

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №_____засідання кафедри

від “_____” ____2026 р.

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАДИЦІЙНОЇ ТА
МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ДІАГНОСТИКИ АЛЕРГІЙ У КОНТЕКСТІ ССД-
ІНТЕРФЕРЕНЦІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біотехнології та
біоінженерія

Ніколаєнка Дмитра Олексійовича

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Скопенко О. В.

Робота виконана на базі ТОВ «МедЛаб» під керівництво завідувача
медичної лабораторії Пархомчук Карини Юріївни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ACIT	– алерген-специфічна імунотерапія;
IL	– інтерлейкіни;
BSA	– Bovine Serum Albumin (бичачий сироватковий альбумін);
CAP	– Cellulose Active Particle (активована целюлоза);
CCD	– cross-reactive carbohydrate determinant (крос-реактивна вуглеводна детермінанта);
CSR	– class-switch recombination (рекомбінація перемикання класів);
EAACI	– European Academy of Allergy and Clinical Immunology (Європейська академія алергології та клінічної імунології);
ELISA	– Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (імуноферментний аналіз);
FEIA	– Fluorescent Enzyme ImmunoAssay (флюоресцентний ферментний імуноаналіз);
IQR	– Interquartile Range (міжквартильний розмах (25–75-й перцентилі); міра розсіювання для непараметричних даних);
LoQ	– Limit of Quantitation (обмеження кількісної оцінки);
MUXF3	– специфічний маркер CCD-реактивності (бромелаїн — N-глікозильований протеїн ананаса з характерними ксилозо- та фукозовмісними детермінантами)
PBS	– Phosphate Buffered Saline (фосфатно-сольовий буфер);
RAST	– RadioAllergoSorbent Test (радіоалерсорбентний тест)

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Теоретичні основи сучасної алергодіагностики	6
1.1. Імунологія алергічних реакцій негайного типу	6
1.2. Характеристика алергенів та їх молекулярних компонентів	8
1.3. Крос-реактивність в алергології	10
1.4. Вплив CCD на результати in vitro алергодіагностики	13
1.5. Традиційні методи визначення специфічних IgE	15
1.6. Мультиплексна компонентна діагностика алергій.....	18
1.7. Алерген-специфічна імунотерапія	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	24
2.1. Характеристика досліджуваної групи осіб	24
2.2. Біологічний матеріал для дослідження.....	25
2.3. Мультикомпонентне визначення специфічних IgE.....	26
2.4. Моноплексна алергодіагностика ImmunoCAP на аналізаторі Phadia 100.....	30
2.6. Статистична обробка даних.....	35
РОЗДІЛ 3. Результати дослідження та обговорення	37
3.1. Загальний аналіз досліджуваної групи	37
3.2. Результати мультиплексної алергодіагностики методом ALEX ²	40
3.3. Результати діагностики специфічного IgE методом ImmunoCAP.....	45
3.4. Порівняльний аналіз результатів ALEX ² та ImmunoCAP	49
3.5. Верифікація CCD-інтерференції методом специфічного сироваткового інгібування	55
ВИСНОВКИ	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	62

ВСТУП

Алергічні захворювання належать до найпоширеніших хронічних патологій сучасності: за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я та Європейської академії алергології та клінічної імунології (ЕААСІ), на різні форми алергії страждає від 20 до 30% населення планети, а прогнози свідчать про подальше зростання цих показників упродовж наступних десятиліть. В Україні проблема набуває особливої гостроти з огляду на розширення спектра кліматично-пилкових сезонів, зростання урбанізації та змін у харчових звичках населення — факторів, що безпосередньо корелюють із підвищенням захворюваності на поліноз, харчову алергію та атопічний дерматит [1, 2].

Ефективна алергодіагностика є фундаментом раціональної терапії та первинної профілактики. Визначення специфічних IgE-антитіл (sIgE) до конкретних алергенних компонентів дозволяє не лише підтвердити факт сенсibilізації, але й встановити її молекулярний профіль — ідентифікувати причинно-значущі алергени, передбачити ризик перехресних реакцій і обґрунтувати показання до алерген-специфічної імунотерапії (АСІТ) [3]. Саме тому точність і надійність методів IgE-діагностики безпосередньо визначають якість клінічного рішення.

Донедавна золотим стандартом кількісного визначення sIgE залишався моноплексний метод ImmunoCAP, заснований на принципі твердофазного флюоресцентного імуноаналізу. Попри беззаперечну аналітичну надійність, метод має суттєве обмеження: він позбавлений вбудованого механізму розпізнавання перехресно-реактивних вуглеводних детермінант — CCD (Cross-Reactive Carbohydrate Determinants) [4, 5]. CCD є N-глікановими структурами рослинного та безхребетного походження, здатними індукувати специфічні IgE-антитіла без будь-якого клінічного значення; їхня присутність у складі глікозильованих алергенів (отрута комах, пилок бур'янів, харчові глікопротеїни) може спричиняти хибнопозитивні результати ImmunoCAP та суттєво ускладнювати клінічну інтерпретацію, зокрема при диференціації

алергії на бджолу та осу [6].

У відповідь на цю діагностичну проблему в клінічну практику впроваджено мультиплексні платформи молекулярної алергодіагностики, зокрема систему ALEX2. На відміну від ImmunoCAP, ALEX2 дозволяє одночасно визначати sIgE до понад 300 алергенних компонентів і містить вбудований маркер CCD-реактивності — MUXF3 (бромелайн), що робить можливою інтегровану діагностику CCD-інтерференції безпосередньо в ході аналізу. Однак питання щодо ступеня конкордантності між ALEX2 та ImmunoCAP, кількісної оцінки CCD-внеску у розбіжності між методами та клінічних наслідків таких розбіжностей залишаються недостатньо вивченими, особливо в умовах реальної алергологічної практики [5, 7].

Таким чином, метою роботи було порівняти діагностичну конкордантність методів ALEX2 та ImmunoCAP у визначенні специфічних IgE до алергенних компонентів різних груп та встановити клінічне значення CCD-інтерференції для інтерпретації профілю сенсibilізації у пацієнтів з алергічними захворюваннями.

Для досягнення мети було поставлено завдання:

1. охарактеризувати досліджувану групу пацієнтів за демографічними показниками, нозологічною структурою та клінічними параметрами;
2. визначити частоту та кількісні показники sIgE-сенсibilізації за алергенними компонентами методом ALEX2 та ImmunoCAP;
3. провести порівняльний аналіз конкордантності результатів ALEX2 та ImmunoCAP та виявити статистично значущу асиметрію розбіжностей;
4. верифікувати CCD-зумовлену хибнопозитивність методом специфічної сироваткової інгібіції у підгрупі MUXF3-позитивних пацієнтів;
5. провести клінічну рекласифікацію MUXF3-позитивних пацієнтів на підставі результатів блокадного тесту.

РОЗДІЛ 1

ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ СУЧАСНОЇ АЛЕРГОДІАГНОСТИКИ

1.1. Імунологія алергічних реакцій негайного типу

Термін "алергія" був визначений в 1906 році австрійським педіатром Клеменсом фон Пірке як підвищена здатність організму реагувати на чужорідну речовину. Сьогодні цей термін означає надчутливість до чужорідних речовини, які зазвичай не є шкідливими. Поряд з будь-якою генетичною схильністю, численні негенетичні фактори також відіграють певну роль, такі як вплив алергену, стан харчування, існуючі хронічні захворювання та гострі вірусні інфекції [5]. Атопія - це спадкова схильність до розвитку алергічних реакцій, таких як бронхіальна астма, риніт (сінна лихоманка) або дерматит (включаючи атопічну екзему) [1].

Найбільш частий прояв алергії супроводжується реакцією гіперчутливості I типу, при якій утворюються специфічні антитіла IgE. Симптоми (висип, набряк або свербіж), зазвичай, виникають незабаром після контакту з алергеном. Тому такого роду алергії також називають реакціями негайного типу [2, 6]. Як правило, алергени потрапляють до організму або з повітря через слизові оболонки (інгаляційна алергія), або шляхом прийому їжі (харчова алергія) [7].

Перший етап розвитку алергічної реакції — сенсibilізація — відбувається під час первинного контакту з алергеном. Антигенпрезентуючі клітини, зокрема дендритні клітини, захоплюють алерген, обробляють його та презентують пептидні фрагменти у комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності класу II (МНС II) на своїй поверхні [8]. Це призводить до активації наївних CD4+ Т-лімфоцитів і їх диференціації у Th2-клітини під впливом відповідного цитокінового мікрооточення. Th2-клітини

продукують цитокіни, серед яких ключову роль відіграють ІЛ-4 та ІЛ-13, що індують класове переключення В-лімфоцитів на синтез ІgЕ, а також ІЛ-5, який стимулює активацію еозинофілів [2, 5-8]. У результаті В-лімфоцити диференціюються у плазматичні клітини, що продукують алерген-специфічні ІgЕ, які зв'язуються з високоафінними FcεRI-рецепторами на поверхні тучних клітин і базофілів, формуючи стан сенсibiliзації [9].

Після етапу сенсibiliзації зазвичай настає фаза повторного контакту з алергеном, під час якої імунна відповідь реалізується інакшим шляхом. До місця запалення мігрують тучні клітини (мастоцити), які несуть на своїй поверхні Fc-рецептори, зв'язані зі специфічними ІgЕ. При взаємодії антигена з цими антитілами відбувається дегрануляція тучних клітин та вивільнення групи прозапальних медіаторів, що й обумовлює клінічні прояви алергічної реакції [10]. Одним із ключових первинних медіаторів є гістамін, який взаємодіє з H1-рецепторами, спричиняючи скорочення гладких м'язів бронхів, розширення та підвищення проникності судин. Крім гістаміну, тучні клітини виділяють вторинні прозапальні медіатори, зокрема цитокіни ІЛ-3, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6 та TNF, деякі з яких активують еозинофіли та протеази [11].

Водночас на мембрані тучних клітин відбуваються метаболічні перетворення арахідонової кислоти. Ліпоксигеназний шлях призводить до синтезу лейкотрієнів, тоді як циклооксигеназний каскад формує простагландини. Ці молекули беруть участь у локалізації запального процесу та контролі дії алергену. Наприклад, лейкотрієни LTB₄ та LTC₄ не лише спричиняють бронхоконстрикцію і пошкодження епітелію, подібно до гістаміну, але й залучають додаткові імунні клітини, такі як нейтрофіли та еозинофіли, навіть після зникнення алергену [12-15].

Окрім ранньої фази, алергічна реакція може супроводжуватися розвитком пізньої фази, яка виникає через кілька годин після первинної відповіді. Вона характеризується міграцією та накопиченням у тканинах еозинофілів, Th2-лімфоцитів і базофілів, що підтримують запальний процес. Еозинофіли, зокрема, виділяють цитотоксичні білки, які спричиняють

ушкодження тканин і сприяють хронізації алергічного запалення [9]. Саме ця фаза відіграє важливу роль у патогенезі тривалих алергічних захворювань.

Визначення специфічних IgE є ключовим інструментом лабораторної алергодіагностики, оскільки дозволяє ідентифікувати сенсibilізацію до конкретних алергенів без безпосереднього контакту пацієнта з ними [13, 16]. Водночас наявність специфічних IgE не завжди свідчить про клінічно значущу алергію, оскільки можливі випадки субклінічної сенсibilізації або перехресних реакцій. Особливу роль у цьому контексті відіграють крос-реактивні вуглеводні детермінанти, які можуть зумовлювати зв'язування IgE без реальної клінічної значущості, що ускладнює інтерпретацію результатів лабораторних досліджень [5].

Для корекції реакцій гіперчутливості першого типу застосовують різні фармакологічні підходи. Антигістамінні препарати блокують дію гістаміну, зменшуючи судинну проникність і бронхоспазм. Кортикостероїди використовують для зниження запальної відповіді, а епінефрин вводять внутрішньом'язово або внутрішньовенно при загрозі анафілактичного шоку, оскільки він звужує судини та запобігає критичним наслідкам [17]. Проте всі ці підходи є симптоматичними та не усувають причину захворювання. На сьогодні єдиним ефективним лікувальним методом алергії вважається алерген-специфічна імунотерапія, яка спрямована на довготривалу модифікацію імунної відповіді.

1.2. Характеристика алергенів та їх молекулярних компонентів

Алергени — це переважно білкові або глікопротеїнові молекули екзогенного походження, здатні індукувати IgE-опосередковану імунну відповідь у сенсibilізованих осіб. Їх джерелами є рослини (пилки, харчові продукти), тварини (епідермальні алергени, слина, секрет), кліщі домашнього пилу, мікроміцети, а також інсектні алергени. З імунологічної

точки зору, алерген визначається не лише своїм походженням, а передусім наявністю специфічних епітопів — ділянок молекули, які розпізнаються антитілами IgE [18]. Саме структура та доступність цих епітопів визначають алергенність речовини та її здатність викликати клінічно значущу реакцію.

Більшість клінічно значущих алергенів належить до обмеженої кількості білкових родин, що мають подібні структурні та функціональні властивості. До таких родин відносять PR-10 білки, профіліни, ліпокаліни, тропоміозини, запасні білки рослин (storage proteins), а також ферменти, зокрема протеази [17-19]. Наприклад, білки родини PR-10 (Bet v 1-гомологи) є характерними для пилоквих алергенів і багатьох рослинних харчових продуктів, вони термолабільні та легко руйнуються при термічній обробці, що пояснює розвиток переважно локальних симптомів, таких як оральний алергічний синдром. Натомість запасні білки, зокрема 2S-альбуміни та 7S/11S глобуліни, є термостабільними та резистентними до протеолізу, що асоціюється з більш тяжкими системними реакціями [20].

Алергени можуть існувати у вигляді екстрактів або окремих молекулярних компонентів. Екстракт алергену являє собою суміш різних білків та інших біомолекул, отриманих з природного джерела, і може містити як основні, так і мінорні алергени, а також домішки, включаючи глікани. Такий підхід традиційно використовується в алергодіагностиці, проте він має обмеження через варіабельність складу та наявність компонентів, що не мають клінічної значущості. На противагу цьому, молекулярна (компонент-резольвована) діагностика передбачає визначення IgE до окремих очищених або рекомбінантних алергенних компонентів, що дозволяє більш точно оцінити характер сенсibilізації та її клінічні наслідки [21-23].

З точки зору клінічної значущості, алергенні компоненти поділяють на основні (major) та мінорні (minor). Основні алергени розпізнаються IgE більш ніж у 50% сенсibilізованих пацієнтів і зазвичай відповідають за первинну сенсibilізацію. Мінорні алергени, навпаки, викликають імунну відповідь у меншій частці пацієнтів і часто беруть участь у перехресній реактивності.

Важливим є також поділ компонентів на маркери істинної сенсibilізації та маркери перехресної реактивності. Наприклад, специфічні компоненти кліщів домашнього пилу (Der p 1, Der p 2) або арахісу (Ara h 2) вважаються маркерами первинної сенсibilізації, тоді як профіліни чи PR-10 білки часто є причиною перехресних реакцій між пилком і харчовими алергенами [24].

Особливе місце серед молекулярних характеристик алергенів займає їх глікозилювання. Багато алергенів, особливо рослинного та інсектного походження, містять N-зв'язані олігосахаридні структури, які формують так звані крос-реактивні вуглеводні детермінанти (CCD). Ці структури можуть розпізнаватися IgE, однак у більшості випадків не мають клінічної значущості. Наявність CCD призводить до перехресного зв'язування антитіл з різними алергенами, що може викликати хибнопозитивні результати при лабораторній діагностиці, особливо при використанні екстрактних тест-систем [25].

Фізико-хімічні властивості алергенів також суттєво впливають на їх алергенність. До таких властивостей належать термостабільність, стійкість до ферментативного розщеплення, розчинність та здатність зберігати конформаційну структуру. Термолабільні білки зазвичай руйнуються при кулінарній обробці, що знижує їх алергенність, тоді як стабільні білки зберігають свою структуру і можуть викликати системні реакції навіть після термічного впливу. Крім того, конформаційні епітопи можуть втрачатися при денатурації білка, що впливає на результати діагностики залежно від типу використовуваного алергену (нативний чи рекомбінантний) [26].

