

DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1499>

Актуальные вопросы стандартизации водно-солевых экстрактов микст-аллергенов из клещей домашней пыли, предназначенных для лечебных форм сублингвальной иммунотерапии



В.М. Бержец, С.Ю. Петрова, Л.Н. Нестеренко, П.В. Самойликов, С.В. Хлгатын, Н.С. Петрова, А.В. Васильева

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Стандартизация лечебных форм аллергенов — процесс установления и применения единой системы показателей качества и методов контроля. Проведение контроля качества лечебных форм аллергенов является неотъемлемым условием гарантии клинической эффективности и безопасности аллергенспецифической иммунотерапии. В лаборатории по разработке аллергенов Научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова подготовлена технология получения гранулированной формы микст-аллергена из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* для перорального применения.

Цель — определение подлинности бесфенольного водно-солевого экстракта микст-аллергена из клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*, предназначенного для лечебной формы препарата.

Материалы и методы. Стандартизация полученного экстракта аллергена происходила по единицам белкового азота (метод Несслера); количество белка в искомом экстракте и нативном стандартном аллергене подсчитывали методом Бредфорда. Наличие алергокомпонентов в микст-аллергене определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Величину pH определяли потенциометрическим методом. Сравнение специфической активности стандартного аллергена и экспериментального микст-аллергена проводили методом реверсивного иммуноанализа (reversible allergosorbent test).

Результаты. Электрофорез в полиакриламидном геле по Лэммли показал сохранение белкового профиля водно-солевого экстракта микст-аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* соответствующего белковому профилю аллергенов клещей домашней пыли. По результатам реверсивного иммуноанализа с референс-сыворотками, содержащими специфические IgE к *Dermatophagoides pteronyssinus* или *Dermatophagoides farinae*, не выявлено статистически значимых отличий оптической плотности исследуемого аллергена (четыре серии препарата) и стандартного аллергена при реакции с референс-сывороткой 3-го класса ($p > 0,05$).

Заключение. Таким образом, выполненные исследования подтвердили подлинность бесфенольного водно-солевого экстракта микст-аллергена из клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* в качестве лечебной формы препарата, что отражено в Государственной фармакопее Российской Федерации (ОФС.1.7.2.0034.15). Бесфенольное экстрагирование не повлияло на основные аллергенные компоненты микст-аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* и позволило ему сохранить высокую степень специфичности.

Ключевые слова: аллергены; стандартизация; определение подлинности; *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Dermatophagoides farinae*.

Как цитировать

Бержец В.М., Петрова С.Ю., Нестеренко Л.Н., Самойликов П.В., Хлгатын С.В., Петрова Н.С., Васильева А.В. Актуальные вопросы стандартизации водно-солевых экстрактов микст-аллергенов из клещей домашней пыли, предназначенных для лечебных форм сублингвальной иммунотерапии // Российский аллергологический журнал. 2022. Т. 19, № 1. С. 91–99. DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1499>

DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1499>

Actual questions of standardization of water-salt extracts of mixed allergens from house dust mites intended for medicinal forms of sublingual immunotherapy

Valentina M. Berzhets, Stanislava Yu. Petrova, Lyubov N. Nesterenko, Pavel V. Samoylikov, Svetlana V. Khlgatian, Nina S. Petrova, Anna V. Vasilyeva

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Standardization of medical forms of allergens is the process of establishing and applying a unified system of quality indicators and control methods. The quality control of therapeutic forms of allergens is an essential condition for guaranteeing the clinical efficacy and safety of allergen-specific immunotherapy. The technology for obtaining the granular form of the mixed allergen from house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* for oral use was developed in the laboratory of allergens Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.

AIM: To determine the authenticity of the anphenolic water-salt extract of the mixed allergen from mites *D. pteronyssinus* and *D. farinae*, intended for the therapeutic form of the drug.

MATERIALS AND METHODS: Standardization of the obtained allergen extract was performed by protein nitrogen unit using the Nessler method. The protein concentration was determined using the Bradford method. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis was used to study the presence of protein composition in mixed allergen. The pH value was determined potentiometrically. The specific activity of the standard allergen and the experimental mixed allergen were compared using the reverse immunoassay method.

RESULTS: Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis showed the preservation of the protein profile of the water-salt extract of the mixed allergen *D. pteronyssinus* and *D. farinae*, corresponding to the protein profile of allergens of house dust mites. No statistically significant differences were noted in the optical density of the studied allergen (four drug series) and the standard allergen with reference serums containing specific IgE to *D. pteronyssinus* or *D. farinae* when reacting with a class 3 reference serum in the reverse immunoassay method ($p > 0.05$).

CONCLUSIONS: The result of the study in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition is a confirmation of the authenticity of the drug. Not phenolic extraction did not affect the main allergenic components of the mixed allergen *D. pteronyssinus* and *D. farinae* and allowed it to maintain a high degree of specificity.

