

Определение расширенного профиля IgE-опосредованной сенсibilизации на основе технологии макроматрицы: новый метод персонифицированной медицины в диагностике аллергии

Персонифицированная медицина (ПМ) оказывает значительное влияние на диагностику и лечение аллергических заболеваний (АЗ) [1]. С момента своего появления диагностика *in vivo* и *in vitro* способствовала индивидуальному подходу к пациенту, в результате чего появился своего рода прототип ПМ [2, 3]. Специфический анализ для выявления иммуноглобулина Е (IgE) был разработан в 1960-е годы [4], но в начале 1990-х число молекулярных аллергенов, клонированных или полученных путем биохимической очистки [5], значительно улучшило качество диагностики АЗ.

Истинная сенсibilизация идентифицируется путем выявления IgE, специфичного для компонентов, ограниченных конкретным аллергеном. Перекрестная реакция определяется наличием иммунного ответа на перекрестно-реагирующие компоненты, такие как профилины и белки семейства PR-10 [6]. Кроме того, молекулярная аллергодиагностика (МАД) позволяет выявлять специфические IgE к потенциально опасным, таким как белки-транспортёры липидов (LTP), или к вероятно безопасным (либо минимально опасным) компонентам (профилины и полкальцины) [7]. Международные руководства [8] по-прежнему указывают на то, что история болезни, физикальное обследование и кожные прик-тесты составляют первый этап (первый уровень) диагностики АЗ в стратегии «сверху вниз». Специфический IgE-анализ, проведенный на экстрагированных (цельных) аллергенах, считается диагностическим показателем второго уровня, а МАД – диагностикой третьего уровня [7, 9]. Впрочем, некоторые авторы высказали предположение, что стратегия «снизу вверх» также может обладать преимуществами [10]. В данном контексте расширенный профиль IgE-опосредованной сенсibilизации, основанный на микроочиповой диагностике аллергенов (МДА), может быть чрезвычайно информативным. МДА была разработана в начале 2000-х [11], и в настоящее время исследование ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher) на основе 112 различных молекулярных компонентов (как экстрагированных, так и рекомбинантных) является наиболее изученным и наиболее часто используемым молекулярным диагностическим инструментом на основе микроочипа [12].

Недавно была разработана макроматрица, объединяющая диагностику второго и третьего уровней. Макроматрица содержит

157 экстрактов аллергенов и 125 молекулярных компонентов и, по-видимому, в настоящее время располагает наиболее широким набором аллергенов. Кроме того, в один тест входят основной IgE-анализ на экстракты аллергенов и оценка уровня IgE к соответствующим специфическим и перекрестно-реагирующим компонентам. Ингибирование перекрестно-реактивных углеводных детерминантов (Cross-reactive carbohydrate determinants, CCD) дополнительно улучшает специфичность IgE-анализа [13]. В настоящем исследовании проведен обзор расширенного анализа IgE-опосредованной сенсibilизации как перспективного инструмента для диагностики и лечения пациентов с АЗ в соответствии с современными принципами ПМ.

Методы

Многокомпонентный анализ ALEX был разработан компанией MacroArrayDX (Австрия). Макроматрица содержит 282 аллергена (157 экстрактов аллергенов и 125 молекулярных компонентов), большинство из них – представители групп ингаляционных, пищевых, латексных и инсектных аллергенов.

Для оценки профиля IgE с помощью нового анализа были изучены 43 образца сыворотки пациентов с АЗ. Размер выборки был рассчитан с учетом того, что в ходе предварительных анализов 12% тестируемых аллергенов, включая результаты с низкой оценкой, отличались при анализе с помощью ALEX и других методов, таких как специфический IgE для экстрактов или компонентов. Учитывая предварительные результаты с уровнем достоверности 95% и стандартной погрешностью 0,05, расчетный размер выборки составил 43 различные сыворотки. Из-за большого количества семейств аллергенов (круглогодичных

или сезонных ингаляционных аллергенов, пищевых и т. д.) и предполагаемой невозможности изучения всех семейств в рамках одного исследования были отобраны сыворотки с определенными характеристиками. В связи с этим использовались образцы, полученные у пациентов с реакционной способностью к травам (где имелось наибольшее количество молекулярных компонентов), и перекрестно-реагирующие компоненты, в частности PR-10, профилин и LTP [15]. Все сыворотки ранее были протестированы с помощью ImmunoCAP ISAC.

