

Определение расширенного профиля IgE-опосредованной сенсибилизации 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 сенсибилизация идентифицируется путем выявления IgE, специфичного для компонентов, ограниченных конкретным аллергеном. Перекрестная реакция определяется наличием иммунного ответа на перекрестно-реагирующие компоненты, такие как профиллины и белки семейства PR-10 [6]. Кроме того, молекулярная аллергodiагностика (МАД) позволяет выявлять специфические IgE к потенциально опасным, таким как белки-транспортеры липидов (LTP), или к вероятно безопасным (либо минимально опасным) компонентам (профиллины 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 сенсибилизации, основанный на микрочиповой 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 микрочипа [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 экстракти аллергенов и оценка уровня IgE к соответствующим специфическим и перекрестно-реагирующими 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 сенсибилизации 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, профиллин 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 экстракти давали отрицательный результат по компонентам. Хорошая сопоставимость была обнаружена для таких аллергенов, как киви, ольха, амброзия, сельдерей, арахис, польынь, *Aspergillus fumigatus*, бересклет, орешник, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, собаки, кошки, треска, куриные яйца, яблоки, постенница, тимофеевка, персик и ясень (рис. 1). Низкая сопоставимость наблюдалась для гевеи бразильской (Hevea b.), где экстракти были отрицательными, при этом у некоторых пациентов Nev b 8 (профиллин) 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).

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, аллергodiагностика, 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 микрочиповой 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 (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 научометрическом 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.

