

Katarzyna Jamrozik

z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc Zespół Pediatryczny w Rabce
Dyrektor: dr med. J. Buchwald

OCENA PRZYDATNOŚCI 2 METOD OZNACZANIA STĘŻENIA ALERGENOWO-SWOISTYCH PRZECIWCIAŁ IGE W SUROWICY – PHADEBAS RAST I IMMUNO CAP SYSTEM

DIAGNOSTIC VALUE OF ALLERGEN SPECIFIC IGE ANTIBODIES DETERMINATION IN BLOOD
SERUM PHADEBAS RAST AND IMMUNO CAP SYSTEM VERSUS THE SKIN PRICK TESTS.

Summary: Two diagnostics sets Pharmacia – Phadebas RAST and Immuno CAP System determining the concentration of specific IgE antibodies in blood serum were compared with each other and with skin prick tests (SPT). Two common allergens – *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* were evaluated. Analysis of ROC curves shows that maximum specificity and sensitivity was obtained when the cut off value of RAST and CAP reached to 4.9PRU/ml and 7.3kU/l respectively. Our data shows the good correlation between RAST,CAP and SPT.

Key words: ROC, RAST, CAP, SPT, cut-off value

PNEUMONOL. ALERGOL. POL., 2001, 69, 1-2, 33-39

Wstęp Oznaczanie alergenowo swoistych IgE (asIgE) ma od wielu lat ważne znaczenie w diagnostyce chorób alergicznych. W 1967 r. Wide i wsp. (14) opisali metodę do oznaczania swoistych IgE w surowicy z użyciem fazy stałej. Ten oryginalny pomysł umożliwił wprowadzenie do praktyki laboratoryjnej testu wykrywającego swoiste przeciwciała IgE reagujące z poszczególnymi alergenami. Wprowadzane obecnie na rynek testy są przeważnie różnymi wariantami opisanej metody. Okres półtrwania IgE w połączeniu z mastocytami skóry wynosi ponad 15 dni, natomiast w surowicy jest znacznie krótszy i nie przekracza 2 dni. Wynika stąd, że metody wykrywające IgE muszą być znacznie czulsze i bardziej swoiste niż powszechnie stosowane testy skórne. W ostatnich latach, opierając się na zebranych doświadczeniach, opracowano w firmie Pharmacia nową generację testów do badań immunologicznych – „Immuno CAP System”. Jest ona oparta na nowym rodzaju fazy stałej składającej się z giętkiego hydrofilowego nośnika polimerowego upakowanego w kapsule (7). Nośnik ten zbudowany jest z aktywnej pochodnej celulozy, która może wiązać trzykrotnie więcej białka niż papierowy dysk stosowany w metodzie RAST i 50-krotnie więcej niż może być zaadsorbowane na wewnętrznej powierzchni tradycyjnie pokrywanej próbówki.

Zakłada się, że wartość stężenia swoistego IgE powinna różnicować chorych z uczuleniem na określony alergen od wszystkich pozostałych chorych. Ta zdolność różnicowania zależy w znacznej mierze od wartości stężenia przyjętej przy interpretacji wyników oznaczeń swoistych IgE jako tzw. graniczna

wartość odcinająca (cut-off value). Brak jest precyzyjnych reguł wyznaczania wartości odcinającej, dlatego ma to w znacznym stopniu charakter intencjonalny.

Celem pracy była ocena przydatności dwóch metod oznaczających stężenia alergenowo swoistych IgE (asIgE) w surowicy: Phadebas RAST i Immuno CAP System w diagnostyce chorób alergicznych u dzieci. W tym celu dokonano:

1. Porównania wartości asIgE oznaczonych metodą RAST i CAP z wynikami SPT.
2. Ustalenia wartości progowej stężenia asIgE dla obu metod.
3. Wyznaczenie kryteriów oceniających przydatność kliniczną obu metod – czułości i swoistości diagnostycznej (NPV i PPV) oraz wartości predykcyjnej wyników ujemnych i dodatnich.
4. Ustalenie wartości maksymalnej czułości i swoistości dla obu metod.

