А. Є. Богомолов, С. В. Зайков

ВИЗНАЧЕННЯ СЕНСИБІЛІЗАЦІЇ ДО ПИЛКОВИХ АЛЕРГЕНІВ БЕРЕЗИ ТА ВІЛЬХИ У ХВОРИХ НА РЕСПІРАТОРНІ АЛЕРГІЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОБЛОТУ ТА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО КОМПОНЕНТНОГО ТЕСТУВАННЯ

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова
Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К ПЫЛЬЦЕВЫМ АЛЛЕРГЕНАМ БЕРЕЗЫ И ОЛЬХИ У БОЛЬНЫХ РЕСПИРАТОРНЫМИ АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОБЛОТА И МУЛЬТИПЛЕКСНОГО КОМПОНЕНТНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

А. Е. Богомолов, С. В. Зайков

Резюме

Цель исследования — оценить диагностические параметры метода иммуноблота по сравнению с методом Immunocap ISAC для определения сенсибилизации к аллергенам березы и ольхи у пациентов с респираторными аллергическими заболеваниями — аллергическим ринитом и бронхиальной астмой.

Материалы и методы. Двумя различными методами специфической аллергологической диагностики (in vitro) было обследовано 40 пациентов с бронхиальной астмой и/или аллергическим ринитом. Количественное определение специфических IgE в сыворотке крови проводили с помощью метода иммуноблота «RIDA® AllergyScreen» (R-Biopharm AG, Германия) на базе лаборатории ООО «Аллергоиммунологический центр КПП». Обследование методом Immunocap ISAC было выполнено в «Клинике аллергологии и иммунологии "Форпост"».

Результаты и обсуждение. Среди обследованных сенсибилизация к аллергену березы составила 80,0 % (32 чел.) при наличии специфических IgE методом Rida AllergyScreen, 77,5 % (31 чел.) при наличии специфических IgE методом ImmunoCAP ISAC; сенсибилизация к аллергену ольхи составила 40,0 % (16 чел.) при наличии специфических IgE методом Rida AllergyScreen, 42,5 % (17 чел.) при наличии специфических IgE методом ImmunoCAP ISAC.

В качестве метода количественного определения специфических IgE к аллергену березы иммуноблот по сравнению с Immunocap ISAC имеет высокую чувствительность и прогнозируемость положительного результата (96,77 % и 93,75 % соответственно), однако специфичность и прогнозируемость отрицательного результата составляет 77,78 % (95 % ДИ: 39,99; 97,19) и 87,50 % (95 % ДИ: 49,66; 98,03), соответственно, а точность метода — 92,5 % (95 % ДИ: 79,61 ; 98,43).

В качестве метода количественного определения специфических IgE к аллергену ольхи иммуноблот по сравнению с Immunocap ISAC имеет высокую специфичность и прогнозируемость положительного результата (95,65 % и 93,75 %), однако чувствительность и прогнозируемость отрицательного результата имеют значение 88,24 % (95 % ДИ: 63,56; 98,54) и 91,67 % (95 % ДИ: 74,90; 97,59), соответственно, а точность метода составляет 92,50 % (95 % ДИ: 79,61; 98 , 43).

Ключевые слова: аллергия, иммуноблотинг, IgE, молекулярная аллергология.

Укр. пульмонол. журнал. 2020, № 1. С. 15–18.

DETERMINATION OF SENSITIZATION TO POLLEN ALLERGENS OF BIRCH AND ALDER IN PATIENTS WITH RESPIRATORY ALLERGIC DISEASES USING IMMUNOBLOT AND MULTIPLEX COMPONENT TESTING

A. E. Bogomolov, S. V. Zaykov

Abstract

The purpose of our study was to evaluate the diagnostic parameters of immunoblot and Immunocap ISAC methods to determine birch and alder allergy sensitization in patients with respiratory allergic diseases - allergic rhinitis and bronchial asthma.