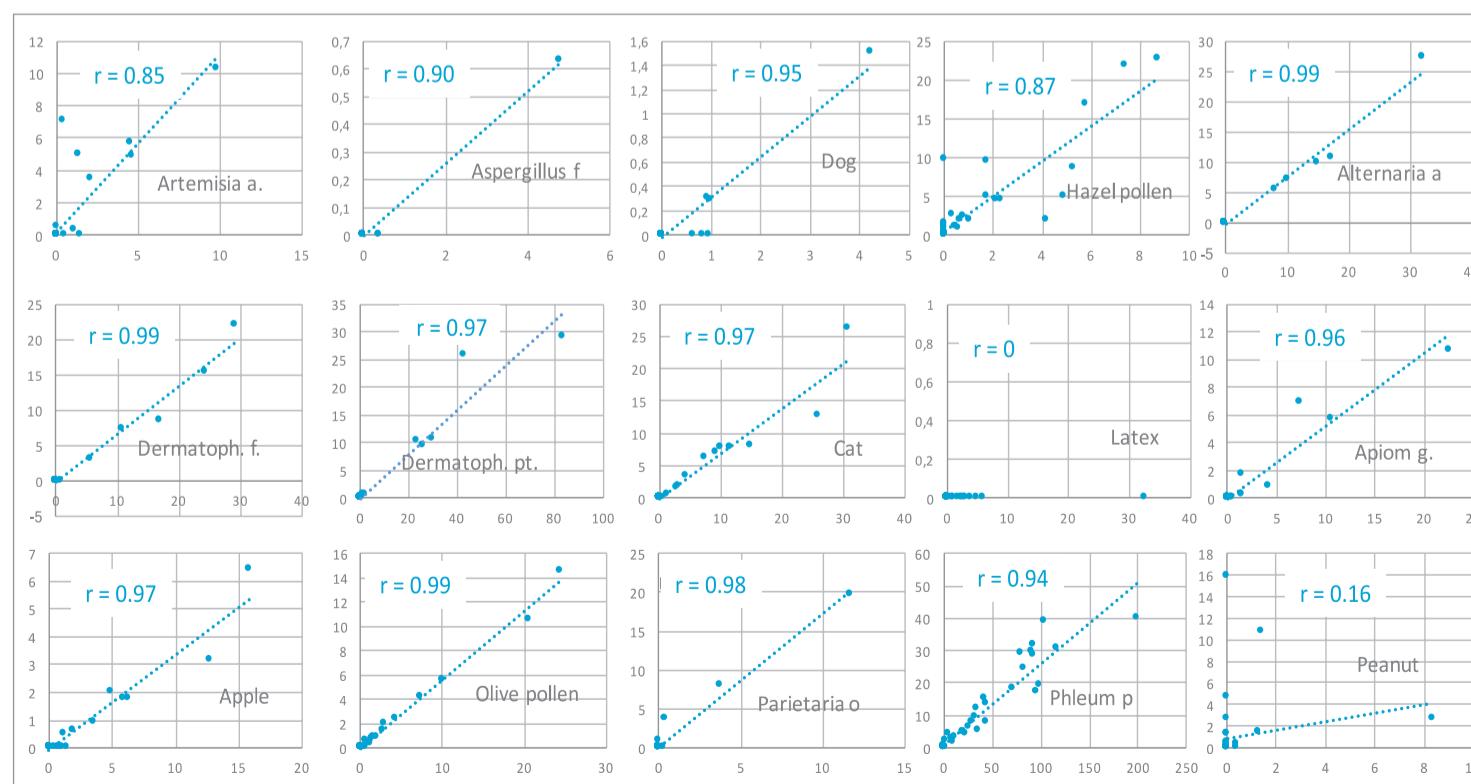


Рис. 1. Корреляция между суммой компонентов (горизонтальная ось) и результатами соответствующих экстрактов аллергенов (вертикальная ось), полученных с использованием ALEX