1.3. Крос-реактивність в алергології

Крос-реактивність в алергології — це явище, при якому специфічні IgE зв'язуються з подібними епітопами, що присутні у різних алергенах, незалежно від їх джерела. Вона зумовлена структурною гомологією білків

або наявністю спільних антигенних детермінант і є однією з основних причин полісенсibilізації. У таких випадках пацієнт може мати позитивні результати до кількох алергенів без реального контакту з усіма з них, що ускладнює інтерпретацію лабораторної діагностики та може призводити до хибних клінічних висновків [3, 26]. Молекулярною основою крос-реактивності є наявність ідентичних або подібних епітопів, які можуть бути лінійними (визначаються амінокислотною послідовністю) або конформаційними (залежать від тривимірної структури білка). Здатність IgE до перехресного зв'язування визначається ступенем гомології між білками та афінністю антитіл. Чим вищий рівень структурної подібності, тим більша ймовірність виникнення крос-реакції [27, 28-30].

Найбільш поширеною є білкова (структурна) крос-реактивність, що виникає між гомологічними білками однієї родини. Класичним прикладом є перехресна реактивність між пилковими алергенами та рослинними харчовими продуктами, зумовлена білками родини PR-10 (гомологи Bet v 1), що лежить в основі орального алергічного синдрому. Профіліни виступають як паналергени, присутні у клітинах більшості рослин, і зумовлюють перехресну сенсibilізацію між пилком і харчовими продуктами. Тропоміозини, у свою чергу, є причиною крос-реактивності між алергенами кліщів домашнього пилу, ракоподібних і тарганів [19, 20]. Паналергени становлять окрему групу молекул із високим ступенем консервативності, що широко поширені у природі. До них належать профіліни, полкальцини, ліпокаліни та деякі ферменти. Сенсibilізація до цих білків часто супроводжується множинними позитивними результатами при тестуванні, однак у більшості випадків має низьку клінічну значущість і проявляється переважно локальними симптомами або їх відсутністю [31].

Окремим механізмом є CCD-опосередкована крос-реактивність, пов'язана з N-зв'язаними олігосахаридами глікопротеїнів (рис 1.1). Такі крос-реактивні вуглеводні детермінанти характерні для алергенів рослин, комах і паразитів. IgE можуть зв'язуватися з цими гліканами незалежно від білкової

частини алергену, що призводить до неспецифічного зв'язування антитіл із різними молекулами. У більшості випадків CCD-реактивність не має клінічної значущості, але є причиною хибнопозитивних результатів, особливо при використанні екстрактних тест-систем [5, 17, 26].

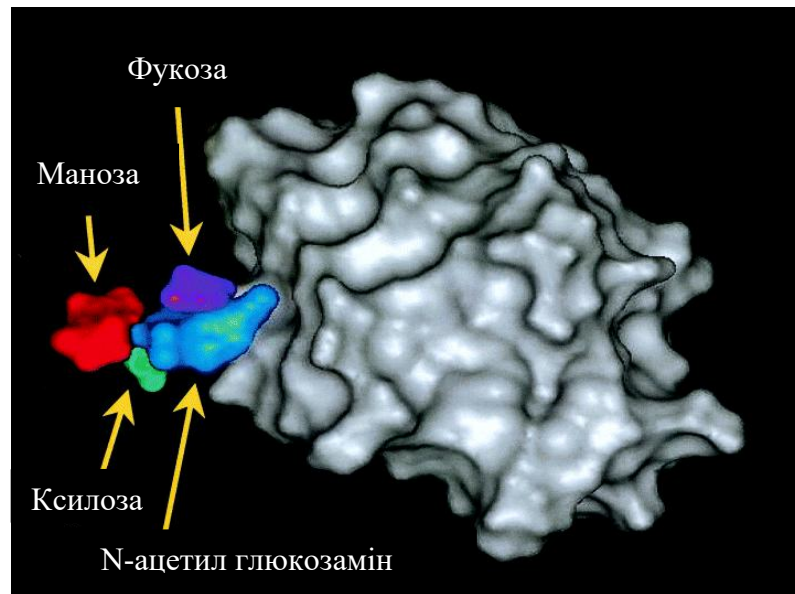


Рис 1.1. Тривимірна структура перехресно-реактивної вуглеводної детермінанти (CCD) (кольорові структури), показана як глікан, приєднаний до вихідного білка (лектин еритрину, сіра структура) [5]

Перші крос-реактивні вуглеводні детермінанти (CCD) були описані японськими дослідниками у 1979 році як N-зв'язані олігосахаридні структури типу олігоманоз, що містять залишки β 1,2-ксилози та α 1-3-фукози. Вони були ідентифіковані у складі бромелаїну — протеолітичного ферменту, виділеного з ананаса [27].

Подібні глікани були виявлені й у інших рослинних глікопротеїнах, зокрема у пероксидазі хрону та аскорбатоксидазі, які також здатні зв'язувати IgE та асоціюються з CCD різного походження [32]. Незважаючи на численні дослідження, клінічна значущість антитіл до CCD залишається дискусійною. Наразі відсутні переконливі докази їх суттєвого впливу на розвиток алергії до отрути комах, пилоквих алергенів або окремих харчових продуктів.

Водночас показано, що у пацієнтів із сенсibilізацією до пилюк дерев або деяких рослинних продуктів, таких як кипарис, томати чи селера, антитіла до CCD можуть бути асоційовані з розвитком алергічних реакцій [33-35].

У практиці лабораторної діагностики широко використовуються стандартизовані CCD-маркери, зокрема бромелайн, пероксидаза хрому та аскорбатоксидаза, які включаються до складу тест-систем для виявлення сенсibilізації до вуглеводних детермінант [26, 37].

1.4. Вплив CCD на результати *in vitro* алергодіагностики

Крос-реактивні вуглеводні детермінанти (CCD) є одним із ключових факторів, що знижують аналітичну специфічність *in vitro* методів визначення специфічних IgE. Їх вплив реалізується через неспецифічне зв'язування IgE з глікозильованими структурами алергенів, що призводить до появи позитивних результатів без клінічної кореляції. Це особливо характерно для методів, які використовують природні алергенні екстракти, що містять глікопротеїни з N-зв'язаними олігосахаридами [38].

Однією з основних проблем є формування множинних позитивних результатів при тестуванні, які не відповідають реальному профілю сенсibilізації пацієнта. Наприклад, у пацієнтів із наявністю анти-CCD IgE можуть одночасно визначатися позитивні результати до пилюкових алергенів (береза, амброзія), рослинних харчових продуктів (селера, томати) та отрути перетинчастокрилих, незважаючи на відсутність клінічних симптомів при контакті з більшістю з них. [5, 10, 39] Такий профіль є типовим проявом CCD-інтерференції і часто інтерпретується як полісенсibilізація, що не відповідає дійсності.

CCD-опосередковане зв'язування IgE зазвичай характеризується низькою афінністю та низькими концентраціями антитіл, що відображається у вигляді низькопозитивних або граничних значень результатів. У більшості

випадків такі значення знаходяться у межах класів 1–2 (залежно від системи оцінки), що ускладнює диференціацію між істинною сенсibilізацією та аналітичним артефактом. При цьому навіть незначна кількість анти-CCD IgE може взаємодіяти з великою кількістю глікозильованих алергенів, створюючи ефект «широкого спектра» реактивності [26, 40].

Важливим аспектом є залежність ступеня CCD-інтерференції від типу тест-системи. Методи, що використовують нативні екстракти (наприклад, твердофазні імуноаналізи), більш схильні до впливу CCD через наявність глікопротеїнів у складі алергену. Натомість використання рекомбінантних алергенів, отриманих у прокаріотичних системах експресії, дозволяє уникнути глікозилювання і, відповідно, зменшити неспецифічне зв'язування IgE. Це пояснює вищу аналітичну специфічність компонент-резольвованої діагностики у порівнянні з екстрактними методами [41-43].

У мультиплексних тест-системах вплив CCD може бути ще більш вираженим через одночасну присутність великої кількості алергенів на одному носії. У таких умовах анти-CCD IgE здатні зв'язуватися з багатьма компонентами одночасно, що призводить до формування складних профілів сенсibilізації з великою кількістю позитивних результатів. [29] Наприклад, при використанні мультиалергенних панелей у пацієнтів з анти-CCD антитілами часто спостерігається позитивність до широкого спектра рослинних алергенів, що не підтверджується клінічною симптоматикою [5, 18]. Для мінімізації впливу CCD-опосередкованої реактивності на результати алергодіагностики застосовують декілька підходів. Встановлено, що антитіла до CCD, як правило, виявляються лише в умовах *in vitro* і рідко корелюють із позитивними результатами шкірних тестів або провокаційних проб [43].

Особливої уваги потребує інтерпретація результатів у клінічній практиці. Наявність анти-CCD IgE може призводити до гіпердіагностики алергії, призначення необґрунтованих елімінаційних дієт або навіть відмови від необхідної алерген-специфічної імунотерапії. Це підкреслює необхідність використання додаткових діагностичних підходів, таких як компонентна

діагностика або функціональні тести, для підтвердження клінічної значущості сенсibilізації [37, 39].

Альтернативним методом є тест активації базофілів, який характеризується високою специфічністю і не реагує на CCD. Також ефективним підходом є використання компонент-резольвованої діагностики із застосуванням рекомбінантних або очищених алергенів, позбавлених глікозильованих епітопів, що не розпізнаються анти-CCD антитілами. Додатково можуть застосовуватися спеціальні блокуючі реагенти (CCD-інгібітори), які зв'язують антитіла до CCD та знижують рівень неспецифічного зв'язування в імуноаналізах [15, 16].

1.5. Традиційні методи визначення специфічних IgE

Визначення специфічних IgE є основою лабораторної діагностики алергічних реакцій першого типу. Класичні підходи включають шкірні проби (skin prick test, SPT), радіоалерсорбентний тест (RAST), твердофазні імуноферментні аналізи (ELISA) та сучасні автоматизовані системи, такі як ImmunoCAP. Кожен із цих методів має свої переваги та обмеження щодо чутливості, специфічності та практичного застосування [44, 45].

Шкірний прик-тест (SPT) є стандартним *in vivo* методом визначення сенсibilізації до алергенів, що базується на локальній IgE-опосередкованій реакції негайного типу. Процедура передбачає нанесення алергенного екстракту на шкіру та легке проколювання верхнього шару епідермісу для контакту з сенсibilізованими тучними клітинами, що призводить до утворення папули та еритеми через 15–20 хвилин, розмір якої корелює з рівнем специфічних IgE. Для контролю використовують позитивний (гістамін) та негативний (сольовий розчин) контроль. SPT дозволяє одночасно тестувати кілька алергенів, швидко оцінити сенсibilізацію та корелює з клінічними проявами, проте результати можуть бути

хибнонегативними при дерматологічних захворюваннях або прийомі антигістамінів, а також існує ризик локальних алергічних реакцій [15].

RAST (RadioAllergoSorbent Test) — це класичний *in vitro* метод визначення специфічних IgE до алергенів у сироватці крові пацієнта. Тест заснований на адсорбції алергену на тверду фазу, після чого додається сироватка пацієнта, і специфічні IgE зв'язуються з алергеном. Надалі до системи додають радіоактивно мічені анти-IgE антитіла, які дозволяють кількісно визначити рівень зв'язаних антитіл за допомогою радіоімунного детектора. RAST забезпечує високу специфічність та чутливість, дозволяючи одночасно досліджувати широкий спектр алергенів, включаючи харчові, побутові та пилокві, та мінімізує ризик анафілаксії, притаманний *in vivo* методам. Основні обмеження методу пов'язані з використанням радіоактивних ізотопів, необхідністю спеціалізованого обладнання та тривалим часом аналізу [3-5, 17].

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) є *in vitro* методом визначення специфічних IgE, що базується на ферментативно-маркованому імунологічному зв'язуванні. У класичному варіанті алерген адсорбується на тверду поверхню (мікропланшет), після чого додається сироватка пацієнта; специфічні IgE зв'язуються з алергеном. Потім вводять фермент-марковані анти-IgE антитіла, які при додаванні субстрату утворюють кольорову реакцію, інтенсивність якої пропорційна концентрації зв'язаних IgE. Метод забезпечує високу чутливість і специфічність, дозволяє кількісно оцінювати сенсibilізацію до окремих алергенів і може використовуватися як для монокомпонентних, так і для панельних тестів [15, 17].

На відміну від попередніх методів ImmunoCAP є сучасним золотим стандартом для *in vitro* визначення специфічних IgE і заснований на технології твердо-фазного ферментного імуносорбентного аналізу. У цій системі алерген фіксується на високопористому носії (ImmunoCAP), що забезпечує оптимальну площу поверхні для зв'язування антитіл. Сироватка пацієнта інкубується з носієм, і специфічні IgE при цьому зв'язуються з

алергеном. Надалі вводять фермент-марковані анти-IgE антитіла, які після додавання хромогенного субстрату генерують кольорову або флуоресцентну реакцію. Інтенсивність сигналу прямо пропорційна концентрації специфічних IgE у зразку, що дозволяє отримати кількісні результати з високою точністю (зазвичай у кілоунях на літр, kUA/L) [44, 46-48].

Однією з ключових переваг ImmunoCAP є можливість тестування як окремих алергенів, так і комплексних панелей, що охоплюють харчові, пилкові, побутові та тваринні алергени. Система дозволяє досліджувати сенсibilізацію до окремих молекулярних компонентів алергенів, що особливо важливо для ідентифікації клінічно значущих IgE та уникнення впливу перехресної реактивності, включно з CCD. Крім того, ImmunoCAP має високу репродукованість та стандартизовані порогові значення, що робить результати порівнянними між лабораторіями [47, 49].

Метод широко застосовується в клінічній практиці та наукових дослідженнях для оцінки ризику алергічних реакцій, планування алерген-специфічної імунотерапії та моніторингу ефективності лікування. Так наприклад у дослідженні Inal (2016) ImmunoCAP використовувався для моніторингу специфічних IgE та IgG4 у пацієнтів, що проходили алерген-специфічну імунотерапію. Результати показали зниження IgE/IgG4 співвідношення у пацієнтів, що добре реагували на терапію, що дозволяє використовувати ImmunoCAP для оцінки відповідності лікування. У дослідженні Hourihane та співавт. (2017) показано, що ImmunoCAP здатний відокремити істинну сенсibilізацію від перехресної, наприклад у випадках пилок-харчові перехресні реакції (бірч-плодовий синдром) [43]. Робота Poulsen et al. (2022) показала, що ImmunoCAP із компонент-резольвованим аналізом (CRD) дозволяє чітко відрізнити істинну сенсibilізацію до білків пилку *Bet v 1* від перехресної реактивності до харчових PR-10 білків. [44, 49] Це критично для уникнення неправильних рекомендацій щодо уникнення харчових продуктів у пацієнтів з пилковою алергією.

Точність і безпечність цього методу перевищують традиційні *in vivo*

методи, такі як SPT, оскільки виключають ризик анафілаксії. Основні обмеження ImmunoCAP — це відносно висока вартість та необхідність використання спеціалізованого обладнання, однак ці витрати компенсуються широкою діагностичною здатністю та можливістю високоточної кількісної оцінки специфічних IgE [44].

1.6. Мультиплексна компонентна діагностика алергій

Мультиплексна компонентна діагностика (МКД) — це сучасний підхід до лабораторної алергодіагностики, який дозволяє одночасно визначати сенсibilізацію до великої кількості алергенних компонентів у межах одного аналізу. На відміну від традиційних *singleplex*-методів (наприклад, ImmunoCAP, де кожний алерген аналізується окремо), мультиплексні системи дозволяють розгорнуто оцінити молекулярний профіль сенсibilізації пацієнта за один вимір. Основна ідея полягає в одночасному взаємодії сироватки пацієнта з десятками або сотнями алергенних молекул, що адсорбовані або іммобілізовані на твердій поверхні носія — чіпі, мікросфері чи іншій платформі [50].