Materials and methods. 40 patients with bronchial asthma and / or allergic rhinitis were examined using two different methods of specific allergic diagnosis (in vitro). Quantitative determination of specific IgE in the serum was performed using the RIDA® AllergyScreen immunoblot method (R-Biopharm AG, Germany) on the basis of the private laboratory of LLC Allergy-Immunological Center PPC. Immunocap ISAC testing was performed at ««Forpost» Allergy and Immunology Clinic».

Results and discussion. Among study subjects, birch allergen sensitization was 80.0 % (32 individuals) with the presence of specific IgE by the Rida AllergyScreen method, 77.5 % (31 persons) with the presence of specific IgE by the ImmunoCAP ISAC method; allergy sensitization to alder was 40.0 % (16 people) in the presence of specific IgE by the Rida AllergyScreen method, 42.5 % (17 persons) in the presence of specific IgE by the ImmunoCAP ISAC method.

As a method for quantifying the specific IgE to birch allergen, immunoblot compared to Immunocap ISAC has a high sensitivity and prognosis of a positive result (96.77 % and 93.75 %, respectively), but the specificity and prognosis of a negative result are 77.78 % (95 % CI: 39.99; 97.19) and 87.50% (95 % CI: 49.66; 98.03), respectively, and the accuracy of the method is 92.5 % (95 % CI: 79.61 98.43).

As a method for quantifying the specific IgE of alder allergen, immunoblot compared to Immunocap ISAC has a high specificity and predictability of a positive result (95.65 % and 93.75%), however, the sensitivity and predictability of a negative result are 88.24 % (95 % CI: 63.56; 98.54) and 91.67 % (95 % CI: 74.90; 97.59), respectively, and the accuracy of the method is 92.50 % (95 % CI: 79.61; 98 , 43).

Key words: allergy, immunoblotting, IgE, molecular allergology.

Ukr. Pulmonol. J. 2020; 1:15–18.

Богомолов Артемій Євгенійович
Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова
Кафедра фтизіатрії з курсом клінічної імунології
Кандидат мед. наук, доцент
21018, Україна, Вінниця, вул. Пирогова, 56
Тел.: +380970663555, art.bogomolov@gmail.com

Artemii Ye. Bogomolov
National Pirogov memorial medical university
Phthisiology, clinical immunology and allergy department
Associate professor, PhD
56, Pirogova str., 21000, Vinnytsya, Ukraine,
Tel.: +38 097 066355, art.bogomolov@gmail.com

Специфічна діагностика респіраторних алергічних захворювань є безумовним базисом сучасної алергології, адже дозволяє не тільки адекватно провести освіту пацієнта з метою елімінації причинного алергену, а й провести хворим алерген-специфічну імунотерапію [1–4].

Поряд з тим, різноманіття сучасних діагностичних методів не завжди дає лікарю правильне уявлення щодо послідовності їх застосування, переваги і недоліки кожного з них. Безумовним «золотим стандартом» діагностики в усьому світі є шкірне тестування методом прик-тесту [5, 6]. Втім, існує ряд факторів, які обмежують використан-

© Богомолов А. Є. , Зайков С. В., 2020
www.search.crossref.org
DOI: 10.31215/2306-4927-2020-107-1-15-18

ня шкірного тестування – вік пацієнта (діти до 5 років та люди похилого віку), прийом протиалергічних препаратів, можливість виникнення анафілаксії тощо.

В якості другого етапу діагностики часто застосовуються серологічні методи — імуноферментний аналіз, імуноблотінг, тест активації базофілів, молекулярний компонентний аналіз. Вони дозволяють отримати результат з невеликої кількості плазми, не залежать від супутнього прийому препаратів, проте результат не показує безпосередню чутливість пацієнта до алергенів [7, 8].

Метою нашого дослідження було оцінити діагностичні параметри метода імуноблоту в порівнянні з методом Immunocap ISAC для визначення сенсибілізації до алергенів берези та вільхи у пацієнтів з респіраторними алергічними захворюваннями — алергічним ринітом та бронхіальною астмою.