MATERIAŁ I METODY:

Badaniem objęto 1979 dzieci w wieku od 2 do 19 lat. Średni wiek w badanej grupie wynosił 9.2 roku. Dzieci te były w latach 1995-1998 pacjentami rabczańskiego oddziału Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc. Pozostawały pod opieką lekarzy alergologów i miały przeprowadzony szczegółowy wywiad lekarski, a następnie punktowe testy skórne z zestawem 17 alergenów. U wszystkich dzieci wykonano oznaczenia alergenowo swoistych IgE (asIgE) metodą Phadebas RAST lub ImmunoCAP w zależności od aktualnych możliwości laboratorium.

Testy skórne: Alergiczne testy skórne metodą „Skin Prick Test” (SPT) wykonano w obu grupach przy użyciu zestawu alergenów firmy Allergopharma według standardowej procedury. Wyniki testów odczytano mierząc dwie prostopadłe średnice powstałych bąbli i obliczono pole powierzchni elipsy przez nie utworzonej (9).

Metoda Phadebas RAST- IgE: Wykonano 417 badań metodą RAST według instrukcji producenta dla alergenów Dermatophagoides pteronyssinus – d1 i 101 dla Dermatophagoides farinae – d2, których wyniki posłużyły do dalszego opracowania. Podana przez producenta wartość odcięcia fizjologii od patologii wynosiła 0.35PRU/ml (Phadebas RAST Units), dlatego wszystkie wyniki powyżej tej wartości przyjmowano za dodatnie.

Metoda ImmunoCap System: W badanych surowicach wykonano 1043 oznaczenia asIgE metodą ImmunoCAP, według instrukcji producenta dla alergenów Dermatophagoides pteronyssinus – d1 i Dermatophagoides farinae – d2. Wyniki były obliczane przez program komputerowy Phamas 4 i wyrażone wg standardów WHO w jednostkach międzynarodowych (kU/l). Za wartości patologiczne, zgodnie z instrukcją producenta przyjęto wartość 0.35kU/l.

Metody statystyczne: Przy użyciu tablicy czteropolowej obliczono wskaźniki takie jak: czułość, swoistość oraz wartość predykcyjną wyników dodatnich (PPV) i ujemnych (NPV), które określają wartość diagnostyczną testu (4).

Graficzną prezentacją zależności między czułością a swoistością testu jest krzywa ROC (Receiver Operating Curve) (11). Powstaje ona przez naniesienie wartości otrzymanych w wyniku użycia testu i ilustruje pozycję badania w układzie współrzędnych, gdzie na osi X jest wartość 1-swoistość, a na osi Y - czułość. Pozwala ona na wnikliwą ocenę kształtowania się czułości i swoistości oraz na dokonywanie porównań pomiędzy różnymi metodami. Im bardziej krzywa ROC dla danej metody przebiega w pobliżu górnego, lewego narożnika osi wykresu, tym lepsza, bardziej zbliżona do idealnej jest wartość testu. Przy porównywaniu użyteczności diagnostycznej dwóch metod już nawet wizualna ocena krzywych ROC pozwala ocenić, która z nich charakteryzuje się wyższą czułością i swoistością diagnostyczną. Zazwyczaj do takiej oceny stosuje się metody matematyczne np. obliczanie pola powierzchni pod krzywą, które dla metody idealnej zbliża się do 1.0, a dla metody zupełnie bezużytecznej osiąga wartość 0.5 (5).

Wyniki

Dla wyników metody RAST i dla progu odcięcia 0.35 PRU/ml obliczono czułość i swoistość diagnostyczną metody oraz NPV i PPV. Czułość metody RAST dla alergenu d1 wyniosła 0.98, a swoistość 0.46. Dokładność przewidywania dodatniej wartości testu wynosi 0.44, a ujemnej 0.98. Odpowiednie wartości dla d2 (wers trzeci) wyniosły: czułość 0.83, swoistość 0.45, PPV 0.39, a NPV 0.86. Te same wskaźniki wyliczono, aby opisać test CAP w stosunku do SPT (tab. I). Dla alergenu d1 czułość wyniosła 0.98, swoistość 0.44, PPV przyjął wartość 0.43, a NPV 0.98. Czułość metody CAP dla alergenu d2 wyniosła 0.96, a swoistość 0.47, PPV 0.46, a NPV 0.96.