Keywords: allergens; standardization; determining the authenticity; *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Dermatophagoides farinae*.

To cite this article

Berzhets VM, Petrova SYu, Nesterenko LN, Samoylikov PV, Khlgatian SV, Petrova NS, Vasilyeva AV. Actual questions of standardization of water-salt extracts of mixed allergens from house dust mites intended for medicinal forms of sublingual immunotherapy. *Russian Journal of Allergy*. 2022;19(1):91–99. DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1499>

ОБОСНОВАНИЕ

Успех аллергенспецифической иммунотерапии во многом зависит от высокой степени очистки и правильно подобранной дозы белковых компонентов, находящихся в готовой форме лечебного аллергена [1]. Ранее показано, что на аллергенность клещевых экстрактов влияют количество и состав примесей в среде их обитания, соблюдение технологии производства и способов хранения, срок изготовления и др. [1, 2]. Применение физико-химических, химических и иммунобиологических методов исследования для анализа качества водно-солевого клещевого экстракта, предназначенного для получения готовой формы лечебного аллергена, является необходимым условием процесса стандартизации лечебного препарата. Последнее, в свою очередь, гарантирует клиническую эффективность и безопасность аллергенспецифической иммунотерапии [1, 3].

Стандартизацию аллергенов проводят внутри живого организма (*in vivo*) и в лабораторных (*in vitro*) условиях [4]. Стандартизация *in vivo* осуществляется кожными или внутрикожными тестами [4, 5]. Некоторые методы, предназначенные для стандартизации аллергенов *in vitro*, такие как определение единиц белкового азота и количества белка в экстракте, используются с 70-х годов XX века и уже доказали свою эффективность [1].

На современном этапе для определения специфичности (подлинности) экстракта рекомендуется применять иммунологические методы, и прежде всего иммуноферментный анализ [4, 6]. Определение подлинности исходного водно-солевого экстракта требует стандартизованного нативного референс-аллергена (для сравнения) и референс-сыворотки для иммуноферментного анализа [1].

Существуют также стандартные тест-системы, которые позволяют определить содержание основных аллергенов в экстрактах [4]. Стандартизация основных аллергенов требует надёжных контрольных референс-аллергенов, изготовленных из рекомбинантных аллергенов и стандартных наборов для иммуноферментного анализа на основе иммуносорбентов (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) [6].

В лаборатории по разработке аллергенов НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова создана технология получения гранулированной формы микст-аллергена из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) и *Dermatophagoides farinae* (Der f) [7]. Основой для её изготовления является водно-солевой экстракт из клещей Der p и Der f и сред их культивирования в соотношении 1:1 [8]. Данный экстракт по технологии приготовления отличается от классического, так как основное экстрагирование клещей проводится без применения консерванта (фенола), что обеспечивает его бóльшую безопасность. Для увеличения длительности хранения полученного маточного раствора его лиофильно высушивают. Доклинические испытания экстракта из клещей Der p и Der f показали отсутствие токсичности, высокую аллергенную

и иммуногенную активность. Однако для соблюдения требований подлинности аллергена, регламентированных в общей фармакопейной статье ОФС.1.7.2.0034.15¹ Государственной фармакопеи Российской Федерации, необходимо проведение дополнительных исследований [4, 7, 8].

Цель — определение подлинности бесфенольного водно-солевого экстракта микст-аллергена из клещей Der p и Der f, предназначенного для лечебной формы препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Стандартизация полученного экстракта микст-аллергена и стандартного аллергена происходила по единицам белкового азота (метод Несслера)²; количество белка в искомом экстракте и нативном стандартном аллергене определяли методом Бредфорда [4]. Стандартная кривая для метода Бредфорда находилась в диапазоне от 1 до 25 мкг/мл по бычьему сывороточному альбумину (Bio-Rad, США). Наличие алергокомпонентов в микст-аллергене изучали с помощью разработанного в 1970 году У.К. Лэммли (Ulrich K. Laemmli) электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE)³. Величину pH определяли потенциометрическим методом [4]. Исследованы четыре серии препарата.

Сравнение специфической активности стандартного аллергена и экспериментального микст-аллергена проводили методом реверсивного иммуноанализа (*reversible allergosorbent test*, REAST), который заключается в следующем. В лунках полистиролового планшета сорбированы моноклональные антитела к иммуноглобулинам E (IgE) человека, в которые вносят образцы референс-сывороток в стандартных концентрациях, содержащие специфические IgE к стандартному аллергену, стандартные положительные и отрицательные контроли. К образовавшемуся в лунке планшета комплексу IgE-анти-IgE добавляют аллергены, меченные биотином. Конъюгат — стрептавидин-пероксидаза хрена. В лунках планшета с положительной реакцией проявляется цветное окрашивание. Метод исключает перекрёстные неспецифические

¹ Фармакопея.рф. ОФС.1.7.2.0034.15 Определение подлинности препаратов аллергенов. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0034-15-opredelenie-podlinnosti-preparatov-allergenov/>. Дата обращения: 03.12.2021.

