

Porovnání multiplexových čipových technologií pro diagnostiku alergií

Charlotte Nerelius, Research and Development, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden a Malin Berthold, Scientific and Medical Affairs, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden

Multiplexové čipové technologie se již běžně využívají v laboratorní diagnostice alergií. Na našem trhu jsou v současné době k dispozici dvě CE-certifikované platformy – ImmunoCAP™ ISAC test (Phadia AB) a ALEX® (Macroarray Diagnostics). V tomto článku jsou shrnuty výsledky porovnávací studie těchto dvou diagnostických testů a také porovnání s ImmunoCAP testy pro jednotlivé extrakty a komponenty. Studie byla provedena v laboratořích Thermo Fisher Scientific a nedávno publikována v Russian Journal of Allergology.¹ Cílem článku je také upozornit na možná úskalí využívání těchto čipových metod obecně.

Úvod

ImmunoCAP ISAC multiplexový test obsahuje 112 alergenových komponent, každá je na čipu nanesena třikrát. Měření generuje semikvantitativní výsledky (ISAC standardized units/ISU-E).²

V multiplexovém testu ALEX 1 najdeme 282 analytů, 156 extraktů a 125 komponent a také total IgE. Dle výrobce test udává semikvantitativní výsledky pro tIgE do 2500 kU/L, pro sIgE u extraktů a komponent test udává kvantitativní výsledky do 50 kU/L.³

Oba testy se ve skladbě komponentů částečně překrývají – 81 komponent najdeme na obou čipech, 44 je unikátních pro test ALEX a 31 jiných komponent je zastoupeno jen na testu ISAC.

Porovnávací studie

Měření byla prováděna dle instrukcí od výrobců v laboratořích Thermo Fisher Scientific v Dánsku a ve Švédsku. Sérové vzorky byly analyzovány za použití testu ALEX, ImmunoCAP ISAC sIgE 112, ImmunoCAP Specific IgE celých alergenů (extraktů), ImmunoCAP testů pro alergenní komponenty a ImmunoCAP Total IgE testu. ImmunoCap testy pro tIgE, celé alergeny a komponenty generují kvantitativní výsledky navázané na standardy od WHO.^{2,4}

Bylo použito až 66 vzorků sér od polysenzitivních pacientů, ve kterých bylo měřeno 11 extraktů a jim příslušné komponenty (celkem 25). Analyty byly vybrány dle klinické

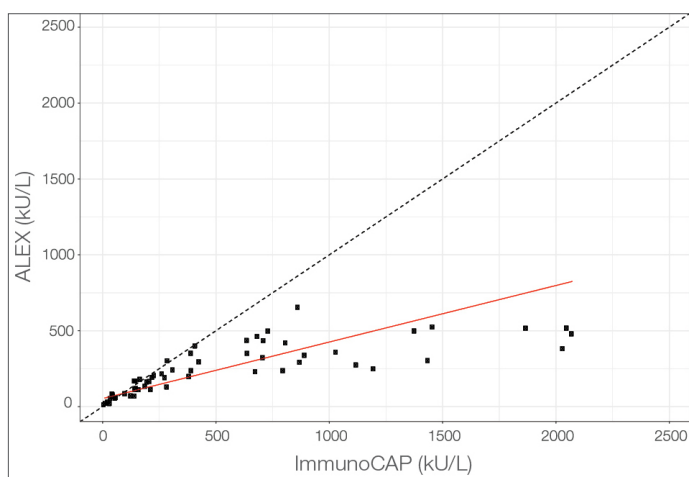
relevance a podle toho, aby byly přítomny na všech platformách (Tabulka 1). Pro výpočet pozitivní i negativní shody mezi testy byly použity třídy definované pro test ALEX.

