



Применение ИФА (ELISA) для оценки иммунной нагрузки на организм животного

О.С. ПРОКОПЦЕВА, М.Л. ЕРШОВА, А.В. ДЕМИДЕНКО, ООО «Иммуновет»,
С.Э. КОНДАКОВ, химический факультет МГУ, г. Москва,
В.А. КУЗЬМИН, Санкт-Петербургская ГАВМ, г. Санкт-Петербург

Специалисты в области ветеринарии все чаще отмечают, что количество аллергических заболеваний среди животных неуклонно растет. В большей степени это верно для животных, живущих в условиях крупных городов. Причинами считают неправильное кормление и неудовлетворительную экологическую обстановку и, как следствие, нарушение обменных процессов, снижение защитных сил организма (1, 6).

Среди аллергических реакций выделяют быстрые реакции (реакции I типа, классическую, IgE-опосредованную аллергию) и замедленные, проявляющиеся через несколько часов или дней (преимущественно реакции III и IV типов, характеризующиеся повышенным уровнем иммуноглобулинов G и M в крови, таблица 1) [1, 7]. Во многих из этих случаев выявление аллергии с использованием классических для ветеринарии методов (элиминационной диеты и последовательных испытаний пищевых продуктов) может оказаться длительным и затруднительным процессом. При непереносимости целого спектра пищевых антигенов и в других сложных случаях их применение редко приводит к успешным диагностическим результатам. Кожные тесты в свою очередь характеризуются неточностью диагностики и способны выявить лишь ограниченный спектр типов аллергий [1, 2, 5].

Аллергические расстройства, являющиеся следствием индивидуальной пищевой непереносимости (ПН), приводят к возникновению:

— кожных проблем (алопеции, раздражения, шелушения, воспаления, изъязвлений и т.д.);

— отитов;
— гастроинтестинальных проблем (диареи, рвоты, анорексии, изменений веса);
— дыхательных проблем (одышка, чихания);
— снижения подвижной активности и выносливости;
— поведенческих расстройств (агрессии, апатии) [5-7].

Использование иммунологических тестов, способствующих выявлению спектра кормов с риском повышенной иммунной реакции на них, значительно облегчает формирование гипоаллергенной диеты для животных, страдающих пищевой аллергией (ПА) и ПН.

Этиология, патогенез, классификация

Реакции на пищевые аллергены развиваются после периода сенсибилизации, при проникновении чужеродных белковых молекул, входящих в состав корма, либо их фрагментов через участки микроповреждений слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и, возможно, ротовой полости в кровеносное русло. При регулярном представлении антигена реакция иммунной системы на него усиливается, что выражается

в повышении титра специфических антител. Последующие контакты с антигеном могут приводить к развитию явной (по I типу) либо скрытой (по II и III типам) формам аллергической реакции (таблица 1).

Развитие истинных аллергических реакций проходит три стадии.

I. Стадия иммунных реакций (иммунологическая) начинается с первого контакта организма с пищевым белковым аллергеном (ПБА) и заключается в образовании и накоплении в организме аллергических антител или сенсибилизированных лимфоцитов. При повторном попадании ПБА в организм образуется комплекс аллерген-антитело и/или аллерген-сенсибилизированный лимфоцит.

II. Стадия биохимических реакций (патохимическая). В результате сложных биохимических процессов, запускаемых комплексами аллерген-антитело или аллерген-сенсибилизированным лимфоцитом, выделяются готовые и образуются новые медиаторы. Со специфическим аллергеном взаимодействуют клетки-мишени аллергии, несущие комплексы IgE, G или антител других классов.

III. Стадия клинических проявлений (патофизиологическая). Повышение в крови уровня медиаторов приводит к развитию гиперемии кожи, зуда, кожных высыпаний, лихорадке, головной боли, затруднению дыхания и ряда других клинических симптомов, а при скрытых формах ПА возможно развитие локальных воспалительных процессов [8].



Таким образом, развитие аллергической реакции невооруженным глазом можно диагностировать лишь на последнем этапе ее развития. При скрытой форме ПА главное следствие — системное ослабление иммунитета и организма в целом за счет регулярного контакта с пищевыми антигенами и развития локальных воспалительных процессов. В таком состоянии организм в большей степени подвержен поражению извне и воспалительный процесс может быть приписан инфекционному заболеванию.