Результаты

Анализ сопоставимости в экстрактах ALEX. Этот анализ проводили с использованием сывороток пациентов, чтобы идентифицировать ситуации, когда положительные экстракты давали отрицательный результат по компонентам. Хорошая сопоставимость была обнаружена для таких аллергенов, как киви, ольха, амброзия, сельдерей, арахис, полынь, *Aspergillus fumigatus*, береза, орешник, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, собаки, кошки, треска, куриные яйца, яблоки, постенница, тимфеевка, персик и яблоня (рис. 1). Низкая сопоставимость наблюдалась для гевеи бразильской (Hevea b.), где экстракты были отрицательными, при этом у некоторых пациентов Hev b 8 (профилин) был положительным.

Сравнение с результатами ImmunoCAP ISAC. Было проведено два сравнения. Во-первых, сравнивали компоненты, присутствующие в обоих анализах (ISAC и ALEX) и представленные в необходимом количестве в когорте участников исследования. Во-вторых, сравнивали способность методов идентифицировать семейства аллергенов с общими компонентами. Показаны результаты однокомпонентных сравнений (рис. 2).

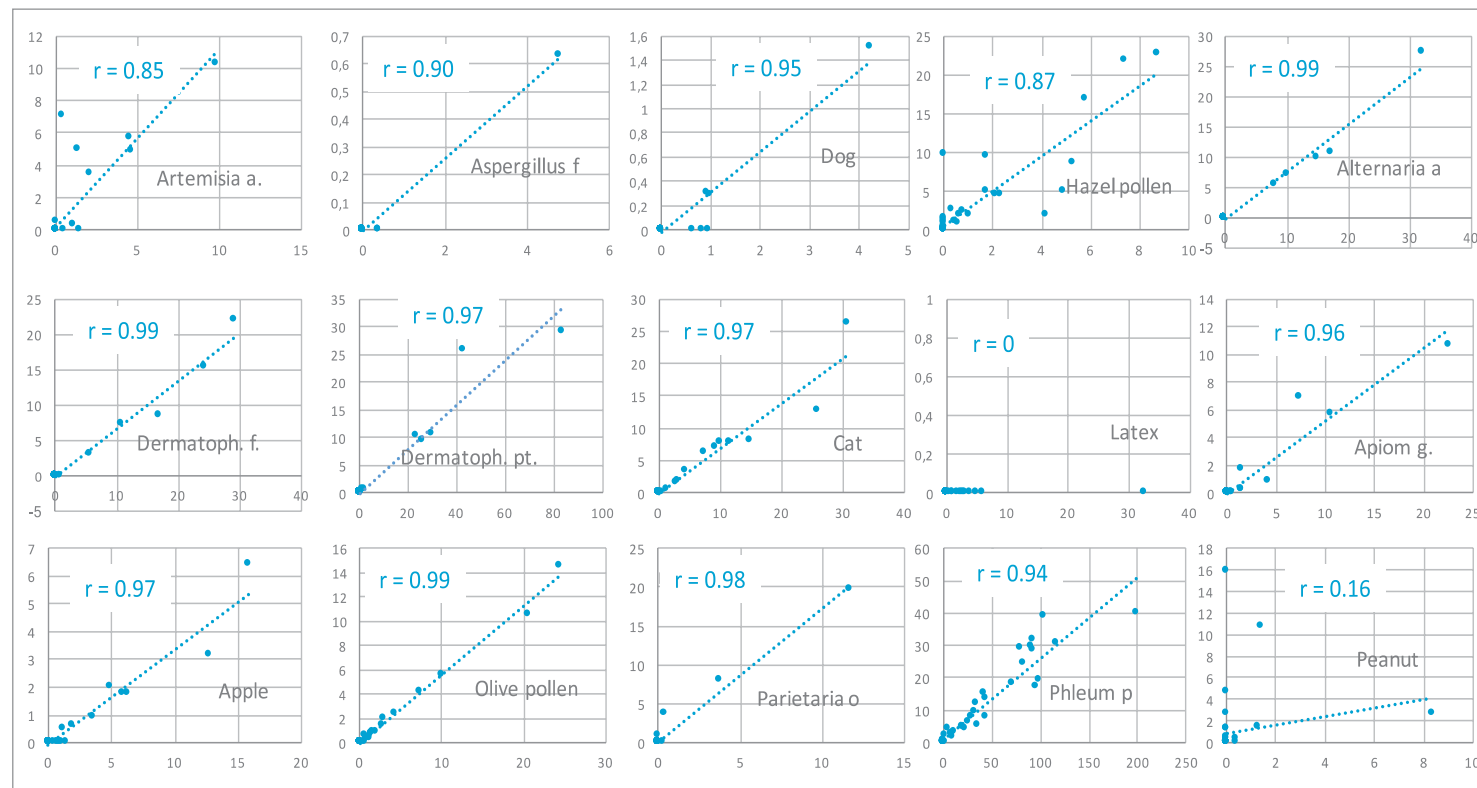


Рис. 1. Корреляция между суммой компонентов (горизонтальная ось) и результатами соответствующих экстрактов аллергенов (вертикальная ось), полученных с использованием ALEX

Комментарий эксперта

Сергей Юрьев, представитель ALEX® Macro Array Diagnostics GmbH в Украине:

– Начиная с 2015 года, когда впервые была создана инициативная группа по вопросам персонализированной медицины, приоритетным направлением в системе здравоохранения стал индивидуализированный подход к диагностике и лечению различных заболеваний. Это потребовало пересмотра прежних диагностических алгоритмов, и в отношении проблемы аллергологической патологии первые шаги уже сделаны. Европейской академией аллергологии и иммунологии (EAACI) в 2016 году был предложен новый революционный алгоритм обследования пациентов. Его основу составляет компонентная, или молекулярная, аллергодиагностика, которая позволяет осуществлять диагностику у пациента на принципиально новом уровне.