Сучасні мультиплексні платформи побудовані на технологіях мікрочіпів або мікросфер (*bead-based*). Найбільш відомі та широко використані системи включають ISAC (*Immuno Solid-phase Allergen Chip*) та ALEX (*Allergy Explorer*). ISAC використовує стек нативних і рекомбінантних алергенних компонентів, що іммобілізовані в певному порядку на твердому носії в форматі мікрочіпу. Аналіз базується на флуоресцентному сигналі, що генерується при зв'язуванні специфічних IgE з компонентами чіпу [1]. ALEX реалізує твердофазну імуноферментну технологію з наступним одночасним вимірюванням IgE до великої панелі алергенів — більше ніж 300 в одній реакції — завдяки використанню кодування мікросфер [50, 51].

Основним клінічним завданням мультиплексної компонентної

діагностики є точна оцінка профілю сенсibilізації з ідентифікацією молекулярних компонентів, що дозволяє відрізнити істинну сенсibilізацію від перехресної реактивності та визначити потенційно клінічно значущі молекули. Це має вирішальне значення при складних випадках, коли пацієнт має множинні позитивні реакції або неясну клінічну картину. МКД особливо корисна у випадках полісенсibilізації до пилку, харчових продуктів, кліщів домашнього пилу, латексу та інсектних отрут [5, 52].

Одне з центральних застосувань мультиплексної діагностики — компонент-резольвована діагностика (CRD). CRD дозволяє ідентифікувати конкретні маркерні білки, наприклад Bet v 1 (головний алерген берези), Phl p 5 (основний алерген тимофіївки), Ara h 2 (ключовий білок арахісу), що мають вищу клінічну значущість, на відміну від білків, що викликають перехресну реакцію, таких як профіліни або PR-10. CRD дозволяє прогнозувати тяжкість реакції — наприклад, на відміну від загальних IgE до екстрактів, IgE до Ara h 2 корелюють із системними реакціями на арахіс, а не лише з контактними проявами [50].

У дослідженні Curin et al. (2020) ISAC був використаний для оцінки сенсibilізації у дітей із полісенсibilізацією до пилоквих, харчових та побутових алергенів. Дослідники показали, що молекулярні профілі, отримані за допомогою ISAC, дозволили відокремити маркерні компоненти (наприклад Phl p 1, Bet v 2) від паналергенів, що сприяло значно точнішій інтерпретації результатів порівняно зі стандартними екстрактними тестами. Цей підхід дозволив зменшити кількість хибнопозитивних висновків, що характерні для екстрактних панелей [49].

Інше дослідження, Lee et al. (2021), показало практичну користь застосування ALEX у пацієнтів із складними харчовими алергіями. Аналіз компонентів великої панелі алергенів дозволив виділити у групі пацієнтів характерні молекулярні патерни IgE, які корелювали з тяжкістю реакцій та клінічними симптомами. Зокрема, високі рівні IgE до Gly m 5 та Gly m 6 у пацієнтів із соєвою алергією асоціювалися з тяжкими системними реакціями,

що не було очевидно при використанні стандартних методів. Це підкреслює здатність мультиплексних систем виявляти профілі компонентної сенсibilізації з клінічною релевантністю [50].

МКД також використовується для аналізу сенсibilізації при укусах комах та анафілаксії невідомого генезу. У роботі *Vublin et al. (2019)* мультиплексна платформа дозволила ідентифікувати IgE до специфічних компонентів отрути перетинчастокрилих, що допомогло відрізнити пацієнтів із справжньою сенсibilізацією до *Hymenoptera* від тих, у кого позитивні результати були зумовлені перехресною реактивністю до CCD або білків харчових джерел. Це сприяло корекції діагнозу та плануванню відповідної імунотерапії [20, 51].

Серед загальних переваг мультиплексної компонентної діагностики слід відзначити економічність та ефективність: зменшення обсягу необхідної сироватки пацієнта (часто <100 мкл), можливість одночасного тестування >100 компонентів та отримання молекулярного профілю за одну реакцію. Використання рекомбінантних і раціонально очищених компонентів дозволяє уникнути неспецифічного зв'язування, включно із впливом CCD, підвищуючи специфічність і клінічну значущість результатів в порівнянні з традиційними екстрактними тестами [17, 53].

Водночас мультиплексні системи мають технічні нюанси: вищі вимоги до стандартизації, потребу у спеціалізованому обладнанні та експертній інтерпретації профілів IgE, що може вимагати додаткової кваліфікації лаборанта чи алерголога. Однак їх здатність деталізувати фенотип сенсibilізації пацієнта робить МКД незамінним інструментом сучасної алергодіагностики, особливо в складних клінічних випадках, що не піддаються інтерпретації традиційними методами [5].

1.7. Алерген-специфічна імунотерапія

Алерген-специфічна імунотерапія (АСІТ) є єдиним підтвердженим методом, який модифікує природний перебіг алергічних захворювань, спрямованим на індукцію імунної толерантності до конкретного алергену та зниження клінічних проявів. Основним імунологічним ефектом АСІТ є зниження продукції алерген-специфічного IgE та одночасне підвищення блокуючого IgG4, що зменшує доступність алергену для IgE-опосередкованої активації ефекторних клітин. Додатково АСІТ сприяє індукції регуляторних Т-лімфоцитів (Treg) та секреції імуномодулюючих цитокінів, таких як IL-10, що трансформує імунну відповідь від патогенетично активної Th2-орієнтованої реакції до більш толерантного профілю [54, 55].

Підбір релевантних алергенів для АСІТ значною мірою базується на сучасних лабораторних методах, зокрема ImmunoCAP та мультиплексних платформах, таких як ISAC та ALEX. ImmunoCAP дозволяє кількісно оцінювати специфічні IgE до окремих алергенних компонентів (наприклад Der p 1, Der p 2, Bet v 1, Phl p 5), що дозволяє диференціювати істинну сенсibilізацію від перехресної реактивності та уникати включення до терапії компонентів, що не мають клінічного значення. У дослідженні Yamamoto et al. (2020) визначення компонент-специфічних IgE за допомогою ImmunoCAP було використано для ідентифікації пацієнтів із кліщовою сенсibilізацією, які найкраще реагували на субкутанну АСІТ кліщів (HDM-SCIT), що корелювалося з клінічним поліпшенням симптомів і зниженням потреби в медикаментозному контролі стану [55, 56].

Ефективність АСІТ підтверджена не лише клінічними оцінками симптомів, а й імунологічними маркерами. У великому мультицентровому дослідженні Agache et al. (2021) ImmunoCAP використовувався для моніторингу динаміки специфічних IgE та IgG4 у пацієнтів із сезонною алергією на трав'яний пилок під час АСІТ [11]. Результати показали значне

зниження співвідношення IgE/IgG4, що корелювало зі зменшенням клінічних симптомів та зниженою потребою в симптоматичному лікуванні [56].

У сезонній алергічній риніті сублінгвальна АСІТ зарекомендувала свою ефективність у багатьох клінічних дослідженнях. У систематичному огляді Normansell et al. (2018) встановлено, що застосування сублінгвальної АСІТ проти пилку трав значно зменшує тяжкість сезонних симптомів і використання медикаментозних засобів у порівнянні з плацебо, а ImmunoCAP-визначені показники IgE дозволили стратифікувати пацієнтів за ризиком та покращити прогноз терапевтичної відповіді [57].

Одне з перспективних напрямків — використання АСІТ при харчовій алергії. У дослідженні Sampson et al. (2017) показано, що оральна АСІТ для дітей з алергією на арахіс підвищує толерантний поріг та знижує ризик реакцій при випадковому вживанні алергену. ImmunoCAP-визначення специфічних IgE до Ara h 2 дозволило стратифікувати пацієнтів, які мали найбільшу користь від терапії, та відрізнити тих, у кого високі рівні IgE були пов'язані з більш тяжкими реакціями [29, 58].

Окрім того, мультиплексні методи застосовуються для прогнозування та оптимізації АСІТ у пацієнтів з мультиплічними сенсibilізаціями. Наприклад, Curin et al. (2020) використали ISAC для виявлення профілів IgE, що дозволили диференціювати маркерні білкові компоненти від паналергенів у дітей із полісенсibilізацією, що у подальшому дозволило більш точно підібрати алергени для АСІТ і тим самим підвищити клінічну ефективність лікування [49, 58].

АСІТ має переваги, які виходять за рамки лише контролю симптомів. У дослідженні Luo et al. (2019) показано, що у пацієнтів з астмою, пов'язаною з кліщами домашнього пилу, проведення субкутаної АСІТ призводило до значного зниження частоти загострень та покращення показників контролю захворювання в довгостроковій перспективі, що підтверджує змінюючу природу терапії [59].

Важливою перевагою АСІТ є її здатність зменшувати медикаментозну

залежність та попереджувати прогресування алергічних захворювань. Пацієнти, що завершили курс АСИТ, часто демонструють значне зниження використання антигістамінних препаратів, кортикостероїдів та інгаляційних бронходилататорів. У дітей АСИТ також асоціюється зі зниженням ризику розвитку астми у пацієнтів із персистуючим алергічним ринітом, що було показано у контрольованих дослідженнях Marogna et al. (2019) [60].

Таким чином, ImmunoCAP і мультиплексні методи виступають не лише діагностичними інструментами, а й ключовими факторами для персоналізованого підбору алергенів та моніторингу ефективності АСИТ, що дозволяє не тільки контролювати симптоми, а й змінювати імунну відповідь та довготривало покращувати якість життя пацієнтів з алергічними захворюваннями. Водночас мультиплексні системи мають технічні нюанси: вищі вимоги до стандартизації, потребу у спеціалізованому обладнанні та експертній інтерпретації профілів IgE, що може вимагати додаткової кваліфікації лаборанта чи алерголога. Однак їх здатність деталізувати фенотип сенсibiliзації пацієнта робить МКД незамінним інструментом сучасної алергодіагностики, особливо в складних клінічних випадках, що не піддаються інтерпретації традиційними методами [53, 60].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика досліджуваної групи осіб

Задля проведення дослідження було сформовано групу з із 136 осіб різної вікової категорії. Основна мета полягала у паралельному застосуванні двох методів специфічної IgE-діагностики — мультиплексного (ALEX²) та моноплексного (ImmunoCAP) — до тих самих зразків крові з подальшим порівняльним аналізом їхніх результатів та оцінкою впливу CCD-інтерференції. Усі три серії аналізів (ALEX², ImmunoCAP без блокади, ImmunoCAP із CCD-блокадою) виконувались на матеріалі одних і тих самих пацієнтів, що забезпечило повну парність вимірювань та виключило вплив міжіндивідуальної варіабельності при міжметодовому порівнянні.

Критеріями включення у дослідження слугували:

- 1) вік від 18 до 65 років;
- 2) клінічно підтверджений або підозрюваний IgE-опосередкований алергічний стан (алергічний риніт / поліноз, бронхіальна астма, atopічний дерматит, харчова алергія або алергія на отруту комах);
- 3) наявність показань до специфічної IgE-діагностики за рішенням лікаря-алерголога;
- 4) відсутність системної кортикостероїдної терапії протягом щонайменше 4 тижнів до забору крові;
- 5) підписана форма інформованої згоди.

Критеріями виключення були:

- 1) вагітність та лактація;
- 2) первинний або вторинний імунодефіцит;
- 3) аутоімунні захворювання з порушенням синтезу або катаболізму імуноглобулінів;

- 4) прийом імунодепресантів або біологічних препаратів, зокрема анти-IgE-терапія (омалізумаб);
- 5) прийом антигістамінних препаратів менш ніж за 5 діб до забору крові;
- 6) недостатній об'єм зразка сироватки для проведення всіх трьох аналітичних серій (< 2,5 мл).

2.2. Біологічний матеріал для дослідження

Для дослідження використовувались зразки сироватки крові взятої шляхом венепункції. Забір біологічного матеріалу здійснювався кваліфікованим компетентним персоналом із дотриманням усіх правил щодо забору периферичної венозної крові, правил асептики та антисептики. Для уникнення факторів, які можуть вплинути на результати аналізів пацієнти строго дотримувались наступних правил:

- за 24 години виключили вживання алкоголю, надмірне фізичне навантаження, теплові процедури та вживання лікарських засобів, намагались уникнути також надмірного емоційного збудження;
- за 12 годин до проведення обстеження виключали з раціону прийом жирної та гострої їжі, вживання кави та міцного чаю, куріння;

Для отримання зразків сироватки крові використовували вакуумні пластикові пробірки типу Vacuette виробництва австрійської компанії Greiner Bio-One об'ємом 4,0 мл з активатором згортання – діоксидом кремнію, які повністю заповнювали зразком крові до спеціальної мітки [61]. Цей процес перебігає в спеціальній послідовності: спочатку відбувається забір крові у пробірку з активатором згортання, і лише потім у пробірку з антикоагулянтом. Після заповнення пробірок кров'ю їх перевертають певну кількість разів на 180° для повного перемішування з наповнювачем. Далі пробірки поміщають вертикально в штатив на 20-30 хв до повної взаємодії наповнювача з кров'ю. Дана реакція відбувається за кімнатної температури

(+20...+25°C), далеко від сонячного світла і приладів, які можуть виділяти тепло.

Процес відділення сироватки є результатом двоступеневого біохімічного процесу: згортання крові та ретракції (ущільнення) згустка. Під час першого етапу діоксид кремнію вступає в реакції коагуляційного каскаду, що призводить до утворення згустку крові. Після утворення згустку відбувається його ущільнення, яке осаджується за допомогою центрифугування. Дані пробірки центрифугували протягом 10 хвилин при 2000 g.

Для дослідження показників сироватки крові суворо забороняється використовувати гемолізний, хільозний та іктеричний біоматеріал. За наявності принаймні одної вищезазначеної ознаки – пацієнта запрошували на перезабір біологічного матеріалу [37].

Фактор втручання гемолізу у лабораторні дослідження пояснюється рядом феноменів, які включають вивільнення внутрішньоклітинного вмісту клітин крові (таким чином збільшуючи його концентрацію в досліджуваній сироватці), спектрофотометричні перешкоди, а також вивільнення активних речовин, які можуть заважати або викликати, неспецифічні реакції (наприклад, прокоагулянти, аденілаткіназа і гліколітичні ферменти), які інтерферують з результатами лабораторного дослідження [35, 37].

2.3. Мультикомпонентне визначення специфічних IgE

ALEX² (Macro Array Diagnostics GmbH (MADx), Австрія) - багатокомпонентний тест, який забезпечує одночасне визначення рівня антитіл до екстрактів алергенів та їх молекулярних компонентів в сироватці крові, і отримати практично повну картину сенсibilізації кожного пацієнта. Тест спроектовано на основі унікальних нанотехнологій, в який інтегровано потужний інгібітор перехресно-реактивних карбогідратних детермінант (CCDs), які взаємодіють з сироваткою крові під час інкубації, що дозволяє

отримати максимально точні кількісні результати рівня специфічних IgE в крові пацієнта. Ця особливість тесту ALEX² значно покращує рівень правильної і точної інтерпретації результатів аналізу у пацієнтів з сенсibilізацією до CCDs, чим, власне, підвищує специфічність методу [62].

Часто для встановлення достовірного діагнозу необхідним є проведення додаткових етапів діагностики, наприклад визначення рівня загального IgE. Тест ALEX² дозволяє сформувавши загальну картину сенсibilізації пацієнта, враховуючи аналіз на загальний IgE, що значно полегшує та прискорює діагностику алергії.

Для компонентної діагностики доступні 160 екстрактивних та 122 молекулярних алергенів. Вони включають в себе білкові молекули з різних груп білків, для яких характерна як висока, так і обмежена перехресна реактивність, а також абсолютно нові маркери алергії як рослинного, так і тваринного походження (наприклад, *Acarus siro*, *Malassezia sympodialis*, *Anisakis simplex*).

Система ALEX² є твердофазним імунологічним аналізом. Екстракти алергенів або молекулярні алергени, пов'язані з наночастинками, систематично осідають на твердій фазі, утворюючи макроскопічну матрицю.