Клиническая картина

Наиболее частыми проявлениями ПА являются общие аллергические реакции (анафилактический шок, многоформная эритема, буллезный эпидермолиз, включая эпидермальный некролиз). Нередки различные кожные реакции (крапивница, контактный дерматит, фиксированная экзема, экзема и подобные ей поражения, акнеформные высыпания, лихеноидная сыпь и др.), поражения слизистых оболочек ротовой полости, языка, глаз, губ (стоматиты, гингивиты, глосситы, хейлиты и др.) и желудочно-кишечного тракта (гастрит, гастроэнтерит).

Со стороны кроветворной системы при ПА могут вовлекаться все три ряда кроветворения. Чаше

всего наблюдают аллергические лейкопению и агранулоцитоз, реже — тромбопению и анемию. Реже ПА выявляют как причину миокардитов, нефропатии, системных васкулитов, узелкового периартериита [9]. Однако распространенными симптомами ПА являются поражения сосудов, по-разному проявляющиеся на разных клеточно-органных территориях: в почках они приводят к развитию нефрита, в желудочно-кишечном тракте — гастритов, в легких — пневмоний, в коже — экзантем. Аллергические реакции на пищевые аллергены могут развертываться в миокарде и коронарных сосудах, в результате чего возникают преходящие расстройства коронарного кровообращения вплоть до типичной картины инфаркта.

Диагностика

Классическим способом определения неблагоприятных реакций животного на корм в ветеринарии являются скарификационные тесты в сочетании с элиминационной диетой (так называемый «золотой стандарт») [5, 7]. Однако таким образом выявляются лишь те пищевые продукты, реакция на которые достигла крайней, третьей, степени развития, когда клинические проявления нельзя не заметить. Но развитие ПА нужно не только лечить, но и предотвращать.

Другим испытанным способом диагностики, используемым для определения атопии и ПА, является проведение кожных тестов с аппликацией или инъекцией экстрактов пищевых аллергенов [1, 2, 5]. Однако так возможно диагностировать только IgE-зависимую форму аллергии и опять же лишь в значительной степени ее развитие.

Наиболее универсальным методом диагностики ПА в медицине — постепенно он занимает все более значимое место в ветеринарии — является использование серологических тестов, позволяющих выделить спектр пищевых аллергенов, на которые иммунная реакция организма наиболее выражена. Титр специфических антител позволяет выявить не только те корма, которые являются причиной существующих симптомов, но и выделить в группу риска продукты, потенциально способные вызвать развитие аллергии при регулярном контакте. Только с помощью серологических тестов можно выявить случаи так называемой кросс-реактивности аллергенов корма, когда реакция проявляется на продукт ранее не употребляемый. Кроме того, применение серологических тестов позволяет выявить как IgE-зависимые, так и IgG-зависимые реакции [1, 3, 4].

Таблица 1. Классификация аллергических реакций

тип	характеристика	комплемента	иммуноглобулин	медиаторы	клиническая картина
I	аллерген взаимодействует с IgE на поверхности мембраны тучной клетки, что приводит к выбросу медиаторов	—	E	гистамин, лейкотриены, простагландины, фактор активации тромбоцитов, хемотаксические факторы	аллергические ринит, конъюнктивит, бронхоспазм, крапивница, отек Квинке, анафилактический шок
II	аллерген на поверхности клеток периферической крови, эпителия взаимодействует с иммуноглобулинами сыворотки, активируется система комплемента, происходит цитолиз	+	G, M	лизосомальные ферменты, хемотаксические факторы, анафилотоксины	синдром Лайела, синдром Стивенса-Джонсона, цитопении
III	повышено содержание иммунных комплексов с аллергеном; они активируют систему комплемента, что приводит к повреждению стенки сосудов и образованию периваскулярных клеточных инфильтратов	+	G, M	лизосомальные ферменты, анафилотоксины, хемотаксические факторы	сывороточная болезнь, васкулиты, нефриты, альвеолит, реакция Артюса-Сахарова
IV	сенсibilизированные лимфоциты продуцируют интерлейкины, вызывающие клеточную инфильтрацию, повреждение тканей и выброс медиаторов воспаления	—	—	интерлейкины, хемотаксические факторы, лизосомальные ферменты	контактный дерматит, эозинофильные инфильтраты, гранулемы внутренних органов, реакция на туберкулин

