

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046449**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.15

(51) Int. Cl. **G01N 33/68 (2006.01)**

(21) Номер заявки
202190867

(22) Дата подачи заявки
2019.10.08

(54) **СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ IgE И IgG**

(31) **A 50880/2018**

(32) **2018.10.09**

(33) **AT**

(43) **2021.07.02**

(86) **PCT/AT2019/060333**

(87) **WO 2020/073066 2020.04.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕДИЦИНИШЕ УНИВЕРЗИТЕТ
ВИН; ХФД ФЕРТРИБС ГЕЗ.М.Б.Х.
(AT)**

(72) Изобретатель:
**Валента Рудольф, Гариб Виктория,
Гастагер Феликс (AT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) ANDERSEN NANCY J ET AL.: "Detection of immunoglobulin isotypes from dried blood spots", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.AMSTERDAM, NL, vol. 404, 13 December 2013 (2013-12-13), pages 24-32, XP028668320, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2013.12.001 page 26, column 2, line 10-line 12; figure 1
US-B2-9140691

NICO GRÜNER ET AL.: "Dried Blood Spots - Preparing and Processing for Use in Immunoassays and in Molecular Techniques", JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, no. 97, 13 March 2015 (2015-03-13), XP055467281, DOI: 10.3791/52619 abstract; figure 2
WO-A1-2016179402

(57) Изобретение относится к способу детекции и/или количественного анализа аллерген-специфических IgE и/или IgG в образце крови или сыворотки млекопитающего, включающему стадии а) переноса образца крови или сыворотки на абсорбирующий материал, б) сушки абсорбирующего материала, содержащего образец крови или сыворотки со стадии а), с) элюирования IgE и/или IgG из высушенного абсорбирующего материала или его части, содержащего высушенный образец крови или сыворотки, посредством нанесения буфера на указанный абсорбирующий материал или его часть, d) выделения элюата со стадии с) и е) нанесения выделенного элюата со стадии d) на тест-систему для одновременной детекции и/или количественного анализа IgE и/или IgG, связывающихся по меньшей мере с двумя аллергенами, где тест-система содержит твердую подложку, содержащую по меньшей мере два аллергена и/или их функциональные фрагменты, связанные с ней, в количестве менее 1 нг каждый.

046449
B1

046449
B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам детекции и/или количественного анализа аллерген-специфических IgE и/или IgG в образцах крови или сыворотки.

Уровень техники

Определение аллерген-специфического иммуноглобулина E (IgE) было внедрено в диагностику аллергии более 50 лет назад. В дополнение к клиническому анамнезу и провокационным пробам, оно представляет собой один из краеугольных камней в диагностике IgE-ассоциированной аллергии. Подробная характеристика вызывающих заболевание молекул аллергенов с помощью технологий молекулярного клонирования обеспечивает новые формы молекулярной диагностики аллергии, позволяющие измерять IgE, специфические для большого количества собранных в микропанель молекул аллергенов, содержащих наиболее важные источники аллергенов, с помощью технологии чипов. Молекулярная диагностика аллергии очень полезна для разрешения сложных профилей сенсибилизации, особенно у детей, и позволяет выбирать персонализированные формы лечения, такие как избегание аллергена, диета и/или аллерген-специфическая иммунотерапия (АИТ). Важное преимущество относительно общепринятых форм количественного тестирования IgE на основе аллергенных экстрактов, состоит в том, что микропанели аллергенов позволяют одновременно определять уровни IgE и IgG, специфические для множества аллергенов, с использованием небольших объемов сыворотки, и можно точно определять молекулы аллергенов, вызывающие заболевание.

Однако не все аллергологи обладают прямым доступом к новым формам молекулярной диагностики аллергии, и, таким образом, им необходимо отправлять образцы крови в специализированные лаборатории. Для транспортировки образцов сыворотки или крови в лаборатории, проводящие молекулярный анализ, необходимы тщательная упаковка и охлаждение, она часто ограничена общими правилами безопасности и транспортировки (например, правилами безопасности авиаперевозок) и, таким образом, является дорогостоящей или даже невозможной.

Также было бы предпочтительно предоставлять систему, делающую возможным сбор образцов крови или сыворотки самим пациентом, при этом собранные образцы затем доставляют в лабораторию для дальнейшего анализа.

Целью настоящего изобретения является разработка способов и средств для сбора и транспортировки образцов крови и сыворотки в лабораторию без необходимости охлаждения и тщательной упаковки для детекции и/или количественного анализа аллерген-специфических IgE и IgG.

Сущность изобретения

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу детекции и/или количественного анализа аллерген-специфических IgE и/или IgG в образце крови или сыворотки млекопитающего, включающему стадии

- a) переноса образца крови или сыворотки на абсорбирующий материал,
- b) сушки абсорбирующего материала, содержащего образец крови или сыворотки со стадии a),
- c) элюирования IgE и/или IgG из высушенного абсорбирующего материала или его части, содержащего высушенный образец крови или сыворотки, посредством нанесения буфера на указанный абсорбирующий материал или его часть,
- d) выделения элюата со стадии c) и
- e) нанесения выделенного элюата со стадии d) на тест-систему для одновременной детекции и/или количественного анализа IgE и/или IgG, связывающихся по меньшей мере с двумя аллергенами, где тест-система содержит твердую подложку, содержащую по меньшей мере два аллергена и/или их функциональные фрагменты, связанных с ней, в количестве менее 1 нг каждый.

Неожиданно оказалось, что целей по настоящему изобретению можно достигать с использованием абсорбирующих материалов, способных нести на себе высушенный образец крови или сыворотки, из которого можно элюировать аллерген-специфические IgE и IgG и анализировать их на предмет специфичностей. Одним из основных преимуществ способа по настоящему изобретению является возможность детекции и/или количественного анализа с использованием одного образца множественности IgE и IgG, способных специфически связываться по меньшей мере с 50, предпочтительно - по меньшей мере 100 разными аллергенами или их функциональными фрагментами, присутствующими в тест-системе в указанных выше количествах или менее.

Неожиданно, количество аллерген-специфических IgE и/или IgG, элюированных из высушенных образцов крови или сыворотки, является достаточным для определения их аллергенной специфичности и количества с использованием твердой подложки, содержащей менее 1 нг различных аллергенов. Для известных в этой области способов, используемых для определения и/или количественного анализа аллерген-специфических антител, как правило, необходимы гораздо более высокие количества аллергена (т.е. более 1 мкг; например, Eysink, *Pediatr Allergy Immunol* 2001; Aalberse et al., *J Allergy Clin Immunol* 1981). Специалист в этой области будет ожидать, что детекция и количественный анализ аллерген-специфических антител в образце, элюированном из абсорбирующего материала, содержащего высушенную кровь или сыворотку, является слишком низкой для захвата менее 1 нг аллергена, связанного на твердой подложке.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано сравнение уровней аллерген-специфических IgE, выделенных из образцов сыворотки (фиг. 1A) или крови (фиг. 1B) после хранения в течение одной недели в разных условиях с использованием фильтровальной бумаги или нитроцеллюлозы для иммобилизации и PBS или дилуента образца (SD) для элюирования. Уровни IgE (ось y: ISU-IgE), специфических в отношении аллергенов (ось x), показаны в соответствии с условиями (внизу фигуры).

На фиг. 2 показаны уровни специфических IgE (оси y: ISU-IgE), определяемых в элюатах из высушенной сыворотки пациента с аллергией (#18, табл. I), выделенной сразу или после хранения в течение 1 недели при разных температурах (нижняя линия) к (оси x) А, аллергенам пыльцы трав, В, аллергенам пыльцы деревьев и родственных продуктов питания, и С, аллергенам клещей домашней пыли, домашних питомцев и плесени. Приведены средние значения для трех параллелей \pm SD.

На фиг. 3 показана корреляция аллерген-специфических уровней IgE, измеренных в свежей сыворотке пациента с аллергией (#18, табл. I), с уровнями IgE, измеренными в образцах сыворотки, выделенных сразу и после 1 недели хранения при +37°C, +22°C, +4°C и -20°C. Корреляция приведена для 21 распознаваемого аллергена на диаграммах рассеяния со значениями г и р.

На фиг. 4A и B показана корреляция аллерген-специфических уровней IgE, измеренных в свежей крови 9 пациентов с аллергией, с уровнями IgE, измеренными в выделенных сразу образцах крови. Корреляция приведена для 8 чаще всего распознаваемых аллергенов на диаграммах рассеяния со значениями г и р.

На фиг. 5 показана корреляция уровней аллерген-специфических IgE, измеренных в свежих сыворотках 17 пациентов с аллергией (#1-17, табл. I), с уровнями IgE, измеренными в образцах сыворотки, выделенных сразу или после 2 недель хранения при +37°C. Корреляция приведена для 8 чаще всего распознаваемых аллергенов на диаграммах рассеяния со значениями г и р.

На фиг. 6 показаны аллерген-специфические IgE, выделенные из высушенной сыворотки и сохраняющие биологическую активность. IgE из образцов сыворотки от пациентов 13 и 15 (табл. I) выделяли из бумаги через 1 и 7 недель хранения при 37°C и нагружали на клетки RBL, экспрессирующие FcεRI человека, а затем подвергали воздействию разных концентраций Phl p 5, буфера или антител против IgE (оси x). Индуцированное высвобождение бета-гексозаминидазы выражают как процентную долю общего высвобождения, достигнутого посредством лизиса клеток (оси y), в виде средних значений для двух параллелей с ошибкой <5%.

На фиг. 7 показано сравнение специфической реактивности IgG в отношении собранных в микропанель аллергенов в свежем, разведенном 1:50 образце сыворотки и в трех идентично сразу выделенных элюатах, которые были в 15 раз менее разведенными для компенсации потери белка, происходящей при иммобилизации и элюирования. Снимки экрана для реактивности IgG в отношении собранных в микропанель аллергенов приведены для образца свежей сыворотки (A) и выделенных сразу элюатов из трех идентично полученных высушенных пятен крови на бумаги (B-D). На E показана диаграмма рассеяния для корреляции уровней аллерген-специфических IgG со значениями г и р для 48 распознаваемых аллергенов (табл. IV).

Подробное описание вариантов осуществления

Способ по настоящему изобретению делает возможным качественное, а также количественное определение аллерген-специфических IgE и/или IgG в высушенных образцах крови или сыворотки способами тестирования, осуществляемыми с использованием количеств аллергенов менее 1 нг. Обнаружено, что IgE и/или IgG, присутствующие в образцах крови и сыворотки, высушенных на абсорбирующем материале, в значительной степени сохраняют свою способность связываться с аллергенами. Количество аллерген-специфических IgE и IgG, элюированных из таких высушенных образцов крови и сыворотки, является достаточным для детекции на твердой подложке, содержащей менее 1 нг аллергена, используемого для захвата антител на указанной твердой подложке. Способы связывания аллергенов на твердой подложке описаны, например, в Hiller R, et al. FASEB J. 2002 Mar; 16(3):414-6.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения твердая подложка может содержать менее 0,1 или 0,05 нг, предпочтительно - менее 0,01 нг, более предпочтительно - менее 0,005 нг, более предпочтительно - менее 1000 фг, более предпочтительно - менее 500 фг, более предпочтительно - менее 250 фг, более предпочтительно - менее 200 фг каждого аллергена.

Минимальное количество каждого аллергена, связанного с указанной твердой подложкой, составляет, предпочтительно, по меньшей мере 5 фг, более предпочтительно - по меньшей мере 10 фг, более предпочтительно - по меньшей мере 15 фг, более предпочтительно - по меньшей мере 20 фг, более предпочтительно - по меньшей мере 25 фг, более предпочтительно - по меньшей мере 30 фг, более предпочтительно - по меньшей мере 40 фг, более предпочтительно - по меньшей мере 50 фг.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная твердая подложка содержит от 5 фг до 0,1 нг, предпочтительно - от 10 фг до 0,05 нг, более предпочтительно - от 15 фг до 0,01 нг, более предпочтительно - от 20 фг до 0,005 нг, более предпочтительно - от 25 до 1000 фг, более предпочтительно - от 30 до 500 фг, более предпочтительно - от 40 до 250 фг, наиболее

предпочтительно - от 50 до 200 фг каждого аллергена, связанного с ней.

Для способа по настоящему изобретению необходимо лишь небольшое количество крови или сыворотки. Это полезно, т.к. позволяет получать образцы способами, подобными проколу пальца. Забор крови из вены не является необходимым, и, таким образом, способ по настоящему изобретению также можно использовать для детекции и/или количественного анализа аллерген-специфических IgE и/или IgG в образцах новорожденных млекопитающих (например, новорожденных людей).

Способ по настоящему изобретению имеет преимущество, состоящее в том, что IgE и/или IgG можно подвергать детекции и/или количественному анализу при одновременном связывании с более чем одним аллергеном. Это позволяет определять наличие и количественно анализировать IgE и/или IgG, присутствующие в образце крови или сыворотки и специфические в отношении по меньшей мере двух аллергенов. Кроме того, способ по настоящему изобретению позволяет определять биологически активные антитела, которые при связывании с аллергеном могут активировать эффекторные клетки.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения абсорбирующий материал содержит целлюлозу или ее производное.

Особенно предпочтительно использовать абсорбирующий материал, содержащий или состоящий из целлюлозы, ее производных или смесей. Целлюлоза и ее производные демонстрируют исключительные свойства абсорбции и десорбции компонентов крови и сыворотки, таких как белки, подобные антителам.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения производным целлюлозы является нитроцеллюлоза.

Абсорбирующий материал может иметь различные формы, при этом абсорбирующий материал, предпочтительно, представляет собой лист, тампон или т.п. и, необязательно, может являться тканым или нетканым.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения абсорбирующий материал имеет скорость абсорбции от 0,04 до 0,30 г/см², предпочтительно - от 0,10 и 0,18 г/см², более предпочтительно - от 0,12 до 0,15 г/см² в случае воды.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения абсорбирующий материал может абсорбировать от 20 до 80%, предпочтительно - от 30 до 60%, более предпочтительно - от 40 до 50% от максимальной емкости для воды за приблизительно 1 минуту.