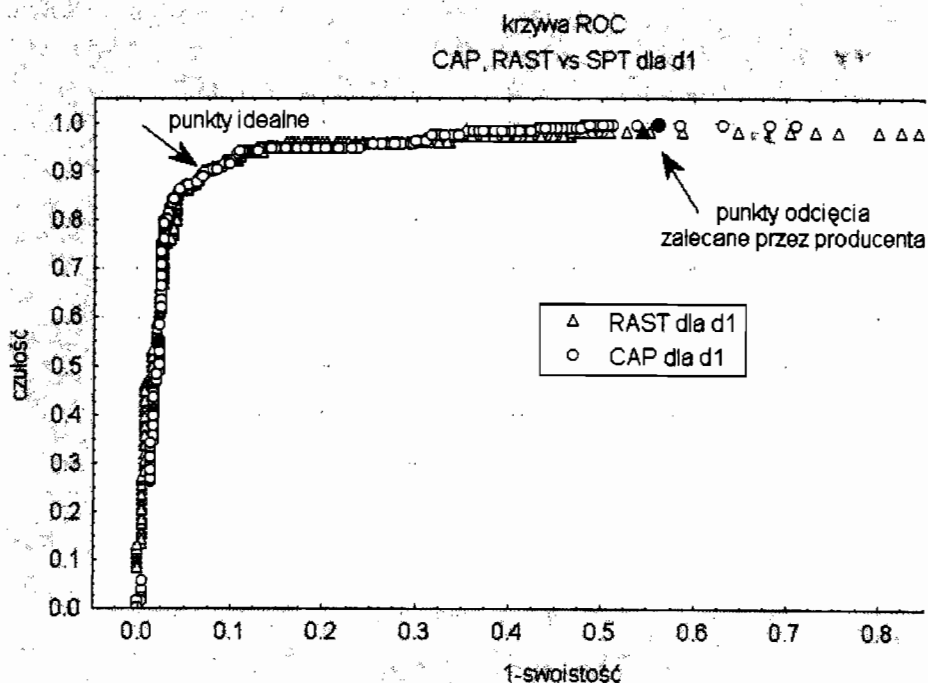
Tabela I. Obliczone współczynniki czułości, swoistości oraz PPV i NPV dla metody RAST i CAP oraz alergenów roztoczy, w zależności od sugerowanego i obliczonego progu odcięcia.

Table I Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value for RAST and CAP methods, mites allergens and calculated cut-off value

Metoda Metody	Alergen Allergen	Liczba Number	Próg Cut-off	Czułość Sensitivity	Swoistość Specyficity	Współczynnik predykcji Prediction value	
						Dodatni PPV positive	Ujemny NPV negative
RAST	d1	376	0.35	0.98	0.46	0.44	0.98
	d1	376	4.9	0.89	0.92	0.82	0.95
	d2	60	0.35	0.83	0.45	0.39	0.86
	d2	60	7.6	0.77	0.88	0.74	0.90
CAP	d1	711	0.35	0.98	0.44	0.43	0.98
	d1	711	7.3	0.88	0.92	0.83	0.95
	d2	250	0.35	0.96	0.47	0.46	0.96
	d2	250	10.2	0.79	0.90	0.79	0.95