² Фармакопея.рф. ОФС.1.7.2.0026.15. Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в иммунобиологических лекарственных препаратах. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0026-15-opredelenie-belkovogo-azota-s-reaktivom-nesslera-s-predvaritelnyim-osazhdeniem-belkovogo-materiala-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennyh-preparatah/>. Дата обращения: 03.12.2021.

³ Фармакопея.рф. ОФС.1.2.1.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0023-15-elektroforez-v-poliakrilamidnom-gele/>. Дата обращения: 03.12.2021.

Таблица 1. Схема заполнения планшета**Table 1.** Filling scheme of the plate

	1	2	3	4
A	ПК	AP	CP	CF
B	ПК	AP	CP	CF
C	OK1	BP	CP	CF
D	OK1	BP	CP	CF
E	КК	CP	CP	CF
F	КК	CP	CP	CF
G	КК	DP	OK2	OK2
H	КК	DP	OK2	OK2
Вносимые аллергены / Концентрация	Стандартный аллерген /	Стандартный аллерген /	Микст-аллерген /	Микст-аллерген /

Примечание. КК — контроль конъюгата (в лунку вместо сыворотки внесён разводящий раствор; результат должен быть отрицательным); AP — референс-сыворотки к Der p (0,35 МЕ/мл); BP — референс-сыворотки к Der p (0,7 МЕ/мл); CP — референс-сыворотки к Der p (3,5 МЕ/мл); DP — референс-сыворотки к Der p (17,5 МЕ/мл); CF — (3-й класс) референс-сыворотки к Der f; ПК — положительный контроль (в соответствии с тест-системой); OK1 — отрицательный контроль (в соответствии с тест-системой); OK2 — отрицательный контроль с сывороткой здоровых доноров.

Note: КК — conjugate control (A diluting solution was introduced into the holes instead of serum. The result should be negative); AP — reference serum to Der p (0,35 IU/ml); BP — reference serum to Der p (0,7 IU/ml); CP — reference serum to Der p (3,5 IU/ml); DP — reference serum to Der p (17,5 IU/ml); CF — reference serum to Der f; ПК — Positive Control (according to the test system); OK1 — Negative Control (according to the test system); OK2 — Negative Control with serum from healthy donors.

реакции с иммуноглобулинами других классов (А, G, М, D), в результате чего исключается получение ложноотрицательных результатов⁴.

Для сравнения специфической активности водно-солевого экстракта микст-аллергена из клещей Der p и Der f использовали биотинилированный нативный стандартизированный аллерген Der p (Dr. Fooke, Германия) и референс-сыворотки к Der p, входящие в тест-систему и соответствующие 1-му (0,35 МЕ/мл), 2-му (0,7 МЕ/мл), 3-му (3,5 МЕ/мл) и 4-му (17,5 МЕ/мл) классам. Референс-сыворотку к Der p 3-го класса также использовали в реакции с водно-солевым экстрактом микст-аллергена, что делает результат исследования более достоверным.

Для сравнения специфической активности экспериментального аллергена по белковым фракциям клеща Der f, содержащегося в нём, использовали сыворотки пациентов, подобранные с помощью метода RIDA AllergyScreen (R-Biopharm AG, Германия)⁵. Подбирали

сыворотки с установленной степенью активности (3-й класс), что соответствует содержанию специфических IgE 3,50–17,49 МЕ/мл.

Оптическую плотность растворов в лунках планшета оценивали фотометрическим методом на лабораторном фотометре STAT FAX 2100 (Awareness Technology, США) на длине волны Δ 450/630 нм.

Поскольку тест требует биотинилирования антигена, конъюгацию микст-аллергена с биотином проводили по протоколу биотинилирования белков, в основном по остаткам лизина, используя набор для биотинилирования антител (белков) фирмы ООО «Силекс» (Россия)⁶.

Использована стандартная схема заполнения планшета согласно ОФС.1.7.2.0034.15 [4] с небольшими модификациями (табл. 1).

Критерии соответствия

Соотношение биотина в стандартном аллергене и микст-аллергене Der p и Der f проверяли по уровню связывания с конъюгатом. На нитроцеллюлозную мембрану Immobilon PVDF (Merck Millipore, Германия) были нанесены (1) стандартный биотинилированный аллерген Der p (концентрация белка 1 мкг/мл); (2) биотинилированный микст-аллерген из клещей Der p и Der f (концентрация

⁴ Инструкция по применению наборов реагентов для количественного иммуноферментного определения концентраций аллерген-специфических IgE в сыворотке (плазме) крови с биотинилированными жидкофазными экстрактами аллергенов, рекомбинантными и высокоочищенными нативными аллергенами. Режим доступа: http://fooke.ru/upload/iblock/cb1/Instructions_slgE_REAST_with_Biotinylated-Recombinant_Allergens_2018.pdf. Дата обращения: 03.12.2021.

