

DOI: 10.36691/RAJ.2020.17.1.007

Сравнительное исследование Allergy Explorer (ALEX) и платформ ImmunoCAP

Ш. Нерелиус¹, М. Андерссон¹, Л. Сегаард², М. Шванбек¹, С. Кофлер³, М. Бертольд⁴

¹ Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Рапсгата 7P, P.O. а/я 6460, 751 37 Упсала, Швеция

² Thermo Fisher Scientific, компания Thermo Fisher Diagnostics ApS, ЦБР № 27640745, Гидеванг 33, 3450 Аллерод, Дания

³ Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Diagnostics Austria GmbH, Дрезднер штрассе 89, 1200 Вена, Австрия

⁴ Сухоне АВ, Адельгата 21, 211 22 Мальмё, Швеция

РЕЗЮМЕ. Цель. В данной работе проводилось сравнение результатов нового мультиплекс-теста ALEX с результатами, полученными на мультиплекс-платформе ImmunoCAP ISAC sIgE 112 и при постановке единичных тестов ImmunoCAP.

Материалы и методы. Для анализа сывороток 64–66 пациентов на трех платформах использовались 11 цельных экстрактов аллергенов и соответствующих аллергенных компонентов.

Результаты. При исследовании на специфические IgE с цельными аллергенами 55% результатов, полученных с помощью теста ALEX, были ложноотрицательными по сравнению с ImmunoCAP, в то время как для компонентов аллергенов ALEX продемонстрировал 33% ложноотрицательных результатов по сравнению с результатами тестов ImmunoCAP. Кроме того, тест ALEX характеризуется более низким динамическим диапазоном — на платформе не было получено результатов выше 36 kU_A/L для соответствующих образцов с уровнем ≥100 kU_A/L в тестах ImmunoCAP при анализе IgE-ответа на цельные аллергены. В случае IgE-ответа на аллергенные компоненты ALEX не показал результатов выше 38 kU_A/L для образцов с уровнем 150 kU_A/L в тестах ImmunoCAP. По сравнению с единичными ImmunoCAP-тестами ALEX продемонстрировал низкий динамический диапазон и слабую согласованность количественных результатов для общего и специфических IgE как для цельных аллергенов, так и для компонентов. При сравнении с платформой ImmunoCAP ISAC sIgE 112 согласованность была лучше, однако чувствительность и динамический диапазон теста ALEX все равно оставались на низком уровне.

Выводы. Тест ALEX имеет ряд серьезных ограничений производительности по сравнению с обоими типами платформ ImmunoCAP.

Ключевые слова: sIgE, tIgE, тесты на основе чипов, ImmunoCAP, ALEX

Для цитирования: Ш. Нерелиус, М. Андерссон, Л. Сегаард, М. Шванбек, С. Кофлер, М. Бертольд. Сравнительное исследование Allergy Explorer (ALEX) и платформ ImmunoCAP. Российский Аллергологический Журнал. 2020;17(1):66-75. DOI: 10.36691/RAJ.2020.17.1.007

Введение

Чип ALEX® — это многокомпонентный тест, позволяющий одновременно измерять общий IgE (tIgE) и специфические IgE (sIgE) к экстрактам аллергенов и алергокомпонентам в одном исследовании. В общей сложности измеряется 282 анализита, из них 156 экстрактов и 125 компонентов, а также общий IgE. При сравнении с ImmunoCAP™ ISAC 112 81 алергокомпонент перекрывается, 44 есть

только в тесте ALEX, в то время как 31 присутствует только в тесте ImmunoCAP ISAC. Производитель теста ALEX утверждает, что тест предоставляет полуколичественные результаты для tIgE до 2500 kU/L, для sIgE к экстрактам аллергенов и алергокомпонентам указываются количественные результаты в диапазоне до 50 kU_A/L [1].