Проведення аналізу розпочиналося з підготовки камери для інкубації. Для цього на дно інкубаційної камери розміщували паперові рушники та просочували деіонізованою водою. Далі кожному пацієнту призначався свій індивідуальний код, який відповідає номеру, що вказаний на тестовому картриджі. За допомогою спеціального тримача всі матриці були поміщені до інкубаційної камери. Наступним кроком було нанесення зразків сироватки на тестові картриджі. Для цього спочатку наносили 400 мкл ALEX² розчинника для зразків, не торкаючись мембрани, потім одразу наносили 100 мкл сироватки крові пацієнта та накривали камеру кришкою аби не втрачати рівень вологості. Інкубація зразків проходила на рокер-шейкері з кутом нахилу 8° зі швидкістю 8 об/хв впродовж 120 хв за кімнатної температури. На даному етапі відбувається зв'язування алергенів, зчеплених з

наночастинками, зі специфічними IgE (за умови їх наявності), а також блокування антитіл до CCD-вмісних алергенів за участі CCD-блокатора, який знаходиться в складі ALEX² буфера для розведення зразків. За умов стандартного протоколу інгібування CCD-антитіл (як описано вище) ефективність інгібування становить 85%. У разі потреби більшого пригнічення, рекомендовано проводити превентивне блокування шляхом додавання 100 мкл сироватки до 400 мкл розчину для розведення зразків в окремій ємності та подальшою інкубацією протягом 30 хв. Додатковий етап інгібування CCD забезпечує рівень пригнічення до 95%.

Після інкубації незв'язані компоненти видаляли промиванням. Для цього додавали 500 мкл готового розчину для промивання та витримували протягом 5 хв на рокер-шейкері за тих самих умов. Дану процедуру повторювали ще два рази, після чого додавали 500 мкл розчину кон'югату антитіл проти IgE людини з ферментом. Інкубували на шейкері протягом 30 хвилин за кімнатної температури із закритою кришкою камери. Після дії кон'югату проводили п'ятикратне промивання незв'язаних реагентів додаванням 500 мкл розчину для промивання. Кожне промивання проводили на рокер-шейкері за тих самих умов. Наступним кроком додавали 500 мкл розчину хромогенного субстрату та витримували 8 хв на рівній поверхні камери без коливань шейкера. Для зупинення реакції додавали 100 мкл стоп-розчину з наступним промиванням 500 мкл розчину для промивання на рокер-шейкері п з кутом нахилу 8° зі швидкістю 8 об/хв впродовж 30 с за кімнатної температури. Після завершення усіх маніпуляцій вміст тестових картириджив обережно зливали, промокували фільтрувальним папером та залишали на повітрі до повного висихання, щоб запобігти появі артефактів при зчитуванні результатів.

Процедура клінічного аналізу тестування продовжується формуванням зображення та його валідацією з використанням приладу ImageXplorer. До дослідницької підпанелі ALEX² було включено 22 алергенні компоненти, відібрані за двома принципами: (1) клінічна значущість для регіону (висока

поширеність відповідних алергічних захворювань); (2) різний ступінь CCD-ризиків — для забезпечення методологічно збалансованої вибірки між «CCD-ризиковими» та «CCD-стабільними» компонентами. Панель охоплює шість алергенних груп: пилок трав (Phl p 1, Phl p 5, Poa p), пилок дерев (Bet v 1, Aln g 1, Cor a 1), пилок бур'янів (Art v 1, Art v 3, Par j 2), харчові алергени (Ari g 1, Dau s 1, Ara h 2, Gal d 1, Bos d 8), алергени отрути комах (Ari m 1, Ari m 2, Ves v 5), побутові алергени та епідерміс тварин (Der p 1, Der p 2, Fel d 1, Can f 1), а також специфічний маркер CCD-реактивності MUXF3 (бромелаїн).

MUXF3 (бромелаїн — глікозилізований рослинний протеїн) є специфічним маркером перехресно-реактивних вуглеводних детермінант (CCD, Cross-Reactive Carbohydrate Determinants), включеним до стандартної панелі ALEX². Структура CCD представлена N-глікановими ланцюгами, що містять ксилозильні та фукозильні залишки (Lewis-подібні епітопи, характерні для рослин та безхребетних), і здатна індукувати специфічні IgE-антитіла, що не мають клінічного значення. Позитивний результат за MUXF3 ($\geq 0,30$ ISU-E) сигналізує про наявність таких антитіл і є підставою для критичної переоцінки позитивних результатів за глікозилізованими алергенами (отрута комах, бур'яни, харчові глікопротеїни) [62]. У цьому дослідженні MUXF3-статус використовувався як критерій стратифікації пацієнтів на «CCD-групу ризику» (MUXF3+) та референсну групу (MUXF3-), а також як показання до проведення CCD-блокадного тесту.

Кількісні результати ALEX² виражаються в одиницях ISU-E (ISAC Standardized Units for IgE), які є стандартизованими та відтворюваними між різними партіями чіпів. Порогом позитивності вважали концентрацію sIgE $\geq 0,30$ ISU-E, що відповідає рекомендаціям виробника та консенсусу EAACI щодо молекулярної алергодіагностики. Результати класифікували за чотирирівневою шкалою, наведеною у таблиці 2.1.

Класифікація результатів ALEX² за рівнем sIgE (ISU-E)

Клас	Рівень sIgE (ISU-E)	Ступінь реактивності	Інтерпретація
0	< 0,30	Негативний	Сенсибілізація не виявлена
1	0,30–1,00	Низький	Незначна сенсибілізація
2	1,01–5,00	Середній	Помірна сенсибілізація
3	5,01–15,00	Високий	Виражена сенсибілізація
4	> 15,00	Дуже високий	Масивна сенсибілізація

2.4. Моноплексна алергодіагностика ImmunoCAP на аналізаторі Phadia 100

ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific / Phadia AB, Упсала, Швеція) — це золотий стандарт кількісного визначення специфічних IgE у клінічній алергології, рекомендований EAACI, WAO та включений до більшості національних протоколів алергодіагностики. Метод базується на принципі твердофазного флюоресцентного імуноаналізу (FEIA — Fluorescent Enzyme ImmunoAssay): алерген ковалентно зв'язаний із активованою целюлозою всередині спеціальної пластикової капсули (CAP), що забезпечує виняткову поверхневу щільність алергену, мінімальну неспецифічну сорбцію та відтворюваність результатів. Кожна реакція аналізується індивідуально (моноплекс), що принципово відрізняє метод від мультиплексних платформ.

Аналізатор Phadia 100 є напівавтоматичною настільною системою, призначеною для алергологічних лабораторій із середнім потоком зразків.

Технічні характеристики: продуктивність — до 100 тестів на годину; діапазон вимірювання sIgE — 0,10–100 кМО/л (кілоодиниць на літр); коефіцієнт варіації (CV) — < 10% для внутрішньосерійної та < 15% для міжсерійної відтворюваності; об'єм зразка на один тест — 40 мкл сироватки. Калібрування системи виконується за допомогою шеститочкової калібрувальної кривої (набір Phadia CAP Calibrators). Контроль якості здійснюється щосеансово з використанням тривірневих контрольних матеріалів (Phadia QC Low/Medium/High); результати аналізу допускались до інтерпретації лише за умови відповідності контрольних значень допустимим межам [63].

Панель ImmunoCAP включала 21 алергенний компонент — ті самі, що використовувались на ALEX², за виключенням MUXF3. Такий підхід забезпечив максимальну відповідність панелей для коректного міжметодового порівняння. Усі алергенні CAP-реагенти є сертифікованими комерційними препаратами Thermo Fisher Scientific; кожен компонент тестувався індивідуально з окремою капсулою, що є специфічною особливістю моноплексного дизайну ImmunoCAP. Варто підкреслити, що іммобілізований у ImmunoCAP алерген часто є натуральним очищеним екстрактом або рекомбінантним білком, який може містити CCD-детермінанти, що і є основою для потенційної CCD-інтерференції. ImmunoCAP не має вбудованого механізму ідентифікації таких реакцій, на відміну від ALEX² із маркером MUXF3.

Аналіз виконували відповідно до стандартної операційної процедури Phadia 100. На першому етапі 40 мкл сироватки пацієнта інкубували з алергеном, зв'язаним із CAP-носієм, протягом 30 хвилин при кімнатній температурі; наявні в сироватці sIgE фіксувалися на іммобілізованому алергені. Після відмивання додавали ензимний кон'югат (анти-IgE-антитіла, мічені бета-галактозидазою) та інкубували 30 хвилин. Після повторного відмивання вносили флюорогенний субстрат (4-метилумбеліферил-бета-D-галактозид); інтенсивність флюоресценції продукту реакції (405 нм) прямо пропорційна концентрації sIgE та автоматично перераховувалась у кМО/л на

підставі внутрішньої калібрувальної кривої аналізатора. Результати реєструвались у базі даних Phadia 100 та експортувались у форматі CSV. Кількісні результати ImmunoCAP виражаються в одиницях кМО/л (кілоодиниць алергену на літр, еквівалентних kUA/L). Порогом позитивності вважали концентрацію sIgE $\geq 0,35$ кМО/л, що відповідає нижній межі класу 1 за стандартною шестикласовою системою Phadia/ISAC та є загальноприйнятим клінічним критерієм [63]. Результати класифікували відповідно до таблиці 2.2.

Слід зазначити принципову різницю між одиницями вимірювання двох методів: ImmunoCAP використовує кМО/л, що є біологічно каліброваною одиницею, прив'язаною до Міжнародного стандарту ВООЗ (WHO/IUIS IS 75/502); одиниці ALEX² (ISU-E) є внутрішньостандартизованими і не мають прямого числового еквіваленту у кМО/л, що унеможлиблює пряме кількісне порівняння абсолютних значень sIgE між платформами.

Таблиця 2.2

Класифікація результатів ImmunoCAP за рівнем sIgE (кМО/л)

Клас	Концентрація sIgE (кМО/л)	Рівень сенсibilізації	Клінічна інтерпретація
0	< 0,10	Негативний	Сенсibilізація відсутня
1	0,10–0,34	Сумнівний	Слабка реактивність, клінічне значення непевне
2	0,35–0,69	Низький	Низький рівень сенсibilізації
3	0,70–3,49	Середній	Помірна сенсibilізація

Клас	Концентрація sIgE (кМО/л)	Рівень сенсibiliзації	Клінічна інтерпретація
4	3,50–17,49	Високий	Виражена сенсibiliзація
5	17,50–49,99	Дуже високий	Значна сенсibiliзація
6	$\geq 50,00$	Надвисокий	Масивна сенсibiliзація

З цієї причини міжметодове зіставлення у цьому дослідженні здійснювалось виключно на рівні бінарних результатів (позитивний/негативний) та порівняння рангових показників, а не абсолютних концентрацій.

2.5. Процедура CCD-блокадного тесту

Для специфічної інгібіції CCD-реактивних IgE-антитіл використовували комерційний препарат CCD-Blocker (BIOMAY AG, Відень, Австрія) — єдиний сертифікований інгібітор CCD-реактивності, доступний для діагностичного застосування в країнах ЄС. Склад препарату: очищений N-глікозильований рослинний глікопротеїн (мікс природних CCD-антигенів рослинного та безхребетного походження) у стабілізуючому буфері PBS із BSA; концентрація активної речовини — 1 мг/мл [64]. Механізм дії: конкурентне насичення CCD-специфічних IgE сайтів надлишком вільних вуглеводних детермінант до контакту із твердофазним алергеном, що усуває CCD-обумовлений сигнал при подальшому ImmunoCAP-аналізі. Важливо підкреслити, що CCD-Blocker діє виключно на вуглеводно-специфічні IgE і не впливає на антитіла, спрямовані проти білкових епітопів алергенів, що

забезпечує специфічність блокади.

ССD-блокадний тест проводили для всіх пацієнтів із позитивним результатом за маркером MUXF3 на ALEX² (sIgE \geq 0,30 ISU-E), тобто для 31 пацієнта (22,8% від загальної групи $n = 136$). Відбір саме цієї підгрупи обумовлений тим, що позитивність MUXF3 є безпосереднім серологічним маркером ССD-реактивності та визначає підвищений ризик хибнопозитивних результатів для глікозильованих алергенів. Включення пацієнтів без MUXF3-позитивності у блокадний тест не мало б аналітичного обґрунтування та призвело б до невиправданих витрат реагентів і часу. Для кожного MUXF3-позитивного пацієнта 30 мкл сироватки змішували з 10 мкл ССD-Blocker (розведення 1:4 за інструкцією виробника для сироватки з передбачуваним класом ССD-реактивності 1–3), обережно перемішували та інкубували 60 хвилин при 37 °С у термошейкері з горизонтальним перемішуванням (300 об/хв). Після інкубації суміш безпосередньо використовувалась для постановки ImmunoCAP без додаткових кроків відмивання або розведення. Паралельно для кожного пацієнта тестували незаблоковану аліквоту в ідентичних умовах, що слугувало контролем для попарного порівняння результатів.

Панель ImmunoCAP для блокадного тесту включала 12 компонентів: 7 ССD-ризикових алергенів (Art v 1, Api g 1, Dau c 1, Api m 1, Api m 2, Ves v 5, Art v 3) та 5 ССD-стабільних алергенів як внутрішня референсна група (Phl p 1, Bet v 1, Der p 1, Der p 2, Fel d 1). Включення ССD-стабільних алергенів до панелі блокадного тесту мало принципове методологічне значення: відсутність змін у їхніх результатах після блокади підтверджувала специфічність дії ССD-Blocker та виключала неспецифічний вплив умов інкубації на рівень sIgE. Результат вважався «елімінованим» (ССD-зумовленим) за умови переходу sIgE-значення з позитивного (\geq 0,35 кМО/л) у негативний діапазон ($<$ 0,35 кМО/л) після застосування ССD-Blocker. Клінічно значущим зниженням рівня sIgE вважали редукцію \geq 50% від вихідного значення навіть за умови збереження технічної позитивності, що свідчить про

суттєвий CCD-компонент у загальному сигналі. Пацієнтів класифікували на три категорії: «виключно CCD-реактивність» — усі позитивні результати за CCD-ризиковими алергенами елімінуються блокадою; «змішана реактивність» — частина результатів зберігається, частина елімінується; «справжня сенсибілізація» — жоден результат не змінюється після блокади.

2.6. Статистична обробка даних

Усі статистичні розрахунки виконано у середовищі R (версія 4.3.2, R Foundation for Statistical Computing, Відень, Австрія) з використанням пакетів: irr (версія 0.84.1) — для розрахунку коефіцієнта каппа Коена; coin (версія 1.4) — для непараметричних тестів; ggplot2 (версія 3.4) та ggpubr — для статистичної візуалізації. Додаткову графічну обробку даних виконано засобами Python (версія 3.11) з бібліотеками matplotlib (версія 3.8), seaborn (версія 0.13) та matplotlib-venn (версія 0.11) [65].

Для кількісних змінних із нормальним розподілом (перевірка за критерієм Шапіро-Уїлка, $p > 0,05$) розраховували середнє арифметичне (M) та стандартне відхилення (SD); для змінних із ненормальним розподілом — медіану (Me) та міжквартильний розмах (IQR: 25–75-й перцентилі). Враховуючи типово правосторонньо асиметричний розподіл концентрацій sIgE, для всіх показників sIgE використовували медіану та IQR. Категоріальні змінні описували як абсолютні значення (n) та відсотки (%). При порівнянні груп за кількісними показниками нормальність розподілу перевіряли у кожній підгрупі окремо.

Для кількісної оцінки міжметодової узгодженості між ALEX² та ImmunoCAP застосовували коефіцієнт каппа Коена (κ) — стандартну статистичну міру конкордантності для двох незалежних бінарних вимірювань, яка враховує конкордантність, що виникає внаслідок випадковості. Для кожного алергенного компонента будували таблицю 2×2 та розраховували κ і

відсоток загальної згоди. Інтерпретацію к здійснювали відповідно до шкали Landis and Koch (1977): $\kappa < 0,20$ — слабка; $0,21-0,40$ — задовільна; $0,41-0,60$ — помірна; $0,61-0,80$ — суттєва; $0,81-1,00$ — Майже досконала узгодженість.