⁵ RIDA® AllergyScreen. Панели 1, 2, 3, 4 (Регистрационное удостоверение ФС № 2005/348 от 03.03.2005). Режим доступа: http://www.allergen.ru/docs/rida_allergyscreen_panel_1_2_3_4_rus.pdf. Дата обращения: 03.12.2021.

⁶ ООО «Силекс». Биотинилирование антител, белков и выделение клеток с использованием магнитных частиц, покрытых стрептавидином. Режим доступа: <https://sileks.com/assets/files/protocol-for-kits/biotinilation-and-mag-separation-ver-170626.pdf>. Дата обращения: 03.12.2021.

белка 1 мкг/мл); (3) микст-аллерген из клещей Der p и Der f (концентрация белка 1 мкг/мл) в качестве отрицательного контроля. Затем наносили конъюгат — стрептавидин-пероксидазу хрена. После отмывания — ТМБ-субстрат (система тетраметилбензидин). Результаты оценивали визуально по интенсивности голубого окрашивания. К исследованию допускался лишь тот биотинилированный микст-аллерген Der p и Der f, который на нитроцеллюлозной мембране визуально давал одинаковое со стандартным аллергеном окрашивание.

Условия проведения

Исследование проведено в лаборатории по разработке аллергенов Научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (Москва) совместно с центром коллективного пользования.

Статистический анализ

Принципы расчёта размера выборки: исследование проводили на четырёх сериях препарата.

Методы статистического анализа данных: результаты обрабатывали с помощью пакета прикладных статистических программ Microsoft Excel, версия 2010, с анализом количественных признаков. Вычисляли следующие величины: выборочное среднее (\bar{x}), выборочное стандартное отклонение (s), стандартную ошибку среднего ($s_{\bar{x}}$). Достоверность различий между более чем двумя группами изучали с помощью 95% доверительного интервала для среднего (95% ДИ). Критической величиной уровня значимости считали $\alpha=0,05$, где α — это максимально приемлемая вероятность ошибочно признать существование различий там, где их нет [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследуемый водно-солевой экстракт микст-аллергена Der p и Der f представляет собой прозрачную жидкость с характерным пигментным окрашиванием светло-коричневого цвета без видимых включений и осадка. Исходная величина белкового азота в исследуемом микст-аллергене — $40\ 000 \pm 10\ 000$ PNU; в стандартном аллергене — $800\ 000$ PNU. Исходная концентрация белка в микст-аллергене — 4,8 мг/мл, в стандартном аллергене — 10 мг/мл. pH микст-аллергена — $7,0 \pm 0,25$.

SDS-PAGE по Лэммли

SDS-PAGE по Лэммли показал сохранение белкового профиля водно-солевого экстракта микст-аллергена Der p и Der f, соответствующего белковому профилю аллергенов клещей домашней пыли, представленному в литературе [10]. Отмечается высокое содержание белковых фракций с молекулярной массой ниже 14 kDa, что может соответствовать пептидным фрагментам белка (рис. 1). Фрагментированные молекулы аллергена, возможно,

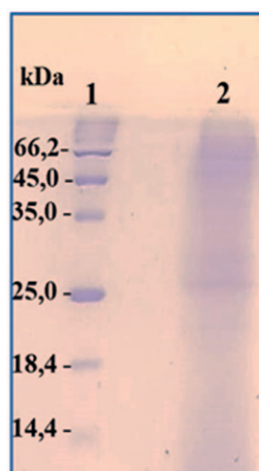


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) по Лэммли.

Примечание. 1 — белковые стандарты; 2 — водно-солевой экстракт микст-аллергена Der p и Der f (концентрация белка 0,171 мг/мл).

Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) by Laemmli.

Note: 1 — Protein standards; 2 — Water-salt extract of mixed allergen Der p and Der f (protein concentration 0.171 mg/ml).

могут реже вызывать анафилактические реакции при сублингвальной иммунотерапии из-за потери части своих IgE-связывающих эпитопов [11]. Можно также отметить большое разнообразие белков, присутствующих в клещевом аллергене.

Определение подлинности

Сравнение специфической активности стандартного аллергена и экспериментального микст-аллергена проводили методом реверсивного иммуноанализа (REAST). Для сравнения специфической активности водно-солевого экстракта микст-аллергена из клещей Der p и Der f использовали референс-систему, состоящую из биотинилированного нативного стандартизированного аллергена Der p и референс-сывороток, содержащих IgE к Der p или Der f. Репрезентативную прямую положительной корреляционной зависимости оптической плотности от концентрации белковых компонентов экстракта микст-аллергена Der p и Der f устанавливали методом подбора. Показано, что для получения положительной корреляционной зависимости оптической плотности от концентрации антигена необходимо применение высокотитражной сыворотки (3-й класс) и аллергена с содержанием белкового азота 1000–5000 PNU для Der p и 1000–8000 PNU для Der f (рис. 2). Исходя из полученных результатов, экспериментальный микст-аллерген Der p и Der f был введён в референс-систему (Dr. Fooke, Германия). Сравнительный анализ стандартного аллергена и исследуемого микст-аллергена проводили на референс-сыворотках 3-го класса, при этом концентрации вводимого в тест-систему стандартного и микст-аллергена существенно не отличались.