Все однокомпонентные тесты ImmunoCAP — общий IgE, экстракты аллергенов и алергоком-

Для корреспонденции

Charlotte Nerelius, PhD, Thermo Fisher Scientific, Phadia
E-mail: charlotte.nerelius@thermofisher.com

Статья поступила 04.12.2019 г.
Принята к печати 11.02.2020 г.
Рекомендована к публикации
Е.С. Феденко

поненты – выдают количественные результаты, соотносящиеся со стандартом ВОЗ [2, 3]. Многокомпонентный тест ImmunoCAP ISAC содержит 112 аллергокомпонентов и генерирует полуколичественные результаты (стандартизированные единицы ISAC/ISU) [4].

Цель

Целью была оценка технической производительности теста ALEX в измерении общего IgE, специфических IgE к цельным экстрактам аллергенов и аллергокомпонентам в сравнении с результатами однокомпонентных тестов ImmunoCAP (общий IgE, sIgE) и многокомпонентной платформы ImmunoCAP ISAC sIgE 112.

Дизайн эксперимента и методы

Основываясь на доказанной клинической значимости и представленности на платформах ALEX и ImmunoCAP, для исследования были отобраны одиннадцать цельных аллергенов и соответствующих аллергокомпонентов из разных групп (сезонные/круглогодичные ингаляторные аллергены, пищевые аллергены животного и растительного происхождения).

Образцы, полученные из Отдела диагностических образцов Phadia AB, отбирались на основе заведомо известного положительного sIgE-ответа на выбранные цельные аллергены и соответствующие компоненты, представленные в микрочипе. Для исследования были взяты образцы с положительным ответом на несколько экстрактов и уровнями sIgE в диапазоне от 0,35 до 50 kU_A/L.

В общей сложности было проанализировано 64–66 образцов сыворотки с помощью теста ALEX, тестов ImmunoCAP для определения специфического IgE к цельным аллергенам, теста ImmunoCAP для

определения общего IgE и теста для определения специфических sIgE к 112 аллергокомпонентам на чипе ImmunoCAP ISAC. 19–50 образцов также исследовали с помощью тестов ImmunoCAP для определения специфического IgE к аллергокомпонентам (n=25), соответствующим выбранным цельным аллергенам (табл. 1).

Все исследования были проведены согласно инструкциям каждого производителя профессиональными лабораторными работниками. Тесты ALEX проводились в Сервисной лаборатории Thermo Fisher Scientific (Аллерёд, Дания), все остальные тесты – в R&D отделе в Упсале (Швеция).

Статистический анализ

Согласованность между разными тест-системами оценивалась на образцах, для которых было получено не менее шести положительных результатов как в ALEX, так и в ImmunoCAP. Для сравнения методов использовалась процедура сравнения Пассинга–Баблока [5] с применением последующего линейного регрессионного анализа. Анализ проводился отдельно для каждого аллергена в диапазоне измерений, соответствующем тесту ALEX (0,3–50 kU_A/L для sIgE; 1–2500 kU/L для общего IgE), согласно инструкции производителя. Рассчитывались общая положительная и отрицательная согласованность, а также согласованность в пределах классов, соответствующих классам для теста ALEX.

Результаты

Общий IgE

Уровни общего IgE в тесте ImmunoCAP для образцов сыворотки (n=65) находились в диапазоне между 7 и 7900 kU/L, в то время как результаты теста

Таблица 1. Список отобранных цельных аллергенов и аллергокомпонентов, проанализированных на каждой платформе. Полные названия продуктов ImmunoCAP приведены в конце документа

Цельные экстракты аллергенов (n=11)	Соответствующие компоненты, общие для теста ALEX и аллергенов ImmunoCAP (n=25)	Компоненты, общие для ALEX и теста ISAC sIgE 112 (n=26)
Клещ домашней пыли	Der p 1, Der p 2, Der p 10, Der p 23	Der p 1, Der p 2, Der p 10, Der f 1, Der f 2
Пшеница	Глиадин	–
Персик	Pru p 3	Pru p 3
Пыльца оливы	Ole e 1	Ole e 1
Тимофеевка	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12
Постенница	Par j 2	Par j 2
Яйцо	Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3	Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 5
Молоко	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8
Лесной орех	Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 14	Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9
Грецкий орех	Jug r 1	Jug r 1, Jug r 2

ALEX укладывались в диапазон между 12 и 654 kU/L. Корреляция между тестами ALEX и ImmunoCAP выше 500 kU/L была слабой. Согласно информации производителя, измерительный диапазон теста ALEX – 1–2500 kU/L, результаты полуколичественные [1]. Тест ImmunoCAP на общий IgE выдает количественные результаты [2] (рис. 1).