Для перевірки статистичної значущості спрямованості розбіжностей між методами застосовували критерій Мак-Немара (McNemar's chi-square test) для парних бінарних даних. Метод розраховує χ^2 на підставі кількості дискордантних пар: В (позитивний тільки за ALEX²) та С (позитивний тільки за ImmunoCAP): $\chi^2 = (B - C)^2 / (B + C)$. Тест виконували окремо для кожного алергенного компонента. Статистично значуща асиметрія ($p < 0,05$) свідчить про те, що один метод систематично більш «чутливий» щодо відповідного алергену — що в контексті цього дослідження інтерпретується як ймовірна CCD-інтерференція для ImmunoCAP.

Для оцінки статистичної значущості зміни рівнів sIgE до та після CCD-блокади використовували критерій Вілкоксона для парних вибірок (Wilcoxon signed-rank test) — непараметричний аналог парного t-тесту, що є методом вибору для ненормально розподілених концентраційних даних.

Для порівняння частот між підгрупами MUXF3-позитивних та MUXF3-негативних пацієнтів використовували критерій хі-квадрат (χ^2) Пірсона або точний двосторонній критерій Фішера.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Загальний аналіз досліджуваної групи

До дослідження було залучено 136 пацієнтів, які звернулись до медичної лабораторії впродовж 2024–2025 рр. Усі учасники підписали форму інформованої згоди. Як видно з таблиці 3.1, серед обстежених переважали особи жіночої статі — 79 пацієнтів (58,1%) проти 57 чоловіків (41,9%). Середній вік учасників склав $34,7 \pm 13,2$ року при медіані 33,0 року (IQR: 24,0–44,0). Найчисельнішою виявилась вікова група 26–35 років (38 осіб; 27,9%), що відповідає піку клінічної маніфестації IgE-опосередкованих алергічних захворювань. Частка пацієнтів зрілого та передстаршого віку (46–65 років) становила 25,0%, що свідчить про доцільність алергодіагностики у широкому віковому діапазоні.

Таблиця 3.1

Загальна демографічна характеристика досліджуваної групи (n = 136)

Показник	n (%) або M±SD	Діапазон / IQR
Загальна кількість пацієнтів	136 (100%)	—
Стать		
Жіноча	79 (58,1%)	—
Чоловіча	57 (41,9%)	—
Вік (роки)		
Середнє ± стандартне	$34,7 \pm 13,2$	18–65

Показник	n (%) або M±SD	Діапазон / IQR
відхилення		
Медіана (IQR)	33,0	24,0–44,0
Вікові групи		
18–25 років	31 (22,8%)	—
26–35 років	38 (27,9%)	—
36–45 років	33 (24,3%)	—
46–55 років	22 (16,2%)	—
56–65 років	12 (8,8%)	—

Примітка: M — середнє арифметичне; SD — стандартне відхилення; IQR — міжквартильний розмах (25-й – 75-й перцентилі).

Аналіз нозологічної структури групи (рис. 3.1) показав, що найбільшу частку склали пацієнти з алергічним ринітом / полінозом — 52 особи (38,2%). На другому місці за частотою — харчова алергія: 29 пацієнтів (21,3%). Атопічний дерматит діагностовано у 22 учасників (16,2%), інсектна алергія — у 19 (14,0%), бронхіальна астма — у 14 (10,3%). Така структура є репрезентативною для регіональної алергологічної практики та охоплює нозологічні форми з принципово різним спектром CCD-залежних і CCD-незалежних алергенів, що є методологічно важливим для мети цього дослідження.

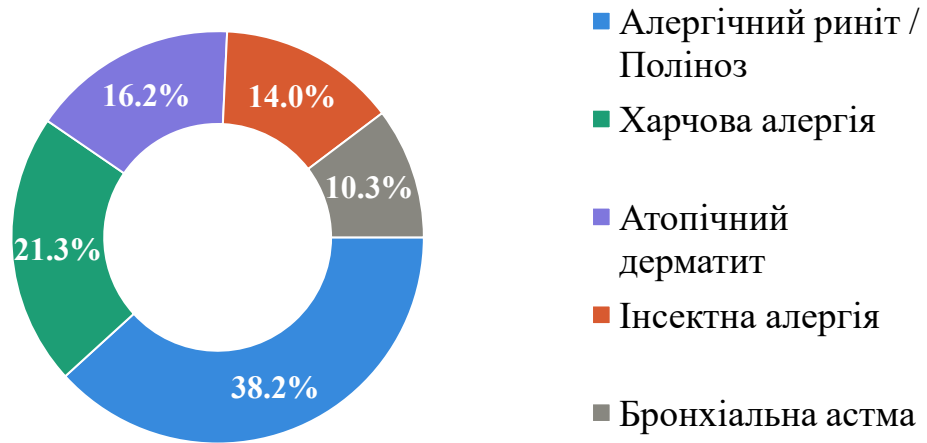


Рис. 3.1. Розподіл пацієнтів за основним клінічним діагнозом (n = 136)

За даними таблиці 3.2, більшість пацієнтів страждали від алергічного захворювання більше 1 року: тривалість 1–5 років зафіксована у 47 осіб (34,6%), 5–10 років — у 43 (31,6%), понад 10 років — у 28 (20,6%). Лише 18 учасників (13,2%) мали анамнез менше 1 року, що підтверджує хронічний характер патології в обстеженій когорті. Обтяжений сімейний алергологічний анамнез виявлено у 89 пацієнтів (65,4%), що узгоджується з відомими даними про спадкову схильність до атопії. Більш ніж половина учасників (78 осіб; 57,4%) проходила алергологічну діагностику повторно, що свідчить про актуальність переобстеження при зміні клінічної картини або для уточнення профілю сенсibilізації. На момент включення 97 пацієнтів (71,3%) приймали антигістамінні препарати, які були своєчасно відмінені відповідно до протоколу дослідження. Рівень загального IgE виявився підвищеним у переважної більшості учасників: помірне підвищення (100–500 кМО/л) зафіксовано у 68 осіб (50,0%), значне (> 500 кМО/л) — у 47 (34,6%); у нормі показник залишався лише у 21 пацієнта (15,4%). Ці дані підтверджують атопічний характер захворювань у досліджуваній групі та обґрунтовують доцільність мультиплексної IgE-діагностики.

Таблиця 3.2

Клінічна характеристика пацієнтів досліджуваної групи (n = 136)

Показник	n	%
Тривалість захворювання		
Менше 1 року	18	13,2%
1–5 років	47	34,6%
5–10 років	43	31,6%
Понад 10 років	28	20,6%
Обтяжений сімейний алергологічний анамнез		
Так	89	65,4%
Ні	47	34,6%
Попередня алергологічна діагностика		
Первинне обстеження	58	42,6%
Повторне обстеження	78	57,4%
Антигістамінна терапія на момент обстеження		
Відміна ≥ 5 діб до забору	97	71,3%
Не застосовували	39	28,7%
Рівень загального IgE		
В межах норми (< 100 кМО/л)	21	15,4%
Помірно підвищений (100–500 кМО/л)	68	50,0%
Значно підвищений (> 500 кМО/л)	47	34,6%

3.2. Результати мультиплексної алергодіагностики методом ALEX²

Мультиплексне дослідження специфічних IgE (sIgE) до 22 алергенних

компонентів проводили за допомогою системи ALEX² (Macro Array Diagnostics, Австрія).

За результатами ALEX², позитивний профіль sIgE ($\geq 0,30$ кМО/л за хоча б одним компонентом) виявлено у 98 із 136 обстежених пацієнтів, що становить 72,1%. У решти 38 пацієнтів (27,9%) результат за всіма 22 компонентами панелі виявився негативним. Детальна характеристика частоти сенсibilізації за кожним алергенним компонентом із розподілом за нозологічними групами наведена у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

**Частота сенсibilізації за алергенними компонентами панелі ALEX²
(n = 136)**

Алерген	Біологічне джерело	n	%
Пилок трав			
Phl p 1	Тимофіївка лучна	61	44,9%
Phl p 5	Тимофіївка лучна	48	35,3%
Poa p	Мітлиця / Мятлик лучний	43	31,6%
Пилок дерев			
Bet v 1	Береза бородавчаста	52	38,2%
Aln g 1	Вільха сіра	44	32,4%
Cor a 1	Ліщина звичайна	38	27,9%
Пилок бур'янів			
Art v 1	Полин звичайний	37	27,2%
Art v 3	Полин	19	14,0%

Алерген	Біологічне джерело	n	%
Par j 2	Постінок	12	8,8%
Харчові алергени			
Ari g 1	Селера	22	16,2%
Dau c 1	Морква	18	13,2%
Ara h 2	Арахіс	14	10,3%
Gal d 1	Овомукоїд	12	8,8%
Bos d 8	Казеїн	9	6,6%
Отрута комах			
Ari m 1	Фосфоліпаза A2	24	17,6%
Ari m 2	Гіалуронідаза	18	13,2%
Ves v 5	Антиген 5 (оса звичайна)	19	14,0%
Побутові алергени та епідерміс тварин			
Der p 1	Dermatophagoides pteronyssinus	47	34,6%
Der p 2	D. pteronyssinus (ізоалерген)	39	28,7%
Fel d 1	Кішка свійська	31	22,8%
Can f 1	Собака свійський	24	17,6%
CCD-маркер			
MUXF3	Бромелаїн	31	22,8%
≥1 позитивний результат за будь-яким алергеном		98	72,1%

Серед пилкових алергенів найвища частота сенсibilізації зафіксована до Phl p 1 (тимофіївка лучна) — 61 пацієнт (44,9%), що відображає провідну роль злакових трав у структурі полінозу в регіоні. Другим за значущістю пилковим алергеном виявився Bet v 1 (береза бородавчаста) — 52 особи (38,2%), що узгоджується з високою поширеністю берези в дендрофлорі України та відомим феноменом пилкового синдрому берези (PR-10/Bet v 1-асоційований синдром). Серед побутових алергенів домінував Der p 1 (47 осіб; 34,6%), що підтверджує значущість алергії на кліщів домашнього пилу, особливо у пацієнтів з atopічним дерматитом та бронхіальною астмою.

Алергени отрути комах виявились позитивними у 24 пацієнтів для Api m 1 (17,6%) та у 19 — для Ves v 5 (14,0%), що відповідає очікуваній частоті інсектної сенсibilізації в загальній алергологічній практиці. Серед харчових алергенів найвищу частоту продемонстрував Api g 1 (селера) — 22 пацієнти (16,2%), що може бути частково зумовлено CCD-реактивністю в контексті полінозу трав (синдром «морква–селера–береза–полін»).

Аналіз ступеня полісенсibilізації серед 98 ALEX²-позитивних пацієнтів показав переважання помірної полісенсibilізації (2–4 алергени) — 37 осіб (37,8% серед позитивних). Виражена полісенсibilізація (5–9 компонентів) зареєстрована у 31 пацієнта (31,6%). Моносенсibilізація виявлена у 18 осіб (18,4%), що відповідає даним літератури про відносно рідкісну ізольовану сенсibilізацію в дорослих пацієнтів з тривалим перебігом алергічних захворювань. Масивна полісенсibilізація (≥ 10 компонентів) зафіксована у 12 пацієнтів (12,2% серед позитивних).

Загалом, більшість ALEX²-позитивних пацієнтів (81,6%) виявляли сенсibilізацію до 2 і більше компонентів, що підкреслює значущість мультиплексного підходу для виявлення повного профілю сенсibilізації та необхідність диференціації справжньої полісенсibilізації від псевдополісенсibilізації, зумовленої CCD-реактивністю.

Маркер перехресно-реактивних вуглеводних детермінант MUXF3 (бромелаїн) виявився позитивним у 31 пацієнта, що становить 22,8% від усієї

групи та 31,6% від 98 ALEX²-позитивних пацієнтів. Ці пацієнти формують так звану CCD-групу ризику, оскільки наявність sIgE до MUXF3 свідчить про потенційну клінічно незначущу перехресну реактивність, яка може призводити до хибнопозитивних результатів щодо ряду глікозильованих алергенів. Детальну характеристику MUXF3-позитивних пацієнтів відображено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Характеристика MUXF3-позитивних пацієнтів (CCD-група ризику),

n = 31

Характеристика	n	% (від 31 MUXF3+)
Загальна к-ть MUXF3+ пацієнтів	31	22,8% від 136
Клас sIgE за MUXF3		
Клас 1 (0,10–0,34 кМО/л)	8	25,8%
Клас 2 (0,35–0,69 кМО/л)	9	29,0%
Клас 3 (0,70–3,49 кМО/л)	11	35,5%
Клас 4 (3,50–17,49 кМО/л)	3	9,7%
Ко-сенсibiliзація (поєднання з іншими алергенами)		
З пилковими алергенами	28	90,3%
З алергенами отрути комах	19	61,3%
З харчовими CCD-ризиковими алергенами	17	54,8%
Ізольована MUXF3-позитивність	3	9,7%
Медіана sIgE MUXF3 (кМО/л) [IQR]		1,8 [0,6–5,2]

Переважає більшість MUXF3-позитивних пацієнтів (90,3%) мали одночасну сенсibilізацію до пилоквих алергенів, що відповідає відомому зв'язку між CCD-реактивністю та полінозом. Клінічно важливою є значна частка ко-сенсibilізації з алергенами отрути комах — 61,3% (19 пацієнтів): наявність sIgE до *Ari m 1* та/або *Ves v 5* на тлі MUXF3-позитивності потребує обов'язкової диференціальної діагностики, оскільки CCD-зумовлена реактивність може симулювати справжню інсектну сенсibilізацію та призводити до хибного призначення алерген-імунотерапії. Ізольовану MUXF3-позитивність без жодного іншого позитивного компонента виявлено лише у 3 пацієнтів (9,7%).

Кількісний аналіз рівнів sIgE серед позитивних пацієнтів виявив найвищі медіанні значення для алергенів кліщів домашнього пилу: *Der p 1* — 8,3 кМО/л (IQR: 2,8–24,1) та *Der p 2* — 7,2 кМО/л (IQR: 2,1–19,3), що свідчить про виражену клінічну значущість кліщової сенсibilізації. Серед пилоквих алергенів максимальні значення спостерігались для *Bet v 1* — 6,1 кМО/л (IQR: 2,3–18,7) і *Phl p 1* — 4,8 кМО/л (IQR: 1,9–14,2). Показово, що медіанний рівень sIgE для MUXF3 становив лише 1,8 кМО/л (IQR: 0,6–5,2) і переважно перебував у межах класів 1–3, тоді як клінічно значущі алергени демонстрували вищі значення.

3.3. Результати діагностики специфічного IgE методом ImmunoCAP

Дослідження специфічних IgE (sIgE) методом ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific / Phadia, Швеція) проводили для тих самих 136 пацієнтів за переліком із 21 алергенного компонента. Від панелі ALEX² відрізняється відсутністю маркера MUXF3, який є специфічним внутрішнім контролем CCD-реактивності системи ALEX² і не входить до стандартної лінійки ImmunoCAP. Забір крові та підготовка зразків виконувались відповідно до умов, описаних у розділі «Матеріали і методи». Порогом позитивності вважали концентрацію

sIgE \geq 0,35 кМО/л, що відповідає класу 1 за стандартною класифікацією виробника. Усі аналізи виконано в умовах одного аналітичного сеансу у режимі одноразового вимірювання.