Extrakty (n=11)	Příslušné komponenty společné pro test ALEX a ImmunoCAP alergeny (n=25)	Komponenty společné pro ALEX a ImmunoCAP ISAC sIgE 112 (n=26)
Domácí roztoči (d1 + d2)	Der p 1, Der p 2, Der p 10, Der p 23	Der p 1, Der p 2, Der p 10, Der f 1, Der f 2
Pšenice	Gliadin	-
Broskev	Pru p 3	Pru p 3
Pyl olivovníku	Ole e 1	Ole e 1
Bojínek	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12
Drnavec	Par j 2	Par j 2
Vejce	Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3	Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 5
Mléko	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8
Lískový ořech	Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 14	Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9
Vlašský ořech	Jug r 1	Jug r 1, Jug r 2

Tabulka 1: Seznam vybraných extraktů a alergenních komponent analyzovaných na obou platformách.

ImmunoCap Total IgE versus ALEX Total IgE

Výsledky měření sérových vzorků (n=65) pro ImmunoCap Total IgE byly v rozmezí 7–7900 kU/L, zatímco u testu ALEX bylo rozmezí 12–654 kU/L. Korelace mezi výsledky z obou platform byla nízká v hladinách nad 500 kU/L (Graf 1).



Graf 1: Korelace výsledků total IgE z testů ALEX a ImmunoCAP ukazuje datové body do 2500 kU/L (n=58) z ImmunoCAP. Sedm datových bodů s výsledky nad 2500 kU/L z ImmunoCAP je vypuštěno. Regresivní přímka je červená.

Alergenové extrakty: ImmunoCAP celé alergy versus ALEX 1

Celkově bylo změřeno 423 pozitivních výsledků na platformě ImmunoCAP a 234 pozitivních výsledků při použití testu ALEX. Poměr falešně negativních výsledků, definovaný jako $\leq 0,3$ kU_A/L na testu ALEX, ale $\geq 0,3$ kU_A/L na ImmunoCAP testech, byl tedy 55 % pro ALEX test. Navíc žádné výsledky z testu ALEX nepřesáhly 36 kU_A/L i pro vzorky, které na ImmunoCAP sIgE testech měly hodnoty přes 100 kU_A/L. ALEX test měl tedy nízkou senzitivitu a nízký dynamický rozsah při měření celých alergenů.

4					45
3			1	18	31
2	1	2	21	21	25
1		4	8	8	5
0	285	94	100	30	10
	0	1	2	3	4

Výsledky ImmunoCAP Specifické IgE

Graf 2: Grafické znázornění (heat map) výsledků z testů ALEX vs. ImmunoCAP. Falešně negativní výsledky testu ALEX můžeme najít v celém měřicím rozsahu.

ImmunoCAP alergenové komponenty versus ALEX 1 alergenové komponenty

Výsledky se porovnávaly ve třídách, stejně jako u celých alergenů. Celková shoda v těchto třídách dosahovala 70%. Pomocí testů ImmunoCAP specifické IgE pro komponenty bylo naměřeno 426 pozitivních výsledků. Při použití testu ALEX bylo celkově naměřeno 286 pozitivních výsledků. Poměr falešně negativních výsledků, definovaný jako $\leq 0,3$ kU_A/L na testu ALEX, ale $\geq 0,3$ kU_A/L na ImmunoCAP testech, byl 33 % pro ALEX test. Stejně jako u celých alergenů měl ALEX nízký dynamický rozsah, nejvyšší naměřená hodnota byla 38 kU_A/L, zatímco u ImmunoCAPu byly hodnoty u pozitivních vzorků až kolem 150 kU_A/L.

Analýza negativních výsledků pro extrakty na testu ALEX vs. výsledky příslušných komponentů na testech ALEX a ImmunoCAP

