количество грибов, которые попадают в помещения вместе с пылью, они долгое время способны сохранять свою жизнеспособность и в благоприятных условиях активно размножаться. В результате, происходит увеличение микогенной нагрузки помещений. После деструкции грибов биотопы пополняются микогенными β -глюканами, которые относятся к пирогенным соединениям и в свою очередь могут провоцировать различные реакции иммунной системы человека в зависимости от их количества [4,9]. Таким образом, пыль помещений становится аккумулятором разных препаратов, способных провоцировать различные иммунологические реакции человеческого организма. Вероятно, привлечение иммунохимических методов может позволить разработать эффективные способы определения количественного содержания самих АЛ или пирогенов, а не их источников в окружающей среде. Поэтому представлялось интересным использовать методику определения содержания АЛ в пыли помещений при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) на примере пыльцевых АЛ, в частности АЛ пыльцы березы (*Betula pendula*).

Материалы и методы. В работе использовали антитела диагностические против IgG(H+L) кролика, меченные пероксидазой (РАМН, предприятие по производству бакпрепаратов НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи), коммерческий АЛ березы (*Betula pendula*) (г. Ставрополь, ФГУП «Аллерген», 10000 рну/мл, что соответствует концентрации белка 0,625 мг/мл), пыльца березы, собранную весной 2011 года в г. Мо-

ске. Поликлональную антисыворотку (ПА) против стандартного аллергенного экстракта пыльцы березы (*Betula pendula*) получали путем иммунизации кроликов один раз в 28 дней в течение 3 месяцев по 500 мкг стандартного аллергенного экстракта пыльцы березы, причем первую инъекцию проводили в присутствии полного адъюванта Фрейнда («Sigma»). ПА разливали по 50 мкл и хранили при -20°C .

В течение года в жилых помещениях г. Москвы были собраны комплексные образцы пыли. Образцы пыли собирали на стерильный хлопчатобумажный фильтр при обработке поверхности помещения пылесосом. Образцы пыли до проведения анализа хранили 2–4 недели при -20°C . Визуальный подсчет пыльцевых зерен в образцах пыли проводили в прокрашенных сафранином пробах на предметных стеклах с лунками. Для этого к 5 мг пыли прибавляли 1 мл стерильного физиологического раствора, тщательно перемешивали. К 50 мкл суспензии пыли прибавляли раствор сафранина (2–3 мкл) для подкрашивания и помещали в лунку предметного стекла, закрывали сверху предметным стеклом.

Для определения концентрации АЛ пыльцы березы обратным ИФА к 5 мг пыли прибавляли 1 мл карбонат-бикарбонатного буфера pH 9,6 (КББ), экстрагировали при перемешивании при комнатной температуре в течение 60 мин. В 2 параллельные лунки 96-луночного планшета помещали по 100 мкл разведений стандартного АЛ пыльцы березы в КББ (в первые две лунки А – 1 мкг/мл, в последующие В, С, D – 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,125 мкг/мл соответственно), в лунке E – по 100 мкл КББ, и далее в следующие 2 параллельные лунки – по 100 мкл исследуемого экстракта (надосадочной жидкости). Инкубировали 1 час при 37°C , затем ночь при 4°C , удаляли жидкость из лунок, промывали 245 мл фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (ФСБ) в присутствии 0,5% Tween-20. В лунки вносили по 100 мкл ПА в разведении 1:1000, инкубировали 45 минут при 37°C . Лунки освобождали от реакционной массы, промывали 3 раза ФСБ, прибавляли по 100 мкл конъюгата (антитела диагностические против IgG(H+L) кролика, меченные пероксидазой) в разведении 1:2000, инкубировали 30 минут при 37°C . Реакционную смесь удаляли из лунок, промывали 3 раза ФСБ, затем 2 раза дистиллированной водой. В лунки вносили по 100 мкл субстрата – ТМБ. Инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 3–5 мин. Реакцию останавливали прибавлением 100 мкл 5%-го раствора серной кислоты.