За результатами ImmunoCAP позитивний профіль sIgE (\geq 0,35 кМО/л за хоча б одним компонентом) виявлено у 101 зі 136 обстежених пацієнтів, що становить 74,3%. У решти 35 пацієнтів (25,7%) результат за всіма 21 компонентами панелі виявився негативним. Детальна характеристика частоти сенсibilізації за кожним алергенним компонентом із розподілом за нозологічними групами наведена у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

**Частота сенсibilізації за алергенними компонентами методом
ImmunoCAP (n = 136)**

Алерген	Біологічне джерело	n	%
Пилок трав			
Phl p 1	Тимофіївка лучна	63	46,3%
Phl p 5	Тимофіївка лучна	46	33,8%
Poa p	Мітлиця / Мятлик лучний	41	30,1%
Пилок дерев			
Bet v 1	Береза бородавчаста	51	37,5%
Aln g 1	Вільха сіра	43	31,6%
Cor a 1	Ліщина звичайна	37	27,2%
Пилок бур'янів			
Art v 1	Полин звичайний	44	32,4%

Алерген	Біологічне джерело	n	%
Art v 3	Полин	21	15,4%
Par j 2	Постінок	13	9,6%
Харчові алергени			
Ari g 1	Селера	29	21,3%
Dau c 1	Морква	24	17,6%
Ara h 2	Арахіс	14	10,3%
Gal d 1	Овомукоїд	12	8,8%
Bos d 8	Казеїн	9	6,6%
Отрута комах			
Ari m 1	Фосфоліпаза A2	32	23,5%
Ari m 2	Гіалуронідаза	27	19,9%
Ves v 5	Антиген 5 (оса звичайна)	24	17,6%
Побутові алергени та епідерміс тварин			
Der p 1	Dermatophagoides pteronyssinus	46	33,8%
Der p 2	D. pteronyssinus (ізоалерген)	38	27,9%
Fel d 1	Кішка свійська	30	22,1%
Can f 1	Собака свійський	23	16,9%
≥1 позитивний результат за будь-яким алергеном		101	74,3%

Серед пилкових алергенів найвищу частоту сенсibilізації зафіксовано до Phl p 1 (тимофіївка лучна) — 63 пацієнти (46,3%), що підтверджує провідну роль злакових трав у структурі полінозу. На другому місці — Bet v 1 (береза бородавчаста): 51 пацієнт (37,5%), що відображає широку поширеність берези в дендрофлорі регіону та закономірну роль Bet v 1-асоційованого пилкового синдрому. Серед бур'янів найчастішим виявився Art v 1 (полин звичайний) — 44 пацієнти (32,4%).

Серед побутових алергенів домінував Der p 1 (кліщ *D. pteronyssinus*) — 46 осіб (33,8%), що підкреслює значущість побутової сенсibilізації, насамперед у пацієнтів з atopічним дерматитом та бронхіальною астмою. Серед харчових алергенів найбільшу частоту показав Api g 1 (селера) — 29 пацієнтів (21,3%), дещо менше — Dau s 1 (морква): 24 особи (17,6%). Для алергенів отрути комах позитивний результат зафіксовано у 32 пацієнтів для Api m 1 (23,5%), 27 — для Api m 2 (19,9%) та 24 — для Ves v 5 (17,6%).

Аналіз ступеня полісенсibilізації серед 101 ImmunoCAP-позитивного пацієнта виявив переважання помірної полісенсibilізації (2–4 алергени) — 38 осіб (37,6% серед позитивних). Виражену полісенсibilізацію (5–9 компонентів) зареєстровано у 33 пацієнтів (32,7%). Моносенсibilізацію виявлено у 16 осіб (15,8%), масивну полісенсibilізацію (≥ 10 алергенів) — у 14 (13,9%).

Загалом 84,2% ImmunoCAP-позитивних пацієнтів виявляли сенсibilізацію до двох і більше компонентів. Масивна полісенсibilізація (≥ 10 алергенів) зафіксована у 14 пацієнтів, що складає 10,3% від усієї групи дослідження. Такий розподіл є характерним для дорослої алергологічної практики з переважанням хронічних полісенсibilізованих пацієнтів.

Кількісний аналіз рівнів sIgE серед позитивних пацієнтів підтвердив провідну роль алергенів кліщів домашнього пилу: медіана для Der p 1 становила 9,1 кМО/л (IQR: 3,2–26,4), для Der p 2 — 7,8 кМО/л (IQR: 2,4–21,7). Серед пилкових алергенів найвищі медіанні значення зафіксовано для Bet v 1 — 6,4 кМО/л (IQR: 2,5–19,2) та Phl p 1 — 5,2 кМО/л (IQR: 2,1–15,8), що

відображає виражений ступінь сенсibilізації до цих компонентів.

Алергени отрути комах продемонстрували помірні медіанні рівні sIgE: для *Ari m 1* — 4,1 кМО/л (IQR: 1,4–14,2), для *Ves v 5* — медіана у межах класу 3. Серед харчових алергенів найнижчі медіанні значення відзначено для *Ari g 1* — 2,6 кМО/л (IQR: 0,8–7,4) та *Dau s 1*, що може відображати як відносно нижчий ступінь справжньої сенсibilізації, так і специфіку аналітичної реакції платформи для цих компонентів. Широкий міжквартильний розмах для більшості алергенів свідчить про значну індивідуальну варіабельність рівнів sIgE в обстеженій групі.

3.4. Порівняльний аналіз результатів ALEX² та ImmunoCAP

Для кількісної оцінки узгодженості між методами ALEX² та ImmunoCAP використовували коефіцієнт каппа Коена (κ) як стандартну міру конкордантності для двох незалежних бінарних вимірювань. Відповідно до шкали Landis and Koch (1977): $\kappa < 0,20$ — слабка; 0,21–0,40 — задовільна; 0,41–0,60 — помірна; 0,61–0,80 — суттєва; 0,81–1,00 — Майже досконала узгодженість. Для оцінки асиметрії розбіжностей між методами застосовували критерій Мак-Немара (McNemar's chi-square test); розбіжності вважались статистично значущими при $p < 0,05$. Всі розрахунки виконано у програмному середовищі R (версія 4.3).

Зведено таблицю 2×2 (табл. 3.6), що відображає розподіл конкордантних і дискордантних результатів між ALEX² та ImmunoCAP за загальною бінарною ознакою (позитивний/негативний за будь-яким алергеном). Загальна відсоткова згода між методами становила 91,9% (125/136 пацієнтів). Коефіцієнт κ для загальної бінарної конкордантності: $\kappa = 0,794$ (суттєва узгодженість). Критерій Мак-Немара для загальної таблиці 2×2: $\chi^2 = 0,82$ ($B = 4$, $C = 7$), $p = 0,366$ — загальна асиметрія розбіжностей статистично незначуща.

Таблиця 3.6

Загальна таблиця конкордантності ALEX² vs ImmunoCAP (n = 136)

	ImmunoCAP позитивний	ImmunoCAP негативний	Всього
ALEX ² позитивний	94 (A)	4 (B)	98
ALEX ² негативний	7 (C)	31 (D)	38
Всього	101	35	136

Для кожного з 21 алергенного компонента побудовано таблицю 2×2 та розраховано карра-коефіцієнт і відсоток згоди (табл. 3.7). Колірне кодування відображає рівень узгодженості: зелений — Майже досконала ($\kappa \geq 0,81$), жовтий — суттєва ($\kappa 0,61-0,80$).

Таблиця 3.7

Конкордантність ALEX² vs ImmunoCAP за кожним алергенним компонентом (n = 136)

Алерген	ALEX ² +	IC+	A	D	B	C	%	κ
Пилок трав								
Phl p 1	61	63	59	71	2	4	95.6	0.911
Phl p 5	48	46	44	86	4	2	95.6	0.903
Poa p	43	41	39	91	4	2	95.6	0.891
Пилок дерев								

Алерген	ALEX ²⁺	IC+	A	D	B	C	%	κ
Bet v 1	52	51	50	83	2	1	97.8	0.953
Aln g 1	44	43	42	91	2	1	97.8	0.948
Cor a 1	38	37	36	97	2	1	97.8	0.951
Пилок бур'янів								
Art v 1	37	44	35	90	2	9	91.9	0.807
Art v 3	19	21	17	113	2	4	95.6	0.803
Par j 2	12	13	11	122	1	2	97.1	0.874
Харчові алергени								
Api g 1	22	29	20	105	2	9	91.9	0.735
Dau c 1	18	24	17	111	1	7	94.1	0.775
Ara h 2	14	14	13	121	1	1	98.5	0.930
Gal d 1	12	12	11	123	1	1	98.5	0.921
Bos d 8	9	9	8	127	1	1	99.3	0.941
Отрута комах								
Api m 1	24	32	22	102	2	10	91.2	0.732
Api m 2	18	27	16	107	2	11	89.7	0.655
Ves v 5	19	24	18	111	1	6	94.9	0.809
Побутові / епідерміс тварин								
Der p 1	47	46	45	88	2	1	97.8	0.952
Der p 2	39	38	37	96	2	1	97.8	0.947
Fel d 1	31	30	29	104	2	1	97.8	0.950

Алерген	ALEX ²⁺	IC+	A	D	B	C	%	к
Can f 1	24	23	22	111	2	1	97.8	0.946
Сума по алергенах	631	667	591	2150	40	76	—	—

Примітка: А (обидва+) — обидва методи позитивні; D (обидва-) — обидва негативні; В — позитивний тільки ALEX²; С — позитивний тільки ImmunoCAP. Зелений фон к — Майже досконала узгодженість ($\geq 0,81$); жовтий — суттєва (0,61–0,80).

Аналіз таблиці 3.7 виявив чітку залежність між CCD-ризиком алергену та рівнем міжметодової конкордантності. Для CCD-стабільних алергенів — кліщів домашнього пилу (Der p 1: $\kappa = 0,952$; Der p 2: $\kappa = 0,947$), епідермісу тварин (Fel d 1: $\kappa = 0,950$; Can f 1: $\kappa = 0,946$), харчових білків (Ara h 2: $\kappa = 0,930$; Gal d 1: $\kappa = 0,921$; Bos d 8: $\kappa = 0,941$) та PR-10-алергенів пилку дерев (Bet v 1: $\kappa = 0,953$; Aln g 1: $\kappa = 0,948$; Cor a 1: $\kappa = 0,951$) — конкордантність відповідає рівню «Майже досконала» ($\kappa > 0,90$) із відсотком згоди $\geq 97,8\%$.

Натомість для CCD-залежних алергенів зафіксовано суттєве зниження κ : Арі m 2 (гіалуронідаза бджоли) — $\kappa = 0,655$; Арі m 1 (фосфоліпаза А2) — $\kappa = 0,732$; Арі g 1 (селера) — $\kappa = 0,735$; Дау с 1 (морква) — $\kappa = 0,775$. Ці чотири компоненти характеризуються найнижчою конкордантністю серед усієї панелі та відносяться до алергенів з найвищим задокументованим вмістом N-глікозилізованих детермінант. Показово, що відхилення переважно спрямовані в один бік: «тільки IC+» суттєво переважає над «тільки ALEX²⁺» для всіх шести CCD-залежних компонентів.

Критерій Мак-Немара виявив статистично значущу асиметрію розбіжностей для п'яти алергенів: Арі m 2 ($\chi^2 = 6,23$; $p = 0,013$), Арі m 1 ($\chi^2 = 5,33$; $p = 0,021$), Art v 1 ($\chi^2 = 4,45$; $p = 0,035$), Арі g 1 ($\chi^2 = 4,45$; $p = 0,035$) та Дау с 1 ($\chi^2 = 4,50$; $p = 0,034$). Для Ves v 5 $\chi^2 = 3,57$ ($p = 0,059$) — граничний рівень значущості (табл 3.8).

Критерій Мак-Немара для оцінки асиметрії розбіжностей між ALEX² та ImmunoCAP

Алерген	В (тільки ALEX ² +))	С (тільки IC+)	χ^2 Мак- Немара	р-значення	Статистично значуща асиметрія
Art v 1	2	9	4.45	< 0,05	Так *
Art v 3	2	4	0.67	нз (> 0,05)	Ні
Par j 2	1	2	0.33	нз (> 0,05)	Ні
Api g 1	2	9	4.45	< 0,05	Так *
Dau c 1	1	7	4.50	< 0,05	Так *
Ara h 2	1	1	0.00	нз (> 0,05)	Ні
Api m 1	2	10	5.33	< 0,05	Так *
Api m 2	2	11	6.23	< 0,05	Так *
Ves v 5	1	6	3.57	нз (> 0,05)	Ні
Der p 1	2	1	0.33	нз (> 0,05)	Ні
Der p 2	2	1	0.33	нз (> 0,05)	Ні
Phl p 1	2	4	0.67	нз (> 0,05)	Ні
Bet v 1	2	1	0.33	нз (> 0,05)	Ні

Примітка: В — кількість пацієнтів з позитивним результатом тільки за ALEX²; С — тільки за ImmunoCAP. χ^2 розраховано без поправки на неперервність. * — $p < 0,05$ (статистично значуща асиметрія на користь ImmunoCAP). Жовте підсвічення — значущі розбіжності. нз — незначуще.

В усіх зазначених випадках кількість «тільки IC+» (C) суттєво перевищує кількість «тільки ALEX²⁺» (B), що вказує на систематичне завищення частоти позитивних результатів методом ImmunoCAP саме для глікозильованих алергенів. Для CCD-стабільних алергенів (Der p 1, Der p 2, Phl p 1, Bet v 1) асиметрія статистично незначуща, що підтверджує еквівалентність методів для цих компонентів.

Для встановлення ролі CCD-реактивності у виявлених розбіжностях усі дискордантні випадки (ImmunoCAP+ / ALEX²⁻) було стратифіковано за MUXF3-статусом пацієнта, визначеним на ALEX². Результати представлено у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

Розподіл розбіжностей (IC+ / ALEX²⁻) за MUXF3-статусом пацієнта

Показник	MUXF3+ (n=31)	MUXF3- (n=105)	Всього (n=136)	p
(IC > ALEX ²)	29 (93,5%)	13 (12,4%)	42	< 0,001
Розбіжності за Art v 1	8 (25,8%)	1 (1,0%)	9	< 0,001
Розбіжності за Api g 1	7 (22,6%)	2 (1,9%)	9	< 0,001
Розбіжності за Api m 1	9 (29,0%)	1 (1,0%)	10	< 0,001
Розбіжності за Api m 2	10 (32,3%)	1 (1,0%)	11	< 0,001
Розбіжності за Dau c 1	6 (19,4%)	1 (1,0%)	7	< 0,001
Розбіжності за Ves v 5	5 (16,1%)	1 (1,0%)	6	< 0,05
Розбіжності за (Der p 1/2, Fel d 1, Ara h 2)	3 (9,7%)	9 (8,6%)	12	нз

Примітка: розбіжності типу «IC+ / ALEX²⁻» = кількість пацієнтів з позитивним ImmunoCAP та негативним ALEX² за відповідним алергеном. Відсотки у стовпцях MUXF3+ та MUXF3- наведено від кількості пацієнтів у

кожній підгрупі. p — критерій Фішера або χ^2 . нз — незначуще.

Дані таблиці 3.9 демонструють різочу концентрацію розбіжностей у MUXF3-позитивній підгрупі: 29 із 31 дискордантного «IC+ / ALEX²-» випадку за CCD-ризиковими алергенами (93,5%) припадає на пацієнтів із позитивним MUXF3 на ALEX², тоді як у MUXF3-негативній підгрупі з 105 пацієнтів лише 13 дискордантних випадків (12,4%), які рівномірно розподілені між CCD-ризиковими та CCD-стабільними алергенами ($p < 0,001$). Це є сильним непрямим свідченням того, що виявлені розбіжності зумовлені саме CCD-реактивністю, а не реальними відмінностями у профілі сенсibiliзації.

3.5. Верифікація CCD-інтерференції методом специфічного сироваткового інгібування

Для прямої верифікації CCD-зумовленої хибнопозитивності в результатах ImmunoCAP проведено блокадний тест із використанням специфічного інгібітора перехресно-реактивних вуглеводних детермінант — MUXF3-кон'югованого полімеру (CCD-Blocker, BIOMAY AG). Принцип методу полягає у попередній інкубації сироватки з надлишком CCD-антигену, що призводить до насичення та блокади CCD-специфічних IgE-антитіл. Після цього заблоковану сироватку тестували методом ImmunoCAP за тими самими алергенними компонентами, що й без блокади.