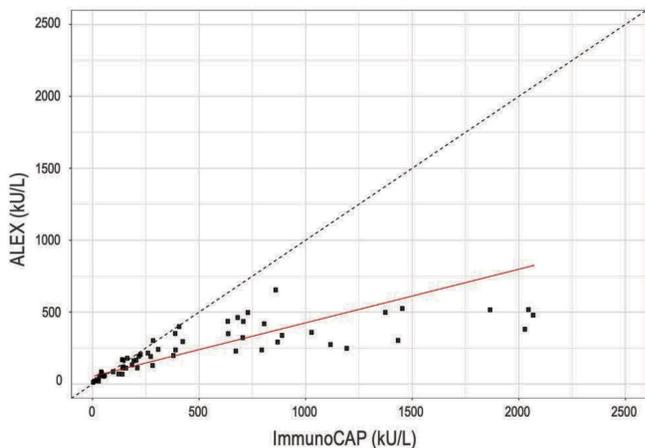


Рис. 1. Корреляция между результатами общего IgE для тестов ALEX и ImmunoCAP, демонстрирующая точечные данные в диапазоне до 2500 kU/L (n=58) для ImmunoCAP. Семь точек для результатов свыше 2500 kU/L, полученных на ImmunoCAP, не включены в анализ. Регрессионная кривая отмечена красным

Экстракты аллергенов: ALEX и Целые Аллергены ImmunoCAP

Согласованность по классам

Согласно информации производителей, как тест ALEX, так и тесты ImmunoCAP для специфического IgE генерируют количественные результаты [1, 3]. Тем не менее для более легкого сравнения результатов во всем диапазоне измерений результаты для экстрактов аллергенов были трансформированы в классы, которые указаны для ALEX (табл. 2, рис. 2). Согласно данным теста ALEX с данными тестов ImmunoCAP рассчитывалась соответственно этим классам. Корреляции для всех результатов приведены на рис. 3 а, b.

Таблица 2. Абсолютная согласованность результатов теста ALEX и результатов теста ImmunoCAP в рамках классов, указанных для ALEX. Общая согласованность классов составила 53%

Класс (определение ALEX)	Согласованность (ALEX и ImmunoCAP)
0 (<0,3 kU/l)	99,7%
1 (0,3–1 kU/l)	4,0 %
2 (1–5 kU/l)	16,2%
3 (5–15 kU/l)	23,4 %
4 (>15 kU/l)	38,8 %

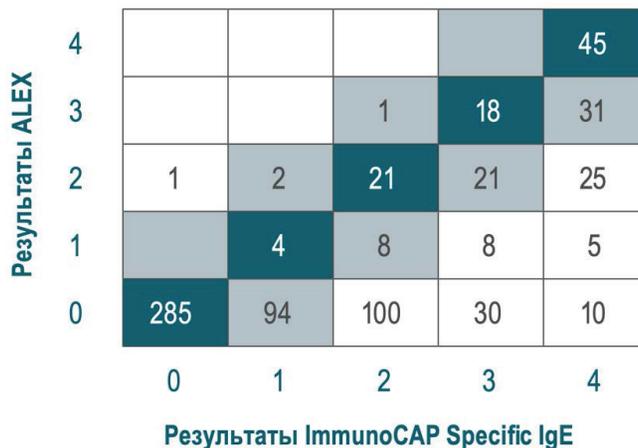


Рис. 2. Тепловая карта результатов теста ALEX и результатов теста ImmunoCAP. Частота ложноотрицательных результатов, определенная как <0,3 kU_A/L в тесте ALEX и как ≥0,3 kU_A/L в тестах ImmunoCAP, была на уровне 55% (234/423 положительных результата ImmunoCAP) для теста ALEX. Ложноотрицательные результаты обнаруживались во всем измерительном диапазоне