Измеряли оптическую плотность (ОП) растворов в лунках при длине волны, равной 450 нм. Для построения калибровочной кривой использовали данные ОП, полученные для разведений стандартного АЛ пыльцы березы за вычетом средней величины ОП, полученной для лунок, в которые был помещен КББ. По калибровочной кривой определяли концентрацию АЛ пыльцы березы в образцах пыли. Для определения концентрации АЛ пыльцы березы ингибиторным ИФА к 5 мг пыли прибавляли 500 мкл ФСБ, экстрагировали при перемешивании при комнатной температуре в течение 60 минут. В 2 параллельные лунки 96-луночного планшета помещали по 100 мкл раствора стандартного аллергена пыльцы березы в КББ с концентрацией 1 мкг/мл. Количество лунок рассчитывали исходя из следующих данных – 10 лунок для построения калибровочной кривой плюс число образцов, умноженное на два. Инкубировали 1 час при 37°C , затем ночь при 4°C , удаляли жидкость из лунок, промывали 245 мл ФСБ в присутствии 0,5% Tween-20. В первые две лунки (А) вносили 50 мкл стандартного аллергенного экстракта пыльцы березы с концентрацией 2 мкг/мл, в последующие (В, С, D) – 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл соответственно), в лунки F – по 50 мкл ФСБ, в следующие – по 50 мкл исследуемого экстракта. Во все лунки вносили по 50 мкл ПА в разведении 1:500, инкубировали 40 минут при 37°C . Лунки освобождали от реакционной массы, промывали 3 раза ФСБ, прибавляли по 100 мкл конъюгата (антитела диагностические против IgG(H+L) кролика, меченные пероксидазой) в разведении 1:2000, инкубировали 30 минут при 37°C . Реакционную смесь удаляли из лунок, промывали 3 раза ФСБ, затем 2 раза дистиллированной водой. В лунки вносили по 100 мкл субстрата – ТМБ. Инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 3–5 мин. Реакцию останавливали прибавлением 100 мкл 5%-го раствора серной кислоты. Измеряли ОП растворов в лунках при длине волны, равной 450 нм. Для построения калибровочной кривой использовали данные ОП, полученные для разведений стандартного аллергена пыльцы березы и ОП, полученной для лунок, в которые был помещен ФСБ. По калибровочной кривой определяли концентрацию АЛ пыльцы березы в образцах пыли. Аналогично строили и калибровочную кривую для суспензии пыльцы березы.

Результаты и обсуждение. При визуальном определении количества пыльцевых зерен в образцах пыли отмечено присутствие разных видов пыльцы, в частности, в образцах присутствовали

Таблица

Сравнение содержания пыльцевых зерен березы в сравнении с концентрацией аллергена пыльцы березы

| № | Зерна пыльцы (шт./г пыли) | Кол-во АЛ (мкг/г пыли) | № | Зерна пыльцы (шт./г пыли) | Кол-во АЛ (мкг/г пыли) |
|---|---------------------------|------------------------|----|---------------------------|------------------------|
| 1 | 200 | 200 | 6 | 800 | 144 |
| 2 | 140 | 160 | 7 | 180 | 138 |
| 3 | 200 | 122 | 8 | 120 | 78 |
| 4 | 60 | 50 | 9 | 200 | Более 300 |
| 5 | 600 | Более 300 | 10 | | |

одновременно зерна пыльцы березы, сосны, лещины, ольхи, ели. В образцах пыли соотношение разных видов пыльцы было различным. Также наблюдали значительное количество разрушенных зерен, которые не всегда можно было отнести к тому или иному виду. Таким образом, было показано, что в образцах пыли жилых помещений г. Москвы обычно присутствует пыльца различных растений независимо от времени сбора пыли. В данной работе в качестве примера было выбрано изучение аллергенной нагрузки помещений пыльцой березы. Очевидно, что подсчет целых зерен, т. е. тех, которые могут быть точно идентифицированы, не позволяет учесть количество разрушенных зерен в конкретном помещении. Поэтому только в 9 образцах пыли провели визуальный подсчет целых пыльцевых зерен березы. В *таблице* приведены примеры содержания пыльцевых зерен березы в сравнении с концентрацией аллергена пыльцы березы в некоторых квартирах. Концентрацию АЛ пыльцы березы в этом случае определяли обратным ИФА. Ранее было показано, что иммунохимическая активность суспензии пыльцы березы с концентрацией, равной 1000 пыльцевых зерен в 1 мл, соответствует иммунохимической активности аллергенного экстракта пыльцы березы с концентрацией 0,001 мг/мл [1].