До блокадного тесту включено всіх 31 MUXF3-позитивного пацієнта, виявлених на ALEX² (підрозділ 3.2.2), що становить 22,8% від загальної групи та 31,6% від ALEX²-позитивних. Саме ця підгрупа є «CCD-групою ризику», в якій апіорі очікується найвища частота CCD-зумовлених хибнопозитивних результатів. Для кожного пацієнта сироватку розподіляли на два аліквоти: перший тестували у стандартних умовах (результати зафіксовано у блоці 3.3), другий — після інкубації з CCD-блокатором (37 °C, 60 хвилин). Панель

алергенів для блокадного тесту включала 7 CCD-залежних компонентів та 5 CCD-стабільних алергенів як внутрішню референсну групу для контролю специфічності блокади.

Результати порівняння частоти позитивних результатів до та після CCD-блокади серед 31 MUXF3-позитивного пацієнта наведено на рисунку 3.2.

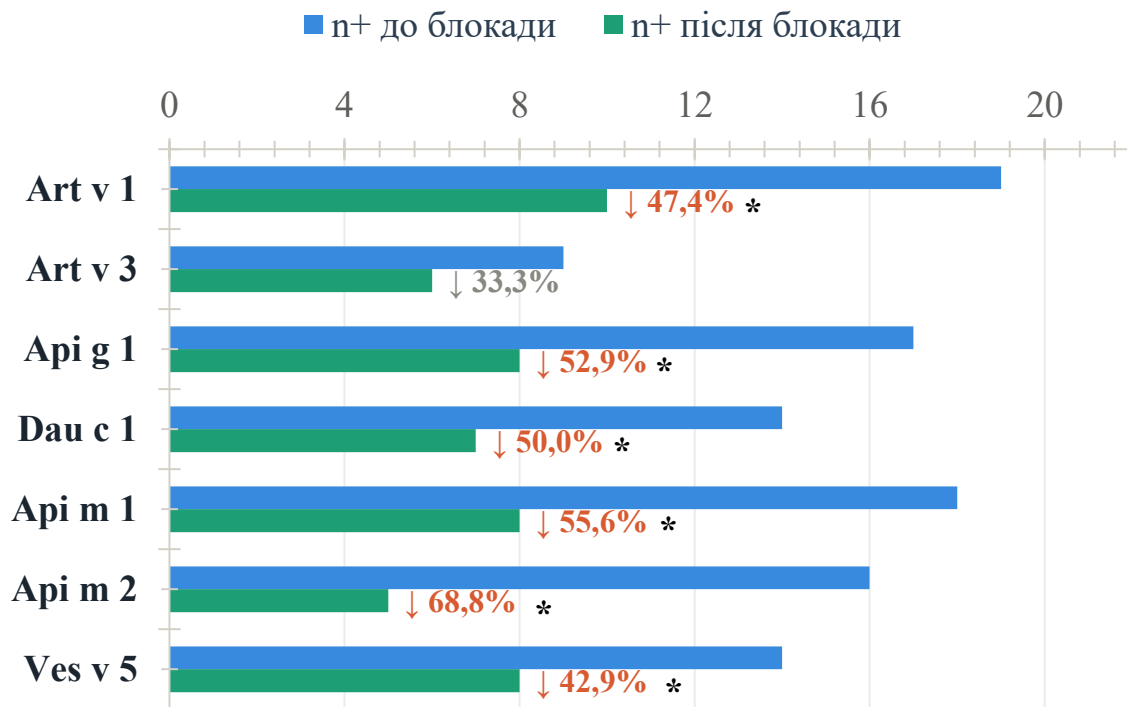


Рис. 3.2. Кількість позитивних результатів ImmunoCAP до та після CCD-блокади для CCD-залежних алергенів (n = 31, MUXF3+ пацієнти). * $p < 0,05$ у порівнянні з групою «до блокади»

Для CCD-залежних компонентів зафіксовано статистично значуще зменшення кількості позитивних результатів: найбільш виражене — для Api m 2 (16 → 5, редукція 68,8%; $p < 0,001$) та Api m 1 (18 → 8, редукція 55,6%; $p < 0,001$). Значну редукцію також спостерігали для Api g 1 (17 → 8; $p < 0,001$), Dau c 1 (14 → 7; $p < 0,001$) та Art v 1 (19 → 10; $p < 0,001$). Для Ves v 5 редукція становила 42,9% ($p < 0,05$). Винятком серед CCD-ризикових компонентів є Art v 3 (ЛТР-компонент полину), де блокада не дала значущого ефекту (9 → 6; $p > 0,05$), що підтверджує переважно білкову (не глікозильовану) природу ЛТР-

алергенів.

Натомість для CCD-стабільних алергенів (кліщі, береза, тимофіївка, кішка) кількість позитивних результатів після блокади практично не змінилась: поодинокі «переходи» у негативну зону (1 пацієнт на алерген) перебувають у межах аналітичної варіабельності методу, а критерій Мак-Немара не виявив статистично значущих відмінностей для жодного з референсних алергенів ($p > 0,05$). Цей результат свідчить про специфічність дії блокатора: він елімінує виключно CCD-реактивний компонент sIgE, не впливаючи на антитіла до білкових епітопів.

Кількісну оцінку впливу CCD-блокади на рівні sIgE проводили з використанням критерію Вілкоксона для парних вимірювань (рис. 3.3).

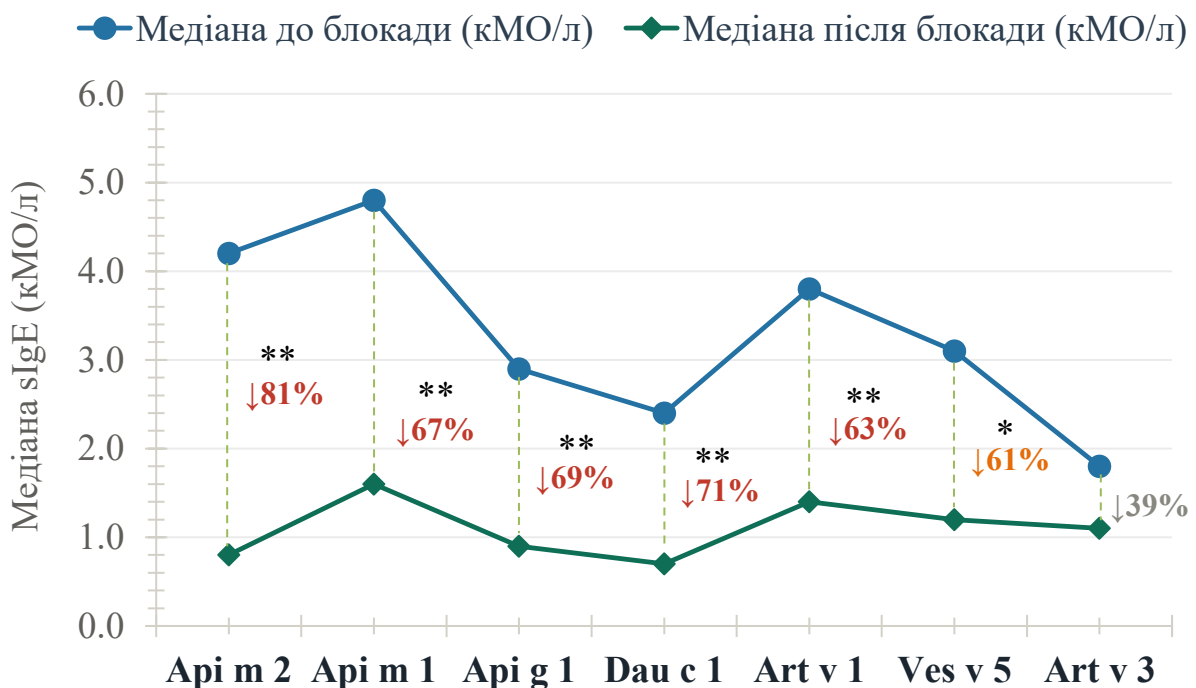


Рис. 3.3. Медіанні рівні sIgE до та після CCD-блокади для CCD-ризикових алергенів ($n = 31$, MUXF3+ пацієнти). * $p < 0,05$ у порівнянні з групою «до блокади»; ** $p < 0,001$ у порівнянні з групою «до блокади»

Найбільше зниження медіанного рівня sIgE після блокади зафіксовано

для *Ari m 2*: з 4,2 до 0,8 кМО/л ($\downarrow 81,0\%$; $p < 0,001$) — це найвища CCD-залежна редукція серед усіх тестованих компонентів, що відповідає відомим даним про максимальний вміст N-глікозильованих детермінант у гіалуронідазі бджоли. Суттєве зниження також виявлено для *Dau s 1* ($\downarrow 70,8\%$), *Ari g 1* ($\downarrow 69,0\%$), *Ari m 1* ($\downarrow 66,7\%$) та *Art v 1* ($\downarrow 63,2\%$).

Для *Ves v 5* редукція становила 61,3% ($p < 0,05$). У всіх цих випадках медіанні значення sIgE після блокади опустились нижче або на рівень клінічного порогу ($< 0,35$ кМО/л) у значної частини пацієнтів.

Для CCD-стабільних алергенів зміни рівнів sIgE після блокади виявились мінімальними та статистично незначущими: для *Der p 1* — $\downarrow 3,2\%$, для *Phl p 1* — $\downarrow 3,9\%$, для *Bet v 1* — $\downarrow 3,2\%$, для *Fel d 1* — $\downarrow 2,4\%$. Такі зміни перебувають у межах аналітичної похибки методу і підтверджують специфічність CCD-блокади відносно вуглеводних детермінант без впливу на справжні антитіла до білкових епітопів.

На підставі результатів блокадного тесту проведено підрахунок загальної кількості CCD-зумовлених хибнопозитивних результатів ImmunoCAP серед MUXF3-позитивних пацієнтів.

Загалом серед 31 MUXF3-позитивного пацієнта зафіксовано 52 CCD-зумовлені хибнопозитивні результати у межах 6 CCD-ризикових алергенів. Таким чином, з усіх 98 позитивних результатів за цими алергенами в підгрупі MUXF3+ — рівно 53,1% виявились хибнопозитивними внаслідок CCD-інтерференції. Найвищу частку хибнопозитивних результатів продемонстрував *Ari m 2* (68,8%), що має принципове клінічне значення: майже 7 із 10 позитивних результатів за гіалуронідазою бджоли у MUXF3+ пацієнтів є потенційно хибними і не відображають справжньої алергічної сенсibiliзації.

На підставі сукупних результатів блокадного тесту всі 31 MUXF3-позитивний пацієнт були рекласифіковані у три категорії відповідно до природи їхньої sIgE-реактивності до CCD-ризикових алергенів (рис. 3.4).

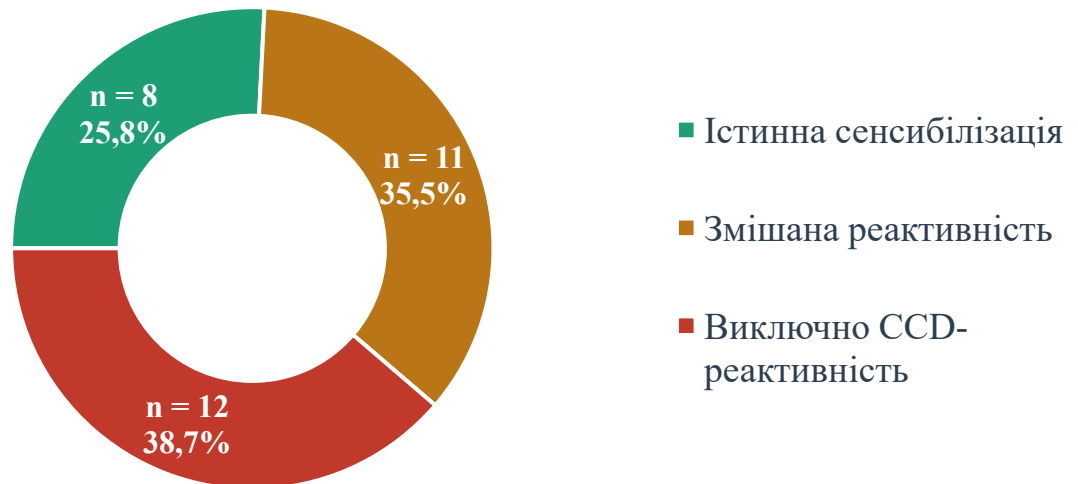


Рис. 3.4. Клінічна рекласифікація MUXF3-позитивних пацієнтів за результатами CCD-блокади (n = 31)

Найбільшу підгрупу склали пацієнти з виключно CCD-реактивністю — 12 осіб (38,7%): у них усі позитивні результати за CCD-ризиковими алергенами після блокади перейшли у негатив, що означає повну відсутність справжньої алергічної сенсibilізації до цих алергенів попри початково позитивні результати ImmunoCAP. Змішану реактивність виявлено у 11 пацієнтів (35,5%): частина їхніх результатів збереглась після блокади (справжня сенсibilізація), а частина зникла (CCD-компонент). Лише 8 пацієнтів (25,8%) мали виключно справжню сенсibilізацію без впливу блокади на жоден із результатів.

Особливу клінічну увагу привертає те, що серед 19 пацієнтів MUXF3+ з позитивним Арі m 1 або Арі m 2 на ImmunoCAP — 15 із них (78,9%) мали частково або повністю CCD-зумовлену реактивність. Хибне призначення алерген-специфічної імунотерапії отрутою комах на підставі таких результатів без попередньої CCD-блокади або молекулярної діагностики може призвести до клінічно необґрунтованого та потенційно небезпечного лікування.

ВИСНОВКИ

За результатами дослідження встановлено, що ALEX2 та ImmunoCAP демонструють суттєву загальну конкордантність ($\kappa = 0,794$), однак ImmunoCAP систематично завищує частоту сенсibilізації для CCD-ризикових алергенів — блокадний тест підтвердив 53,1% хибнопозитивних результатів, а у 38,7% MUXF3-позитивних пацієнтів справжньої сенсibilізації не виявлено взагалі, що обґрунтовує необхідність CCD-верифікації перед призначенням АСІТ.

1. Характеристика досліджуваної групи показала, що у 65,4% пацієнтів виявлено обтяжений сімейний алергологічний анамнез; підвищений рівень загального IgE зафіксовано у 84,6% обстежених, що підтверджує atopічний характер захворювань.

2. Визначили, що обидва методи демонструють частоту сенсibilізації з характерними відмінностями для окремих алергенних груп. Для CCD-стабільних алергенів показники частоти сенсibilізації та медіанні рівні sIgE між методами були практично ідентичними. Натомість для CCD-ризикових алергенів — ImmunoCAP систематично реєстрував вищу частоту позитивних результатів порівняно з ALEX2.

3. Провели порівняльний аналіз та з'ясували, що загальна конкордантність між методами є суттєвою, проте значно знижується для CCD-ризикових алергенів із статистично значущою спрямованістю розбіжностей на користь ImmunoCAP. Загальна відсоткова згода між ALEX2 та ImmunoCAP склала 91,9%. Для CCD-стабільних алергенів κ становив 0,891–0,953, тоді як для CCD-ризикових компонентів — суттєво нижчий.

4. Верифікували CCD-зумовлену хибнопозитивність методом специфічної сироваткової інгібіції. Серед 31 MUXF3-позитивного пацієнта CCD-інгібіція з використанням CCD-Blocker призвела до статистично значущого зниження як частоти позитивних результатів, так і рівнів sIgE для шести CCD-ризикових алергенів. Найбільша редукція зафіксована для *Ari m*

2: частота позитивних результатів знизилась з 16 до 5 пацієнтів.