Абсорбирующий материал по настоящему изобретению в предпочтительном варианте осуществления имеет абсорбционную емкость для воды по меньшей мере 0,5 г/см², такую как по меньшей мере 1,0 г/см², например, по меньшей мере 1,50 г/см², такую как по меньшей мере 2,0 г/см², например, по меньшей мере 4,0 г/см², такую как по меньшей мере 6,0 г/см², например, по меньшей мере 8,0 г/см², такую как по меньшей мере 10 г/см².

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения абсорбционная емкость составляет от 3,5 до 5,0 г/см², например, от 4,0 до 4,5 г/см².

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения абсорбирующий материал имеет абсорбционную емкость для воды по меньшей мере 10 г воды/г материала, такую как, по меньшей мере 30 г воды/г материала, например, по меньшей мере 50 г воды/г материала, такую как по меньшей мере 70 г воды/г материала, например, по меньшей мере 90 г воды/г материала, такую как по меньшей мере 110 г воды/г материала, например, по меньшей мере 130 г воды/г материала.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения абсорбирующий материал имеет абсорбционную емкость для воды от 45 до 60 г воды/г материала, такую как от 50 до 55 г воды/г материала.

В рамках изобретения "скорость абсорбции" определяют как скорость абсорбции/площадь в случае воды, вычисленную как среднюю абсорбцию воды в течение 20 секунд после приведения абсорбирующего материала в контакт с водой. Скорость абсорбции снижается с абсорбцией воды материалом. В рамках изобретения термин "абсорбционная емкость" относится к количеству жидкости, которое материал может абсорбировать, на грамм материала (г/г).

На стадии а) до 500 мкл, предпочтительно - до 400 мкл, более предпочтительно - до 300 мкл, более предпочтительно - до 200 мкл, более предпочтительно - до 100 мкл крови или сыворотки, предпочтительно, переносят на абсорбирующий материал.

Оказалось, что кровь или сыворотка в объеме до 500 мкл содержит достаточно молекул IgE и IgG для идентификации посредством флуоресцентного иммунологического анализа после элюирования. В конкретном предпочтительном варианте осуществления до 100 мкл крови или сыворотки достаточно для использования в способе по настоящему изобретению.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения от 10 до 500 мкл, предпочтительно - от 20 до 400 мкл, более предпочтительно - от 30 до 300 мкл, более предпочтительно - от 40 до 200 мкл, более предпочтительно - от 50 до 250 мкл, более предпочтительно - от 60 до 200 мкл, более предпочтительно - от 70 до 150 мкл, более предпочтительно - от 80 до 120 мкл, в частности, 100 мкл крови или сыворотки на стадии а) переносят на абсорбирующий материал.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения абсорбирующий материал на стадии б) сушат в течение по меньшей мере 1 мин, предпочтительно - в течение по меньшей мере 2

мин, более предпочтительно - в течение по меньшей мере 5 мин при температуре от 5 до 40°C, предпочтительно - от 10 до 30°C, более предпочтительно - от 15 до 25°C, в частности, при комнатной температуре. Стадию сушки осуществляют при температурах, в идеале не влияющих или, по существу, не влияющих на молекулы IgE и IgG, присутствующие в образце. Таким образом, особенно предпочтительно сушить образец крови или сыворотки, находящийся на абсорбирующем материале, при комнатной температуре (от 20 до 25°C).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения образец крови или сыворотки, составляющий часть высушенного абсорбирующего материала со стадии b), получают посредством выштамповки указанной области из указанного высушенного абсорбирующего материала.

Для элюирования из абсорбирующего материала буфер наносят на абсорбирующий материал, содержащий высушенный образец крови или сыворотки. Буфер, предпочтительно, является буфером PBS или буфером PBS Дульбекко, предпочтительно, содержащим детергент, предпочтительно - полисорбат 20 или сывороточный альбумин, предпочтительно, бычий сывороточный альбумин. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения буфер является буфером PBS или буфером PBS Дульбекко.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения IgE и/или IgG, абсорбированные абсорбирующим материалом, элюируют посредством нанесения от 10 до 800 мкл, предпочтительно - от 10 до 700 мкл, более предпочтительно - от 10 до 600 мкл, более предпочтительно - от 10 до 500 мкл, более предпочтительно - от 10 до 400 мкл, более предпочтительно - от 10 до 300 мкл, более предпочтительно - от 10 до 200 мкл, более предпочтительно - от 20 до 200 мкл, более предпочтительно - от 20 до 150 мкл, более предпочтительно - от 20 до 100 мкл, более предпочтительно - от 20 до 90 мкл, более предпочтительно - от 30 до 70 мкл, более предпочтительно - от 40 до 60 мкл, в частности, 50 мкл буфера на указанный абсорбирующий материал или его часть.

Одним значительным преимуществом настоящего изобретения является возможность элюирования достаточного количества молекул антител IgE и IgG, что делает возможным надежное определение их специфичности и количества с использованием ограниченного количества элюента (т.е. буфера).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения высушенный абсорбирующий материал или его часть, содержащий высушенный образец крови или сыворотки, инкубируют с буфером в течение по меньшей мере 10 мин, предпочтительно - в течение по меньшей мере 30 мин, более предпочтительно - в течение по меньшей мере 60 мин, более предпочтительно - в течение по меньшей мере 120 мин, более предпочтительно - в течение по меньшей мере 150 мин.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения высушенный абсорбирующий материал или его часть, содержащий высушенный образец крови или сыворотки, инкубируют с буфером максимум в течение 24 ч, предпочтительно - максимум в течение 18 ч, более предпочтительно - максимум в течение 12 ч, более предпочтительно - максимум в течение 6 ч.

Высушенный абсорбирующий материал или его часть, содержащий высушенный образец крови или сыворотки, предпочтительно, инкубируют с буфером при температуре от 5 до 40°C, предпочтительно - от 10 до 30°C, более предпочтительно - от 15 до 25°C, в частности, при комнатной температуре.

Аллерген-специфические IgE и IgG подвергают детекции и количественному анализу с использованием иммунологического анализа, в котором используют количества аллергена менее 1 нг. Предпочтительный анализ, подлежащий использованию, основан на микрочипах, где аллергены или их фрагменты связаны на твердой подложке. Элюированный образец крови или сыворотки, содержащий молекулы IgE и IgG, подлежащие определению и количественному анализу, наносят на такую подложку. Аллерген-специфические IgE и IgG связываются с соответствующим партнером по связыванию (т.е. аллергеном или его фрагментом), связанным на указанной подложке. После стадии промывки для удаления несвязанных белков и других молекул с поверхности твердой подложки, указанную твердую подложку инкубируют по меньшей мере с одним вторым, предпочтительно, флуоресцентно меченым антителом, специфически связывающимся с молекулами IgE и IgG млекопитающего, из которого получен образец крови или сыворотки. По меньшей мере одно второе антитело связывается с молекулами IgE или IgG.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения иммунологический анализ, предпочтительно, флуоресцентный иммунологический анализ, представляет собой чип, содержащий собранные в виде микропанели аллергены, такой как чип ImmunoCAP ISAC или MeDALL (см. Lupinek C et al., *Methods* 2014; 66, 106-19; Van Hage et al., *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140:974-7), или клеточные анализы, осуществляемые с использованием нанограммовых количеств аллергена, такие как анализ активации базофилов.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения млекопитающее является человеком, домашним питомцем, предпочтительно, кошкой или собакой, или лошастью.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения одновременно подвергают детекции и/или количественному анализу IgE и/или IgG, связывающиеся с по меньшей мере пятью, предпочтительно - по меньшей мере десятью, более предпочтительно - по меньшей мере 20, более предпочтительно - по меньшей мере 50, более предпочтительно - по меньшей мере 100, более предпоч-

тительно - по меньшей мере 120, более предпочтительно - по меньшей мере 150 аллергенами. Особенно предпочтительно иммобилизовать эти аллергены или их фрагменты, содержащие эпитопы, распознаваемые аллерген-специфическими IgE и/или IgG, на твердой подложке. Такую твердую подложку можно использовать в известных в этой области способах.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения одновременно подвергаются детекции и/или количественному анализу IgE и/или IgG, связывающиеся максимум с 300, предпочтительно - максимум с 250, более предпочтительно - максимум с 200, более предпочтительно - максимум с 180, более предпочтительно - максимум с 170, более предпочтительно - максимум с 160, более предпочтительно - максимум с 150 аллергенами.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере два аллергена, связанные с твердой подложкой, выбраны из группы, состоящей из

Alpha Gal, Act d 1, Act d 2, Act d 3, Act d 4, Act d 5, Act d 6, Act d 7, Act d 8, Act d 9, Act d 10, Act d 11, Act d 12, Act d 13, Aed 1, Aed 2, Aed 3, Aed 4, Aed 5, Aed 6, Aed 7, Aed 8, Aed a 10, Aed a 11, Aln g 1, Aln g 2, Aln g 4, Alt 1, Alt 2, Alt 3, Alt 4, Alt 5, Alt 6, Alt 7, Alt 8, Alt 9, Alt a 10, Alt a 12, Alt a 13, Alt a 14, Alt a 15, Amb 1, Amb 1.0101, Amb 1.0201, Amb 1.0202, Amb 1.0301, Amb 1.0302, Amb 1.0303, Amb 1.0304, Amb 1.0305, Amb 1.0401, Amb 1.0402, Amb 1.0501, Amb 1.0502, Amb 3, Amb 4, Amb 5, Amb 6, Amb 7, Amb 8, Amb 9, Amb a 10, Amb a 11, Amb a 12, Ana o 1, Ana o 2, Ana o 3, Ani s 1, Ani s 2, Ani s 3, Ani s 4, Ani s 5, Ani s 6, Ani s 7, Ani s 8, Ani s 9, Ani s 10, Ani s 11, Ani s 12, Ani s 13, Ani s 14, Api g 1, Api g 2, Api g 3, Api g 4, Api g 5, Api g 6, Api m 1, Api m 2, Api m 3,

Api m 4, Api m 5, Api m 6, Api m 7, Api m 8, Api m 9, Api m 10, Api m 11, Api m 12, Api m 13
 кДа, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 8, Ara h 9, Ara h 10, Ara h 11,
 Ara h 12, Ara h 13, Ara h 14, Ara h 15, Ara h 16, Ara h 17, Art v 1, Art v 2, Art v 3, Art v 4,
 Art v 5, Art v 6, Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4, Asp f 5, Asp f 6, Asp f 7, Asp f 8, Asp f 9,
 Asp f 10, Asp f 11, Asp f 12, Asp f 13, Asp f 14, Asp f 15, Asp f 16, Asp f 17, Asp f 18, Asp f
 22, Asp f 23, Asp f 26, Asp f 27, Asp f 28, Asp f 29, Asp f 34, Ber e 1, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3,
 Bet v 4, Bet v 6, Bet v 7, Bet v 8, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 3, Bla g 4, Bla g 5, Bla g 6, Bla g 7, Bla
 g 8, Bla g 9, Bla g 10, Bla g 11, Blo t 1, Blo t 2, Blo t 3, Blo t 4, Blo t 5, Blo t 6, Blo t 7, Blo t 8,
 Blo t 9, Blo t 10, Blo t 11, Blo t 12, Blo t 13, Blo t 14, Blo t 15, Blo t 18, Blo t 19, Blo t 20, Blo t
 21, Bos d 1, Bos d 2, Bos d 3, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d Lf, Bos d 8, Bos d 9,
 Bos d 11, Bos d 12, aS1, aS2, b-казеина, k-казеина, трансферрина, BSA, Bos d 6, Bra n 1, Bra
 n 4, Bra n 7, Bra n 8, Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6, Can f 7, Can f 8, Cas s
 1, Cas s 2, Cas s 5, Cas s 8, Cas s 9, Cha o 1, Cha o 2, Cha o 3, Che 1, Cla h 1, Cla h 2, Cla h 5,
 Cla h 6, Cla h 7, Cla h 8, Cla h 9, Cla h 10, Cla h 12, Cla h 13, Cor 1, Cor 1.0401, Cor 2, Cor 6,
 Cor 8, Cor 9, Cor a 10, Cor a 11, Cor a 12, Cor a 13, Cor a 14, Cry j 1, Cry j 2, Cry j 3, Cry j 4,
 Cyn d 1, Cup 1, Cup 2, Cup 3, Cup 4, Cup s 1, Cup s 2, Cup s 3, Cyn d 1, Cyn d 2, Cyn d 4, Cyn
 d 5, Cyn d 6, Cyn d 7, Cyn d 11, Cyn d 12, Cyn d 13, Cyn d 15, Cyn d 22, Cyn d 23, Cyn d 24,
 Cyp c 1, Dau c 1, Dau c 3, Dau c 4, Dau c 5, Der p 1, Der f 1, Der p 2, Der f 2, Der p 3, Der p 4,
 Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 10, Der p 11, Der p 13, Der p 14, Der p 15,
 Der p 18, Der p 20, Der p 21, Der p 23, Clone 16, Der p 24, Der p 36, Der p 37, Lep d 2, Equ c
 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4, Equ c 6, Equ c 8, Equ c 9, Equ c 10, Equ c 11, Fag e 1, Fag e 2, Fag
 e 3, Fag e 4, Fag e 5, Fag s 1, Fag s 2, Fag s 4, Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5, Fel d 6,
 Fel d 7, Fel d 8, Fra 1, Fra 3, Fra 4, Fra e 1, Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 9, Fra e 10,
 Fra e 11, Fra e 12, Gad c 1, Gad m 1, Gad m 2, Gad m 3, Gad m 4, Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal
 d 4, Gal d 5, Gal d 6, Gal d 7, Gal d 8, Gal d 9, Gal d 10, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4,
 Gly m 5, Gly m 6, Gly m 7, Gly m 8, Hel 1, Hel 2, Hel 3, Hel 4, Hel 6, Hev b 1, Hev b 2, Hev b
 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 6,01, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10, Hev b 11, Hev b
 12, Hev b 13, Hev b 14, Hev b 15, Hom 1, Hom 3, Hom 4, Hom 6, Hum j 1, Hum j 2, Hum j 3,
 Jug n 1, Jug n 2, Jug n 4, Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Jug r 4, Jug r 5, Jug r 6, Jug r 7, Jug r 8, Jun 1,
 Jun 2, Jun 3, Len c 1, Len c 2, Len c 3, Lep d 2, Lep d 3, Lep d 5, Lep d 7, Lep d 8, Lep d 10,
 Lep d 12, Lep d 13, Lep d 33, Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4, Mala s 1, Mala s 4, Mala s 5,
 Mala s 6, Mala s 7, Mala s 8, Mala s 9, Mala s 10, Mala s 11, Mala s 12, Mala s 13, Mer 1, Mus
 m 1, Mus m 2, Mus m 4, Mus m 7, MUXF3, Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 4, Ole e 5, Ole e 6,
 Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10, Ole e 11, Ole e 12, Ole e 13, Ole e 14, Ole e 15, Ory c 1, Ory
 c 3, Ory c 4, Ory c 6, Ory c 8, Ory s 1, Ory s 2, Ory s 3, Ory s 7, Ory s 11, Ory s 12, Ory s 13,
 Ory s 14, Par j 1, Par j 2, Par j 3, Par j 4, Pen c 1, Pen c 2, Pen c 3, Pen c 6, Pen c 13, Pen c 18,
 Pen c 19, Pen c 22, Pen c 24, Pen c 30, Pen c 32, Pen m 1, Pen m 2, Pen m 3, Pen m 4, Pen m 6,
 Pen m 8, Per 1, Per 2, Per 3, Per 4, Per 5, Per 6, Per 7, Per 8, Per 9, Per a 10, Per a 11, Per a 12,
 Phl p 1, Phl p 2, Phl p 3, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12, Phl p 13,
 Pis s 1, Pis s 2, Pis s 3, Pis s 5, Pis s 6, Pis v 3, Pla 1, Pla 2, Pla 3, Pla 8, Pla l 1, Pol d 5, Pru av 1,