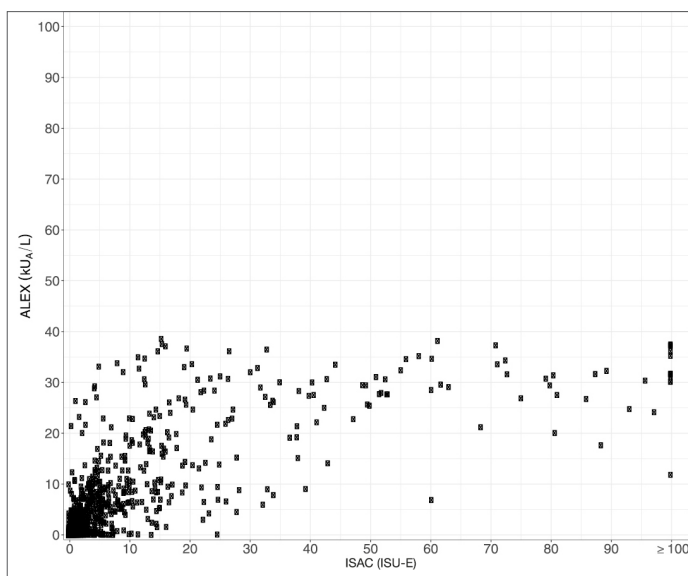
Další analýza odhalila, že některé negativní výsledky pro extrakty na testu ALEX nebyly kompenzovány ani pozitivitou příslušných komponentů. 25 z testovaných vzorků dosáhlo pozitivních hodnot při měření ImmunoCAP sIgE pro extrakt z lískového ořechu ($\geq 0,3$ kU_A/L). Na čipu ALEX byly všechny tyto vzorky negativní. Při testování příslušných komponent (Cor a 1,8,9 a 14) na obou platformách bylo na ImmunoCAPu 23 vzorků pozitivních na některou z komponent, zatímco na ALEXu bylo pozitivních pouze 9 vzorků. Jinými slovy, 14 vzorků pozitivních na ImmunoCAP sIgE testech pro celé alergy i komponenty bylo zcela negativních při použití testu ALEX. Tyto výsledky podtrhují fakt, že negativní výsledky extraktů z testu ALEX nemusí být skutečně negativní.

ALEX 1 versus ImmunoCAP ISAC test

Tyto dvě multiplexové technologie se porovnávaly ve třídách, které udává ALEX, se dvěma předpoklady:

- 1) Výsledky z testu ALEX jsou pravdivé
- 2) Výsledky z testu ISAC jsou pravdivé

Falešně negativních výsledků v prvním případě bylo 15,8 % (59 negativních výsledků na ALEXu z 374 pozitivních na ISACu), ve druhém případě bylo falešně negativních výsledků 9,5 % (33/348). Z tohoto porovnání vidíme, že ISAC test je citlivější platforma, rozdíl ale není tak zásadní jako při předchozích porovnáních.



Graf 3: Výsledky z testu ALEX pro komponenty nepřesahují hodnoty nad 39 kUA/L mezi 407 pozitivními body, zatímco ImmunoCAP ISAC 112 zaznamenává hodnoty slgE až kolem 100 ISU-E. Třináct datových bodů v grafu chybí kvůli oříznutí.

V grafu 3 je znázorněn rozdíl v dynamickém rozsahu, zatímco při použití testu ISAC dosahují hodnoty komponent až přes 100 ISU, při použití testu ALEX byla nejvyšší naměřená hodnota 39 kUA/L z 407 pozitivních měření.

CCD

Při popisu vlastností těchto multiplexových platform je důležité zmínit, že poměr falešně negativních výsledků se významně nezměnil ani při analýze sér bez slgE protilátek proti CCD (zkříženě reagujících cukerných determinantů). Tyto byly určeny ImmunoCAP slgE MUXF3. Je možné, že nižší senzitivita testu ALEX je alespoň částečně způsobena nezbytností pacientské sérum 5x zředit, jak je uvedeno v návodu k testu. Toto ředění vzorků pro test ALEX umožňuje inhibici CCD. Dle výrobce se dosáhne 85 % redukce reaktivity.⁶

Při použití testu ISAC není ředění vzorku nutné. Nový ImmunoCAP ISAC test obsahuje pouze čtyři komponenty citlivé na CCD (Cyn d 1, Phl p 4, Cup a 1 a Cry i 1) vedle CCD markeru MUXF3.

Závěr

Multiplexové čipové technologie mohou být nápomocné v diagnostice alergií u komplikovaných případů, jako u pacientů s respiračními nebo atopickými projevy neznámého původu. Použití těchto technologií s sebou ale může přinášet mnoho nejednoznačných výsledků.