5. Провели клінічну рекласифікацію MUXF3-позитивних пацієнтів та встановили, що майже 40% з них мали виключно CCD-реактивність без жодної справжньої сенсibiliзації до CCD-ризикових алергенів. У 15 із 19 MUXF3-позитивних пацієнтів із реактивністю до Арі m 1 та/або Арі m 2 (78,9%) вона виявилась частково або повністю хибнопозитивною. Це свідчить про реальний ризик хибного призначення АСІТ отрутою комах на підставі некоректно інтерпретованих результатів ImmunoCAP без попередньої CCD-верифікації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Vitte, J., Vibhushan, S., Bratti, M., Montero-Hernandez, J. E., and Blank, U. (2022). Allergy, anaphylaxis, and nonallergic hypersensitivity: IgE, mast cells, and beyond. *Medical Principles and Practice*, 31(6), 501–515.
2. Keshavarz, B., Platts-Mills, T., and Wilson, J. M. (2021). The use of microarray and other multiplex technologies in the diagnosis of allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 127(1), 10–18.
3. Oppenheimer, J., and Spergel, J. (2022). Social determinants of health in the world of allergy/immunology. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 128(1), 2–4.
4. Nkurunungi, G., Mpairwe, H., Versteeg, S. A., van Diepen, A., Nassuuna, J., Kabagenyi, J., Nambuya, I., Sanya, R. E., Nampijja, M., Serna, S., Reichardt, N. C., Hokke, C. H., Webb, E. L., van Ree, R., Yazdanbakhsh, M., and Elliott, A. M. (2021). Cross-reactive carbohydrate determinant-specific IgE obscures true atopy and exhibits α -1,3-fucose epitope-specific inverse associations with asthma. *Allergy*, 76(1), 233–246.
5. Куртова, М. М. (2020). Оптимізація алгоритму серологічної діагностики алергійних захворювань у пацієнтів з полісенсibiliзацією [Дисертація кандидата медичних наук]. Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна.
6. Justiz Vaillant, A. A., Modi, P., and Jan, A. (2023). Atopy. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
7. Yu, W., Freeland, D. M. H., and Nadeau, K. C. (2016). Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 16(12), 751–765.
8. Lambrecht, B. N., Laboret, H., and Hammad, H. (2019). The cytokines of asthma. *Immunity*, 50(4), 975–991.
9. Pawankar, R., Holgate, S. T., Canonica, G. W., Lockey, R. F., and Blaiss, M. S. (Eds.). (2019). *WAO White Book on Allergy 2019 update*. World Allergy

Organization.

10. Galli, S. J., and Tsai, M. (2020). Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in adaptive and innate immunity. *European Journal of Immunology*, 50(7) 45-46.
11. Agache, I., and Akdis, C. A. (2019). Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1493–1503.
12. Gaudenzio, N., Sibilano, R., Marichal, T., Starkl, P., Reber, L. L., Cenac, N., McNeil, B. D., Dong, X., Hernandez, J. D., Sagi-Eisenberg, R., Hammel, I., Roers, A., Valitutti, S., Tsai, M., Espinosa, E., and Galli, S. J. (2016). Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. *Journal of Clinical Investigation*, 126(10), 3981–3998.
13. Lambrecht, B. N., and Hammad, H. (2015). The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nature Immunology*, 18(10), 1076–1083.
14. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1204–1222.
15. Simons, F. E. R., Arduzzo, L. R. F., Bilò, M. B., Cardona, V., Ebisawa, M., El-Gamal, Y. M., Lieberman, P., Lockey, R. F., Muraro, A., Roberts, G., Sanchez-Borges, M., Sheikh, A., Shek, L. P., Tryba, M., Wickman, M., and World Allergy Organization. (2020). 2020 Update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *WAO Journal*, 13(2), 100091.
16. Varga, E.-M., Incorvaia, C., Frew, A. J., Moser, C., Kraft, D., and Valenta, R. (2019). Effects of grass pollen subcutaneous immunotherapy on dendritic cells in the nasal mucosa of grass pollen–allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(4), 1358–1366.
17. Mothes, N., Valenta, R., and Spitzauer, S. (2018). Allergy testing: The role of recombinant allergens. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(2), 125–132.

18. Valenta, R., Hochwallner, H., Linhart, B., and Pahr, S. (2015). Food allergies: The basics. *Gastroenterology*, 148(6), 1120–1131.
19. Radauer, C., Nandy, A., Ferreira, F., Goodman, R. E., Larsen, J. N., Lidholm, J., Pomés, A., Raulf, M., Rozynek, P., Suck, R., van Hage, M., Breiteneder, H., and Chapman, M. (2020). Update of the WHO/IUIS allergen nomenclature database based on analysis of allergen sequences. *Allergy*, 69(4), 413–419.
20. Geiselhart, S., Hoffmann-Sommergruber, K., and Bublin, M. (2018). Tree nut allergens. *Molecular Immunology*, 100, 71–81.
21. Werfel, T., Asero, R., Ballmer-Weber, B. K., Beyer, K., Enrique, E., Knulst, A. C., Mari, A., Muraro, A., Ollert, M., Poulsen, L. K., Vieths, S., Worm, M., Zuberbier, T., and Hoffmann-Sommergruber, K. (2017). Position paper of the EAACI: Food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy*, 70(9), 1079–1090.
22. Hafner, C., Wallner, M., and Ferreira, F. (2019). Molecular-resolved diagnosis: Concept and clinical utility. *Der Hautarzt*, 68(7), 529–536.
23. Gaudenzio, N., Laurent, C., Valitutti, S., and Espinosa, E. (2018). Human mast cells drive memory CD4⁺ T cells toward an inflammatory IL-22⁺ phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4), 1127–1139.
24. Dahlen, S.-E., Dahlen, B., and Drazen, J. M. (2017). Asthma treatment guidelines meet the real world. *New England Journal of Medicine*, 364(18), 1769–1770.
25. Simons, F. E. R., and Simons, K. J. (2022). Epinephrine and its use in anaphylaxis: Current issues. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(4), 354–361.
26. Hofmaier, S., Comberiati, P., and Matricardi, P. M. (2019). Immunology of cross-reactive allergenicity. *Pediatric Allergy and Immunology*, 25(5), 591–593.
27. Dramburg, S., Hilger, C., Santos, A. F., de las Vecillas, L., Aalberse, R. C., Acevedo, N., Aglas, L., Altmann, F., Arruda, L. K., Asero, R., Ballmer-Weber, B., Barber, D., Beyer, K., Bilo, M. B., Blank, S., Blicher, T. K., Bosshard, P.

- P., Breiteneder, H., Brough, H. A., ... Matricardi, P. M. (2023). EAACI Molecular Allergology User's Guide 2.0. *Pediatric Allergy and Immunology*, 34(Suppl 28), e13854.
28. Scala, E., Abeni, D., Cecchi, L., Giani, M., Masala, C., and Cristaudo, A. (2018). Cross-reactivity between plant-food and pollen allergens: Mapping of IgE-binding epitopes. *Clinical and Experimental Allergy*, 48(5), 556–564.
29. Pascal, M., Grishina, G., Yang, A. C., Sanchez-Garcia, S., Lin, J., Towle, D., Ibáñez, M. D., Sastre, J., Sampson, H. A., and Shreffler, W. G. (2017). Molecular diagnosis of shrimp allergy: Efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 3(4), 521–529.
30. van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J. P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L., and Gomord, V. (2000). Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11451–11458.
31. van Ree, R., Hummelshoj, L., Plantinga, M., Poulsen, L. K., and Swindle, E. (2018). Allergic sensitization: Host-immune factors. *Clinical and Translational Allergy*, 4(1), 12.
32. Hemmer, W., Karner, G., Focke-Tejkl, M., Gotz, M., Jarisch, R., and Aberer, W. (2018). Differences in the fine specificity of IgE recognition of epitopes of venom phospholipase A2 in bee venom-sensitized patients with and without clinical allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 172(4), 209–218.
33. Poncet, P., Sénéchal, H., and Charpin, D. (2020). Update on panallergens and their relevance in clinical practice. *Clinical and Translational Allergy*, 10(1), 2.
34. Jappe, U., Minge, S., Kreft, B., Ludwig, A., Przybilla, B., Walker, A., and Hausteiner, D. (2018). Hymenoptera venom allergy: Sensitization patterns by 3 component allergens are useful for diagnosis and treatment planning. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 6(6), 2133–2136.

35. Lippi, G., Plebani, M., and Favaloro, E. J. (2018). Interference in coagulation testing: Focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39(3), 258–266.
36. Schiener, M., Graessel, A., Ollert, M., Schmidt-Weber, C. B., and Blank, S. (2021). Allergen immunotherapy of Hymenoptera venom allergy — also a matter of the bees and wasps. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 15(11), 2551–2562.
37. Lima-Oliveira, G., Volanski, W., Lippi, G., Picheth, G., and Guidi, G. C. (2017). Pre-analytical phase management: A review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 77(3), 153–163.
38. Bernstein, D. I., Blessing-Moore, J., Khan, D. A., Lang, D. M., Nicklas, R. A., Oppenheimer, J., Portnoy, J. M., Randolph, C. C., Schuller, D. E., Spector, S. L., and Tilles, S. A. (2020). Allergy diagnostic testing: An updated practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 106(Suppl 2), S1–S48.
39. Tanno, L. K., Calderon, M. A., Goldberg, B. J., Akdis, C. A., and Demoly, P. (2017). Updating allergy nomenclature and the need for consensus. *Allergy*, 72(8), 1157–1163.
40. Santos, A. F., Shreffler, W. G., and Fox, A. (2020). In vitro diagnostics for allergy: Where are we now and where are we going? *Current Allergy and Asthma Reports*, 20(8), 36.
41. Bousquet, J., Anto, J. M., Bachert, C., Baiardini, I., Bosnic-Anticevich, S., Walter Canonica, G., Melen, E., Palomares, O., Scadding, G. K., Togias, A., and Toppila-Salmi, S. (2020). Allergic rhinitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 95.
42. Dramburg, S., Kalic, T., Lopata, A., Santos, A. F., Breiteneder, H., and Matricardi, P. M. (2022). Mapping of IgE epitopes on allergens by microarray technology. *Frontiers in Allergy*, 3, 874118.
43. Hourihane, J. O., Knulst, A. C., Schreier, T. M., Crevel, R., and Mills, E. N. C.

- (2017). Threshold versus NOAEL doses for food allergens: What clinical evidence do we have? *Allergy*, 72(4), 500–509.
44. Poulsen, L. K., Saxena, A., Elvermark, M., and Oehlenschläger, J. (2022). Comparison of sIgE by ISAC chip and ImmunoCAP with the aim of reducing food allergen misclassification. *Allergy*, 77(6), 1897–1900.
 45. Eckl-Dorna, J., Villazala-Merino, S., Campion, N. J., Bydzovsky, J., Niederberger, V., Valenta, R., and Cabauatan, C. R. (2021). Tracing IgE-producing cells in allergic patients. *Cells*, 8(9), 994.
 46. Berings, M., Karaaslan, C., Altunbulakli, C., Gevaert, P., Akdis, M., Bachert, C., and Akdis, C. A. (2017). Advances and highlights in allergen immunotherapy: On the way to sustained clinical and immunologic tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(5), 1250–1267.
 47. Panzner, P., Vachová, M., and Panzner, P. (2016). A comprehensive analysis of middle European molecular sensitization profiles to pollen allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 170(3), 194–201.
 48. Dramburg, S., Hilger, C., Santos, A. F., de las Vecillas, L., Aalberse, R. C., Acevedo, N., Aglas, L., Altmann, F., Arruda, L. K., Asero, R., Ballmer-Weber, B., Barber, D., Beyer, K., Bilo, M. B., Blank, S., Blicher, T. K., Bosshard, P. P., Breiteneder, H., Brough, H. A., ... Matricardi, P. M. (2023). EAACI Molecular Allergology User's Guide 2.0. *Pediatric Allergy and Immunology*, 34(Suppl 28), e13854.
 49. Curin, M., Reininger, R., Swoboda, I., Focke, M., Valenta, R., and Spitzauer, S. (2020). Skin prick test extracts for dog allergy diagnosis show considerable variation regarding the content of major and minor dog allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 181(7), 536–544.
 50. Lee, J. H., Kim, Y. H., Kim, M. J., Kim, J. Y., Lee, S. C., Park, Y. J., and Kim, H.-Y. (2021). Clinical utility of multiplex allergen microarray (ALEX) compared to component-resolved diagnostics in patients with atopic dermatitis. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 13(3), 447–460.
 51. Bublin, M., Sohno, C., Radauer, C., Hafner, C., Humeniuk, P., Gomez-Casado,

- C., Barber, D., Wallner, M., Pahr, S., Pfeiffer, S., Poulsen, L. K., and Breiteneder, H. (2019). Genuine sensitization to Hymenoptera venoms is confirmed by IgE to marker allergens Api m 10 and Ves v 6. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 7(2), 612–620.
52. Roberts, G., Pfaar, O., Akdis, C. A., Ansoategui, I. J., Durham, S. R., Gerth van Wijk, R., Halken, S., Larenas-Linnemann, D., Pawankar, R., Pitsios, C., Sheikh, A., Worm, M., Asaria, M., Bewick, M., Dhimi, S., Garber, G., Hamelmann, E., Hellings, P. W., Jung, I. D., ... Muraro, A. (2018). EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy*, 73(4), 765–798.
53. Pfaar, O., Bachert, C., Bufe, A., Buhl, R., Ebner, C., Eng, P., Friedrichs, F., Fuchs, T., Hamelmann, E., Hartwig-Bade, D., Hering, T., Huttegger, I., Jung, K., Klimek, L., Kopp, M. V., Merk, H., Rabe, U., Saloga, J., Schmid-Grendelmeier, P., ... Kleine-Tebbe, J. (2020). Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases. *Allergo Journal International*, 23(8), 282–319.
54. Calderón, M. A., Casale, T. B., Togias, A., Bousquet, J., Durham, S. R., and Demoly, P. (2021). Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: From meta-analysis to registration and beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(1), 30–38.
55. Yamamoto, A., Takizawa, H., Nonaka, M., Ogawa, A., Ueda, T., Miura, K., Sato, N., and Nagashima, Y. (2020). Prediction of clinical outcomes of allergen-specific immunotherapy for house dust mite allergy using Der f 2 IgE/IgG4 ratios. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 8(6), 2027–2036.
56. Agache, I., Jutel, M., Zemelka-Wiacek, M., Akdis, M., Chivato, T., del Giacco, S., Gomes, E. R., Grattan, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Klimek, L., Knol, E., Lauerma, A., Ollert, M., Palomares, O., Pfaar, O., Pitsios, C., Sestini, P., Syrigou, E., Torres, M. J., ... Worm, M. (2021). Immune tolerance and its relation to allergen immunotherapy. *Allergy*, 76(12), 3663–3680.

57. Normansell, R., Kew, K. M., and Bridgman, A.-L. (2018). Sublingual immunotherapy for asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD011293.
58. Sampson, H. A., Shreffler, W. G., Yang, W. H., Sussman, G. L., Brown, A. E., Cheema, A. S., Kaplan, M. A., Vickery, B. P., Bird, J. A., Burks, A. W., and Jones, S. M. (2017). Effect of varying doses of epicutaneous immunotherapy vs placebo on reaction to peanut protein exposure among patients with peanut sensitivity. *JAMA*, 318(18), 1798–1809.
59. Luo, W., Liao, W., Tan, Y., Wen, L., Luo, B., Qiu, S., and Huang, H. (2019). Efficacy of house dust mite immunotherapy in patients with allergic asthma and rhinitis: A meta-analysis. *Medicine*, 98(40), e17401.
60. Marogna, M., Massolo, A., Berra, D., Zanon, P., Chiodini, E., Canonica, G. W., and Passalacqua, G. (2019). The type of sensitization order and the multiplicity of sensitization are determinants of the outcome of allergen immunotherapy in respiratory allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, 44(7), 941–950.
61. Greiner Bio-One International GmbH. (2021). Vacuette blood collection system: Instructions for use. Greiner Bio-One International GmbH.
62. Macro Array Diagnostics GmbH. (2023). ALEX² Allergy Explorer: Instructions for use. Macro Array Diagnostics GmbH.
63. Thermo Fisher Scientific. (2022). ImmunoCAP specific IgE: Instructions for use. Thermo Fisher Scientific / Phadia AB.
64. BIOMAY AG. (2022). CCD blocker: Instructions for use. BIOMAY AG.
65. R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.