Матеріали та методи

У процесі цього дослідження двома різними методами специфічної алергологічної діагностики (in vitro) було обстежено 40 пацієнтів, хворих на бронхіальну астму та / або алергічний риніт. Всі пацієнти, що ввійшли в групу спостереження, пройшли співбесіду та підписали лист поінформованої згоди на участь у дослідженні. Всі жінки були опитані на предмет можливої вагітності.

Кількісне визначення специфічних IgE в сироватці крові проводили за допомогою методу імуноблоту «RIDA® AllergyScreen» (R-Biopharm AG, Німеччина) на базі приватної лабораторії ТОВ «Алерго-імунологічний центр КПП».

Тест RIDA® AllergyScreen (панелі 1, 2, 3, 4) заснований на принципі імуноблотінга. Специфічні алергени, відповідні за складом панелі, нанесені на поверхню нітроцелюлозних мембран (стрипів). IgE-антитіла, специфічні до цих алергенів, присутні у зразках крові пацієнтів, реагують з антигенами, забезпечуючи тим самим на другій стадії інкубації прикріплення антитіл до IgE людини, кон'югованих з біотином (що проявляють антитіла), до смуг алергенів на стрипах. Для обстеження нами було використано панель 2 (респіраторну), яка містила наступні алергени: домашній пил (кліщ Derm. pteronyssinus, Derm. farinae), вільха, береза, ліщина, дуб, суміш трав, жито, полин, подорожник, епідермальний алерген кішки, коня, собаки, морської свинки, хомяка, кролик, Alternaria alternata, Penicillium notatum, Cladospor. herbarum, Aspergillus fumigatus.

У відповідності до існуючих критеріїв результати інтерпретувались в залежності від концентрації специфічного IgE як клас 0–6. Клас ≥1 інтерпретували як позитивний. У клінічній практиці алергени з результатами, більшими, ніж у 2 класу (sIgE ≥ 0,7 Ku / l), вважалися позитивними. Після отримання результатів всі дані було конвертовано у номінальні шкали.

Алергочіп ImmunoCAP (*Phadia* AB, Thermo Fisher Scientific, *Швеція)* - метод кількісного вимірювання рівня IgE-антитіл до різних алергенів в сироватці крові, розроблений компанією Phadia (Фадіа), обстеження методом Immunocap ISAC було виконане у «Клініці алергології та імунології «Форпост»». Метод дозволяє одномоментно визначити наявність антитіл класу Е до 112 алергокомпонентів з 51 джерела алергенів - продукти харчування, пилок, епідермальні алергени тварин, алергени цвілевих грибів і комах, кліщі домашнього пилу на імунному твердофазному аллергочіпі (ISAC). Після отримання результатів всі дані також було конвертовано у номінальні шкали.

Статистична обробка результатів, побудова діаграм та розподілів значень статистичного аналізу була виконана за допомогою програмного пакету IBM SPSS Statistics 21.

Результати дослідження

У основну фазу дослідження було відібрано 40 осіб віком 19–42 роки, середній вік групи склав 31,6 роки (95 % ДІ: 26,6; 41,6), гендерний розподіл – 60,0 % чоловіків та 40,0 % жінок.

Серед обстежених, сенсибілізація до алергену *берези* склала 80,0 % (32 особи) за наявності специфічних IgE методом Rida AllergyScreen, 77,5 % (31 особи) за наявності специфічних IgE методом ImmunoCAP ISAC; сенсибілізація до алергену *вільхи* склала 40,0 % (16 осіб) за наявності специфічних IgE методом Rida AllergyScreen, 42,5 % (17 осіб) за наявності специфічних IgE методом ImmunoCAP ISAC.

У табл. 1 наведені результати побудови таблиці спорідненості результатів визначення специфічних IgE до берези.

