

БЕСПРИБОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИИ от ведущего Немецкого производителя Dr. Fooke Laboratorien GmbH

Распространенность аллергических заболеваний на сегодняшний день приобретает характер эпидемии во всем мире. Между тем, спектр доступных тестов *in vitro* для большинства клинических лабораторий, медицинских учреждений лечебно-профилактического профиля весьма ограничен. Исходя из выше сказанного, существует острая необходимость в освоении инновационных технологий, таких как метод бесприборной диагностики по определению сенсибилизации к различным аллергенам.

Компания Dr. Fooke Laboratorien GmbH Германия разработала метод бесприборной алерго экспресс-диагностики для определения аллерген-специфических IgE-антител в цельной крови, сыворотке или плазме. ALFA (Allergy Lateral Flow Assay) экспресс-тест имеет Европейский сертификат CE и зарегистрирован в Министерстве Здравоохранения и Социального Развития РФ.

ALFA экспресс-тест делает возможным проведение анализов не только в медицинских учреждениях — больницах, клиниках, медпунктах, но и в аптеках, санаториях, военкоматах, детских садах, школах на дому, где нет специального ИФА оборудования и специализированного медицинского персонала. Тест удобен для использования бригадами скорой помощи, участковыми врачами, и самостоятельно пациентами. Низкая стоимость и удобство применения теста сочетаются с быстротой и точностью.

В основе ALFA экспресс-теста лежит метод иммунохроматографического анализа специфического взаимодействия антигенов и антител на хроматографической мембране после пропитывания её жидкостью исследуемого образца. Такое взаимодействие происходит в результате диффузного перемещения окрашенного коллоидным золотом иммунного компонента, который заранее нанесен на мембрану, и антигенов исследуемого образца. Для визуального выявления специфической иммунной реакции в определённой зоне-линии хроматографической мембраны заранее жёстко сорбированы необходимые известные компоненты иммунологических реакций, которые позволяют сконцентрировать краситель в виде окрашенной линии. Наличие красной линии в тестовой зоне свидетельствует о положительной реакции, в то время как отсутствие таковой указывает на отрицательный результат. ALFA экспресс-тест имеет встроенный внутренний контроль: окрашивание контрольной линии подтверждает, что необходимый объём образца был нанесён на мембрану и то, что капиллярное пропитывание мембраны осуществилось.

Несомненными объективными преимуществами ALFA экспресс-теста по сравнению с другими методами является:

- ♦ простота и удобство — позволяет получить результат без оборудования и специальных навыков,

- ♦ результат анализа в реальном масштабе времени в течение 20 минут,

- ♦ клинически важная информация по 1-й капле капиллярной крови без предварительной подготовки образца,

- ♦ абсолютная безвредность, полная психологическая и физическая комфортность пациента,

- ♦ возможность проведения диагностики у постели,

- ♦ бесспорно высокая специфичность и чувствительность,

- ♦ широкий спектр исследуемых аллергенов — пищевые, бытовые, грибковые, эпидермальные, инсектные, пыльцевые,

- ♦ возможность проведения массовых скрининговых и мониторинговых исследований для оценки состояния здоровья населения и выявления доклинических форм патологий,

- ♦ надёжность в эксплуатации, безопасность, малые габариты — вариант портативной компоновки и дизайн теста обеспечивают возможность его индивидуального использования, как медицинским персоналом, так и пациентом самостоятельно.

ALFA экспресс-тест состоит из универсального тестового модуля (кассеты) в комбинации с индивидуальными биотинилированными (жидкофазными) аллергенами или микстами биотинилированных аллергенов (для скрининга). Аллергены поставляются во флаконах: индивидуальные аллергены — 1.0 мл/10 тестов/флакон, миксты — 2.0 мл/20 тестов/флакон.

Отчет о результатах проведенного открытого, сравнительного, пострегистрационного клинического исследования по изучению диагностической значимости ALFA экспресс-анализа для верификации аллерген-специфических IgE в цельной крови детей и подростков с аллергическим ринитом

Методика диагностики аллергического статуса с помощью ALFA экспресс-теста является достоверной и может использоваться как в сочетании с другими методиками, так и отдельно, что подтверждено клиническими испытаниями. Исследования по изучению диагностической значимости ALFA экспресс-теста проводились на базе:

- ♦ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России (клинический центр №1).