Na podstawie uzyskanych wartości wykreślono krzywe ROC i obliczono położenie punktu idealnego, w którym czułość i swoistość są najwyższe. Punkty te wyznaczono oddzielnie dla każdej metody i alergenu. Najpierw wykreślono krzywą ROC dla alergenu d1 i metody RAST. Pole powierzchni pod krzywą wyniosło 0.946, a położenie punktu idealnego to wartość 4.9PRU/ml (ryc.1). Na podstawie krzywej ROC dla alergenu d2 oznaczonego metodą RAST obliczono wartość punktu idealnego – 7.6PRU/ml i pole powierzchni pod krzywą, równe 0.816. Następnie wykreślono krzywe ROC dla metody CAP i alergenów d1 i d2. Pole powierzchni pod krzywą równało się 0.956. Położenie punktu idealnego dla tego alergenu i tej metody to wartość 7.3 kU/l. Także dla alergenu d2 z otrzymanej krzywej ROC obliczono pole powierzchni pod krzywą, które wyniosło 0.924, a punkt idealny to wartość 10.2kU/l.

O właściwościach testu diagnostycznego świadczą wartości parametrów przedstawione w tabeli.I. W wersji drugim i czwartym przedstawiono parametry metody RAST wobec punktowych testów skórnych, dla progu odcięcia obliczonego z krzywej ROC. Dla alergenu d1 wartości te obliczono w oparciu o 376 otrzymanych wyników RAST i SPT. Czułość metody wyniosła 0.89, swoistość 0.92. Wartość predykcjna wyników dodatnich wyniosła 0.82, a ujemnych 0.95. Obliczona wartość punktu odcięcia to 4.9PRU/ml.



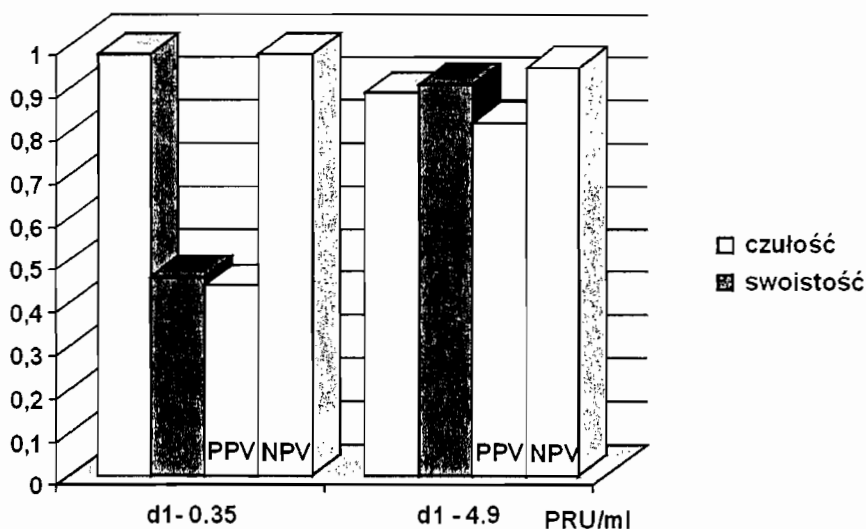
Ryc. 1. Krzywa ROC.
Fig. 1. Receiver operating curve.

Dla alergenu d2 obliczona czułość wyniosła 0.77, swoistość-0.88, a PPV i NPV odpowiednio 0.74 i 0.90. Wartość progu odcięcia wyniosła 7.6PRU/ml.

Podobną analizę przeprowadzono dla metody CAP. Analizowano 711 wyników dla alergenu d1, które stały się podstawą do obliczenia pozostałych parametrów. Czułość metody wyniosła 0.88, a jej swoistość-0.92. Prawdopodobieństwo wystąpienia alergii na roztocze kurzu domowego przy dodatnim wyniku testu CAP wyniosło 0.83, a prawdopodobieństwo jej braku przy wyniku ujemnym, aż 0.95. Dla tego alergenu w metodzie CAP maksymalną czułość i swoistość uzyskano dla punktu odcięcia równego 7.3 kU/l. Zmiany w obliczonych parametrach spowodowane zmianą punktu odcięcia przedstawia ryc. 3. Dla alergenu d2 wykonano 250 badań. Czułość metody obliczona z wyników wyniosła 0.79, a jej swoistość 0.90. Wartość predykcyjna wyników dodatnich wyniosła 0.79, a ujemnych 0.95. Wartość progowa obliczona z tych danych wyniosła 10.2 kU/l.