Как следует из данных, прямого соответствия между количеством пыльцевых зерен и концентрацией АЛ пыльцы березы в образцах пыли нет. Следует заметить, что несоответствие данных иммуноферментного определения концентрации аллергенов и концентрации источников АЛ известно и для грибов, и клещей домашней пыли [3, 5]. Т.е. использование ИФА для выявления АЛ пыльцы деревьев в окружающей среде позволяет учитывать массовую долю АЛ, вносимую разрушенными пыльцевыми зернами. В то же время в нескольких образцах пыли количество АЛ значительно ниже предполагаемого количества. Возможным объяснением этого может быть недоступность для анализа АЛ вследствие изменения структуры под действием внешних факторов либо неполного выхода АЛ из пыльцевых зерен при подготовке проб из-за не определяемых визуально изменений структуры апертур.

ИФА можно проводить разными способами. Часто для концентрационных измерений используют ингибиторный или конкурентный ИФА (*рис. 1*) [6]. Данная методика основана на ингибировании связывания избытка АС с АЛ, сорбированным на твердой фазе, известным количеством свободного антигена (АЛ) – в этом случае получают данные для построения калибровочной кривой – или неизвест-

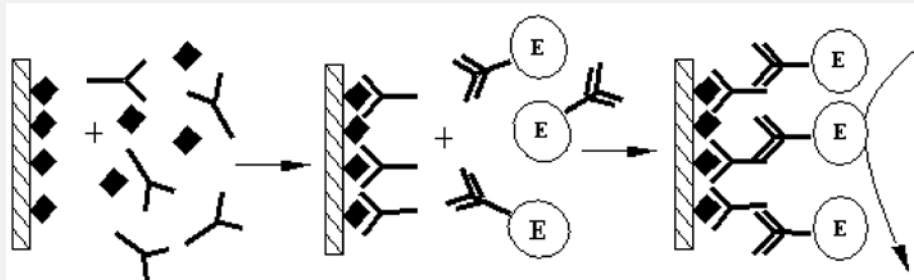


Рис. 1. Принцип метода – непрямой конкурентный двухстадийный ИФА

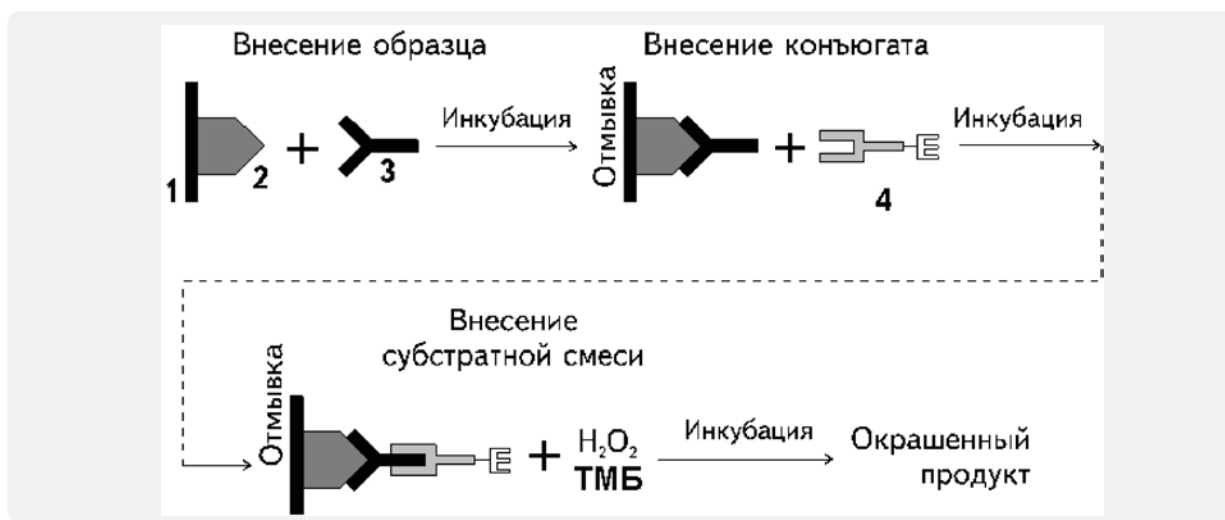


РИС. 2. Схема обратного или непрямого иммуноферментного анализа

ным количеством антигена (АЛ), содержащегося в пробе, для определения концентрации. Другим способом проведения ИФА является не прямой или обратный метод (рис. 2) [7]. В этом случае на твердую фазу сорбируют пробу образца пыли и искомый АЛ в разных концентрациях для построения калибровочной кривой.