- ♦ Кафедры педиатрии Российской медицинской академии последипломного образования МЗиСР РФ (клинический центр №2).

Координатор исследования:

◆ Т.П. Маркова – зав. курсом аллергологии и иммунологии для педиатров, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГОУ ИПК ФМБА.

Исследователи:

◆ И.Н. Захарова – д.м.н., профессор заведующая кафедрой педиатрии Российской медицинской академии последипломного образования МЗиСР РФ.

◆ А.Л. Заплатников – д.м.н., профессор кафедры педиатрии Российской медицинской академии последипломного образования МЗиСР РФ.

◆ Д.Г. Чувиров – к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГОУ ИПК ФМБА.

Предмет исследования

Метод оценки диагностической значимости ALFA экспресс-теста для качественного определения общего и аллерген-специфических IgE в цельной крови – сопоставление частоты совпадения результатов исследуемого теста и результатов параллельно проведенного референс-теста, а также определение чувствительности и специфичности исследуемого теста.

Тестирование проводилось с помощью ALFA экспресс-теста производства «Dr. Focke Laboratorien GmbH» Германия. Референс-тест – кожные аллергические пробы (prick-тесты) с диагностикумами (Allergofarma Германия). Тестировались: общий IgE, моно аллергены: (Dermatophagoides pteronyssinus d1, Dermatophagoides farinae d2, Alternaria tenuis m6, Береза t3, Тимофеевка g6, Полынь w6, Кошка e1, Собака e2), миксты из сезонных аллергенов: (Бермудская трава g2, Райграс g5, Тимофеевка g6, Мятлик g8, Рожь посевная g12, Береза t3, Полынь w6, Alternaria tenuis m6) и круглогодичных аллергенов: (Dermatophagoides pteronyssinus d1, Dermatophagoides farinae d2, Aspergillus fumigatus m3, Aspergillus niger m33, Кошка e1, Собака e2).

У 60 детей и подростков обоего пола в возрасте от 6 лет до 18 лет включая 32 мальчика и 28 девочек с аллергическим ринитом в открытом, сравнительном, пострегистрационном клиническом исследовании оценивали диагностическую значимость иммунохроматографического ALFA экспресс-анализа для качественного определения аллерген специфических IgE в цельной капиллярной крови.

Метод оценки полученных результатов аллергологического обследования:

◆ при иммунохроматографическом ALFA экспресс-тесте для качественного определения общего IgE и аллерген-специфических IgE в цельной крови – проводился через 20–30 мин после помещения цельной крови в тестовый модуль и добавления необходимого биотинилированного аллергена.

◆ при кожных скарификационных пробах, включая prick-тесты – оценка результатов проводилась через 15–20 мин после постановки пробы на основании выраженности местной реакции (реакция немедленного типа) с учетом характера форменного элемента и его размеров при обязательном отрицательном и положительном контроле. При этом степень сенсибилизации к определенным

аллергенам соответствовала выраженности местных изменений: отрицательная – отсутствие волдыря, гиперемия; слабо положительная – волдырь 2–3 мм, гиперемия; умеренно положительная – волдырь 4–5 мм, гиперемия; резко положительная – волдырь 6–10 мм, гиперемия или волдырь 6–10 мм с псевдоподиями, гиперемия; очень резко положительная – волдырь более 10 мм, гиперемия или волдырь более 10 мм с псевдоподиями.