Pru av 2, Pru av 3, Pru av 4, Pru du 1, Pru du 2, Pru du 3, Pru du 4, Pru du 5, Pru du 6, Pru du 6.01, Pru du 6.02, Pru p 1, Pru p 2, Pru p 3, Pru p 4, Pru p 7, Que 1, Que 2, Que 4, Rat n 1, Rat n 4, Rat n 7, Rat n 8, Sal k 1, Sal k 2, Sal k 3, Sal k 4, Sal k 5, Sal k 6, Sal k 7, Ses i 1, Ses i 2, Ses i 3, Ses i 4, Ses i 5, Ses i 6, Ses i 7, Ses i 8, Sin 1, Sin 2, Sin 3, Sin 4, Sol i 1, Sol i 2, Sol i 3, Sol i 4, Sola l 1, Sola l 2, Sola l 3, Sola l 4, Sola l 5, Sola l 6, Sola l 7, Sola t 1, Sola t 2, Sola t 3, Sola t 4, Sola t 8, Tri 1, Tri 2, Tri 3, Tri 4, Tri 5, Tri 7, Tri a 12, Tri a 13, Tri a 14, Tri a 15, Tri a 17, Tri a 18, Tri a 19, Tri a 19.0101, Tri a 20, Tri a 21, Tri a 25, Tri a 26, Tri a 27, Tri a 28, Tri a 29, Tri a 30, Tri a 31, Tri a 32, Tri a 33, Tri a 34, Tri a 35, Tri a 36, Tri a 37, Tri a 39, Tri a 40, Tri a 41, Tri a 42, Tri a 43, Tri a 44, Tri a 45, Tri a глиадина, Tri a aA_TI, Tri a 191_369, Tri a 36, m43, m82, 10/серина, 37/Thiore, 38/GTT, 112/1-Cys, 126/Dehy, пуротионина, Ves v 1, Ves v 2, Ves v 3, Ves v 5, Ves v 6, Zea m 1, Zea m 2, Zea m 3, Zea m 4, Zea m 5, Zea m 6, Zea m 7, Zea m 8, Zea m 11, Zea m 12, Zea m 13, Zea m 14, Zea m 22, Zea m 25, Zea m 32, бета-амилазы, авенина и GG1, предпочтительно, Alpha Gal, Act d 1, Act d 2, Act d 5, Act d 8, Aln g 1, Alt 1, Alt 6, Amb 1, Amb 4, Amb 5, Amb 6, Amb 9, Amb a 10, Ana o 1, Ana o 2, Ana o 3, Ani s 1, Ani s 3, Api g 1, Api m 1, Api m 2, Api m 4, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8, Ara h 9, Art v 1, Art v 3, Asp f 1, Asp f 3, Asp f 6, Ber e 1, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 5, Bla g 7, Blo t 5, Bos d 4, Bos d 5, Bos d Lf, Bos d 8, aS1, aS2, b-казеина, k-казеина, трансферрина, BSA, Bos d 6, Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6, Che 1, Cla h 8, Cor 1.0401, Cor 8, Cor 9, Cor a 14, Cry j 1, Cyn d 1, Cup 1, Der p 1, Der f 1, Der p 2, Der f 2, Der p 4, Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 15, Der p 18, Der p 21, Der p 23, Clone 16, Lep d 2, Equ c 1, Equ c 3, Fag e 2, Fel d 1, Fel d 2, Fel d 4, Gad c 1, Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 5, Gly m 4, Gly m 5, Gly m 6, Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6,01, Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Mal d 1, Mer 1, Mus m 1, MUXF3, Ole e 1, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10, Par j 2, Pen m 1, Pen m 2, Pen m 4, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12, Pis v 3, Pla 1, Pla 2, Pla 3, Pla l 1, Pol d 5, Pru du 3, Pru du 4, Pru du 6, Pru du 6.01, Pru du 6.02, Pru p 1, Pru p 3, Sal k 1, Ses i 1, Tri a 14, Tri a 19.0101, Tri a aA_TI, Tri a 191_369, Tri a 36, m43, m82, 10/серина, 37/Thiore, 38/GTT, 112/1-Cys, 126/Dehy, пуротионина, Ves v 1, Ves v 5, бета-амилазы, авенина и GG1.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения твердая подложка, используемая в способе по настоящему изобретению, содержит все упомянутые выше аллергены, связанные с ней.

Пример

Элюция крови и сыворотки из высушенной бумаги, измерения IgE и IgG, статистический анализ и эксперименты по активации базофилов.

Образцы крови и сыворотки получали от пациентов с аллергией (n=18) с разными профилями сенсибилизации IgE и клинической документацией симптомов (табл. I).

Таблица I

Демографические данные и клиническая характеристика пациентов

Возраст (лет)	Пол (м/ж)	Симптомы (R, C, AS, AD)	Сенсибилизация

1	32	м	R, C, AS	Береза/Травы/Кошка/HDM
2	55	м	R	Береза
3	27	ж	R, C, AD	HDM
4	25	м	R, C, AS	HDM
5	57	ж	R, C	Травы
6	40	м	R, C	Травы
7	57	ж	R, C, AS	Травы/Кошка
8	24	ж	R	HDM
9	34	м	R, C, AS	HDM/Береза/Травы
10	51	м	R, C	Береза
11	53	м	R, C	Береза
12	51	ж	R, C	Кошка
13	30	м	R, C, AS	Береза/Травы/Кошка
14	57	ж	R, C	HDM/Травы/Кошка
15	25	ж	R, C, AS	HDM/Травы/Кошка
16	27	ж	R, C, AS	HDM/Береза/Травы/Кошка
17	20	ж	R, C, AS	HDM/Береза/Кошка
18	50	м	R, C, AS	HDM/Травы/Береза/Кошка

Сокращения: ж, женский; м, мужской; R: ринит; C: конъюнктивит; AS: астма; AD: атопический дерматит; HDM: клещ домашней пыли.

Кровь пациентов для получения сыворотки собирали в пробирки VACUETTE® Z Serum Separator Clot Activator и цельную кровь собирали в пробирки VACUETTE®K3EDTA (Greiner Bio-one International, Austria).

Аликвоты 100 мкл цельной крови или сыворотки переносили на фильтровальную типа ватман 903 (GE Healthcare Europe GmbH, Austria) или нитроцеллюлозу Amersham Protran (GE Healthcare Europe). Бумагу, содержащую образцы, сушили на воздухе при комнатной температуре. Образцы для элюирования получали с использованием перфоратора ручного типа диаметром 3 мм от Wallac OY, Finland. Один, два или три из образцов раздельно помещали в пробирки Eppendorf (2 мл) (Fisher Scientific, USA).

Для определения воспроизводимости тестирования и проверки разных условий хранения осуществляли следующий набор экспериментов. После сушки фильтры помещали в обычные конверты и хранили при разных температурах (+37°C (t+37), при комнатной температуре +22°C (t+22), +4°C (t+4), -20°C (t-20) в течение 1-7 недель в инкубаторах, холодильных камерах и морозильный аппарат для глубокого замораживания, соответственно.

Выделение высушенных образцов осуществляли посредством пропитывания образцов в 50 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) Дульбекко от Gibco-ThermoFisher Scientific (USA) или дилуэнта для образцов (SD) (дилуэнт для образцов ImmunoCAP IgE/ЕСР/триптаза; кат. № 10-9256-01, Phadia-ThermoFisher, Sweden) с последующей инкубацией в шейкере Eppendorf (300 об./мин) в течение 2,5 ч при комнатной температуре. После центрифугирования с помощью настольной центрифуги (10000 об./мин, комнатная температура, 10 мин) супернатанты выбрасывали и использовали для дальнейшего анализа. С целью контроля анализировали свежие образцы сыворотки или образцы сыворотки, замороженные при -20°C, от одних и тех же пациентов. Для определения концентрации белка в пробах использовали набор для анализа белка ВСА (Thermo Scientific) на микропланшетах по инструкции производителя.

Реактивность IgE и IgG в отношении собранных в виде микропанели аллергенов определяли с использованием чипов с аллергенами MeDALL, полученных по технологии ImmunoCAP ISAC (ThermoFisher, Phadia) как описано в Lupinek C et al. (Methods 2014; 66, 106-19). Для измерений IgE использовали неразведенные образцы, в то время как для измерений IgG образцы разводили 1:50, учитывая коэффициент разведения белка. Микропанели сканировали с использованием сканера LuxScan 10K (CapitalBio Technology, China) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа микропанелей версии 3.1.2 (адаптированного для чипов MeDALL). Уровни IgE, измеряемые с помощью чипа MeDALL, точно соответствовали измеренному с помощью ImmunoCAP® ISAC 112, и их стандартизировали с использованием референсной сыворотки с известными количественными уровнями IgE, определяемыми с помощью технологии ImmunoCAP. Определенные уровни IgE являлись следующими: низкий:

0,3-3 ISU-IgE; умеренно-высокий: 3-15 ISU-IgE; очень высокий: >15 ISU-IgE (van Hage M et al. Clin Chem Lab Med. 2017; 55, 571-577). Для сравнительного анализа уровней аллерген-специфических антител используют коэффициент корреляции Пирсона (PCC).

Анализы huRBL осуществляли посредством нанесения разведенных 1:10 сывороток Phl p 5-сенсibilизированных пациентов на клетки базофильного лейкоза крысы (RBL), экспрессирующих субъединицы $\alpha/\beta/\gamma$ Fc ϵ RI человека, посредством инкубации в течение ночи (Nakamura R et al. Allergy 2010; 65:1266-1273). Дегрануляцию индуцировали посредством добавления Phl p 5 в концентрации 100, 10, 1 или 0,1 нг/мл и вычисляли процентные доли высвобождения бета-гексозаминидазы. Для контроля клетки, обработанные Triton-X, служили в качестве 100% высвобождения (Eckl-Dorna J, et al. Allergy. 2018; 73, 1003-1012).

Результаты.

Образцы цельной крови с антикоагулянтом или образцы сыворотки от пациентов с аллергией иммобилизовали на разных типах бумаги (т.е. фильтровальной бумаге, нитроцеллюлозе), сушили на воздухе и полученные элюаты с разными буферами (т.е. PBS, дилуента для образцов) тестировали на реактивность IgE в отношении 175 собранных в виде микропанели молекул аллергенов с использованием технологии ImmunoCAP ISAC (см. табл. II).

Список молекул аллергенов на чипе.