Таблиця 1

Зведена таблиця спорідненості результатів визначення специфічних IgE до берези

Частота		ISAC		Разом
		«негативно»	«позитивно»	
AllergyScreen	«негативно»	7	1	8
	«позитивно»	2	30	32
Разом		9	31	40

У табл. 2 наведені результати побудови таблиці спорідненості результатів визначення специфічних IgE до вільхи.

Таблиця 2

Зведена таблиця спорідненості результатів визначення специфічних IgE до алергену вільхи

Частота		ISAC		Разом
		«негативно»	«позитивно»	
AllergyScreen	«негативно»	22	2	24
	«позитивно»	1	15	16
Разом		23	17	40

Оскільки у випадку визначення сенсибілізації до алергену берези двома різними методами очікувана частота ознаки у одній з клітинок (25 %) зведених таблиць нижче 5, нами було застосовано для аналізу взаємозв'язку метод вирахування точного двостороннього критерію Фішера. В результаті статистичної обробки даних визначено, що абсолютне значення точного двостороннього критерію Фішера за алергеном *берези* відповідає двосторонній асимптотичній значимості 0,001, що відхиляє нульову гіпотезу.

Оскільки у випадку визначення сенсибілізації до алергену вільхи двома різними методами очікувана частота ознаки у жодній з клітинок зведених таблиць нижче 5, нами було застосовано для аналізу взаємозв'язку метод вирахування хі-квадрату Пірсона. В результаті статистичної обробки даних визначено, що абсолютне значення критерію хі-квадрат за алергеном *вільхи* склало 28,662, що відповідає двосторонній асимптотичній значимості 0,001. При таких рівнях асимптотичної значимості різниці між групами вимірювань нульова гіпотеза відхиляється, а, отже, знайдено статистично достовірну різницю між методами обстеження для визначення специфічних IgE до обох алергенів.

Для повноцінного аналізу діагностичних параметрів методів нами було проведено розрахунок чутливості, специфічності, точності, прогностичності позитивного та негативного результатів імуноблоту по відношенню до ImmunoCap ISAC. Результати вказаних параметрів для алергену берези наведено в табл.3.

Таблиця 3

Параметри діагностичної цінності імуноблоту в порівнянні з Immunocap ISAC для визначення специфічних IgE до аллергену берези

Параметр	Значення	95 % ДІ
Чутливість	96,77 %	83,30–99,92 %
Специфічність	77,78 %	39.99–97,19 %
Прогностичність позитивного результату	93,75 %	81,52–98,08 %
Прогностичність негативного результату	87,50 %	49,66–98,03 %
Точність	92,50 %	79,61–98,43 %

Як ми бачимо, імуноблот в порівнянні з ISAC має високу чутливість та прогностичність позитивного результату (96,77 % та 93,75 %, відповідно), проте специфічність та прогностичність негативного результату мають значення 77,78 % (95 % ДІ: 39,99; 97,19) та 87,50 % (95 % ДІ: 49,66; 98,03), відповідно, а точність методу складає 92,5 % (95 % ДІ: 79,61; 98,43).

Чутливість — це здатність діагностичного методу давати правильний результат, який визначається як частка істинно позитивних результатів серед всіх проведених тестів. Специфічність — це здатність діагностичного методу не давати при відсутності захворювання хибнопозитивних результатів, що визначається як частка істинно негативних результатів серед здорових осіб в групі досліджуваних. Отже, метод імуноблотінгу для визначення специфічних IgE до аллергену берези в порівнянні з Immunocap ISAC є високо чутливим, проте володіє не надто високою специфічністю (77,78 %). Окремо слід звернути увагу на прогностичність негативного результату, яка визначається, як відсоток істинно негативних тестів серед всіх негативних тестів, отриманих в результаті обстеження. В цьому випадку вона склала 87,50 %, що говорить про можливість хибнонегативного результату в кожному десятому випадку.

Результати вказаних параметрів для алергену вільхи наведено в табл. 4.