Критериями «включения» в исследование являлись:

- ◆ Нозологическая форма – аллергический ринит сезонный или круглогодичный (САР или КАР).
- ◆ Возраст пациента от 6 лет до 17 лет 11 мес. 29 дней.
- ◆ Клинический статус пациента – период клинико-медикаментозной ремиссии.
- ◆ Статус пациента в лечебном учреждении – амбулаторное наблюдение.
- ◆ Отсутствие данных о развитии анафилактических реакций у пациента при постановке кожных аллергологических проб, на лекарственные препараты в анамнезе.
- ◆ Пациент не получает системные антигистаминные (блокаторы H1-гистаминовых рецепторов) и/или кортикостероидные препараты в течение 3-х недель до включения в исследование.
- ◆ Пациенту не проводится специфическая иммунотерапия.
- ◆ Пациент не участвует в другом исследовательском проекте.
- ◆ Родители (мать или отец) ознакомлены с целями и ходом данного исследования и дают добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

- ◆ Возраст пациента младше 6 лет или старше 17 лет 11 мес. 29 дней.
- ◆ Период обострения аллергического ринита.
- ◆ Дети с аутоиммунными заболеваниями.
- ◆ Дети с аллергическими заболеваниями (бронхиальная астма, диффузный атопический дерматит, поллиноз в период обострения).
- ◆ Дети с тяжелыми сопутствующими заболеваниями печени, центральной нервной системы, диабетом.
- ◆ Пациент в течение последних 3-х недель получал антигистаминные (блокаторы H1-гистаминовых рецепторов), кортикостероидные или иммуностимулирующие препараты.
- ◆ Пациенту проводится специфическая иммунотерапия.
- ◆ Пациент участвует в другом исследовательском проекте.
- ◆ Родители (мать или отец) не ознакомлены с целями и ходом данного исследования и не дают добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Ход исследования

На предварительном этапе исследования был проведен клинико-anamnestический скрининг, позволивший провести отбор пациентов, которые по-

тенциально могли стать участниками исследования. Скрининг (1-ый визит) проводили среди детей и подростков, находящихся под наблюдением у аллергологов и педиатров. Для этого была проведена выборка пациентов, соответствующих критериям включения по следующим параметрам – возраст, нозологическая форма, а также анализ анамнестических данных (на основании результатов разработки первичной медицинской документации). В дальнейшем отобранные пациенты были приглашены на прием (2-ой визит), для уточнения анамнеза заболевания и жизни, семейного анамнеза, проведения клинического осмотра, оценивалось состояние здоровья и возможность включения в исследование. На каждого пациента, включенного в исследование, была заполнена анкета для последующего введения результатов аллергологического обследования. Пациентам, отобранным для участия в исследовании, были определены даты повторного визита для проведения запланированного обследования.

Во время 3-его визита у пациентов, включенных в исследование, еще раз уточняли критерии включения и исключения и только после подтверждения соответствия их протоколу проводили аллергологическое обследование. Таким образом, были обследованы 60 детей (средний возраст – $11,4 \pm 3,7$ лет), из них девочек – 28, мальчиков – 32. Проведение аллергологического обследования строго соответствовало официальным инструкциям.

Результаты и обсуждение

Аллергологическое обследование с помощью кожных проб (prick-тест) у пациентов, включенных в исследование, выявило у 56 детей причинно-значимые аллергены в патогенезе САР и КАР. По результатам клинического осмотра, сбора анамнеза и кожных проб (prick-тесты) у 25 детей (44,7%) диагностирован сезонный аллергический ринит (САР), у 18 детей (32,1%) – круглогодичный аллергический ринит (КАР), у 13 детей (33,4%) – сочетания САР и КАР.

Частота совпадения положительных результатов при проведении кожных скарификационных проб и ALFA экспресс-теста для качественного определения аллерген специфических IgE в цельной капиллярной крови показал, что в целом имеет место высокая чувствительность исследуемого лабораторного теста:

1. Клинический центр №1

Результаты ALFA экспресс-теста полностью совпадали с данными референс-теста при исследовании с аллергенами собаки 2 случая из 2. ALFA экспресс-тест был более чувствителен в сравнении с кожным тестированием при исследовании с аллергенами *Dermatophagoides farinae* было отмечено в 9 случаях из 8, кошки в 5 случаях из 4, березы в 18 случаях из 17, полыни в 7 случаях из 6. ALFA экспресс-тест был менее чувствителен в сравнении с кожным тестированием при исследовании с аллергенами *Dermatophagoides pteronyssinus* в 21 случаях из 19, тимофеевки в 4 случаях из 3. На основании результатов проведенного исследования установлено, что чувствительность изучаемого лабораторного метода составляет 94,2%.