В лабораторной практике молекулярная диагностика достаточно давно используется в виде двух основных типов анализов: отдельных показателей (один образец, один аллерген) и мультиплексных тестов. Современный алгоритм, предложенный EAACI, как раз рассматривает необходимость использования мультиплексных панелей уже на первом этапе диагностического поиска.

В настоящее время доступны два варианта подобных диагностических методов. Один из них – ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher) – основан на микроочиповой диагностике, включающей 112 различных молекулярных компонентов (как экстрагированных, так и рекомбинантных). Это достаточно хорошо изученный и востребованный молекулярный диагностический инструмент. Однако второй вариант – новая, но уже получившая высокую оценку специалистов по всему миру макроматрица ALEX (ALEX® Macro Array Diagnostics GmbH, Австрия), – на сегодня дает возможность оценить в 2,5 раза больше показателей (282 параметра: 157 экстрактов аллергенов и 125 компонентов) и открывает широкие перспективы в диагностике аллергических заболеваний.

Данная публикация предоставляет аллергологам возможность ознакомиться с исследованием, демонстрирующим перспективность метода, основанного на принципах персонифицированной медицины в ведении пациентов с аллергией. Результаты данного исследования были опубликованы в 2018 году в World Allergy Organization Journal (журнале Всемирной аллергологической организации) – специализированном рецензируемом наукометрическом периодическом издании, имеющем высокий рейтинг в профессиональном сообществе.

Надеемся, что предложенный материал будет полезен для практической деятельности. Хотелось бы подчеркнуть, что в ситуации огромного потока различной информации, часто, к сожалению, не имеющей ничего общего с доказательной медициной, при выборе оптимального метода молекулярной диагностики для пациента с аллергией практикующему врачу следует быть крайне осторожным и делать выбор только на основе имеющихся доказательств точности и эффективности того или иного метода.