По результатам исследования выявлено, что статистически значимых отличий оптической плотности исследуемого аллергена (во всех четырёх сериях препарата) в REAST с референс-сыворотками ($n=6$), содержащими специфические IgE к Der p, и оптической плотности при реакции стандартного аллергена с референс-сывороткой 3-го класса ($n=8$) нет ($p > 0,05$). Аналогично оптическая

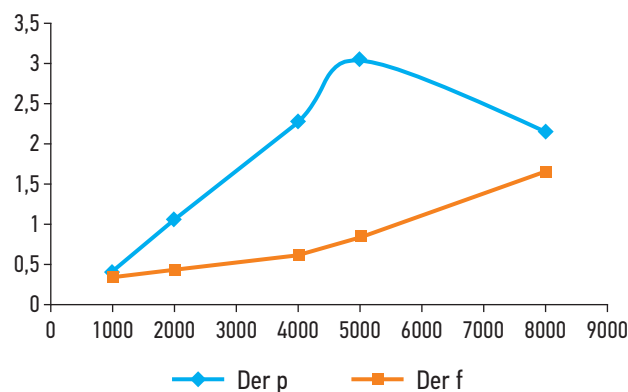


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации белка в микст-аллергене Der p и Der f в REAST-тесте с референс-сыворотками, содержащими IgE-антитела к Der p или Der f (3,5 МЕ/мл).

Примечание. По оси ординат отобразена оптическая плотность вещества в лунках планшета (длина волны Δ 450/630 нм); по оси абсцисс — концентрация белкового азота в экспериментальном микст-аллергене клещей домашней пыли Der p и Der f (PNU).

Fig. 2. The dependence of the optical density on the protein concentration in the mixed allergen Der p and Der f in a REAST test with reference serums containing IgE antibodies to Der p or Der f (3.5 IU/ml).

Note: The optical density of the substance in the holes of the plate is displayed along the ordinate axis (wavelength Δ 450/630 nm); along the abscissa axis is the concentration of protein nitrogen in the experimental mix-allergen of house dust mites Der p and Der f (PNU).

плотность водно-солевого экстракта микст-аллергена Der p и Der f в реакции с референс-сывороткой, содержащей специфические IgE к Der f ($n=6$), не имеет статистически значимых отличий от оптической плотности 3-го класса в реакции стандартного аллергена и референс-сыворотки ($p > 0,05$). Таким образом, всё вышеизложенное в соответствии с ОФС.1.7.2.0034.15 является подтверждением подлинности препарата (табл. 2, 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В иммунологии под специфичностью понимают избирательность взаимодействия индукторов и продуктов иммунных процессов, в частности антигенов и антител

[12]. Именно поэтому чтобы доказать подлинность аллергена, необходимы, прежде всего, строго специфичные к данному аллергену референс-сыворотки. Согласно ОФС.1.7.2.0034.15, сравнение изучаемого аллергена надо проводить с референс-аллергеном и референс-сыворотками [4].

До 90-х годов XX века в России и за рубежом препараты аллергенов были стандартизованы по содержанию белка и тестировались *in vivo* (кожные пробы) на пациентах, чувствительных к исследуемому аллергену, поскольку количество белка не всегда коррелирует с его аллергенной активностью. С целью стандартизации методов оценки активности препаратов аллергенов и перехода на использование методов *in vitro* была предпринята попытка по созданию международных стандартных образцов, в результате которой получены 5 нативных экстрактов референс-аллергенов и 2 стандартных образца главных аллергенов. Разработанные стандартные образцы рекомендованы для сравнения препаратов от разных производителей, а также разных серий одной фирмы [2, 6].

В настоящее время в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (правопреемник Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича) продолжается работа по созданию стандартных образцов для оценки биологической активности препаратов аллергенов. В Российской Федерации для клещей домашней пыли, к сожалению, референс-аллергены ещё не разработаны [6], что усложняет решение задачи по определению подлинности экспериментального микст-аллергена Der p и Der f. В результате для её реализации была взята за образец зарегистрированная в Российской Федерации полностью стандартная диагностическая референс-система, которая содержит как стандартный нативный экстракт аллергена Der p, так и референс-сыворотки к нему. Вводя экспериментальный микст-аллерген Der p и Der f в данную референс-систему, мы наиболее приближаемся к решению задачи его подлинности. Поскольку аллергенные экстракты Der p и Der f сопоставимы по физико-химическим и биологическим

Таблица 2. Оптическая плотность в REAST-тесте (стандартный аллерген и референс-сыворотки)