2. Клинический центр №2

Результаты ALFA экспресс-теста полностью совпадали с данными референс-теста при исследовании с аллергенами *Dermatophagoides pteronyssinus* 4 случая из 4, *Dermatophagoides farinae* 3 случая из 3, кошки 3 случая из 3 и полыни 4 случая из 4. В единичных случаях ALFA экспресс-тест был менее чувствителен с кожным тестированием при исследовании с аллергенами тимофеевки в 3 случаях из 4, с березой в 9 случаях из 10, с аллергенами собаки и *Alternaria tenuis* – по 1 случаю из 2. На основании результатов проведенного исследования установлено, что чувствительность изучаемого лабораторного метода составляет 87,5%

Таким образом, в результате проведенных исследований можно отметить высокий процент совпадений результатов кожных проб и определения, специфических IgE при использовании ALFA экспресс-теста, % совпадений составил 75,0–100,0%.

Отдельно анализировалась специфичность ALFA экспресс-теста для определения аллерген-специфических IgE в цельной капиллярной крови. Отмечено, что изучаемый экспресс-тест обладает высокой специфичностью, составлявшей от 94,1 до 100% при постановке с различными аллергенами. При этом отрицательные результаты кожного тестирования и экспресс-теста одновременно наблюдали во всех случаях при постановке проб с *Dermatophagoides farinae*, аллергенами собаки и полыню. Установлено, что ложноположительные результаты экспресс-анализа были отмечены лишь в единичных случаях, лишь в 5 случаях из 176 негативных проб кожного тестирования с соответствующими аллергенами экспресс-тест был позитивен, что позволяло констатировать ложноположительный результат изучаемого лабораторного метода. Выявленные положительные результаты экспресс-теста и отрицательные кожные пробы могут быть связаны с латентной сенсибилизацией и не снижают достоинства экспресс-диагностики. Причинно значимые аллергены были выявлены у всех 60 детей (100,0%). Таким образом, установлено, что специфичность ALFA экспресс-теста для качественного определения аллерген специфических IgE в цельной капиллярной крови составляла 97,1%.

Особый интерес представлял анализ результатов параллельного исследования экспресс-теста при использовании моно аллергенов и их микстов. При этом обращали внимание на совпадение как положительных, так и отрицательных результатов. Проведенные исследования показали, что в ряде случаев выявленная сенсибилизация к определенным аллергенам при использовании референс-теста и экспресс-теста, проведенного с моно аллергенами, не выявлялась при параллельной постановке изучаемого иммунохроматографического экспресс-анализа с микстами аллергенов. Были отмечены затруднения оценки результатов исследования из-за незначительного изменения цвета тестовой полосы при использовании микстов аллергенов. Последнее, в ряде случаев, становилось предметом ошибочных заключений и увеличивало уровень субъективизации оценки. Учитывая, что даже слабо-розовый цвет окрашивания тестовой полосы, согласно протоколу исследования, считался подтверждением положительного результата,

нередко разными исследователями, заключения носили полярный характер. Поэтому результаты оценивались коллегиально и только после этого, принималось окончательное решение, а также делалось заключение по результату исследования. В целом следует отметить, что чувствительность исследуемого теста при использовании микстов-аллергенов была меньшей, чем при проведении его с моно-аллергенами и составляла 75%.

Положительные результаты при определении общего IgE ALFA экспресс-тестом наблюдали у всех детей с САР и КАР. Уровень общего IgE параллельно определялся методом ИФА и составил $254 \pm 10,6$ МЕ/мл (фирма ХЕМА, Россия). В результате проведенных исследований можно отметить высокий процент совпадений результатов кожных проб и определения, специфических IgE с ALFA экспресс-тестом. Известно, что результаты кожных проб не всегда совпадают с результатами определения специфических IgE, что связывают с более сложными механизмами формирования кожной реакции. Чаще всего несоответствие результатов наблюдают при определении сенсибилизации к грибковым и пищевым аллергенам; возможны ложноположительные и ложноотрицательные реакции. Вычисление коэффициента корреляции не всегда целесообразно, так как определение коэффициента корреляции подразумевает нормальное распределение результатов, что бывает не всегда при аллергических заболеваниях. Чаще говорят о конкордантности (совпадении) результатов, но при этом необходимо использовать золотой стандарт для сравнения. Золотым стандартом в нашем исследовании могут быть кожные пробы, но механизм их формирования не совпадает с методами определения общего и аллерген-специфических IgE. Например, совпадение результатов prick-тестов и MAST-теста для пищевых аллергенов составляет 73%, для трав – 93%, для клещей – 93%, для аллергенов кошки – 75%, для поллиноза – 85%. Полученные результаты частоты совпадений показателей prick-теста и ALFA экспресс-теста сходны с результатами других исследователей.