<i>Аллерген</i>	<i>Источник</i>	<i>Название/функция белка/семейство аллергенов</i>
Alpha Gal	<i>Красное мясо</i>	<i>Эпитоп Gal-α1-3Gal-β1-3GlcNAc</i>
Act d 1	<i>Киви</i>	Цистеиновая протеаза
Act d 2	<i>Киви</i>	Тауматин-подобный белок
Act d 5	<i>Киви</i>	Кивеллин
Act d 8	<i>Киви</i>	PR-10
Aln g 1	<i>Ольха</i>	PR-10
Alt a 1	<i>Альтернария</i>	Acidic гликопротеин
Alt a 6	<i>Альтернария</i>	Енолаза
Amb a 1	<i>Амброзия</i>	Пектатлиаза
Amb a 4	<i>Амброзия</i>	Дефенсин-подобный белок
Amb a 5	<i>Амброзия</i>	Полкальцин (кальций-связывающий белок 2 EF-hand)
Amb a 6	<i>Амброзия</i>	LTP
Amb a 9	<i>Амброзия</i>	Полкальцин (кальций-связывающий белок 2 EF-hand)
Amb a 10	<i>Амброзия</i>	Полкальцин (кальций-связывающий белок 3 EF-hand)
Ana o 1	<i>Орех кешью</i>	Вицилин-подобный белок
Ana o 2	<i>Орех кешью</i>	Запасной белок, 11S глобулин
Ana o 3	<i>Орех кешью</i>	Запасной белок, 2S альбумин
Ani s 1	<i>Анисакис</i>	Ингибитор сериновых протеаз
Ani s 3	<i>Анисакис</i>	Тропомиозин
Api g 1	<i>Сельдерей</i>	PR-10
Api m 1	<i>Яд пчел</i>	Фосфолипаза A2
Api m 2	<i>Яд пчел</i>	Гиалуронидаза
Api m 4	<i>Яд пчел</i>	Мелиттин
Ara h 1	<i>Арахис</i>	Запасной белок, 7S глобулин
Ara h 2	<i>Арахис</i>	Запасной белок, 2S альбумин
Ara h 3	<i>Арахис</i>	Запасной белок, 11S глобулин
Ara h 6	<i>Арахис</i>	Запасной белок, 2S альбумин
Ara h 8	<i>Арахис</i>	PR-10

Ara h 9	<i>Арахис</i>	LTP
Art v 1	<i>Полынь</i>	Дефенсин
Art v 3	<i>Полынь</i>	LTP
Asp f 1	<i>Аспергиллы</i>	Семейство митогиллинов
Asp f 3	<i>Аспергиллы</i>	Пероксисомальный белок
Asp f 6	<i>Аспергиллы</i>	Mn-супероксиддисмутаза
Ber e 1	<i>Бразильский орех</i>	Запасной белок, 2S альбумин
Bet v 1	<i>Береза</i>	PR-10
Bet v 2	<i>Береза</i>	Профилин
Bet v 4	<i>Береза</i>	Полкальцин
Bla g 1	<i>Таракан</i>	Белок таракана, группа 1
Bla g 2	<i>Таракан</i>	Аспаргат-протеаза
Bla g 5	<i>Таракан</i>	Глутатион-S-трансфераза
Bla g 7	<i>Таракан</i>	Тропомиозин
Blo t 5	<i>Blomia tropicalis</i>	Аллергены клещей группы 5
Bos d 4	<i>Коровье молоко</i>	Альфа-лактальбумин
Bos d 5	<i>Коровье молоко</i>	Бета-лактоглобулин
Bos d 5	<i>Коровье молоко</i>	Бета-лактоглобулин
Bos d Lf	<i>Коровье молоко</i>	Трансферрин
Bos d 8	<i>Коровье молоко</i>	Казеины
aS1	<i>Коровье молоко</i>	Казеины
aS2	<i>Коровье молоко</i>	Казеины
b-казеин	<i>Коровье молоко</i>	Казеины
k-казеин	<i>Коровье молоко</i>	Казеины
Трансферрин	<i>Коровье молоко</i>	Трансферрин
BSA	<i>Коровье молоко</i>	Сывороточный альбумин
Bos d 6	<i>Коровье молоко</i>	Сывороточный альбумин
Can f 1	<i>Собака</i>	Липокалин
Can f 2	<i>Собака</i>	Липокалин
Can f 3	<i>Собака</i>	Сывороточный альбумин
Can f 4	<i>Собака</i>	Липокалин
Can f 5	<i>Собака</i>	Калликреин
Can f 6	<i>Собака</i>	Липокалин
Che a 1	<i>Лебеда</i>	Ингибитор трипсина

Cla h 8	Cladosporium	Маннитдегидрогеназа
Cor 1.0401	<i>Лесной орех</i>	PR-10
Cor a 8	<i>Лесной орех</i>	LTP
Cor a 9	<i>Лесной орех</i>	Запасной белок, 11S глобулин
Cor a 14	<i>Лесной орех</i>	Запасной белок, 2S альбумин
Cry j 1	<i>Криптомерия японская</i>	Пектатлиаза
Cyn d 1	<i>Свиной пальчатый</i>	Травы, группа 1
Cup a 1	<i>Китарис</i>	Пектатлиаза
Der p 1	HDM	Цистеиновая протеаза
Der f 1	HDM	Цистеиновая протеаза
Der p 2	HDM	Семейство NPC2
Der f 2	HDM	Семейство NPC2
Der p 4	HDM	Альфа-амилаза
Der p 5	HDM	Неизвестно
Der p 7	HDM	Неизвестно
Der p 10	HDM	Тропомиозин
Der p 11	HDM	Парамиозин
Der p 14	HDM	Аполипофорин
Der p 15	HDM	Хитиназа-подобный белок
Der p 18	HDM	Хитин-связывающий белок
Der p 21	HDM	Неизвестно
Der p 23	HDM	Перитрофин-подобный белок
Clone 16	HDM	Хитин-связывающий белок
Lep d 2	<i>Амбарный клещ</i>	Семейство NPC2
Equ c 1	<i>Лошадь</i>	Липокалин
Equ c 3	<i>Лошадь</i>	Сывороточный альбумин
Fag e 2	<i>Гречиха</i>	Запасной белок, 2S альбумин
Fel d 1	<i>Кошка</i>	Утероглобин
Fel d 2	<i>Кошка</i>	Сывороточный альбумин
Fel d 4	<i>Кошка</i>	Липокалин
Gad c 1	<i>Треска</i>	Парвальбумин
Gal d 1	<i>Яичный белок</i>	Овомукоид
Gal d 2	<i>Яичный белок</i>	Овальбумин
Gal d 3	<i>Яичный белок</i>	Офотрансферрин

Gal d 5	<i>Яичный желток/курица</i>	Ливетин (сывороточный альбумин)
Gly m 4	<i>Соя</i>	PR-10
Gly m 5	<i>Соя</i>	Запасной белок, бета-конглицинин
Gly m 6	<i>Соя</i>	Запасной белок, глицинин
Hev b 1	<i>Латекс</i>	Фактор элонгации резины
Hev b 3	<i>Латекс</i>	Белок малых частиц резины
Hev b 5	<i>Латекс</i>	Кислый белок
Hev b 6,01	<i>Латекс</i>	Гевеин
Jug r 1	<i>Грецкий орех</i>	Запасной белок, 2S альбумин
Jug r 2	<i>Грецкий орех</i>	Суперсемейство купина, 7S вицилин-подобных глобулинов
Jug r 3	<i>Грецкий орех</i>	LTP
Mal d 1	<i>Яблоко</i>	PR-10
Mer a 1	<i>Пролесник однолетний</i>	Профилин
Mus m 1	<i>Мышь</i>	Липокалин
MUXF3	CCD	CCD
Ole e 1	<i>Олива</i>	Ингибитор трипсина
Ole e 5	<i>Олива</i>	Супероксиддисмутазы
Ole e 6	<i>Олива</i>	Кислый белок, опосредующий аллергию на оливу
Ole e 7	<i>Олива</i>	LTP
Ole e 8	<i>Олива</i>	Кальций-связывающие белки
Ole e 9	<i>Олива</i>	Глюканаза
Ole e 10	<i>Олива</i>	Гликозилгидролазы
Par j 2	<i>Постенница лекарственная</i>	LTP
Pen m 1	<i>Креветка</i>	Тропомиозин
Pen m 2	<i>Креветка</i>	Аргининкиназа
Pen m 4	<i>Креветка</i>	Кальций-связывающие белки
Phl p 1	<i>Тимофеевка луговая</i>	Травы, группа 1
Phl p 2	<i>Тимофеевка луговая</i>	Травы, группа 2
Phl p 4	<i>Тимофеевка луговая</i>	Фермент берберинового мостика
Phl p 5b	<i>Тимофеевка луговая</i>	Травы, группа 5
Phl p 6	<i>Тимофеевка луговая</i>	Травы, группа 6

Phl p 7	<i>Тимофеевка луговая</i>	Полкальцин
Phl p 11	<i>Тимофеевка луговая</i>	Ингибитор трипсина
Phl p 12	<i>Тимофеевка луговая</i>	Профилин
Pis v 3	<i>Фисташки</i>	7S вицилин-подобных глобулинов
Pla a 1	<i>Платан</i>	Ингибитор инвертазы
Pla a 2	<i>Платан</i>	Полигалактуроназы
Pla a 3	<i>Платан</i>	LTP
Pla l 1	<i>Подорожник</i>	Пектатлиаза
Pol d 5	<i>Бумажная оса</i>	Ag 5
Pru du 3	<i>Миндаль</i>	LTP
Pru du 4	<i>Миндаль</i>	Профилин
Pru du 6	<i>Миндаль</i>	Запасной белок, 11S глобулин
Pru du 6.01	<i>Миндаль</i>	Запасной белок, 11S глобулин
Pru du 6.02	<i>Миндаль</i>	Запасной белок, 11S глобулин
Pru p 1	<i>Персик</i>	PR-10
Pru p 3	<i>Персик</i>	LTP
Sal k 1	<i>Солянка</i>	Пектинметилэстераза
Ses i 1	<i>Кунжут</i>	Запасной белок, 2S альбумин
Tri a 14	<i>Пшеница</i>	LTP
Tri a 19.0101	<i>Пшеница</i>	Омега-5-глиадин
Tri a aA_TI	<i>Пшеница</i>	Альфа-амилаза/ингибиторы трипсина
Tri a 191_369	<i>Пшеница</i>	Фрагмент глютеина LMW
Tri a 36	<i>Пшеница</i>	Субъединица глютеина, глютеин LMW
m43	m43	Фрагмент глютеина HMW Bx7
m82	m82	Фрагмент глютеина HMW Bx7
10/Серин	#10/Ингибитор сериновых протеиназ	Ингибиторы сериновых протеаз
37/Тиоре	#37/Тиоредоксин h	Тионины (альфа-пуротионин)
38/GTT	#38/Глутатионтрансфераза	Глутатионтрансферазы
112/1-Cys	#112/1-Cys-пероксиредоксин	Пероксиредоксины (1-Cys-пероксиредоксин)
126/Dehy	#126/Дегидрин	Дегидрины
Пуротионин	<i>Пшеница</i>	Тионины (альфа-пуротионин)
Ves v 1	<i>Оса</i>	Фосфолипазы
Ves v 5	<i>Оса</i>	Антиген 5
TNF альфа	<i>Человек</i>	IgG1-калибратор
Бета-амилаза	<i>Пшеница</i>	Бета-амилазы
Авенин	<i>Пшеница</i>	Авенин
GG1	<i>Пшеница</i>	Гамма-глиадины

ON MYO (лошадь) и 2N MYO (лошадь) можно использовать на чипе в качестве отрицательного контроля и CCD-маркера, соответственно.

Элюция с использованием PBS и дилуента для образцов позволяла выделять аллерген-специфические IgE из высушенных пятен крови на бумаге (см. фиг. 1). Высушенные пятна сыворотки и крови на бумаге можно хранить при разных температурах (т.е. +37°C, +22°C, +4°C, -20°C), получая схожие результаты в отношении уровней аллерген-специфических IgE по сравнению с незамедлительным выделением после сушки (фиг. 2). На фиг. 3 показано, что имеет место исключительная корреляция ($r > 0,83$; $p < 0,000001$) между уровнями IgE, измеренными в свежей сыворотке одного пациента, к 21 распознаваемому аллергену и результатами, полученными после незамедлительного выделения или после хранения в течение 1 недели при +37°C, +22°C, +4°C и -20°C.

В следующей группе экспериментов было показано, что имеет место исключительная корреляция ($r > 0,87$; $p < 0,001$) между уровнями аллерген-специфических IgE, измеренных в свежей крови, и выделенных сразу образцов крови от 9 пациентов к 8 из чаще всего распознаваемых аллергенов (фиг. 4). Для дальнейшего исследования надежности и воспроизводимости результатов осуществляли подробный анализ сывороток 17 пациентов посредством сравнения незамедлительного выделения и выделения высушенных на бумаге образцов сыворотки, хранящихся в течение 2 недель при 37°C, для 8 чаще всего определяемых аллергенов. Демографическая и клиническая характеристика 17 пациентов (т.е. #1 -#17) приведена в табл. I. Таким образом, осуществляли 136 анализов в трех параллелях для каждого условия (т.е. незамедлительное выделение и выделение через 2 недели хранения при 37°C) (фиг. 5). Статистический анализ снова показал наличие исключительной корреляции между результатами, полученными с использованием свежих сывороток, по сравнению с незамедлительным выделением, а также в случае свежих сывороток по сравнению с выделенными образцами, полученными после 2 недель при 37°C (фиг. 5).

Для анализа потенциальной потери чувствительности исследовали все аллергены, распознаваемые образцами свежей сыворотки от 17 тестируемых пациентов на фиг. 5. Пациенты демонстрировали положительную реактивность 0,3 ISU-IgE или более в отношении 182 молекул аллергенов.

В пилотном эксперименте было показано, что IgE, выделенные из высушенной сыворотки через 1 и 7 недель хранения при +37°C, все еще являлись функциональными и при нагрузке на базофилы запускали дозозависимое высвобождение медиаторов (фиг. 6). Эти результаты свидетельствуют о том, что транспортировку высушенных пятен крови и сыворотки на бумаге можно осуществлять просто по почте без необходимости охлаждения или с помощью экспресс-доставки и без тщательной упаковки, позволяющей избегать протечки жидкости в разные времена года и в разных климатических зонах, и это делает возможной надежную и воспроизводимую детекцию даже низких уровней аллерген-специфических IgE. Примечательно, что, по-видимому, имеет место более значительная потеря сигналов IgE в случае высоких уровней аллерген-специфических IgE по сравнению с более низкими (например, *Bet v 1* и *Phl p 5*: фиг. 1). Таким образом, анализировали общую потерю белка во время выделения. В табл. III для сывороток девяти пациентов с аллергией показано содержание белка и выделение белка после хранения в течение двух недель при +37°C, +22°C, +4°C, -20°C. Диапазон выделения в случае девяти сывороток в четырех тестируемых условиях составлял 9-18% при осуществлении элюирования в экспериментах (т.е. высушенная сыворотка, фильтровальная бумага, 3 выштампованных фрагмента, 50 мкл PBS).