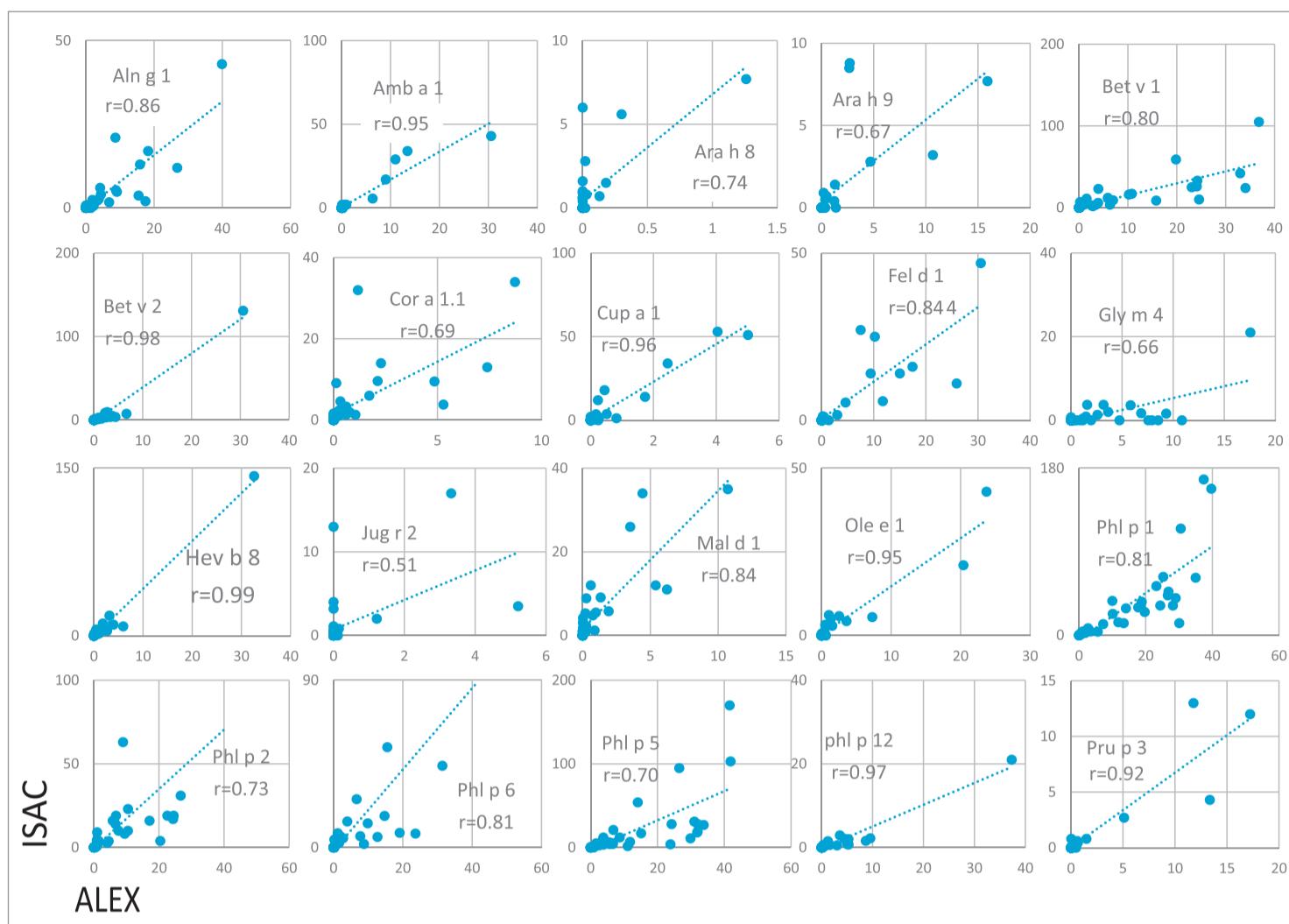


Рис. 2. Кореляція між результатами, отриманими з використанням ALEX (горизонтальна ось), і результатами, отриманими за допомогою ISAC (вертикальна ось)

Коефіцієнти кореляції були дуже значущими для кожного порівняння. Так, для даного числа порівнянь значення $r > 0,39$ відповідає вероятності 0,01% для «відсутності кореляції», а найменше значення становило 0,51 для Jug r 2, де використання інгібтора CCD в розбавленому образці модифікувало реактивність до відомого високоглюкозилованому компоненту [16]. Аналогичний результат був отриманий путем порівняння результатів з допомогою кривих ROC. Результати, приближені до верхніх левих кутів, свідчать про те, що предикторна спроможність обох методів якісно суперечить.

Оцінка спроможності ALEX і ISAC ідентифіковати компоненти семейства. С цією метою був проведений статистичний аналіз (табл.). В результаті було виявлено гетерогенітет, особливо в порівнянні частоти позитивних результатів у популяції аналізу. Наприклад, для LTP, PR-10, профілінів та 2S-альбумінов частота позитивних результатів була вищою при використанні ISAC, тоді як ALEX показав більшу частоту позитивних результатів для тропоміозинів, 11S- та 7S-глобулінів. Динамічний діапазон в деякої ступені вищий у ISAC, ніж у ALEX, по крайній мере для окремих семейств компонентів, таких як LTP.

Ще одне порівняння було зроблено путем побудови результатів компонентів, присутніх як у ALEX, так і у ISAC у одного пацієнта. На рисунку 3 показані результати оцінки 12 пацієнтів, представлені для груп. Значительна кореляція ($r > 0,39$; $p < 0,01$) була виявлена у 10 з 12 учасників. У одного пацієнта, ідентифікованого як К., коефіцієнт кореляції r становив 0,38 ($p < 0,02$), у одного пацієнта

(Л.) були будь-які кореляції. Однак у цих пацієнтів показателі були чрезвично низькими і виявилися нижче клініческої або лабораторної достовірності.

Вплив інгібтора CCD. Цей параметр оцінювався в деяких репрезентативних образцах. Воздіяне на сироватку інгібтором CCD приводило до значительного зниження реакційної спроможності до екстрактів алергенів, смісей яких характеризуються високою концентрацією углеводних ланцюгів в структурі білка. Цей результат справедлив і для деяких некомбінантних компонентів [13, 17].