Таблиця 4

Параметри діагностичної цінності імуноблоту в порівнянні з Immunocap ISAC для визначення специфічних IgE до аллергену вільхи

Параметр	Значення	95 % ДІ
Чутливість	88,24 %	63,56–98,54 %
Специфічність	95,65 %	78,05–99,89 %
Прогностичність позитивного результату	93,75 %	68,64–99,04 %
Прогностичність негативного результату	91,67 %	74,90–97,59 %
Точність	92,50 %	79,6–98,43 %

Як ми бачимо, імуноблот в порівнянні з ISAC має високу специфічність та прогностичність позитивного результату (95,65 % та 93,75 %), проте чутливість та прогностичність негативного результату мають значення 88,24 % (95 % ДІ: 63,56; 98,54) та 91,67 % (95 % ДІ: 74,90; 97,59), відповідно, а точність методу складає 92,50 % (95 % ДІ: 79,61; 98,43).

Отже, метод імуноблотінгу для визначення специфічних IgE до аллергену вільхи в порівнянні з Immunocap ISAC є високо специфічним і високо чутливим. Окремо слід звернути увагу на прогностичність негативного результату, яка визначається, як відсоток істинно негативних тестів серед всіх негативних тестів, отриманих в результаті обстеження. В цьому випадку вона склала 88,24 %, що говорить про істотну можливість хибно негативного результату.

Обговорення результатів

Чим вище чутливість тесту, тим частіше з його допомогою буде виявлятися захворювання, тим, отже, він більш ефективний. У той же час, якщо такий високочутливий тест виявляється негативним, то наявність захворювання малоймовірна. Тому їх слід застосовувати для виключення захворювань. У силу цього високочутливі методи нерідко називають *ідентифікаторами*, їх рекомендується застосовувати на ранніх етапах діагностичного процесу, коли потрібно звузити коло передбачуваних захворювань. З іншого боку, чим вище специфічність методу, тим надійніше з його допомогою підтверджується захворювання, і тим, він більш ефективний. Високоспецифічні методи називаються в діагностиці *дискримінаторами*. Такі дослідження ефективні на другому етапі діагностики, коли коло передбачуваних захворювань звужене і необхідно з великою впевненістю довести наявність хвороби.

Отримані результати аналізу показали високу чутливість та помірну специфічність імуноблоту в порівнянні з ISAC для алергену берези, високу специфічність та помірну чутливість імуноблоту в порівнянні з ISAC для алергену вільхи.

На нашу думку, причини подібних розбіжностей можуть бути пов'язані з рядом факторів. Основним є той факт, що підвищення чутливості тесту неминуче супроводжується втратою його специфічності і навпаки, підвищення специфічності пов'язане зі зниженням його чутливості. Методики діагностики з високою чутливістю рідко «пропускають» пацієнтів, у яких є хвороба, а методики з високою специфічністю не відносять

здорових до категорії хворих. З іншого боку, знижена чутливість методу може бути напряму пов'язана з самою технікою оцінки імуноблотінгу, адже фотометричний аналіз на практиці залежить від багатьох факторів – якості сканування, правильно виконаних процедур підготовки, наявності чи відсутності калібрування тощо.

Прогностичність негативного результату визначається як частота його збігу з відсутністю захворювання. Цей критерій, таким чином, показує, наскільки велика ймовірність того, що пацієнт здоровий, якщо результати дослідження негативні. В нашому випадку знижений показник прогностичності негативного результату для методу імуноблоту, в цілому, напряму пов'язаний з чутливістю методу.

Висновки

1. В якості методу для кількісного визначення специфічних IgE до алергену берези імуноблот в порівнянні з Immunocap ISAC має високу чутливість та прогностичність позитивного результату (96,77 % та 93,75 %, відповідно), проте специфічність та прогностичність негативного результату мають значення 77,78 % (95 % ДІ: 39,99; 97,19) та 87,50 % (95 % ДІ: 49,66; 98,03), відповідно, а точність методу складає 92,5 % (95 % ДІ: 79,61; 98,43).