Таблица III

Концентрации белка, измеренные в образцах свежей сыворотки от 9 пациентов и в образцах, выделенных сразу и после 2 недель сравнения при +37°C, +22°C, +4°C и -20°C. Также приведены процентные доли выделенных белков (средние значения)

Пациенты	Сыворотка	Сразу		+37°C		+22°C		+4°C		-20°C		% сред него
	г/л	г/л	%	г/л	%	г/л	%	г/л	%	г/л	%	
1	73,39	8,92	12	10,85	15	7,51	10	8,32	11	7,62	10	11,77
2	77,87	10,3	13	10,07	13	8,15	10	8,15	10	6,96	9	11,20
3	58,83	9,42	16	7,7	13	7,26	12	8,42	14	9,4	16	14,34
4	74,66	11,15	15	10,12	14	8,72	12	8,75	12	11,17	15	13,36
5	56,55	8,52	15	7,3	13	6,9	12	7,21	13	7,13	13	13,10
6	64,33	8,19	13	9,64	15	7,44	12	8,27	13	8,4	13	13,03
7	64,47	8,16	13	9,23	14	11,3 2	18	11,12	17	9,8	15	15,39
8	83,24	9,1	11	11,67	14	8,73	10	10,8	13	10,25	12	12,14
9	61,81	7,21	12	10,22	17	8,38	14	7,64	12	8,2	13	13,47
Среднее			13		14		12		13		13	

Т.к. измерение аллерген-специфических IgG против собранных в виде микропанели аллергенов также важно для изучения клинически значимых вопросов, таких как индуцирование аллерген-специфических IgG в течение аллерген-специфической иммунотерапии (АИТ) или возникновение аллерген-специфических IgG как признака воздействия природного аллергена, проводили исследование того, можно ли также выделять аллерген-специфические IgG из высушенных пятен сыворотки на бумаге. Наблюдали исключительную корреляцию уровней аллерген-специфических IgG, измеренных в свежей сыворотке и выделенных образцах ($r=0,99$; $p<0,000001$), против распознаваемых аллергенов (фиг. 7; табл. IV).

Таблица IV

Средние уровни IgG в сыворотке, специфические для каждого из аллергенов, распознаваемых сывороткой, тестируемой на фиг. 2, определяемые для образца свежей сыворотки (левый столбец) и после незамедлительного выделения

Аллерген молекулы	ISU-IgG в сыворотке	ISU-IgG в выделенных образцах
nAct d 1	34,50	37,77
rAmb a 10	5,24	3,47
nAna o 2	12,56	12,89
rAni s 3	16,67	18,34
rAra h 3	3,59	4,65
rAra h 8	4,17	4,58
rAsp f 1	3,79	1,70
rBet v 1	48,35	46,71
nBos d 5	15,00	24,57
nBos d 8	24,72	28,57
raS1-казеин	15,27	19,22
rТрансферрин	28,84	26,64
rChe a 1	1,75	1,29
nCor a 9	22,73	21,66
rCor a 14	36,05	35,49
nDer f 1	3,82	4,55
rDer f 2	8,36	9,49
rAna o 2	1,49	1,65
rDer p 2	3,99	4,44
rDer p 10	14,21	18,43
rDer p 14	2,54	2,78
rDer p 15	6,90	10,43
rDer p 23	2,07	2,13
rEqu c 1	1,90	3,08

rFel d 1	14,25	15,06
nFel d 2	4,34	3,81
nGal d 1	75,40	94,07
nGal d 2	101,99	105,12
nGal d 3	3,36	3,88
rGly m 4	2,27	3,01
nGly m 6	2,84	3,88
rCCD	3,64	3,99
rPar j 2	4,88	4,71
nPen m 2	26,07	20,64
rPhl p 1	6,34	7,15
rPhl p 2	10,97	11,26
nPhl p 4	6,05	6,07
rPhl p 5b	21,48	21,22
rPhl p 6	6,62	6,74
rPol d 5	3,27	6,28
nPla a 2	2,69	3,44
rPru p 3	3,59	3,22
rPru du 4	2,16	2,62
rTri a 14	22,17	21,67
nTri a 191_369	2,73	4,67
rm82	1,42	4,51
rOle e 6	2,03	2,42
rGG1	2,39	1,91

Коэффициент выделения специфических IgG являлся сравнимым, когда элюаты получали непосредственно после сушки или после хранения при разных температурах (-20°C - +37°C).

Эти данные свидетельствуют о том, что можно не только выделять из высушенного пятна крови или сыворотки на бумаге достаточно IgE и IgG для тестирования на реактивность в отношении более чем 170 разных аллергенов с помощью технологии микрочипов, но это также будет надежным и воспроизводимым. Т.к. высушенные пятна крови на бумаге можно хранить при разных температурах (-20°C - +37°C) без потери активности, должна быть возможной отправка их запаянными в пластике с помощью конвертов посредством простой почты из любой точки мира в лаборатории, осуществляющие анализ микрочипов. Затем результаты тестирования можно отправлять по почте или электронной почте обратно аллергологу для помощи в лечении сложных случаев. Таким образом, настоящее изобретение относится к надежному способу молекулярной диагностики аллергий из высушенных образцов крови на бумаге, доступному по всему миру.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ детекции и/или количественного анализа аллерген-специфических IgE и/или IgG в образце крови или сыворотки субъекта, представляющего собой человека, включающий стадии
 - a) переноса от 10 до 500 мкл образца крови или сыворотки на абсорбирующий материал,
 - b) сушки абсорбирующего материала, содержащего образец крови или сыворотки со стадии a),
 - c) элюирования IgE и/или IgG из высушенного абсорбирующего материала или его части, содержащего высушенный образец крови или сыворотки, посредством нанесения буфера на указанный абсорбирующий материал или его часть,
 - d) выделения элюата со стадии c) и
 - e) нанесения выделенного элюата со стадии d) на тест-систему для одновременной детекции и/или количественного анализа IgE и/или IgG, связывающихся по меньшей мере с двумя аллергенами, где тест-система содержит твердую подложку, содержащую по меньшей мере два аллергена и/или их функцио-

нальных фрагментов, связанных с ней, в количестве по меньшей мере 5 фг и менее 1 нг каждый.

2. Способ по п.1, где абсорбирующий материал содержит целлюлозу или его производное.

3. Способ по п.2, где производным целлюлозы является нитроцеллюлоза.

4. Способ по любому из пп.1-3, где на стадии а) на абсорбирующий материал переносят от 20 до 400 мкл, предпочтительно от 30 до 300 мкл, более предпочтительно от 40 до 200 мкл, более предпочтительно от 50 до 250 мкл, более предпочтительно от 60 до 200 мкл, более предпочтительно от 70 до 150 мкл, более предпочтительно от 80 до 120 мкл, в частности 100 мкл крови или сыворотки.

5. Способ по любому из пп.1-4, где абсорбирующий материал со стадии б) сушат в течение по меньшей мере 1 мин, предпочтительно в течение по меньшей мере 2 мин, более предпочтительно в течение по меньшей мере 5 мин при температуре от 5 до 40°C, предпочтительно от 10 до 30°C, более предпочтительно от 15 до 25°C, в частности при комнатной температуре.

6. Способ по любому из пп.1-5, где образец крови или сыворотки, содержащий часть высушенного абсорбирующего материала, получают посредством выштамповки указанной области из указанного высушенного абсорбирующего материала.

7. Способ по любому из пп.1-6, где буфер является буфером PBS или буфером PBS Дульбекко, предпочтительно содержащим детергент, предпочтительно полисорбат 20.

8. Способ по любому из пп.1-7, где IgE и/или IgG элюируют посредством нанесения от 10 до 800 мкл, предпочтительно от 10 до 700 мкл, более предпочтительно от 10 до 600 мкл, более предпочтительно от 10 до 500 мкл, более предпочтительно от 10 до 400 мкл, более предпочтительно от 10 до 300 мкл, более предпочтительно от 10 до 200 мкл, более предпочтительно от 20 до 200 мкл, более предпочтительно от 20 до 150 мкл, более предпочтительно от 20 до 100 мкл, более предпочтительно от 20 до 90 мкл, более предпочтительно от 30 до 70 мкл, более предпочтительно от 40 до 60 мкл, в частности 50 мкл буфера на указанный абсорбирующий материал или его часть.

9. Способ по любому из пп.1-8, где высушенный абсорбирующий материал или его часть, содержащий высушенный образец крови или сыворотки, инкубируют с буфером в течение по меньшей мере 10 мин, предпочтительно в течение по меньшей мере 30 мин, более предпочтительно в течение по меньшей мере 60 мин, более предпочтительно в течение по меньшей мере 120 мин, более предпочтительно в течение по меньшей мере 150 мин.

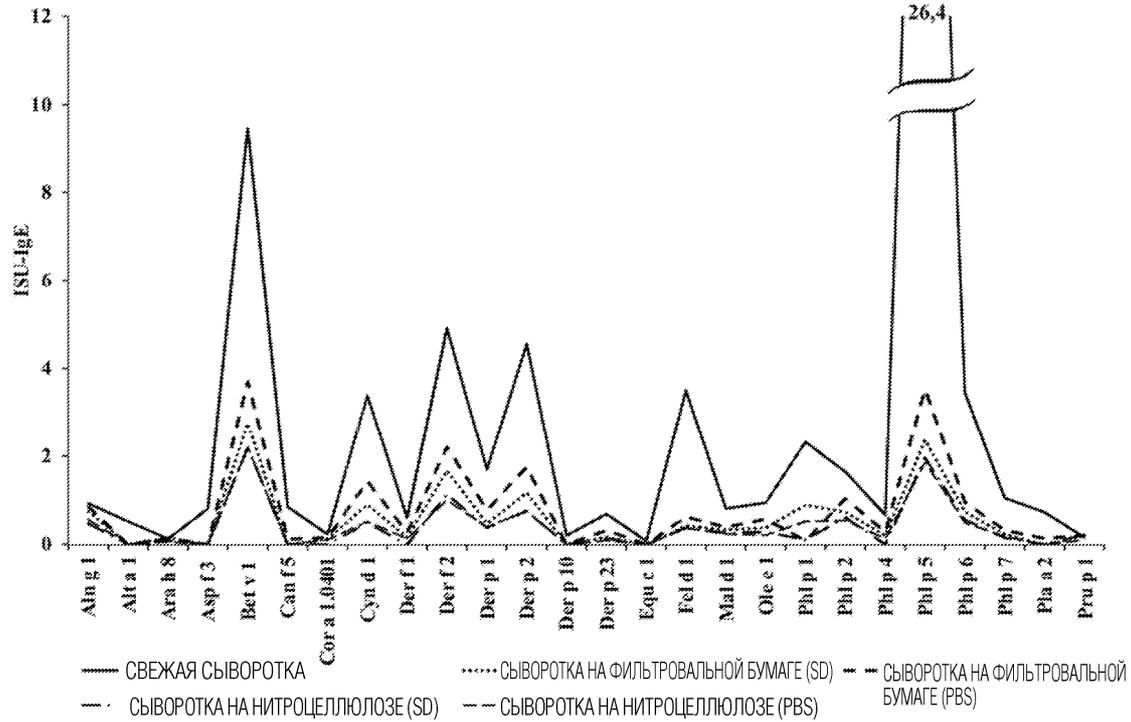
10. Способ по любому из пп.1-9, где высушенный абсорбирующий материал или его часть, содержащий высушенный образец крови или сыворотки, инкубируют с буфером максимум в течение 24 ч, предпочтительно максимум в течение 18 ч, более предпочтительно максимум в течение 12 ч, более предпочтительно максимум в течение 6 ч.

11. Способ по любому из пп.1-10, где высушенный абсорбирующий материал или его часть, содержащий высушенный образец крови или сыворотки, инкубируют с буфером при температуре от 5 до 40°C, предпочтительно от 10 до 30°C, более предпочтительно от 15 до 25°C, в частности при комнатной температуре.

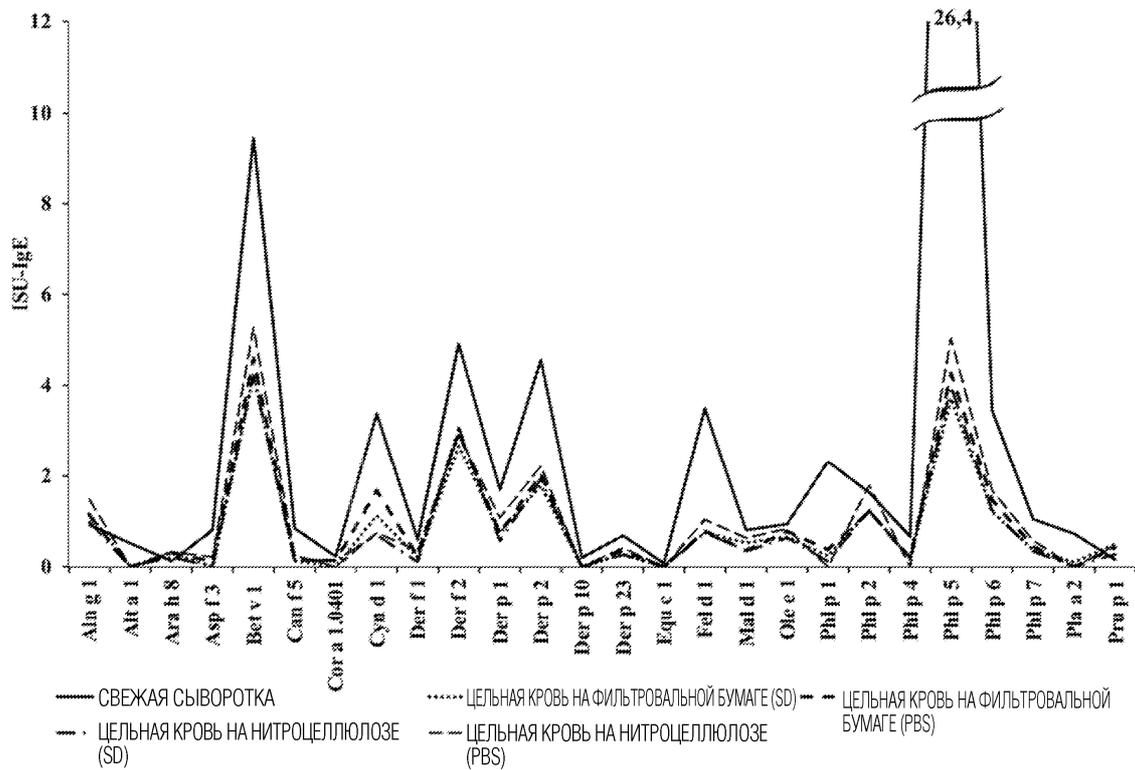
12. Способ по любому из пп.1-11, где одновременно осуществляют детекцию и/или количественный анализ IgE и/или IgG, связывающиеся по меньшей мере с пятью, предпочтительно по меньшей мере десятью, более предпочтительно по меньшей мере 20, более предпочтительно по меньшей мере 50, более предпочтительно по меньшей мере 100 аллергенами.