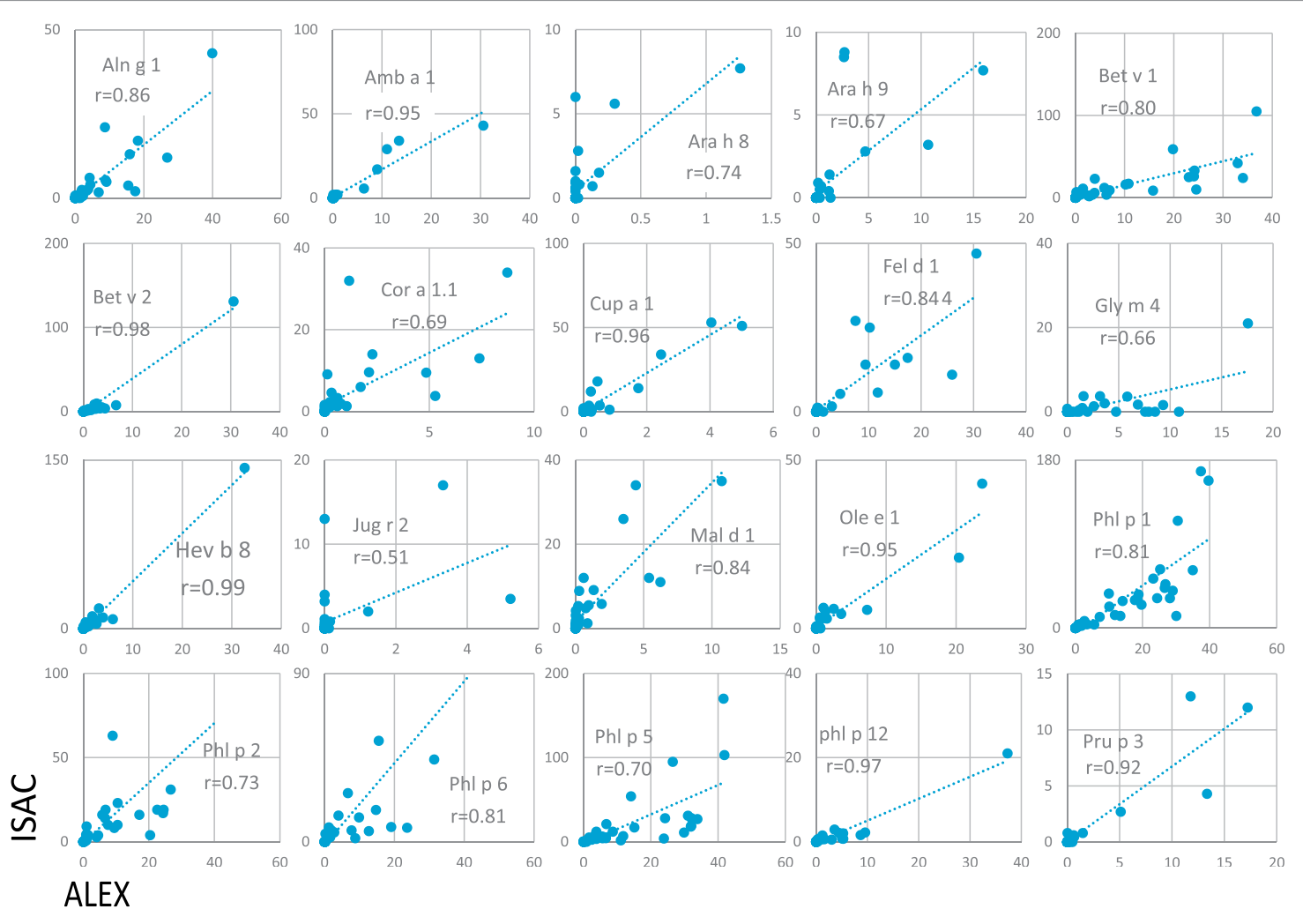


Рис. 2. Корреляция между результатами, полученными с использованием ALEX (горизонтальная ось), и результатами, полученными при помощи ISAC (вертикальная ось)

Коэффициенты корреляции были очень значительными для каждого сравнения. Так, для данного числа сравнений значение $r > 0,39$ соответствует вероятности 0,01% для «отсутствия корреляции», а наименьшее значение составило 0,51 для Jug r 2, где использование ингибитора CCD в разбавленном образце модифицировало реактивность к хорошо известному высокогликозилированному компоненту [16]. Аналогичный результат был получен путем сравнения результатов с помощью кривых ROC. Результаты, приближенные к верхним левым углам, свидетельствуют о том, что предикторная способность обоих методов является сопоставимой.