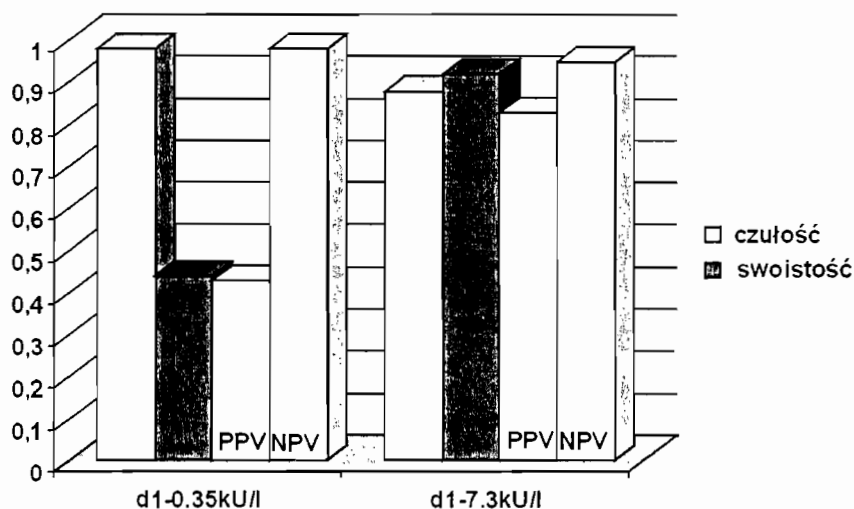
Omówienie: O przydatności testu diagnostycznego świadczą wartości parametrów takich jak: czułość, swoistość, dokładność przewidywania wyników dodatnich i ujemnych itp. Wartość wymienionych parametrów oblicza się na podstawie wyników dwóch testów wykonanych u tej samej osoby – testu referencyjnego i testu badanego. W alergologii przyjęto, że testy skórne są badaniem referencyjnym (2). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że czułość diagnostyczna metody RAST dla alergenów roztoczy była wysoka i wyniosła dla d1-0.98, a dla d2-0.83, swoistość wyniosła tylko 0.45. Jest to wskaźnik zbyt niski dla metody, której wynik kwalifikuje do długotrwałego i obciąża-

2 metody oznaczania stężenia alergenowo- swoistych przeciwciał



Ryc. 2. Zmiany pomiędzy czułością, swoistością oraz wartością predykcyjną wyników dodatnich i ujemnych w zależności od progu odcięcia - 0.35 PRU/ml i obliczonego z krzywej ROC - 4.9 PRU/ml dla alergenu d1 oznaczonego metodą RAST w stosunku do SPT.

Fig. 2. Changes between sensitivity, specificity, positive and negative predictive value according to the cut of value - suggested - 0.35 PRU/ml and a new one calculated from ROC curve - 4.9 PRU/ml for RAST method and allergen d1.



Ryc. 3. Zmiany pomiędzy czułością, swoistością oraz wartością predykcyjną wyników dodatnich i ujemnych w zależności od progu odcięcia - 0.35 kU/l i obliczonego z krzywej ROC - 7.3 kU/l dla alergenu d1 oznaczonego metodą CAP w stosunku do SPT.

Fig. 3. Changes between sensitivity, specificity, positive and negative predictive value according to the cut off value - 0.35 kU/l and a new one calculated from ROC curve - 7.3 kU/l for CAP method and allergen d1.

jącego pacjenta leczenia. Charakterystyczny jest także NPV, który wynosi 0.98 i świadczy także o tym, że metoda RAST ma zbyt małą swoistość.