Table 2. The optical density in the REAST test (standard allergen and serum reference)

Концентрация специфических IgE (МЕ/мл) / Класс сывороток	n	Выборочное среднее, \bar{x}	Выборочное стандартное отклонение, s	Стандартная ошибка среднего, $s_{\bar{x}}$	95% доверительный интервал*
0,35/1	8	0,106	0,038	0,013	от 0,074–0,138
0,7/2	8	0,161	0,057	0,02	от 0,113–0,208
3,5/3	8	0,932	0,182	0,064	от 0,784–1,08
17,5/4	8	1,619	0,581	0,205	от 1,133–2,105

Примечание. * $\alpha=0,05$, критическое значение $t=2,365$, при числе степеней свободы $v=(n-1)=7$.

Note: * $\alpha=0,05$, the critical value of $t=2,365$, with the number of degrees of freedom $v=(n-1)=7$.

Таблица 3. Оптическая плотность в REAST-тесте различных серий водно-солевого экстракта микст-аллергена Der p и Der f с референс-сыворотками, содержащими IgE-антитела к Der p или Der f (3,5 ME/мл)

Table 3. The optical density in the REAST test of various series of water-salt extract of mixed allergen Der p and Der f with reference serums containing IgE antibodies to Der p or Der f (3.5 IU/ml)

Серия	<i>n</i>	Выборочное среднее, \bar{x}	Выборочное стандартное отклонение, <i>s</i>	Стандартная ошибка среднего, $s_{\bar{x}}$	95% доверительный интервал*
<i>Реакция с референс-сывороткой к Der p</i>					
1	6	0,61	0,2	0,07	от 0,428–0,792
2	6	1,1	0,137	0,048	от 0,976–1,225
3	6	0,844	0,18	0,064	от 0,68–1,001
4	6	0,91	0,167	0,059	от 0,758–1,06
<i>Реакция с референс-сывороткой к Der f</i>					
1	6	0,624	0,214	0,075	от 0,429–0,819
2	6	0,809	0,26	0,091	от 0,573–1,045
3	6	0,901	0,168	0,059	от 0,748–1,05
4	6	0,692	0,24	0,084	от 0,474–0,91

Примечание. * $\alpha=0,05$, $t=2,571$, при $v=2(n-1)=5$.

Note: * $\alpha=0.05$, $t=2.571$, at $v=2(n-1)=5$.

свойствам исходного материала, также возможно сравнение специфической Der f-активности исследуемого микст-аллергена с использованием соответствующих специфических к Der f сывороток [6].

Обсуждение основного результата исследования

Поскольку водно-солевой экстракт аллергена (тем более микст-аллерген) — это многокомпонентная смесь, содержащая пептиды, гликопротеиды, полисахариды, производные липидов, энзимы, пигменты и другие минорные примеси [13], то данному экстракту могут быть свойственны определённые матричные эффекты [14]. Возможное объяснение связано с агрегационным состоянием аллергена в различных его разведениях, что может привести к завышенной оценке, если эпитопы свободны, или к заниженной — если эпитопы связаны. Следовательно, прямое сравнение аллергенов в иммуноферментном анализе не всегда отражает или предсказывает реальное содержание в них аллергенных компонентов. Проблема завышения содержания аллергена методами ELISA описана в исследованиях некоторых авторов [10]. Так, при исследовании качества аллергенов клещей домашней пыли европейских компаний отмечено, что в предназначенном для стандартизации нативных аллергенов тесте ELISA (с моноклональными сыворотками и рекомбинантным белком) количество измеренного основного аллергена Der f1 явно завышено и превышает общее содержание белка в образцах. Действительно, наиболее достоверную репрезентативную кривую положительной корреляционной зависимости оптической плотности от концентрации

белков в микст-аллергене Der p и Der f нам пришлось подбирать. Возможно, предлагаемые в ОФС.1.7.2.0034.15 условия определения подлинности в иммуноферментном анализе могут подойти не для каждой белковой смеси исследуемых аллергенов.

Резюме основного результата исследования

Проведённое исследование доказывает подлинность бесфенольного водно-солевого экстракта микст-аллергена из клещей Der p и Der f, предназначенного для лечебных форм сублингвальной иммунотерапии, поскольку продемонстрировано активное связывание со строго специфическими IgE к Der p и Der f.

Ограничения исследования

Сравнительный анализ специфической активности нам представляется малоинформативным, так как отсутствует российский референс-аллерген к Der p и Der f, а сравнение с имеющимися в наличии пыльцевыми референс-аллергенами нецелесообразно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подлинность бесфенольного водно-солевого экстракта микст-аллергена из клещей Der p и Der f, предназначенного для лечебных форм сублингвальной иммунотерапии, доказана.