Оценка способности ALEX и ISAC идентифицировать компоненты семейства. С этой целью был проведен статистический анализ (табл.). В результатах наблюдалась определенная гетерогенность, особенно в отношении частоты положительных результатов в популяции анализа. Например, для LTP, PR-10, профилинов и 2S-альбуминов частота положительных результатов была выше при использовании ISAC, тогда как ALEX показал более высокую частоту положительных результатов для тропомозинов, 11S- и 7S-глобулинов. Динамический диапазон в некоторой степени выше в ISAC, чем в ALEX, по крайней мере для определенных семейств компонентов, таких как LTP.

Еще одно сравнение было сделано путем построения результатов компонентов, присутствующих как в ALEX, так и в ISAC у одного пациента. На рисунке 3 показаны результаты оценки 12 пациентов, репрезентативных для группы. Значительная корреляция ($r > 0,39$; $p > 0,01$) наблюдалась у 10 из 12 участников. У одного пациента, идентифицированного как К., коэффициент корреляции r составлял 0,38 ($p < 0,02$), у одного пациента

(Л.) наблюдались любые корреляции. Однако у этих пациентов показатели были чрезвычайно низкими и оказались ниже клинической или лабораторной достоверности.

Влияние ингибитора CCD. Этот параметр оценивался в некоторых репрезентативных образцах. Воздействие на сыворотки ингибитором CCD приводило к резкому снижению реакционной способности к экстрактам аллергенов, смесь которых характеризуется высокой концентрацией углеводных цепей в структуре белка. Этот результат справедлив и для некоторых нереккомбинантных компонентов [13, 17].

Обсуждение

В ходе сравнения компонентов ALEX и ISAC считалось, что твердые фазы различны, разведения в сыворотке были разными, второе антитело, вероятно, было разным, ферментный субстрат также отличался. Кроме того, в отличие от ALEX, в ISAC не используется ингибитор CCD. Лабораторные методы являются искусственными процедурами, которые пытаются имитировать *in vitro* то, что предположительно происходит *in vivo*. Результаты тестов *in vitro* используются для проведения диагностики и терапии в практике аллерголога. Однако, несмотря на технические различия, между методами исследования должна достигаться значительная корреляция. На уровне компонентов корреляция между результатами ALEX и ISAC оказалась более чем положительной, по крайней мере для профилей IgE, используемых в настоящем исследовании. Мы сосредоточились на образцах, характеризующихся сильной IgE-опосредованной реакцией на пыльцу и связанные с ней перекрестно-реагирующие аллергены, поскольку в данной области молекулярная диагностика, вероятно, дает наиболее ценные

результаты [15]. Все корреляции были сильными, даже учитывая более широкий динамический диапазон ISAC.

Следует отдельно обсудить различия методов в динамическом диапазоне. Несмотря на десятилетия использования специфического IgE в клинической практике, в однокомпонентных анализах для определенных пищевых аллергенов

наблюдалась прямая корреляция между уровнем специфического IgE и тяжестью заболевания [18]. Однако для мультиплексных анализов эта корреляция никогда не описывалась в виде правила для всех аллергенов и, очевидно, не показала свою ценность в клинической практике. Результаты настоящего исследования не позволяют сделать вывод о том, что различия в динамическом диапазоне существенно влияют на характеристики методов.

Способность обнаруживать сенсибилизацию к составным семействам характеризовалась определенной неоднородностью. Возможное объяснение заключается в том, что на уровне компонентов в двух методах использовались разные молекулы, что приводило к различной способности сыворотки распознавать разные эпитопы. Кроме того, применение CCD-ингибитора в ALEX может приводить к появлению дополнительных различий. Окончательным доказательством того, что ALEX работает аналогично ISAC, стала строгая корреляция между результатами молекулярных компонентов на уровне одного пациента.

Интересным аспектом диагностики является влияние ингибитора CCD [13]. Аллергологами обсуждается роль CCD в патогенезе заболеваний человека. С аналитической точки зрения, перекрестные реакции на CCD встречаются часто и могут повлиять на выбор специфической алерговакцинации [9, 19, 20]. Таким образом, наличие ингибитора CCD позволяет получить положительный результат только тогда, когда распознавание аллергена (или компонента) специфично для самого белка.