Na ogół trudno jest znaleźć test, który byłby zarówno wysoce czuły jak i swoisty (3). Zmieniając wartość progową dla testu można uzyskać optymalne wartości czułości i swoistości. Zwiększając wartość progową możemy zwiększyć swoistość przy niewielkim spadku czułości. W tym celu wykreślono krzywe ROC i wyznaczono punkty idealne dla poszczególnych metod i alergenów, które mogą stanowić granicę odcinającą fizjologię od patologii. Zmiana progu odcięcia tak w metodzie RAST, jak i CAP zdecydowanie zmieniła wartości czułości i swoistości oraz pozostałe wskaźniki. Przy niewielkim spadku czułości (z 0.98 na 0.89) swoistość wzrosła dwukrotnie (0.46 na 0.91) (ryc.1). Następnym krokiem było więc wprowadzenie do diagnostyki testu, który posiadałby zalety metody RAST, ale był jeszcze bardziej swoisty i czuły w szerokim zakresie stężeń. Nowa technologia ImmunoCAP System jest systemem złożonym z aparatury, odczynników i oprogramowania. Zastąpienie celulozowego krążka przez dysk z polimeru celulozy spowodowało zwiększenie pojemności wiązania białka przeszło trzykrotnie, a zastosowana faza stała polepszyła parametry reakcji immunologicznej. W nowej metodzie wykorzystano ten sam zestaw alergenów jak w metodzie RAST oraz układ surowic standardowych, dlatego bardzo odpowiednia wydaje się być dla nowego testu nazwa Phadebas RAST II- generacji.

Czułość i swoistość diagnostyczna metody CAP w stosunku do testów skórnych dla wartości progowej 0.35 kU/l i wybranych alergenów wynosi odpowiednio dla d1 i d2 0.98 i 0.96, a swoistość od 0.44 do 0.47. Zwiększenie progu odcięcia z wartości 0.35 kU/l w metodzie CAP do wartości 7.3kU/l dla d1 spowodowało znaczny wzrost swoistości przy niewielkim spadku czułości. Zwiększył się także współczynnik PPV z 0.43 na 0.83. Czułość i swoistość testu są ważne, dla procesu wyboru testu, ale gdy decyzja taka zostanie podjęta, ich miejsce zajmuje wartość predykcyjna (5). Prawdopodobieństwo choroby pod warunkiem znajomości wyniku testu zwane jest wartością predykcyjną. W przypadku testu RAST i progu 0.35PRU/ml dokładność przewidywania negatywnej wartości testu jest duża. Znaczy to, że prawdopodobieństwo „zdrowia” przy uzyskaniu ujemnego wyniku testu ($< 0.35\text{PRU/ml}$) jest niemal pewne. Sytuacja wygląda inaczej, gdy analizujemy PPV. Jeżeli PPV dla alergenu d1 wynosi tylko 0.44, a wynik pacjenta w teście RAST będzie wyższy niż 0.35 PRU/ml to szansa, że jest on chory wynosi tylko 0.44. Dla pozostałych alergenów wartości te są jeszcze niższe. Taka wartość prawdopodobieństwa „a posteriori” jest zbyt niska dla badania, które ma potwierdzić wstępną diagnozę i zakwalifikować pacjenta np. do leczenia. W metodzie CAP, dla progu odcięcia sugerowanego przez producenta, obliczone prawdopodobieństwo wystąpienia alergii na roztocze kurzu domowego dla pacjenta z dodatnim wynikiem CAP ($>0.35\text{kU/l}$) wynosi tylko 0.43. Zwiększenie wartości progowej spowodowało dwukrotny wzrost wartości PPV, podczas gdy NPV pozostał niezmienny. Przy tak ustawionym progu odcięcia, prawdopodobieństwo choroby alergicznej w przypadku otrzymania dodatniego wyniku testu CAP, wynosi aż 0.83. Jest to wynik satysfakcjonujący badacza, przy utrzymanym poziomie wyników fałszywie ujemnych. Podniesienie progów odcięcia proponują także na podstawie własnych wyników Pastorello i wsp. (12), Mazurek H.(10), Sordyl i wsp. (13) i Crobach i wsp.(1).