13. Способ по любому из пп.1-12, где по меньшей мере два аллергена выбраны из группы, состоящей из Alpha Gal, Act d 1, Act d 2, Act d 3, Act d 4, Act d 5, Act d 6, Act d 7, Act d 8, Act d 9, Act d 10, Act d 11, Act d 12, Act d 13, Aed 1, Aed 2, Aed 3, Aed 4, Aed 5, Aed 6, Aed 7, Aed 8, Aed a 10, Aed a 11, Aln g 1, Aln g 2, Aln g 4, Alt 1, Alt 2, Alt 3, Alt 4, Alt 5, Alt 6, Alt 7, Alt 8, Alt 9, Alt a 10, Alt a 12, Alt a 13, Alt a 14, Alt a 15, Amb 1, Amb 1.0101, Amb 1.0201, Amb 1.0202, Amb 1.0301, Amb 1.0302, Amb 1.0303, Amb 1.0304, Amb 1.0305, Amb 1.0401, Amb 1.0402, Amb 1.0501, Amb 1.0502, Amb 3, Amb 4, Amb 5, Amb 6, Amb 7, Amb 8, Amb 9, Amb a 10, Amb a 11, Amb a 12, Ana o 1, Ana o 2, Ana o 3, Ani s 1, Ani s 2, Ani s 3, Ani s 4, Ani s 5, Ani s 6, Ani s 7, Ani s 8, Ani s 9, Ani s 10, Ani s 11, Ani s 12, Ani s 13, Ani s 14, Api g 1, Api g 2, Api g 3, Api g 4, Api g 5, Api g 6, Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 4, Api m 5, Api m 6, Api m 7, Api m 8, Api m 9, Api m 10, Api m 11, Api m 12, Api m 13 кДа, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 8, Ara h 9, Ara h 10, Ara h 11, Ara h 12, Ara h 13, Ara h 14, Ara h 15, Ara h 16, Ara h 17, Art v 1, Art v 2, Art v 3, Art v 4, Art v 5, Art v 6, Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4, Asp f 5, Asp f 6, Asp f 7, Asp f 8, Asp f 9, Asp f 10, Asp f 11, Asp f 12, Asp f 13, Asp f 14, Asp f 15, Asp f 16, Asp f 17, Asp f 18, Asp f 22, Asp f 23, Asp f 26, Asp f 27, Asp f 28, Asp f 29, Asp f 34, Ber e 1, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 6, Bet v 7, Bet v 8, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 3, Bla g 4, Bla g 5, Bla g 6, Bla g 7, Bla g 8, Bla g 9, Bla g 10, Bla g 11, Blo t 1, Blo t 2, Blo t 3, Blo t 4, Blo t 5, Blo t 6, Blo t 7, Blo t 8, Blo t 9, Blo t 10, Blo t 11, Blo t 12, Blo t 13, Blo t 14, Blo t 15, Blo t 18, Blo t 19, Blo t 20, Blo t 21, Bos d 1, Bos d 2, Bos d 3, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d Lf, Bos d 8, Bos d 9, Bos d 11, Bos d 12, aS1, aS2, b-казеина, k-казеина, трансферрина, BSA, Bos d 6, Bra n 1, Bra n 4, Bra n 7, Bra n 8, Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6, Can f 7, Can f 8, Cas s 1, Cas s 2, Cas s 5, Cas s 8, Cas s 9, Cha o 1, Cha o 2, Cha o 3, Che 1, Cla h 1, Cla h 2, Cla h 5, Cla h 6, Cla h 7, Cla h 8, Cla h 9, Cla h 10, Cla h 12, Cla h 13, Cor 1, Cor 1.0401, Cor 2, Cor 6, Cor 8, Cor 9, Cor a 10, Cor a 11, Cor a 12, Cor a 13, Cor a

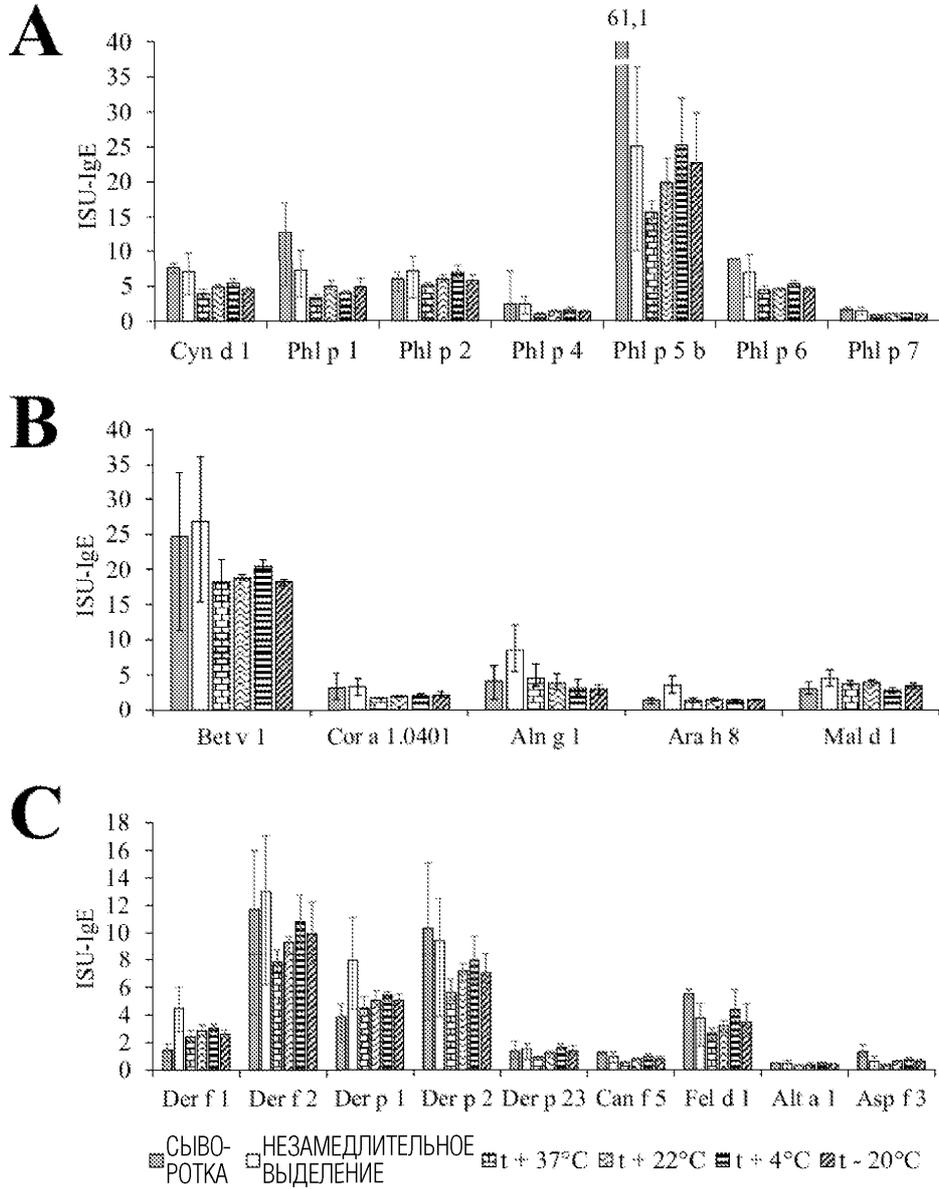
14, Cry j 1, Cry j 2, Cry j 3, Cry j 4, Cyn d 1, Cup 1, Cup 2, Cup 3, Cup 4, Cup s 1, Cup s2, Cup s3, Cyn d , Cyn d 2, Cyn d 4, Cyn d 5, Cyn d 6, Cyn d 7, Cyn d 11, Cyn d 12, Cyn d 13, Cyn d 15, Cyn d 22, Cyn d 23, Cyn d 24, Cyp c 1, Dau c 1, Dau c 3, Dau c 4, Dau c 5, Der p 1, Der f 1, Der p 2, Der f 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 10, Der p 11, Der p 13, Der p 14, Der p 15, Der p 18, Der p 20, Der p 21, Der p 23, Clone 16, Der p 24, Der p 36, Der p 37, Lep d 2, Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4, Equ c 6, Equ c 8, Equ c 9, Equ c 10, Equ c 11, Fag e 1, Fag e 2, Fag e 3, Fag e 4, Fag e 5, Fag s 1, Fag s 2, Fag s 4, Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5, Fel d 6, Fel d 7, Fel d 8, Fra 1, Fra 3, Fra 4, Fra e 1, Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 9, Fra e 10, Fra e 11, Fra e 12, Gad c 1, Gad m 1, Gad m2, Gad m3, Gad m4, Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 4, Gal d 5, Gal d 6, Gal d 7, Gal d 8, Gal d 9, Gal d 10, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4, Gly m 5, Gly m 6, Gly m 7, Gly m 8, Hel 1, Hel 2, Hel 3, Hel 4, Hel 6, Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 6,01, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10, Hev b 11, Hev b 12, Hev b 13, Hev b 14, Hev b 15, Hom 1, Hom 3, Hom 4, Hom 6, Hum j 1, Hum j 2, Hum j 3, Jug n 1, Jug n 2, Jug n 4, Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Jug r 4, Jug r 5, Jug r 6, Jug r 7, Jug r 8, Jun 1, Jun 2, Jun 3, Len c 1, Len c 2, Len c 3, Lep d 2, Lep d 3, Lep d 5, Lep d 7, Lep d 8, Lep d 10, Lep d 12, Lep d 13, Lep d 33, Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4, Mala s 1, Mala s 4, Mala s 5, Mala s 6, Mala s 7, Mala s 8, Mala s 9, Mala s 10, Mala s 11, Mala s 12, Mala s 13, Mer 1, Mus m 1, Mus m 2, Mus m 4, Mus m 7, MUXF3, Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 4, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10, Ole e 11, Ole e 12, Ole e 13, Ole e 14, Ole e 15, Ory c 1, Ory c 3, Ory c 4, Ory c 6, Ory c 8, Ory s 1, Ory s 2, Ory s 3, Ory s 7, Ory s 11, Ory s 12, Ory s 13, Ory s 14, Par j 1, Par j 2, Par j 3, Par j 4, Pen c 1, Pen c2, Pen c3, Pen c6, Pen c 13, Pen c 18, Pen c 19, Pen c22, Pen c24, Pen c30, Pen c32, Pen m 1, Pen m 2, Pen m 3, Pen m 4, Pen m 6, Pen m 8, Per 1, Per 2, Per 3, Per 4, Per 5, Per 6, Per 7, Per 8, Per 9, Per a 10, Per a 11, Per a 12, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 3, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12, Phl p 13, Pis s 1, Pis s 2, Pis s 3, Pis s 5, Pis s 6, Pis v 3, Pla 1, Pla 2, Pla 3, Pla 8, Pla 1 1, Pol d 5, Pru av 1, Pru av 2, Pru av 3, Pru av 4, Pru du 1, Pru du 2, Pru du 3, Pru du 4, Pru du 5, Pru du 6, Pru du 6.01, Pru du 6.02, Pru p 1, Pru p 2, Pru p 3, Pru p 4, Pru p 7, Que 1, Que 2, Que 4, Rat n 1, Rat n 4, Rat n 7, Rat n 8, Sal k 1, Sal k 2, Sal k 3, Sal k 4, Sal k 5, Sal k 6, Sal k 7, Ses i 1, Ses i 2, Ses i 3, Ses i 4, Ses i 5, Ses i 6, Ses i 7, Ses i 8, Sin 1, Sin 2, Sin 3, Sin 4, Sol i 1, Sol i 2, Sol i 3, Sol i 4, Sola l 1, Sola l 2, Sola l 3, Sola l 4, Sola l 5, Sola l 6, Sola l 7, Sola t 1, Sola t 2, Sola t 3, Sola t 4, Sola t 8, Tri 1, Tri 2, Tri 3, Tri 4, Tri 5, Tri 7, Tri a 12, Tri a 13, Tri a 14, Tri a 15, Tri a 17, Tri a 18, Tri a 19, Tri a 19.0101, Tri a 20, Tri a 21, Tri a 25, Tri a 26, Tri a 27, Tri a 28, Tri a 29, Tri a 30, Tri a 31, Tri a 32, Tri a 33, Tri a 34, Tri a 35, Tri a 36, Tri a 37, Tri a 39, Tri a 40, Tri a 41, Tri a 42, Tri a 43, Tri a 44, Tri a 45, Tri а глиадина, Tri а аА_ТI, Tri а 191_369, Tri а 36, m43, m82, 10/серина, 37/Thiore, 38/GTT, 112/1-Cys, 126/Dehy, пуро-тионина, Ves v 1, Ves v 2, Ves v 3, Ves v 5, Ves v 6, Zea m 1, Zea m 2, Zea m 3, Zea m 4, Zea m 5, Zea m 6, Zea m 7, Zea m 8, Zea m 11, Zea m 12, Zea m 13, Zea m 14, Zea m 22, Zea m 25, Zea m 32, бета-амилазы, авенина и GG1, предпочтительно, из группы, состоящей из Alpha Gal, Act d 1, Act d 2, Act d 5, Act d 8, Aln g 1, Alt 1, Alt 6, Amb 1, Amb 4, Amb 5, Amb 6, Amb 9, Amb a 10, Ana o 1, Ana o 2, Ana o 3, Ani s 1, Ani s 3, Api g 1, Api m 1, Api m 2, Api m 4, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8, Ara h 9, Art v 1, Art v 3, Asp f 1, Asp f 3, Asp f 6, Ber e 1, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 5, Bla g 7, Blo t 5, Bos d 4, Bos d 5, Bos d Lf, Bos d 8, aS1, aS2, b-казеина, k-казеина, трансферрина, BSA, Bos d 6, Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6, Che 1, Cla h 8, Cor 1.0401, Cor 8, Cor 9, Cor a 14, Cry j 1, Cyn d 1, Cup 1, Der p 1, Der f 1, Der p 2, Der f 2, Der p 4, Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 15, Der p 18, Der p 21, Der p 23, Clone 16, Lep d 2, Equ c 1, Equ c 3, Fag e 2, Fel d 1, Fel d 2, Fel d 4, Gad c 1, Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 5, Gly m 4, Gly m 5, Gly m 6, Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6,01, Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Mal d 1, Mer 1, Mus m 1, MUXF3, Ole e 1, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10, Par j 2, Pen m 1, Pen m 2, Pen m 4, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5b, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12, Pis v 3, Pla 1, Pla 2, Pla 3, Pla 1 1, Pol d 5, Pru du 3, Pru du 4, Pru du 6, Pru du 6.01, Pru du 6.02, Pru p 1, Pru p 3, Sal k 1, Ses i 1, Tri a 14, Tri a 19.0101, Tri а аА_ТI, Tri а 191_369, Tri а 36, m43, m82, 10/серина, 37/Thiore, 38/GTT, 112/1-Cys, 126/Dehy, пуро-тионина, Ves v 1, Ves v 5, бета-амилазы, авенина и GG1.