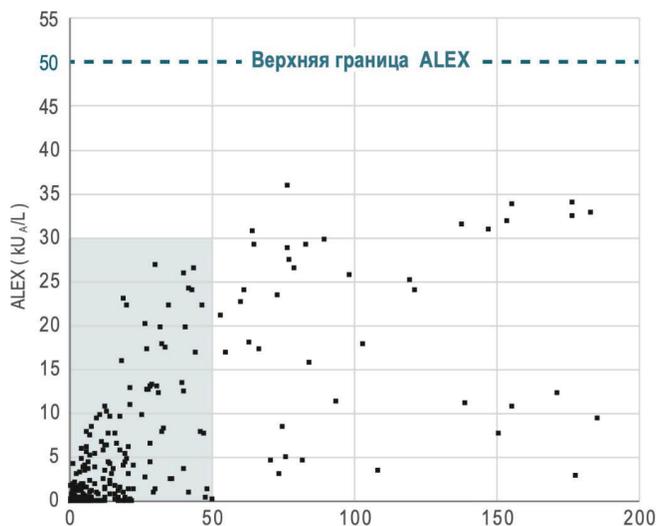


Рис. 3 а. Корреляция результатов всех тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE для целых аллергенов (n=709 точечных данных). Образцы с уровнем до 203 kU_A/L sIgE, согласно результатам теста ImmunoCAP sIgE, генерировали результаты до 36 kU_A/L в тесте ALEX

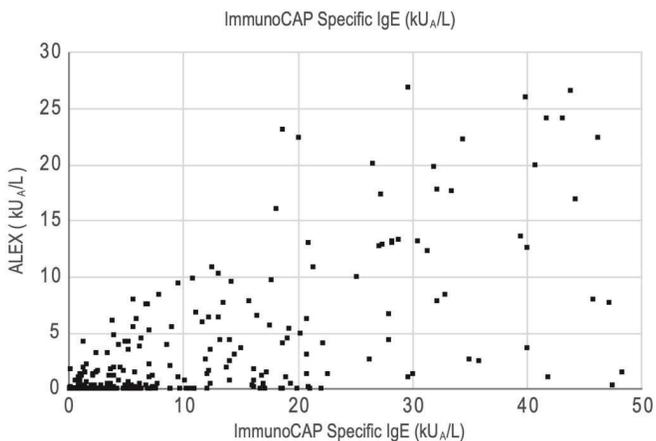


Рис. 3 б. Увеличение затененной области графика на рис. 3 а

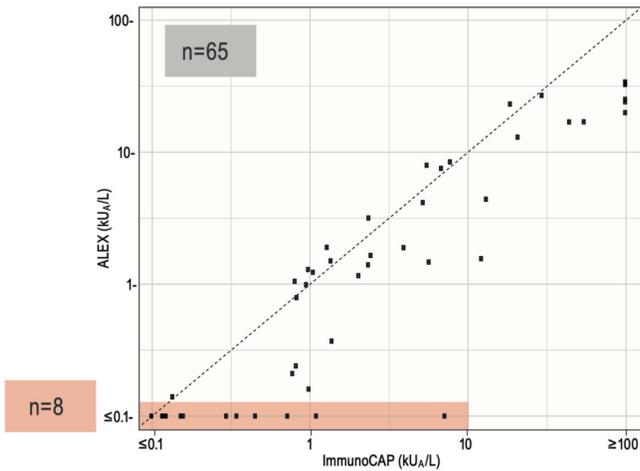


Рис. 4 а. Корреляция результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE в kU_A/L к *D. pteronyssinus*. Полный набор данных изображен в виде логарифмической диаграммы разброса данных