Zastosowanie fazy stałej jako nośnika dla reakcji immunologicznej w metodzie RAST, a następnie CAP spowodowało, że otrzymano wartościową metodę diagnostyczną oznaczającą alergenowo swoiste przeciwciała IgE krążące w surowicy.

Wnioski

1. Metody Phadebas RAST i ImmunoCAP System oznaczające stężenie alergenowo swoistego IgE w surowicy mają dużą wartość diagnostyczną i dostarczają wyników ilościowych, przydatnych w diagnostyce chorób alergicznych.
2. Metody Phadebas RAST i CAP System są bardziej czułe niż SPT, ale mniej swoiste, dlatego aby mogły stanowić uzupełnienie diagnostyczne dla testów skórnych należy zwiększyć ich swoistość poprzez podwyższenie wartości progowej np. dla d1 z wartości 0.35 PRU/ml na 4.9PRU/ml w RASTach i z 0.35kU/l na 7.3kU/l w CAP.
3. Zmiana wartości progowej obu metod powoduje dwukrotny wzrost współczynnika PPV, a tym samym poprawia wykrywalność chorób alergicznych *á posteriori*.
4. Na podstawie analiz z zastosowaniem krzywych ROC wykazano, że metody RAST i CAP mają tę samą wartość diagnostyczną.

Piśmiennictwo

1. Crobach M. J. i wsp. The Phadiatop test compared with RAST, with CAP system; proposal for a third Phadiatop outcome: „inconclusive”. *Allergy* 1994, 49: 170-6
2. Dreborg S; Frew A; red. Standaryzacja alergenów i testy skórne. *Med. Prakt.* 1994, 48, 53-65
3. Jabłoński L. *Epidemiologia- podręcznik dla lekarzy i studentów*, Folium, Lublin 1996
4. Jędrzychowski W. *Podstawy epidemiologii Collegium Medicum UJ, Kraków* 1995
5. Kramer S. M. *Clinical epidemiology and biostatistics*. Springer-Verlag Berlin 1988
6. Lange O, Banasiński A.; *Teoria statystyki., Państwowe Wydawnictwo Ekonomiczne, Warszawa* 1970, 328-333
7. Lars Yman, *The new generation of the Radioallergosorbent test Pharmacia CAP System, Diagnosis*, 1983; 2 : 929-939
8. Malling H. J; Weeke B; *Immunoterapia Med. Prakt.* 1994, 3-26, 53-83
9. Małolepszy J. *Choroby alergiczne i astma. Wrocław, Volumed* 1996 451-462
10. Mazurek H., *Ocen przydatności wybranych sposobów wykrywania alergii na roztocze kurzu domowego u dzieci z astmą oskrzelową ewnątrzpochodną. Rozpraw doktorska, Rabka* 1992
11. Metz Ch. E. *Basic principles of ROC. Semin. in Nucl. Med.* 1978, 4, 283-298
12. Pastorello E.A. i wsp. *Clinical evaluation of CAP System and RAST in the measurement of specific IgE; Allergy* 1992, 47: 463-6
13. Sordyl K, Kurzawa R, Klucjasz S: *Comparison of allergen specific IgE antibodies determinations in blood serum by the Pharmacia CAP System and the Phadebas RAST versus skin prick test in children. Intern. Rev. Allergol. Clin. Immunol.* 1996, 2, 3, 83-88
14. Wide L, Bennich H, Johansson SGO. *Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. Lancet* 1967, 2, 1105-7
15. Williams PB; Dolen WK; Koepke JW.; Selner JC; *Comparison of skin testing and the three in vitro assays for specific IgE in the clinical evaluation of immediate hypersensitivity. Ann. Allergy.* 1992, 68 : 35-45

Wpłynęła : 2000-08-30

Adres :IGiChP ZP Rabka, ul. Prof. J. Rudnika , 34-700 Rabka

Podziękowania:

inż. Sławomirowi Klucjaszowi i mgr inż. Pawłowi Jamrozikowi dziękuję za pomoc w opracowaniu danych liczbowych