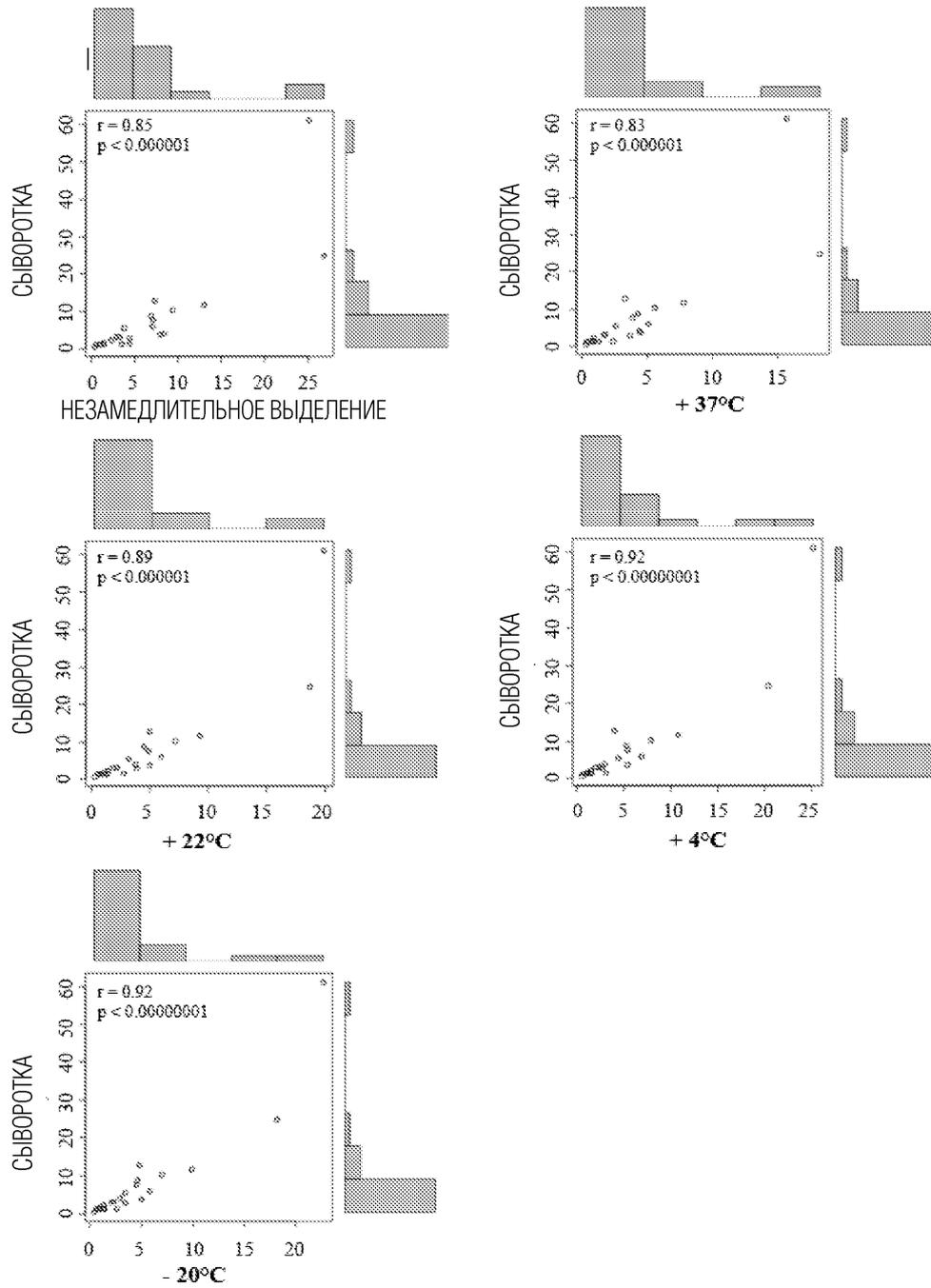
Фиг. 1А



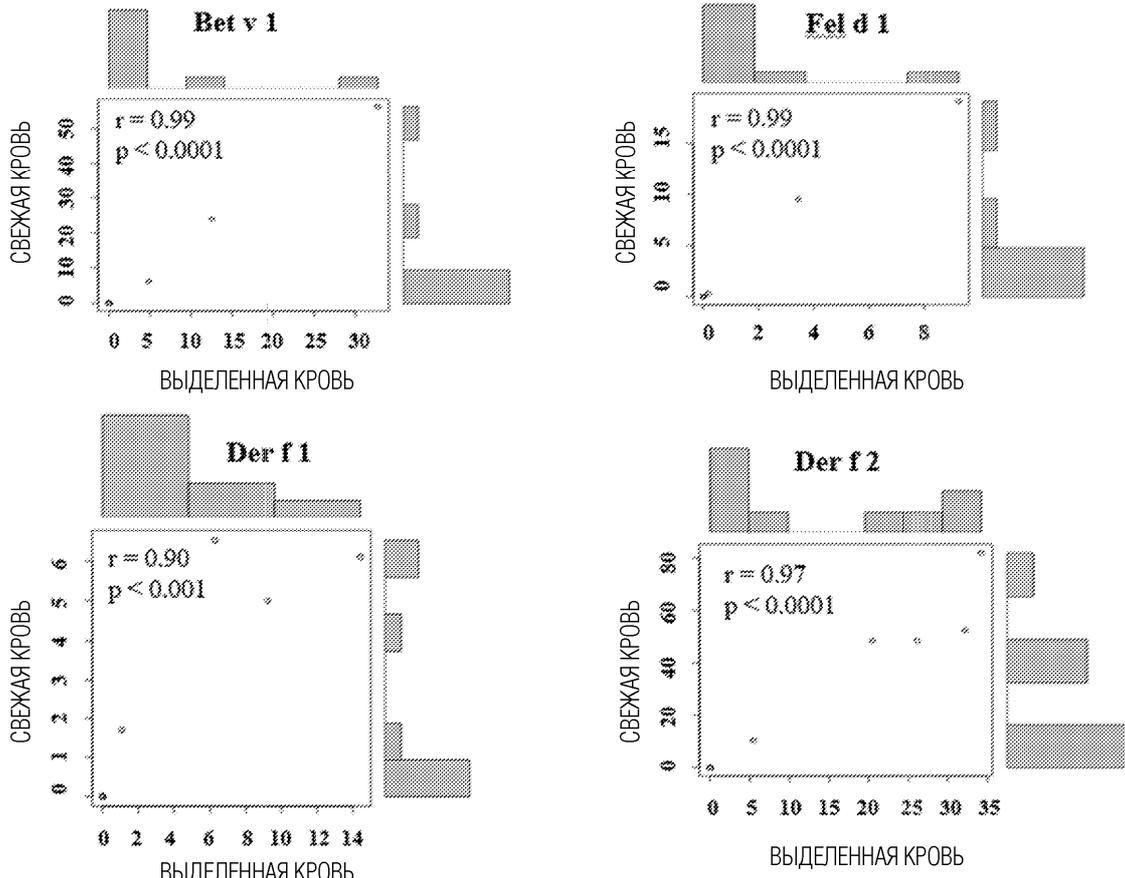
Фиг. 1В



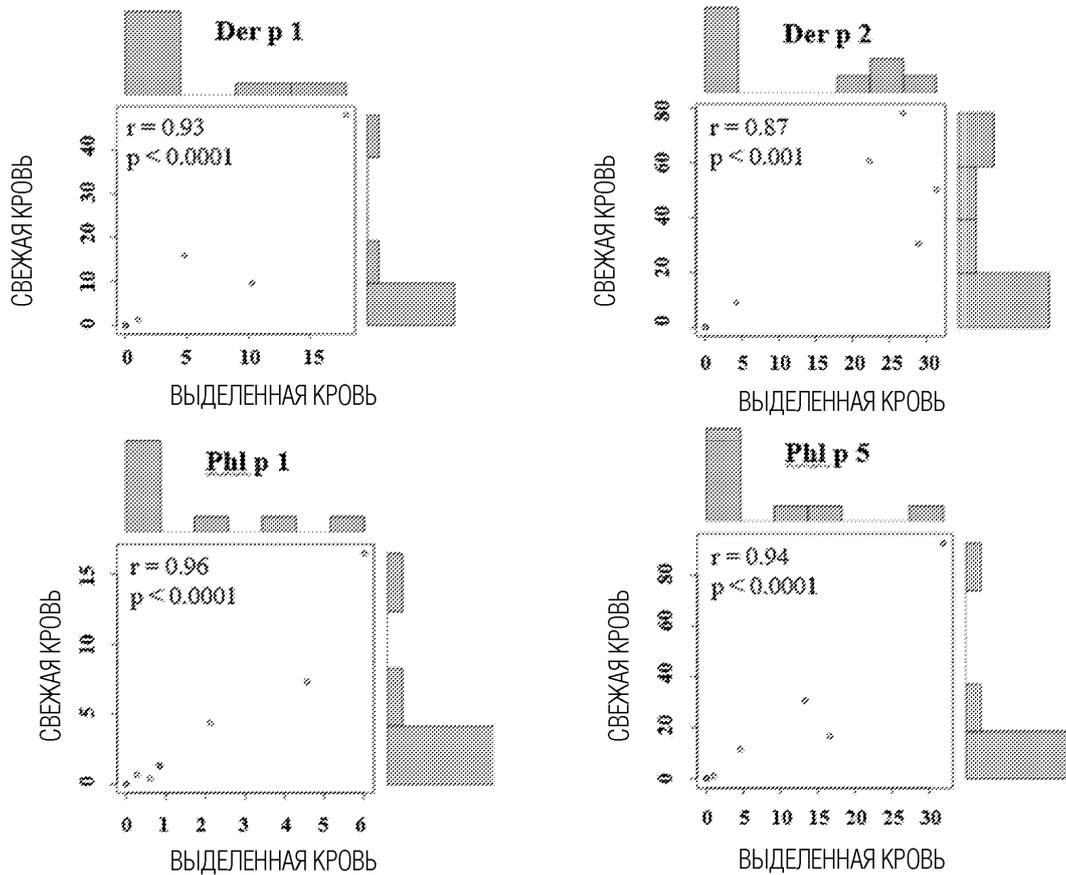
Фиг. 2



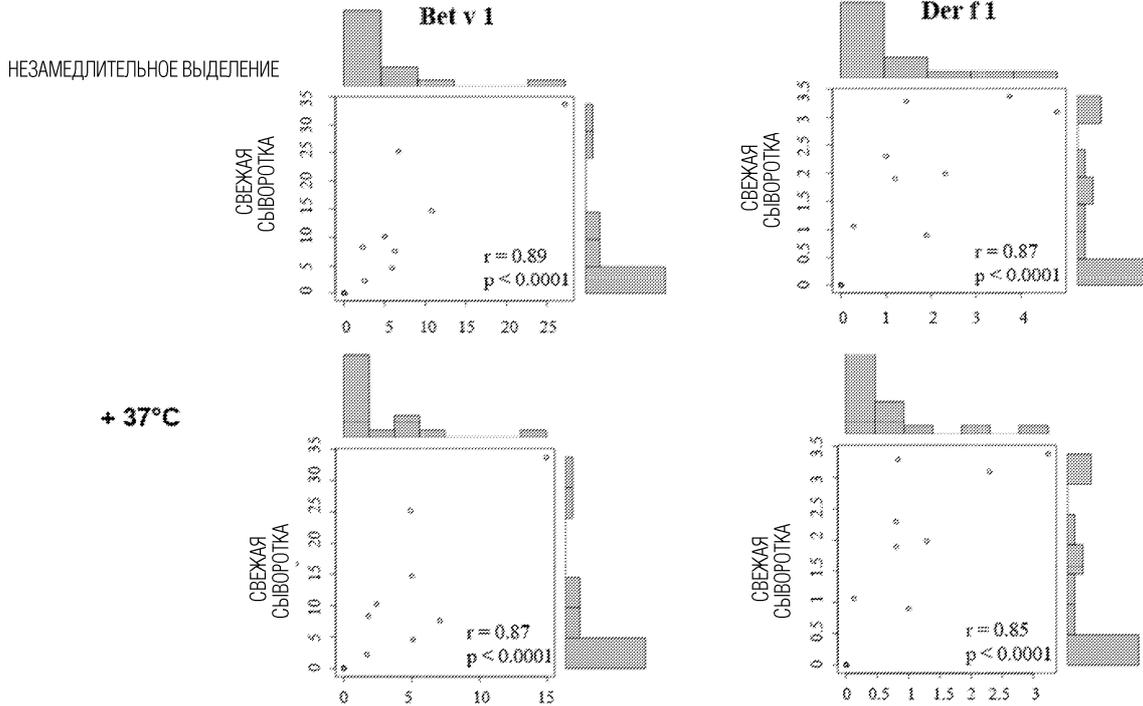
Фиг. 3



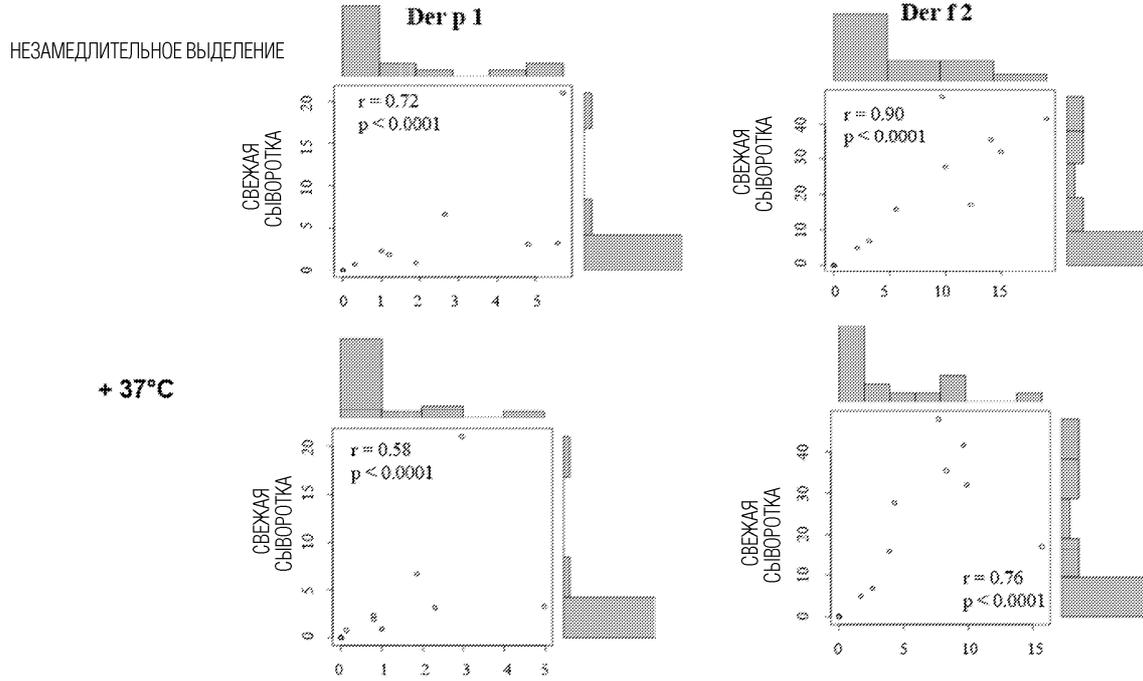
Фиг. 4А



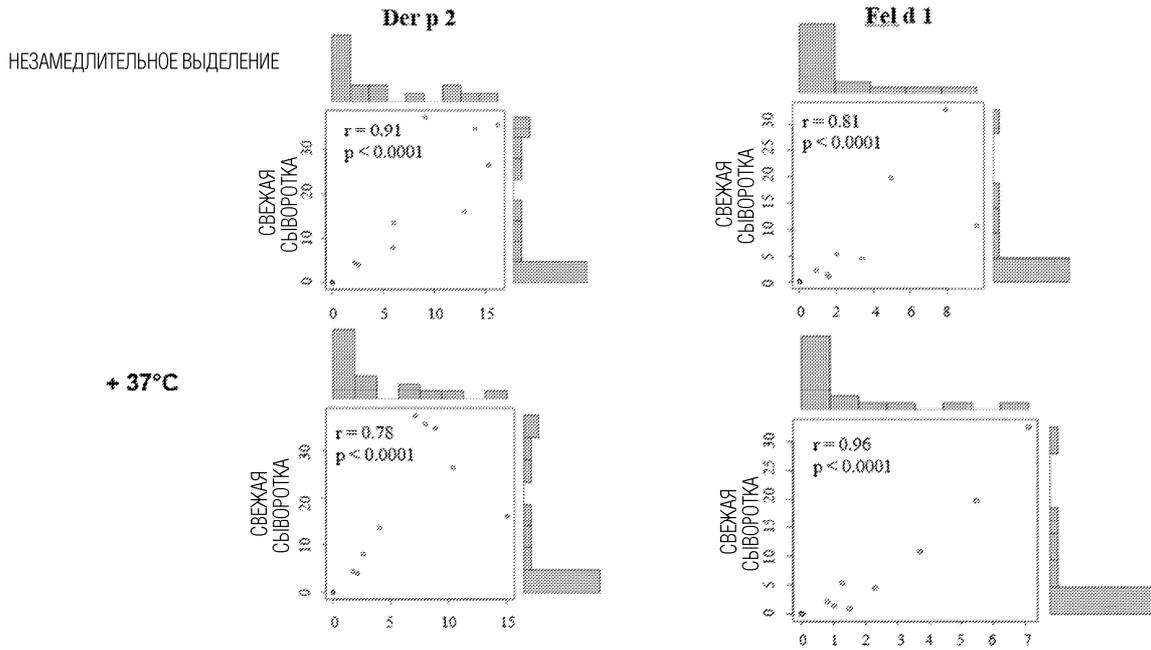
Фиг. 4В



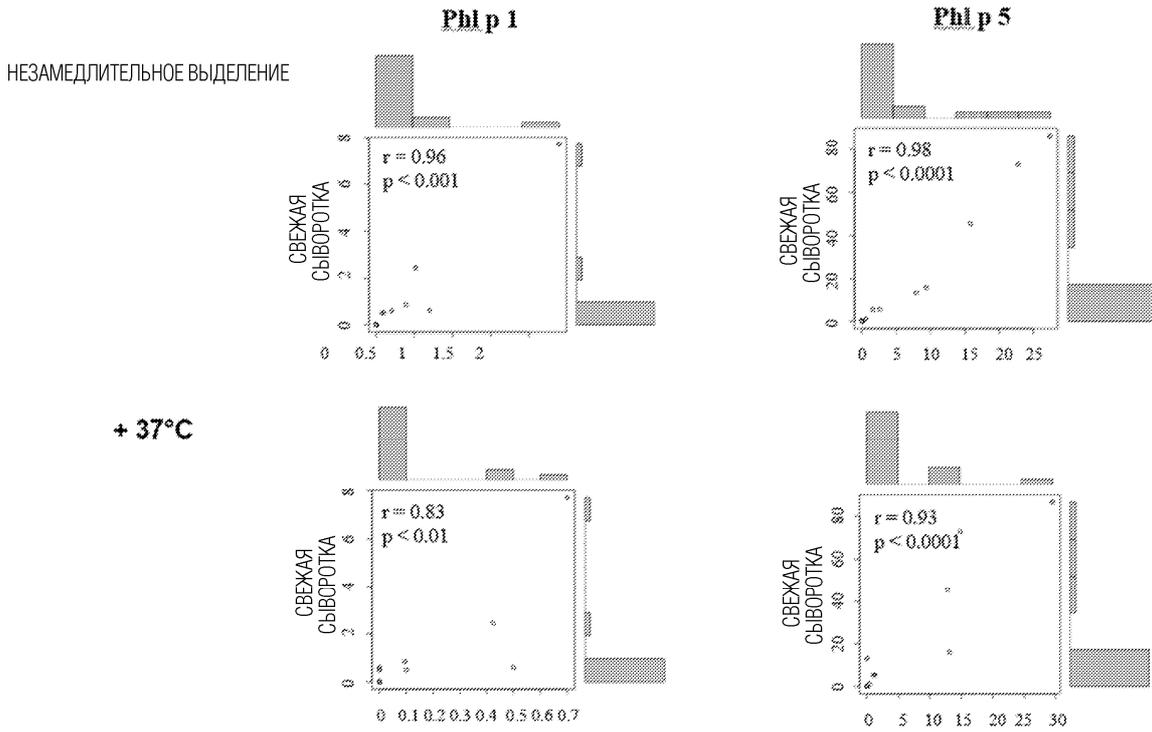
Фиг. 5



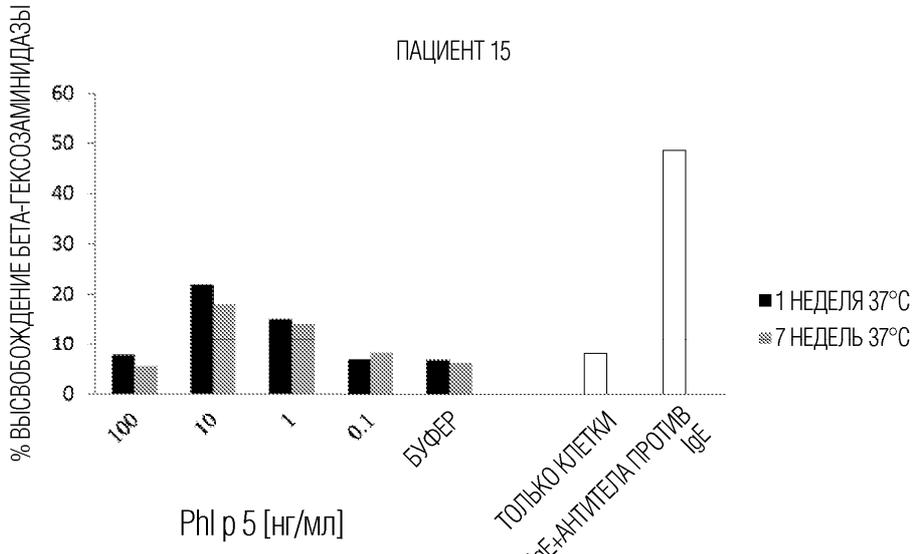
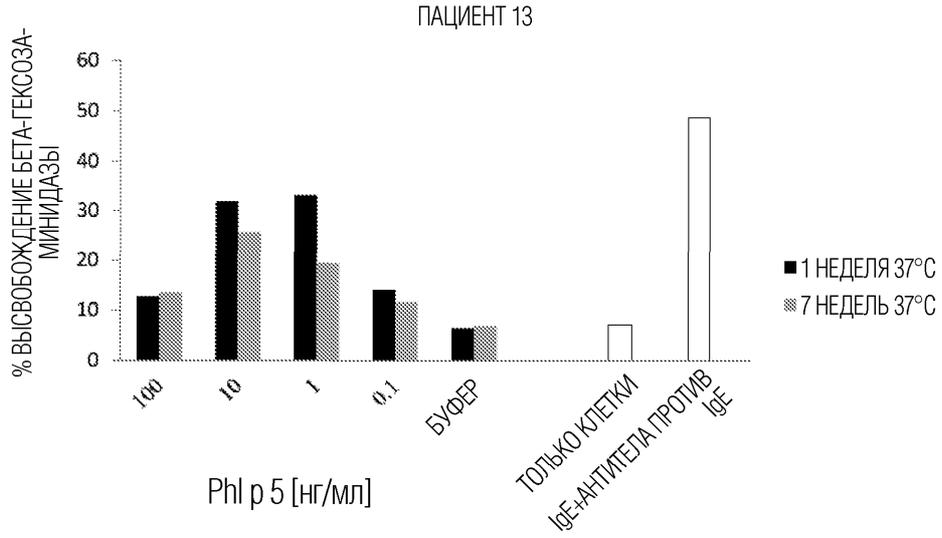