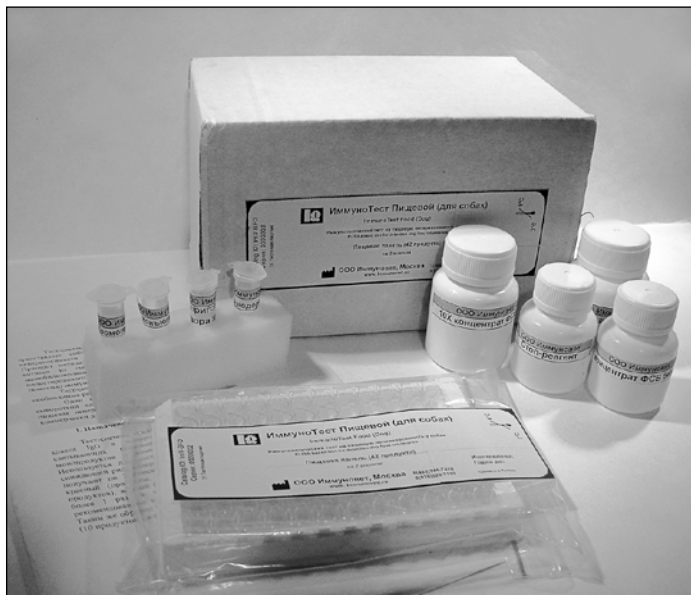


Специфические иммунологические исследования

Для повышения надежности результатов лабораторного выявления различных видов ПА у животных *in vitro* в США и странах ЕС используются иммунологические методы. В России ООО «Иммуновет» также разработало и предлагает тест-системы и наборы реагентов для определения наличия специфических антител на широкий спектр пищевых аллергенов из различных продуктов и коммерчески доступных комплексных кормов. Анализ последних для составления гипо-

аллергенной диеты производится впервые, т.к. в западных ветеринарных клиниках рекомендации по выбору коммерчески доступных кормов осуществляются только на основании заявленных производителями составов готовых рационов.

Авторами статьи с помощью метода ИФА (ELISA) проводились собственные исследования активности аллергенов, выделенных по стандартной методике из породных и диетических рационов для собак, выпускаемых под известными брендами, и из белковых компонентов этих продуктов, согласно составу, заявленному производи-



телем [10, 11]. Реакция считалась положительной, если оптическая плотность пробы или концентрация соответствующего специфического иммуноглобулина, отвечающего за иммунный ответ, превышала контроль в 2 и более раз. Реактивность каждого аллергена исследовалась на выборке из сывороток крови 8 собак (таблица 2).

Таким образом, прямой корреляции между реактивностью на компоненты корма и реактивностью на готовый рацион нет. Это можно связать с тем, что в производстве кормов используется обработанный/расщепленный белок. Из объективных дифференциально-

диагностических критериев рекомендовано полагаться лишь на результаты пробирочных специфических иммунологических тестов, которые при псевдоаллергических реакциях на аллергены корма бывают, как правило, отрицательными. Повторим, что выявление повышенного титра антител к отдельным пищевым аллергенам может быть не сопряжено с проявлением явного клинического ответа (рвоты, зуда, диареи, облысения, нарушения кожных

покровов и др.) на их присутствие в ежедневной диете. Однако их отсутствие не является окончательным признаком отсутствия реакции, поскольку некоторые формы скрытой ПА могут иметь системный характер и проявляться в виде локального воспалительного процесса и/или общего ослабления иммунной системы.

Проведение серологического теста

3-5 мл венозной крови оставляли на 1 час в термостате при 37°C для полного свертывания и удаления форменных элементов крови и белков комплемента, затем центрифугировали при комнатной температуре при 3000 об./мин. в течение 10 минут и отбирали полученную сыворотку. Иммуноферментным, радиоиммунологическим или хемилюминесцентным методами определяли содержание IgG-антител к антигенам из различных продуктов, иммобилизованным на поверхности лунок иммунологического планшета (относительно контроля).

Исследование проводили с помощью тест-систем, наборов реагентов ООО «Иммуновет» и реакции ELISA. В качестве проявляющего агента использовали по-

Таблица 2. Данные об активности аллергенов, выделенных из смесовых кормов и компонентов исследуемых кормов

номер	анализируемый корм 1	компоненты	анализируемый корм 2	компоненты	анализируемый корм 3	компоненты
1	—	0/9	—	1/8	—	0/4
2	—	1/9	—	1/8	—	1/4
3	—	1/9	—	1/8	—	1/4
4	+	5/9	—	5/8	+	3/4
5	—	6/9	—	8/8	—	4/4
6	—	1/9	+	1/8	—	1/4
7	—	2/9	—	4/8	—	3/4
8	—	2/9	—	5/8	+	2/4

Примечание: «-» — нет реакции; «+» — положительная реакция (наличие иммунного конфликта); числитель — число положительных реакций на каждый белковый компонент, знаменатель — число компонентов в данном корме.