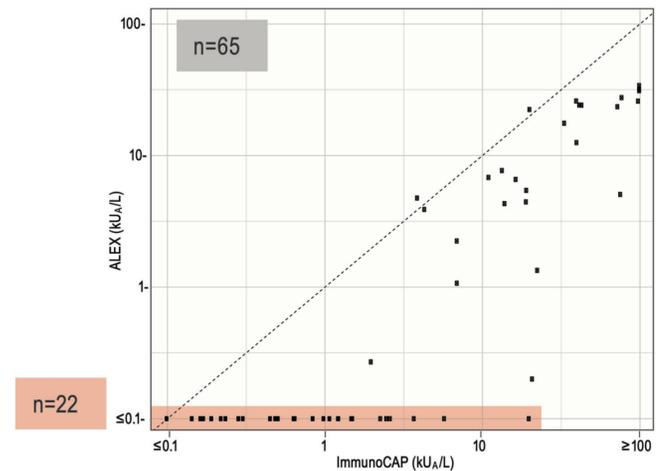


Рис. 4 с. Корреляция результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE в kU_A/L к тимофеевке. Полный набор данных изображен в виде логарифмической диаграммы разброса данных

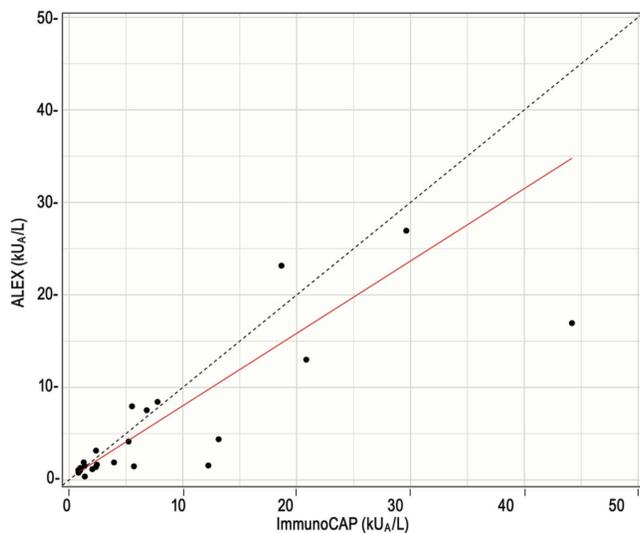


Рис. 4 б. Корреляция результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE в kU_A/L к *D. pteronyssinus*. Представлены корреляции точечных данных, положительные для обеих систем, находящиеся в рамках измерительного диапазона теста ALEX 0,3–50 kU_A/L (регрессионная кривая красного цвета). 39 образцов для *D. pteronyssinus* (клещ домашней пыли, d 1) из общего количества в 65 образцов были положительны в тестах ImmunoCAP на специфический IgE ($\ge 0,3 kU_A/L$). В тесте ALEX количество положительных образцов составило 31