Одним из дополнительных принципиальных преимуществ ALEX является его способность предоставлять результаты по целым экстрактам и соответствующим компонентам в рамках одного анализа. Комбинация методов диагностики второго и третьего уровней в одном тесте позволяет одновременно определить специфические IgE, а также то, является ли реакция истинной или перекрестной.

Учитывая общие социальные и личные издержки, возможность получения всех результатов в рамках одного анализа имеет неоспоримые преимущества. Несмотря

Продовження на стор. .

Таблица. Сравнение доли положительного и среднего значения в kUA/L для группы соответствующих перекрестно-реагирующих компонентов, анализируемых с помощью ALEX и ISAC				
Семейство белков	ALEX		ISAC	
	Положительный, %	Среднее значение	Положительный, %	Среднее значение
LTPs	8,4%	0,43 kUA/L	11,9%	0,71 ISU
PR-10	28,9%	2,06 kUA/L	41,5%	2,84 ISU
Профилины	28,3%	1,46 kUA/L	34,8%	1,43 ISU
Тропомозины	6,1%	1,44 kUA/L	3,3%	1,11 ISU
11S-глобулины	2,6%	0,038 kUA/L	0,8%	0,014 ISU
2S-альбумины	1,0%	0,012 kUA/L	1,5%	1,2 ISU
7S-глобулины	6,5%	0,16 kUA/L	2,6%	0,30 ISU

ALEX

ALLERGY EXPLORER

кращий метод діагностики алергії

- Панель із 282 алергенів в одному дослідженні
- Охоплює більш ніж 99% всіх стандартних діагностичних тестів
- Можливо проводити в період цвітіння, та на тлі прийому антигістамінних і гормональних препаратів
- Гарантія точності кожного показника

Пройти обстеження можливо в алергоцентрі клініки сімейної та функціональної медицини FxMed та медичних центрах-партнерах.

MAD

FxMed

ПОДРОБИЦІ НА
WWW.MACROARRAYDX.COM.UA/TEST

Е. Heffler, F. Puggioni, S. Peveri и соавт., Италия

Определение расширенного профиля IgE-опосредованной сенсibilизации на основе технологии макроматрицы: новый метод персонафицированной медицины в диагностике аллергии

Продовження. Початок на стор. .