Выводы клинического центра №1

Проведенное открытое, сравнительное пострегистрационное клиническое исследование показало, что изучаемый иммунохроматографический ALFA экспресс-тест для качественного определения аллерген специфических IgE в цельной капиллярной крови у детей и подростков с САР и КАР является высокоинформативным и достоверным методом верификации причинно-значимых аллергенов.

У всех 30 детей (100,0%) с АР выявлены причинно значимые аллергены с помощью ALFA экспресс-тест.

Совпадение результатов ALFA экспресс-тест и кожных проб (prick-тест) наблюдали в 75–100% случаев.

Положительные результаты при определении ALFA общего IgE наблюдали у всех детей с АР.

Экспресс-тест удобен и прост в применении. Его использование не требует дополнительного оборудования, дорогостоящей аппаратуры и специальных лабораторных помещений. Все это позволяет рекомендовать внедрение иммунохроматографического ALFA экспресс-тест для качественного определения общего

и аллерген-специфических IgE в цельной капиллярной крови производства компании Dr. Fooke, Laboratorien GmbH в широкую клиническую практику.

Выводы клинического центра №2

Проведенное открытое, сравнительное пострегистрационное клиническое исследование показало, что изучаемый иммунохроматографический ALFA экспресс-тест для качественного определения аллерген специфических IgE в цельной капиллярной крови у детей и подростков с аллергическим ринитом является высокоинформативным и достоверным методом верификации причинно-значимых аллергенов.

Установлено, что чувствительность изучаемого лабораторного метода при постановке с изолированными аллергенами составляет 87,5%, а специфичность – 97,1%.

Чувствительность иммунохроматографического ALFA экспресс-тест для качественного определения аллерген специфических IgE в цельной капиллярной крови при использовании аллергенных микстов была ниже и в целом составила 75%.

Отмечено, что изучаемый экспресс-тест удобен и прост в применении. Его использование не требует дополнительного оборудования, дорогостоящей аппаратуры и специальных лабораторных помещений. Все это позволяет рекомендовать активное внедрение иммунохроматографического ALFA экспресс-теста для определения аллерген специфических IgE в цельной капиллярной крови производства компании Dr. Fooke Laboratorien GmbH в широкую клиническую практику.

Литература

1. Hamilton RG, Franklin Adkinson N Jr. In-vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:213-225.
2. Lucassen R, Fooke M, Kleine-Tebbe J, Mahler M. Development and Evaluation of a Rapid Assay for the Diagnosis of IgE-mediated Type I Allergies. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2008; 18:223-230.
3. Горячкина Л.А., Демборинская А.С. Определение общего и специфического IgE в сыворотке крови аллергических больных методом хемилюминесценции на аппарате MAST-CLA компании «ЛЮМИНЕРИ». *Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии: материалы симпозиума «Новейшие методы диагностики аллергии», 29-31 мая 2001 г., г. Москва, С. 13-17.*
4. Маркова Т.П. Новые направления в диагностике аллергических заболеваний. *Лечащий врач*, 2006, № 4., С.69-72.
5. Constable D.W., Yarris R.I., Ganderton M.A. J. *Investigation in Allergology and Clinical Immunology*, vol. 1 (13), P. 169-178.

Заказ на ALFA экспресс-тесты можно сделать по следующим адресам и телефонам:
121059, г. Москва, Бережковская наб., д.20,
стр. 64, оф. 113,

ООО «Доктор Фооке»,

т.: +7(495) 799-1165, т./ф.: +7(495) 688-4964
e-mail: sale@fooke.ru <http://www.fooke.ru>