Бесфенольное экстрагирование и последующее лиофильное высушивание не повлияли на основные аллергенные компоненты микст-аллергена Der p и Der f и позволили ему сохранить высокую степень специфичности.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Настоящая статья подготовлена при поддержке Правительства Российской Федерации в рамках исполнения государственного задания «Разработка нативных и молекулярных форм аллергенов, предназначенных для диагностики и лечения аллергических заболеваний в педиатрической практике» в НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (Москва, Россия).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Вклад авторов. С.Ю. Петрова, С.В. Хлгатын — концепция и дизайн исследования; Л.Н. Нестеренко, С.Ю. Петрова, П.В. Самойликов — сбор и обработка материала; С.Ю. Петрова, В.М. Бержец, Н.С. Петрова, А.В. Васильева — анализ полученных данных и написание текста. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Благодарности. Благодарим руководство центра коллективного пользования НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (Москва, Россия) за оказанную организационную поддержку.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This article was prepared with the support of the Government of the Russian Federation within the framework of the state task "Development of native and molecular forms of allergens intended for the diagnosis and treatment of allergic diseases in pediatric practice" at Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russian Federation).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. S.Yu. Petrova, S.V. Khlgatian — concept and design of the study; L.N. Nesterenko, S.Yu. Petrova, P.V. Samoylikov — collecting and processing of the material; S.Yu. Petrova, V.M. Berzhets, N.S. Petrova, A.V. Vasilyeva — analysis of the data obtained and writing the text. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Acknowledgments. We thank the management of the Center for Collective Use of Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russian Federation) for the organizational support provided.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park J., Jeong K.Y. Allergen standardization // *Allergy Asthma and Respiratory Disease*. 2018. Vol. 6, N 4. P. 191. doi: 10.4168/aard.2018.6.4.191
2. Боков Д.О., Смирнов В.В. Разработка подходов к стандартизации и методов контроля качества аллергенных экстрактов, применяемых при проведении аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) / VI Международная студенческая научная конференция «Студенческий научный форум-2014»; 15 февраля – 31 марта. Москва, 2014. Режим доступа: <https://scienceforum.ru/2014/article/2014003011>. Дата обращения: 03.12.2021.
3. Смирнов В.В., Игнатов А.А., Кузина В.Н., и др. Использование масс-спектрометрии в стандартизации препаратов аллергенов // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016. Т. 16, № 3. С. 166–171.
4. Фармакопедия.рф. ОФС.1.7.2.0034.15. Аллергены. Режим доступа: <https://pharmacosrcoeia.ru/ofs-1-7-1-0001-15-allergeny/>. Дата обращения: 03.12.2021.
5. Jutel M., Agache I., Bonini S., et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: mechanisms, standardization, and pharmacoconomics // *J Allergy Clin Immunol*. 2016. Vol. 137, N 2. P. 358–368. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1300
6. Невская Л.В., Лавренчик Е.И., Жданова М.Ю., и др. Международная практика стандартизации аллергенных продуктов // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017. Т. 17, № 4. С. 222–229.
7. Бержец В.М., Коренева Е.А., Хлгатын С.В., и др. Изучение специфической активности гранулированной формы микст-аллергена из клещей домашней пыли *Dermatophagoides*

- pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* для пероральной иммунотерапии // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2019. № 2. С. 56–61. doi: 10.14427/jipai.2019.2.56
8. Бержец В.М., Хлгатын С.В., Петрова С.Ю., и др. Изучение свойств водно-солевого микст-аллергена из клещей домашней пыли с целью создания сублингвальной формы // *Медицинская иммунология*. 2018. Т. 20, № 4. С. 597–600. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-597-600
 9. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. Ю.А. Данилова; под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. Москва: Практика, 1999. 459 с.
 10. Brunetto V., Tinghino R., Braschi M.C., et al. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis // *Allergy*. 2010. Vol. 65, N 2. P. 184–190. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02150.x
 11. Петрова С.Ю., Хлгатын С.В., Бержец В.М., Васильева А.В. Аллергенсодержащие вакцины для специфической иммунотерапии // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021. Т. 98, № 1. С. 104–112. doi: 10.36233/0372-9311-11
 12. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
 13. Желтикова Т.М. Аллергены для аллергенспецифической иммунотерапии: достижения и проблемы // *Consilium medicum (Педиатрия)*. 2012. № 1. С. 29–31.
 14. Штыров И.Н., Хасиятуллин А.Ф., Валиев А.Р., и др. Минимизация матричного эффекта при индикации Т-2 токсина методом in-ELISA в растительных пробах // *Ветеринарный врач*. 2021. № 1. С. 56–62. doi: 10.33632/1998-698X.2021-1-56-63