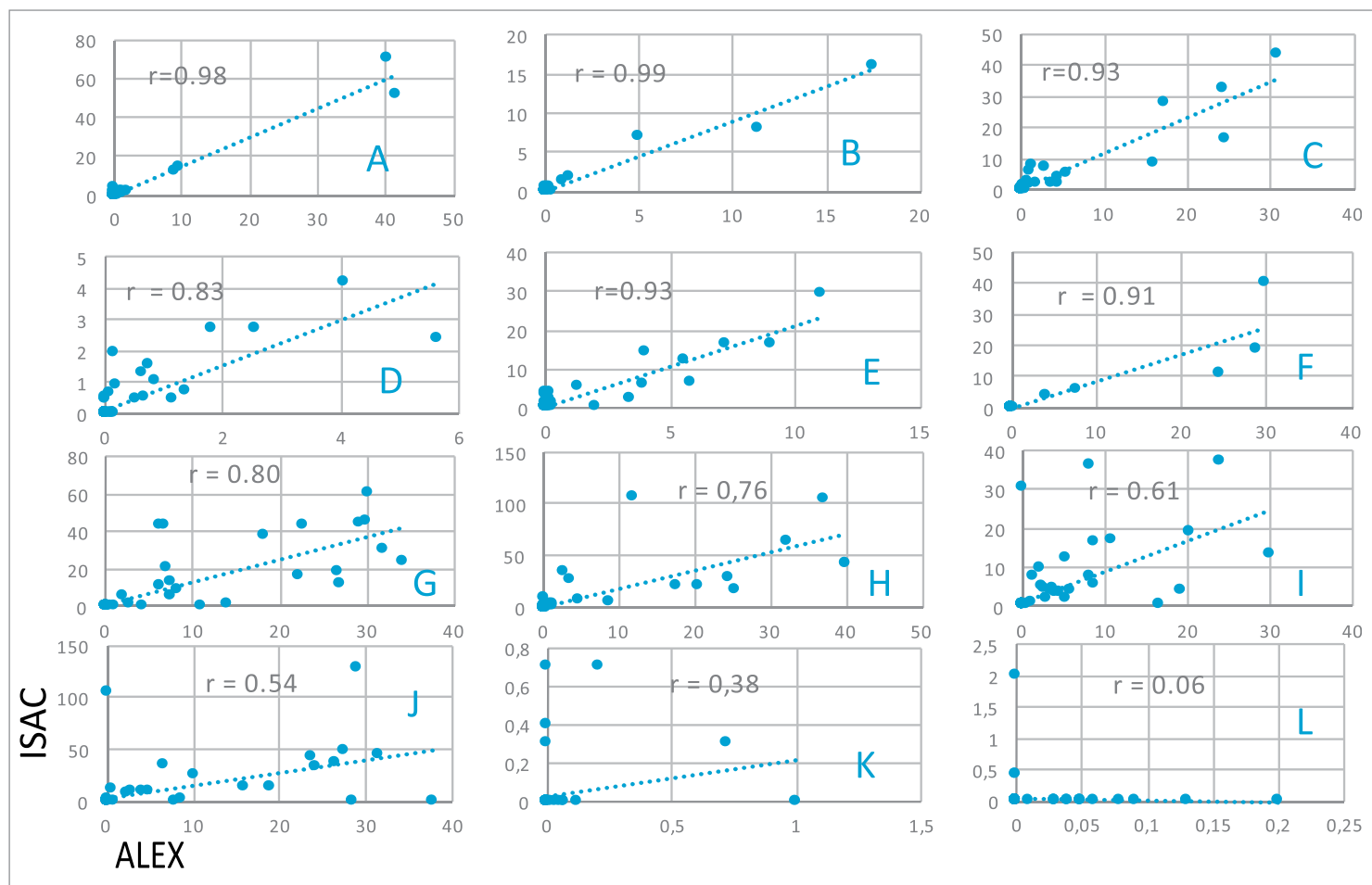


Рис. 3. Корреляция между результатами ALEX и ISAC у одного пациента

на возможные опасения, которые могут возникнуть у аллергологов [21], преимущество широкой матрицы аллергенов и компонентов также позволяет разрабатывать рекомендации для пациентов с использованием стратегии «снизу вверх»: 282 аллергена в одном чипе облегчают оценку сенсibilизации, которая в прошлом *in vitro* и/или *in vivo* тестировалась редко (или вообще не тестировалась). Эта особенность позволяет аллергологу лучше определять IgE-профиль пациента, а в некоторых случаях – улучшать терапевтическую стратегию, особенно при пищевой аллергии. Следует также отметить, что выбор аллергенов и компонентов, разработанный производителем ALEX, близок к всеобъемлющему. Тем не менее диагностическая сила ALEX может быть улучшена, если добавить в аналитическую систему такие компоненты, как омега-5-глиадин, Tri a 14 и альфа-Gal.

Выводы

Таким образом, иммунологический анализ для определения уровня специфического IgE для цельных экстрактов аллергенов и соответствующих молекулярных компонентов ALEX представляет собой перспективный новый подход в диагностике АЗ в рамках стратегии «снизу вверх» [10]. При необходимости точной диагностики АЗ сочетание экстрактов и компонентов должно экономить время и финансовые затраты, особенно при аллерговакцинации полисенсibilизированных пациентов и лиц с аллергией на пыльцу / продукты питания. Особенности метода ALEX наряду с результатами данного исследования оказывают прямое влияние на ведение пациентов с АЗ, основанное на принципах ПМ, и в ближайшем будущем вызовут интерес у аллергологов, особенно работающих в области молекулярной аллергологии [1].

Heffler et al. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. World Allergy Organization Journal 2018; 11: 7 // <https://doi.org/10.1186/s40413-018-0186-3>.

Статья печатается в сокращении.
Список литературы находится в редакции.