Фиг. 5 (продолжение)



Фиг. 5 (продолжение)



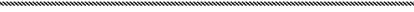
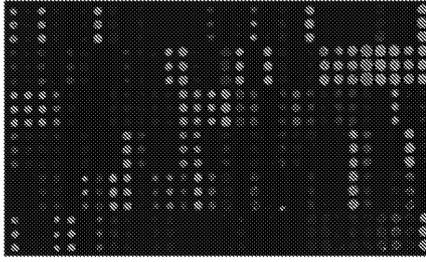
Фиг. 5 (продолжение)



Фиг. 6

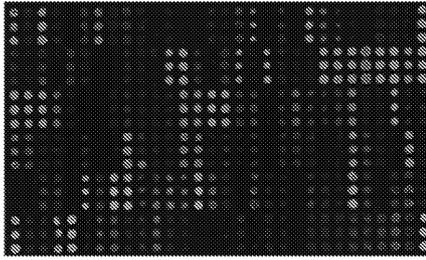
Свежая сыворотка

A

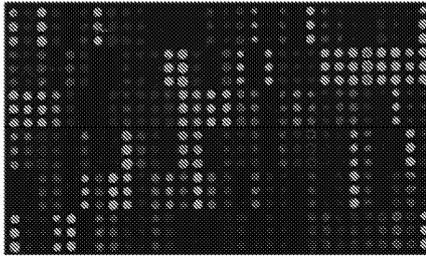


Выделенные образцы

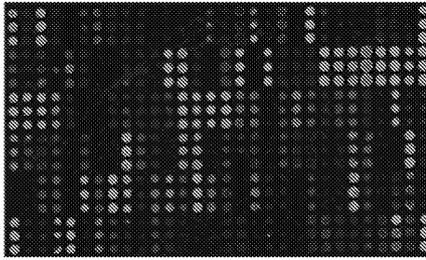
B



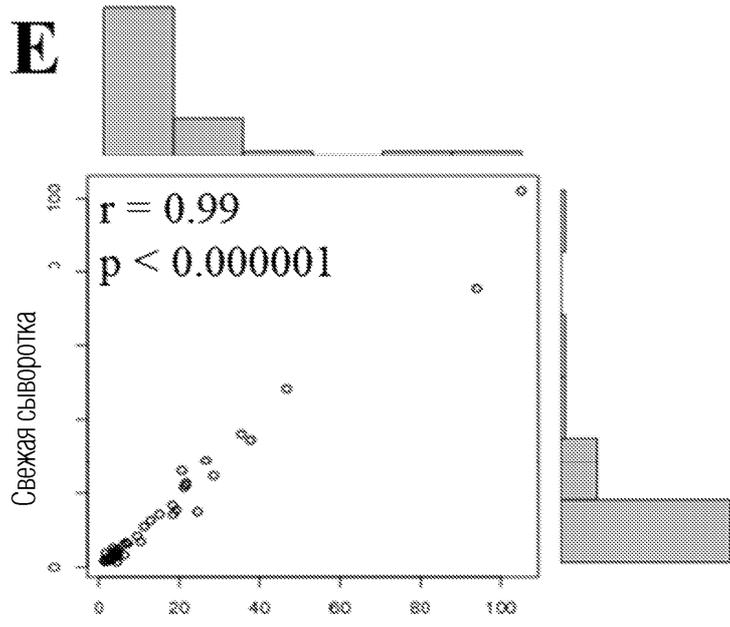
C



D



Фиг. 7



Фиг. 7 (продолжение)