REFERENCES

1. Park J, Jeong KY. Allergen standardization. *Allergy Asthma Res Disease*. 2018;6(4):191. doi: 10.4168/aard.2018.6.4.191
2. Bokov DO, Smirnov VV. Development of approaches to standardization and quality control methods of allergenic extracts used in allergen-specific immunotherapy (ASIT). Materials of the VI International Student Scientific Conference "Student Scientific Forum-2014"; February 15 – March 31. Moscow; 2014. (In Russ). Available from: <https://scienceforum.ru/2014/article/2014003011>. Accessed: 03.12.2021.
3. Smirnov VV, Ignatov AA, Kuzina VN, et al. Mass spectrometry methods for standardization of allergenic preparations. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(3):166–171. (In Russ).
4. Pharmacopoeia.RF. OFS.1.7.2.0034.15. Allergens. (In Russ). Available from: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-1-0001-15-allergeny/>. Accessed: 03.12.2021.
5. Jutel M, Agache I, Bonini S, et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: mechanisms, standardization, and pharmacoconomics. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(2):358–368. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1300
6. Nevskaya LV, Lavrenchik EI, Zhdanova MY, et al. International practice of allergen products standardization. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):222–229. (In Russ).
7. Berzhets VM, Koreneva SV, Khlgatian SV, et al. Study on the specific activity of the granulated form of the mixed-allergen from house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* for oral immunotherapy. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2019;2:56–61. (In Russ). doi: 10.14427/jipai.2019.2.56
8. Berzhets VM, Khlgatian SV, Petrova SY, et al. Study of the properties of the mixed water/salt house dust mite allergen aiming to design its sublingual form. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2018;20(4):597–600. (In Russ). doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-597-600
9. Glants SA. Medico-biological statistics. Transl. from English by Yu.A. Danilov; ed. by N.E. Buzikashvili, D.V. Samoylov. Moscow: Praktika; 1999. 459 p. (In Russ).
10. Brunetto B, Tinghino R, Braschi MC, et al. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. *Allergy*. 2010;65(2):184–190. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02150.x
11. Petrova SY, Khlgatian SV, Berzhets VM, Vasileva AV. Allergy vaccines for specific immunotherapy. *J Microbiol, Epidemiol Immunobiol*. 2021;98(1):104–112. (In Russ). doi: 10.36233/0372-9311-11
12. Yarin AA. Immunology: textbook. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. 752 p. (In Russ).
13. Zheltikova TM. Allergens for allergen-specific immunotherapy: achievements and challenges. *Consilium medicum*. 2012;(1):29–31. (In Russ).
14. Shtyrov IN, Khasiyatullin AF, Valiev AR, et al. Minimization of the matrix effect when indicating T-2 toxin by in-Elisa in plant samples. *Veterinarian*. 2021;(1):56–62. (In Russ). doi: 10.33632/1998-698X.2021-1-56-63

ОБ АВТОРАХ

* **Петрова Станислава Юрьевна**, к.м.н.;

адрес: Россия, 105064, Москва,
Малый Казённый переулоч, д. 5а;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3034-0148>;
eLibrary SPIN: 7268-6944; e-mail: petrovastanislava@yandex.ru

Бержец Валентина Михайловна, д.б.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5055-7593>;
eLibrary SPIN: 9097-0947; e-mail: laball@yandex.ru

Нестеренко Любовь Николаевна, к.х.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>;
eLibrary SPIN: 6819-7980; e-mail: lnesterenko3001@gmail.com

Самойликов Павел Владимирович, к.м.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3580-3199>;
eLibrary SPIN: 4294-2188; e-mail: samoilikov@mail.ru

Хлгатян Светлана Вагинаковна, д.б.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8354-7682>;
eLibrary SPIN: 1476-4605; e-mail: svetkh@gmail.com

Петрова Нина Сергеевна, к.б.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2824-1335>;
eLibrary SPIN: 3151-1562; e-mail: laball21@yandex.ru

Васильева Анна Викторовна;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7703-2698>;
eLibrary SPIN: 4294-2188; e-mail: annaksu@mail.ru

AUTHORS' INFO

* **Stanislava Yu. Petrova**, MD, Cand. Sci. (Med.);
address: 5a Maly Kazennyi pereulok,
105064 Moscow, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3034-0148>;
eLibrary SPIN: 7268-6944; e-mail: petrovastanislava@yandex.ru

Valentina M. Berzhets, Dr. Sci. (Biol), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5055-7593>;
eLibrary SPIN: 9097-0947; e-mail: laball@yandex.ru

Lyubov N. Nesterenko, Cand. Sci. (Chem);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>;
eLibrary SPIN: 6819-7980; e-mail: lnesterenko3001@gmail.com

Pavel V. Samoilikov, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3580-3199>;
eLibrary SPIN: 4294-2188; e-mail: samoilikov@mail.ru

Svetlana V. Khlgatian, Dr. Sci. (Biol);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8354-7682>;
eLibrary SPIN: 1476-4605; e-mail: svetkh@gmail.com

Nina S. Petrova, Cand. Sci. (Biol);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2824-1335>;
eLibrary SPIN: 3151-1562; e-mail: laball21@yandex.ru

Anna V. Vasilyeva;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7703-2698>;
eLibrary SPIN: 4294-2188; e-mail: annaksu@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author