Обсуждение

В ході порівняння компонентів ALEX і ISAC було встановлено, що тверді фази розрізняються, розведення в сироватці були різними, друге антиплото, ймовірно, було різним, ферментний субстрат також відрізнявся. Крім того, відмінність від ALEX в тому, що в ISAC не використовується інгібтор CCD. Лабораторні методи використовують штучними процедурами, які намагаються імітувати *in vitro* то, що відбувається *in vivo*. Результати тестів *in vitro* використовуються для проведення діагностики та терапії в практиці алерголога. Однак, 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 кореляции були 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 пряма кореляция між рівнем специфічного IgE і тяжістю захворювання [18]. Однак для мультиплексних аналізів ця кореляція ніколи не описувалася в виде правил для всіх алергенів і, очевидно, не показала свою цінність в клінічній практиці. Результати цього дослідження не дозволяють зробити висновок про те, що різниці в динамічному діапазоні мають значущий вплив на характеристики методів.

Способність обнаружувати сенсибілізацію до складових семейств характеризувалась определеною неоднорідністю. Возможное объяснение заключается в том, что на уровне компонентов в двух методах использовались разные молекулы, что приводило к различной способности сыворотки распознавать разные epitопы. 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.

Інтересним аспектом діагностики являється вплив інгібтора CCD [13]. Алергологами обговорюється роль CCD в патогенезі захворювань людини. С аналітическої точки зору, перекрестні реакції на CCD виникають часто і можуть повлиять на вибір специфічної алерговакцинації [9, 19, 20]. Таким чином, наявність інгібтора CCD дозволяє отримати позитивний результат тільки тоді, коли распознавання алергена (чи компонента) специфично для самого білка.

Одним з додаткових переваг ALEX є здатність надавати результати по цілим екстрактам і відповідним компонентам в рамках одного аналізу. Комбінація методів діагностики другого та третього рівнів в одному тесті дозволяє одночасно визначити специфічні IgE, а також ті, які виникають від реакції істинної або перекрестної.

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

Продовження на стор. 16.

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.




ПОДРОБНІЦІ НА
WWW.MACROARRAYDX.COM.UA/TEST

Таблиця. 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
Профіліни	28,3%	1,46 kUA/L	34,8%	1,43 ISU
Тропоміозини	6,1%	1,44 kUA/L	3,3%	1,11 ISU
11S-глобуліни	2,6%	0,038 kUA/L	0,8%	0,014 ISU
2S-альбуміни	1,0%	0,012 kUA/L	1,5%	1,2 ISU
7S-глобуліни	6,5%	0,16 kUA/L	2,6%	0,30 ISU

E. Heffler, F. Puggioni, S. Peveri и соавт., Італія

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

Продовження. Початок на стор. 14.