ALEX test pro tlgE, slgE pro celé alergeny a alergenové komponenty prokázal nízký dynamický rozsah a nízkou shodu s kvantitativními výsledky z ImmunoCAP single testů. Senzitivita testu ALEX byla ve všech porovnáních nižší, než na platformách ImmunoCAP. Nebyly zaznamenány žádné problémy s pozadím u multiplexových testů. V porovnání s ImmunoCAP ISAC slgE 112 testem byla shoda lepší než s ImmunoCAP single testy, ale senzitivita a dynamický rozsah testu ALEX je stále nižší, než u ImmunoCAP ISAC testu.

Seznam produktů ImmunoCAP

ImmunoCAP ISAC slgE 112; ImmunoCAP allergen d1, house dust mite; ImmunoCAP allergen d2, house dust mite; ImmunoCAP allergen d202, allergen component rDer p 1, house dust mite; ImmunoCAP allergen d203, allergen component rDer p 2, house dust mite; ImmunoCAP allergen d205, allergen component rDer p 10 tropomyosin, house dust mite; ImmunoCAP allergen d209, allergen component rDer p 23, house dust mite; ImmunoCAP allergen f4, wheat; ImmunoCAP allergen f98, gliadin; ImmunoCAP allergen f95, peach; ImmunoCAP allergen f420, allergen component rRpu p 3 LTP, peach; ImmunoCAP allergen t9, olive; ImmunoCAP allergen t224, allergen component rOle e 1, olive; ImmunoCAP allergen g6, timothy; ImmunoCAP allergen g205, allergen component rPhl p 1, timothy; ImmunoCAP allergen g206, allergen component rPhl p 2, timothy; ImmunoCAP allergen g215, allergen component rPhl p 5b, timothy; ImmunoCAP allergen g209, allergen component rPhl p 6, timothy; ImmunoCAP allergen g212 allergen component rPhl p 12 profilin, timothy; ImmunoCAP allergen w21, wall pellitory; ImmunoCAP allergen w211, allergen component rParj 2 LTP, wall pellitory; ImmunoCAP allergen f1, egg white; ImmunoCAP allergen f233, allergen component nGal d 1 ovomucoid, egg; ImmunoCAP allergen f232, allergen component nGal d 2 ovalbumin, egg; ImmunoCAP allergen f323, allergen component nGal d 3 conalbumin, egg; ImmunoCAP allergen f2, milk; ImmunoCAP allergen f76, allergen component nBos d 4 alpha-lactalbumin, milk; ImmunoCAP allergen f77, allergen component nBos d 5 beta-lactoglobulin, milk; ImmunoCAP allergen f78, allergen component nBos d 8 casein, milk; ImmunoCAP allergen f17, hazelnut; ImmunoCAP allergen f428, allergen component rCora 1 PR10, hazelnut; ImmunoCAP allergen f425, allergen component rCora 8, hazelnut; ImmunoCAP allergen f440, allergen component nCora 9, hazelnut; ImmunoCAP allergen f439, allergen component rCora 14, hazelnut; ImmunoCAP allergen f256, walnut; ImmunoCAP allergen f441, allergen component rJug r 1, walnut; ImmunoCAP allergen o214, allergen component MUXF3CCD, bromelain

Použitá literatura

1. C. Nerelius, M. Andersson, L. Søggaard, M. Schwanbeck, S. Kofler, M. Berthold. Comparative study of Allergy Explorer (ALEX) versus ImmunoCAP platforms. Russian journal of Allergy. 2020;17(1):76-84. DOI: 10.36691/RAJ.2020.17.1.008
2. ImmunoCAP total IgE Direction for Use 52-5292 – EN/08, available at <https://dfu.phadia.com/Data/Pdf/5be5621c-89c2320848d710f6.pdf>
3. ALEX – Allergy explorer. The smart way to explore allergy, available at www.macroarraydx.com
4. ImmunoCAP Specific IgE Direction for Use 52-5291 –EN/09, available at <https://dfu.phadia.com/Data/Pdf/5be441b889c2320848d6fb28.pdf>.
5. ImmunoCAP ISAC sIgE 112 test Directions for Use 81 0002 –62/02, available at thermofisher.com.
6. ALEX – Allergy Explorer Instruction for Use, available at www.macroarraydx.com