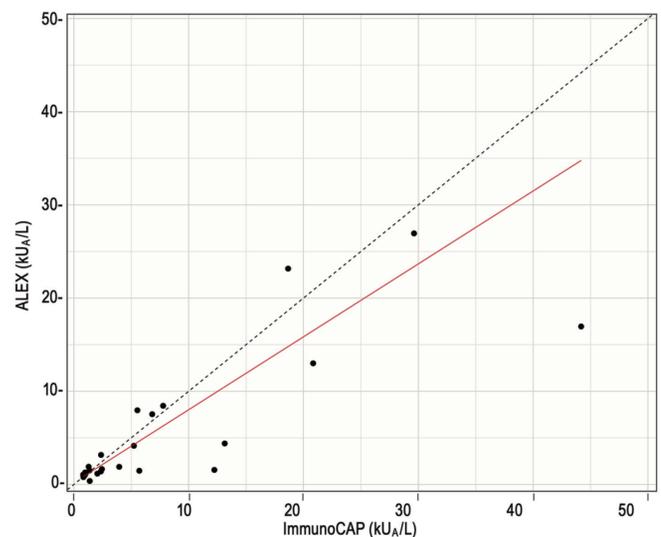


Рис. 4 д. Корреляция результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE в kU_A/L к тимофеевке. Представлены корреляции точечных данных, положительные для обеих систем, находящиеся в рамках измерительного диапазона теста ALEX 0,3–50 kU_A/L (регрессионная кривая красного цвета). 47 образцов для тимофеевки из общего количества в 65 образцов были положительны в тестах ImmunoCAP на специфический IgE ($\ge 0,3 kU_A/L$). В тесте ALEX количество положительных образцов составило 25

Количественные сравнения

Мы также проанализировали количественные корреляции результатов отдельных тестов на экстракты аллергенов. На рис. 4 и 5 показано по два примера каждого экстракта аллергенов с хорошей или плохой согласованностью соответственно при сравнении результатов теста ALEX с результатами тестов ImmunoCAP на специфический IgE к цель-

ным аллергенам. Результаты тестов ImmunoCAP были оценены как положительные, поскольку превышали порог, заданный для теста ALEX, то есть $\ge 0,3 kU_A/L$. Важно отметить, что количество положительных результатов для тестов ImmunoCAP могло быть выше в случае включения результатов от 0,1 kU_A/L (отражая LoQ для тестов ImmunoCAP на специфический IgE).

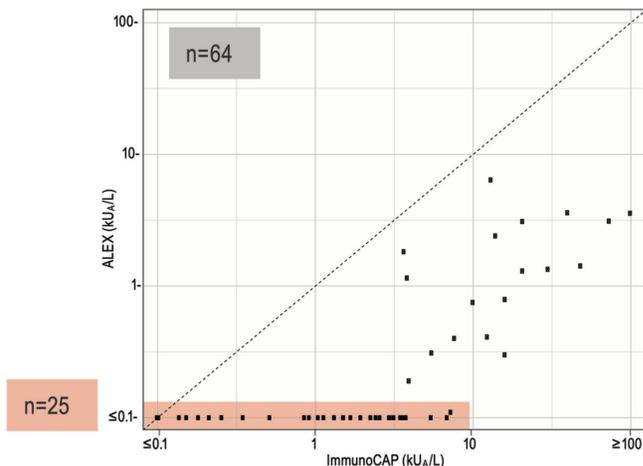


Рис. 5 а. Корреляция результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к цельным аллергенам в kU_A/L для экстрактов **лесного ореха**. Полный набор данных изображен в виде логарифмической диаграммы разброса данных

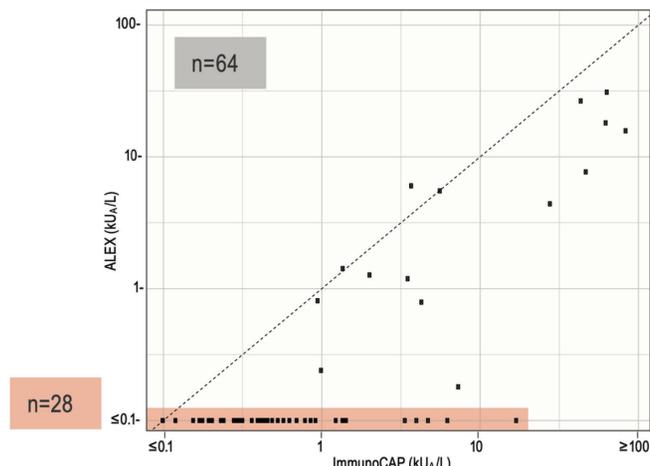


Рис. 5 с. Корреляция результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к цельным аллергенам в kU_A/L для экстрактов **пыльцы оливы**. Полный набор данных изображен в виде логарифмической диаграммы разброса данных