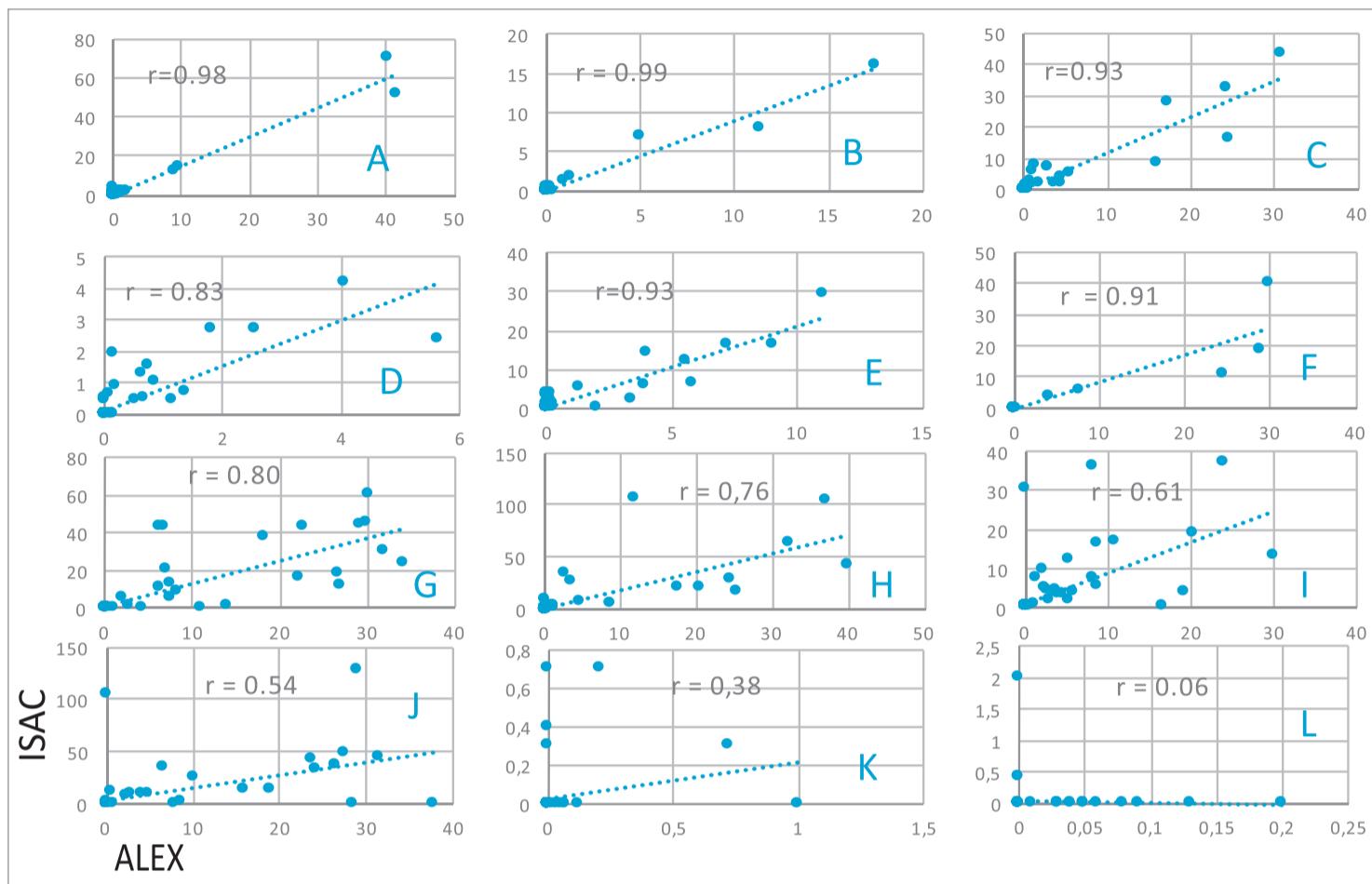


Рис. 3. Кореляція між результатами ALEX і ISAC у одного пацієнта

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 сенсибилизации, которая в прошлом *in vitro* и/или *in vivo* тестирулась редко (или вообще не тестиировалась). 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 сэкономить время и финансовые затраты, особенно при аллерговакцинации полисенсибилизованных 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>

Стаття печатається в сокращенні.

Список літератури знаходиться в редакції.

АНОНС

II Міжнародний конгрес

Раціональне використання
антибіотиків у сучасному світі.
Antibiotic resistance STOP!

15-16 листопада, м. Київ



Захід проводиться у рамках Всесвітнього тижня належного застосування антибіотиків.

Детальна інформація на сайті: <http://antibiotic-congress.com>

Контактна інформація

Ірина Хоменко

тел.: (098) 613 33 01

E-mail: Homenko.medexpert@gmail.com

www.med-expert.com.ua

АНОНС



WORLD THROMBOSIS DAY

OCTOBER 13

III науково-практична конференція
WORLD THROMBOSIS DAY:
Тромбопрофілактика в Україні.
Сучасні світові тенденції

11 жовтня, м. Київ

Місце проведення: конференц-хол ДЕПО (вул. Антоновича, 52)



Учасники отримують національний та міжнародний сертифікати.

Надається можливість перегляду online.

Реєстрація на сайті: wtd-ukraine.org