На рис. 3, 4 представлены концентрационные кривые, полученные при использовании двух методов ИФА. Как в первом, так и во втором случаях концентрационные кривые ингибиторного теста менее информативны, поскольку интервал концентраций сужен, т. е. чувствительность метода невысока. Более эффективным представляется использование концентрационной кривой, полученной при использовании разных концентраций АЛ пыльцы березы. Ранее было показано, что активного разрушения пыльцевых зерен при экстракции АЛ не происходит без проведения дополнительных процедур [2]. Данные рис. 3 также подтверждают, что ИФА предоставляет большую информацию о содержании АЛ в образцах (пыли или суспензии пыльцы). Концентрационные кривые, построенные с привлечением суспензий пыльцы в качестве калибраторов, демонстрируют низкую чувствительность метода для определения содержания пыльцевых зерен. В связи с вышесказанным для определения концентрации АЛ пыльцы березы в домашней пыли г. Москвы был выбран не прямой способ проведения ИФА. Было исследовано 78 образцов пыли. В результате показано, что 32 образца содержали АЛ пыльцы березы в концентрации более 300 мкг/г пыли. В данном случае выбранные пара-

метры для построения концентрационной кривой не позволили провести более точное определение. Соответственно для определения концентрации необходимо либо увеличить количество калибраторов, либо взять большее разведение навески пыли. Значения ОП оставшихся 46 проб находились в пределах кривой концентрации. Количество АЛ пыльцы березы в этих образцах составляло в среднем $165,95 \pm 60,46$ мкг/г пыли.

Заключение. Необходимость в более точном качественном и количественном определении негативных факторов окружающей среды связана с элиминационными мероприятиями, от которых зависит качество жизни людей с генетической предрасположенностью к гиперчувствительности. Разрушенные пыльцевые зерна из-за малых размеров труднее поддаются удалению из помещений даже современными мощными пылесосами. Поэтому разработка и применение новых эффективных методов определения концентрации негативных факторов, в частности АЛ пыльцы березы, весьма актуальны в последнее время. Настоящее исследование показало, что применение обратного ИФА с использованием поликлональной антисыворотки, полученной против стандартного аллергенного экстракта пыльцы березы, эффективно и доступно для проведения скрининговых обследований большого количества объектов. Вероятно, аналогичный подход к определению аллергенной нагрузки помещений будет состоятельным и в отношении других аллергенов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №11-04-01063.

Список использованной литературы

1. Ахапкина И. Г. Иммунохимическая активность пыльцы березы (*Betula pendula*). //Иммунология. – 2007. – №6. – С. 362–364.

2. Ахапкина И. Г. Изменение иммунохимической активности пыльцы березы (*Betula pendula*) в зависимости от способа приготовления проб для исследования. //Аллергология и иммунология. – 2007. 8(4), 407–408.

3. Желтикова Т. М. Синантропные клещи (Acariformes: Pyroglyphidae, Acaridae, Glycyphagidae) – источник бытовых аллергенов. Диссертация на соискание ученой степени доктора биол. наук. 1998. – Москва.

4. Fluckiger B., Koller T., Monn C. Comparison of airborne spore concentrations and fungal allergen content. //Aerobiologia. 2000. –16, №3–4. –P. 393–396.

5. Iossifova Y. Y., Reponen T., Bernstein D. L. et al. House dust (1-3)- β -D-glucan and wheezing in infants. //Allergy, 2007, 62(5), 504–513.