2. В якості методу для кількісного визначення специфічних IgE до алергену вільхи імуноблот в порівнянні з Immunocap ISAC має високу специфічність та прогностичність позитивного результату (95,65 % та 93,75 %), проте чутливість та прогностичність негативного результату мають значення 88,24 % (95 % ДІ: 63,56; 98,54) та 91,67 % (95 % ДІ: 74,90; 97,59), відповідно, а точність методу складає 92,50 % (95 % ДІ: 79,61; 98,43).

ЛІТЕРАТУРА

1. Dhami S, Kakourou A, Asamoah F, et al. Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. Allergy. 2017;72(12):1825–1848. doi:10.1111/all.13208
2. Klimek L, Pfaar O, Bousquet J, et al. Allergen immunotherapy in allergic rhinitis: current use and future trends. Expert Rev Clin Immunol. 2017;13(9):897–906. doi:10.1080/1744666X.2017.1333423
3. Pfaar O, Bonini S, Cardona V, et al. Perspectives in allergen immunotherapy: 2017 and beyond. Allergy. 2018;73(104):5–23. doi:10.1111/all.13355
4. Rael E. Allergen Immunotherapy. Prim Care. 2016;43(3):487–494. doi:10.1016/j.pop.2016.04.004
5. Frati F, Incorvaia C, Cavaliere C, et al. The skin prick test. J Biol Regul Homeost Agents. 2018;32(1):19–24.
6. Nevis IF, Binkley K, Kabali C. Diagnostic accuracy of skin-prick testing for allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis. Allergy Asthma Clin Immunol. 2016;12:20. Published 2016 Apr 27. doi:10.1186/s13223-016-0126-0
7. Sadok Y. *Diagnostic au laboratoire de lhypersensibilite immediate* (Diagnosis of type I hypersensitivity by laboratory test). *Tunis Med.* 2005;83(8):441–444.
8. Westwood M, Ramaekers B, Lang S, et al. ImmunoCAP® ISAC and Microtest for multiplex allergen testing in people with difficult to manage allergic disease: a systematic review and cost analysis. Health Technol Assess. 2016;20(67):1–178. doi:10.3310/hta20670

REFERENCES

1. Dhami S, Kakourou A, Asamoah F, et al. Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. Allergy. 2017;72(12):1825–1848. doi:10.1111/all.13208
2. Klimek L, Pfaar O, Bousquet J, et al. Allergen immunotherapy in allergic rhinitis: current use and future trends. Expert Rev Clin Immunol. 2017;13(9):897–906. doi:10.1080/1744666X.2017.1333423
3. Pfaar O, Bonini S, Cardona V, et al. Perspectives in allergen immunotherapy: 2017 and beyond. Allergy. 2018;73(104):5–23. doi:10.1111/all.13355
4. Rael E. Allergen Immunotherapy. Prim Care. 2016;43(3):487–494. doi:10.1016/j.pop.2016.04.004
5. Frati F, Incorvaia C, Cavaliere C, et al. The skin prick test. J Biol Regul Homeost Agents. 2018;32(1):19–24.
6. Nevis IF, Binkley K, Kabali C. Diagnostic accuracy of skin-prick testing for allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis. Allergy Asthma Clin Immunol. 2016;12:20. Published 2016 Apr 27. doi:10.1186/s13223-016-0126-0
7. Sadok Y. *Diagnostic au laboratoire de lhypersensibilite immediate* (Diagnosis of type I hypersensitivity by laboratory test). *Tunis Med.* 2005;83(8):441–444.
8. Westwood M, Ramaekers B, Lang S, et al. ImmunoCAP® ISAC and Microtest for multiplex allergen testing in people with difficult to manage allergic disease: a systematic review and cost analysis. Health Technol Assess. 2016;20(67):1–178. doi:10.3310/hta20670