6. <http://www.immunotek.ru/product/inr/pr/CSAnth.htm>

7. <http://www.vector-best.ru/publ/doc/9607.php>

8. Pehkonen E., Rantio-Lehtimäki A. Variations in airborne pollen antigenic particles caused by meteorologic factors. //Allergy. 49: 472–477, 1994.

9. Schram-Bijkerk D., Doekes G., Boeve M. et al. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. Clin. & Exp. //Allergy. 2005. –V.35. – P. 1272–1278.

Topicality use of ILISA for characteristics of allergenic loading of dwellings

Akhapkina I. G., Scientific research institute of vaccines and sera of I. I. Mechnikova The Russian Academy of Medical Science, Moscow

Akhapkina I. G., leading research worker Scientific research institute of vaccines and sera of I. I. Mechnikova.

The Russian Academy of Medical Science, Moscow, Maliy Kazenniy str., 5a.

E-mail: isun17@yandex.ru

Necessity of detection of allergenic loading of the dwellings caused by pollen of various plants, remains within all year, despite known seasonal prevalence of process of pollination. Application of the ILISA with use polyclonal antisera received against a standard

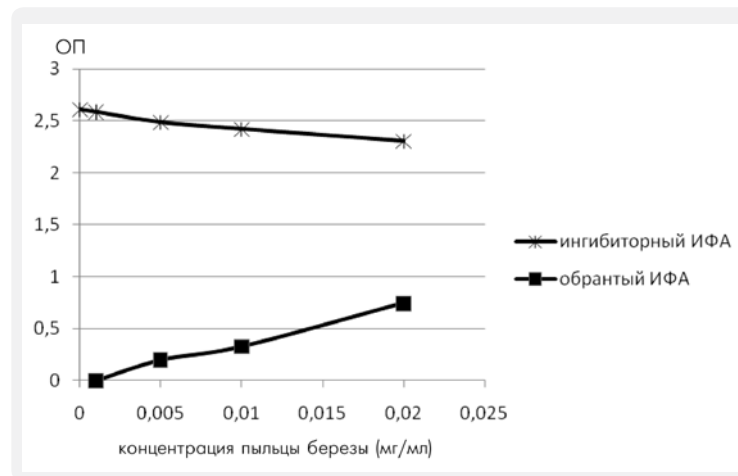


РИС. 3. Сравнение концентрационных кривых ингибиторного и обратного методов ИФА для определения концентрации пыльцы березы

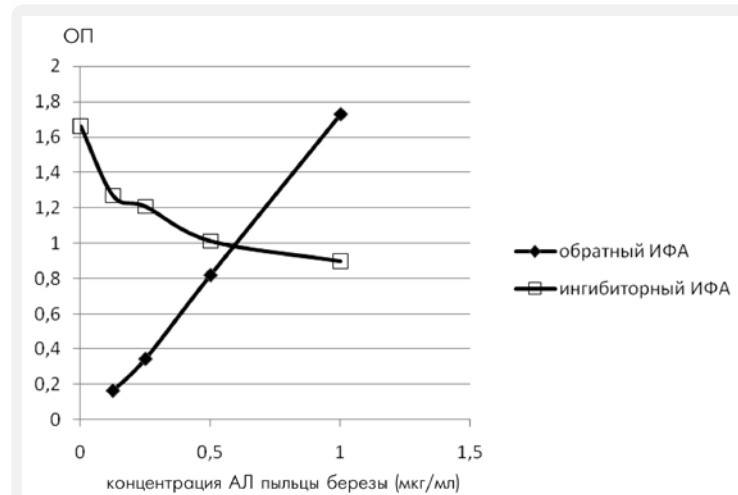


РИС. 4. Концентрационные кривые ингибиторного и обратного методов ИФА для определения концентрации АЛ пыльцы березы

allergenic extract in particular of pollen of a birch (*Betula pendula*), is effective and accessible for screening researches of a dust of dwellings. It is shown, that visual calculation of pollen grains in a dust of dwellings does not allow obtaining data about allergenic loading. At research of 78 samples of a dust of apartments of Moscow concentration of allergen of pollen of a birch 42 samples made more than 300 mkg/g of a dust, in other samples on the average 165,95 60,46 dust mkg/g.

Key words: ELISA, screening research, allergen, birch pollen (*Betula pendula*).