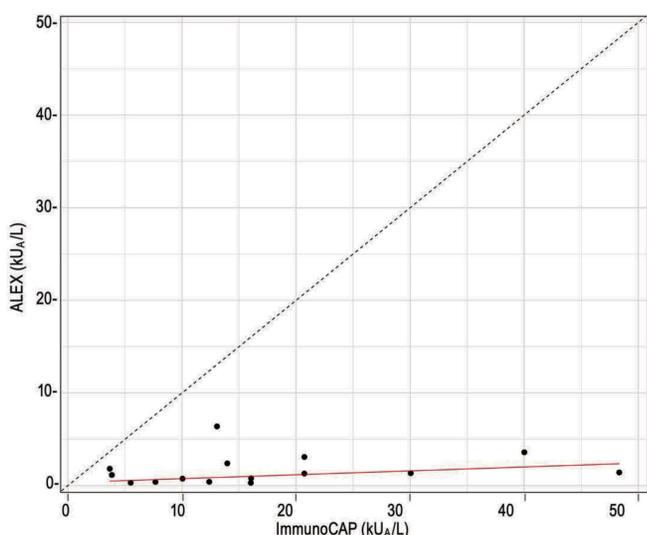


Рис. 5 б. Корреляция результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к цельным аллергенам в kU_A/L для экстрактов **лесного ореха**. Представлены корреляции точечных данных, положительные для обеих систем и находящиеся в рамках измерительного диапазона теста ALEX 0,3–50 kU_A/L (регрессионная кривая красного цвета). 42 образца для лесного ореха из общего количества в 64 образца были положительными в тестах ImmunoCAP на специфический IgE ($\ge 0,3 kU_A/L$). Для результатов теста ALEX те же экстракты дали 17 положительных ответов

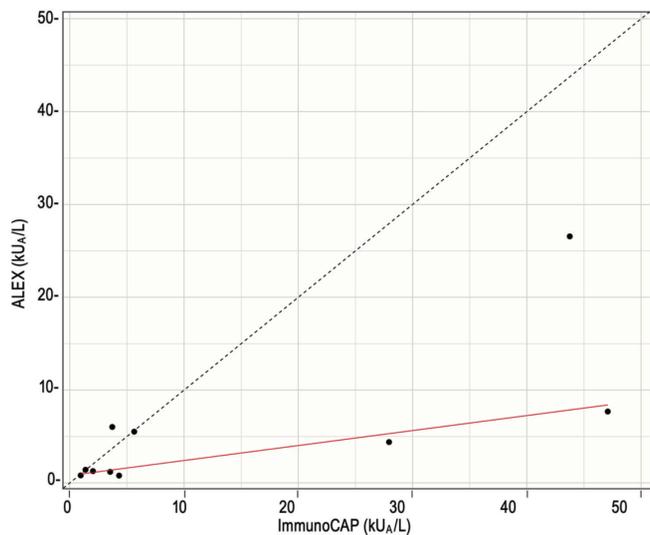


Рис. 5 д. Корреляция результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к цельным аллергенам в kU_A/L для экстрактов **пыльцы оливы**. Представлены корреляции точечных данных, положительные для обеих систем и находящиеся в рамках измерительного диапазона теста ALEX 0,3–50 kU_A/L (регрессионная кривая красного цвета). 41 образец для оливы из общего количества в 64 образца были положительными в тестах ImmunoCAP на специфический IgE ($\ge 0,3 kU_A/L$). Для результатов теста ALEX те же экстракты дали 13 положительных ответов

Компоненты аллергенов: ALEX и Аллергокомпоненты ImmunoCAP

Общую согласованность результатов по уровню sIgE к компонентам аллергенов в тесте ALEX и тестах ImmunoCAP анализировали путем результатов в «классах ALEX». Был проведен анализ двадцати пяти компонентов из 11 выбранных экстрактов аллергенов с использованием 19–50 образцов сыворотки на каждый компонент (см. табл. 1). Согласованность между данными теста ALEX и данными теста ImmunoCAP рассчитывалась в рамках каждого класса (табл. 3, рис. 6).

Поскольку производитель теста ALEX указывает, что тест выдает количественные результаты [1], были также посчитаны корреляции между результатами (в kU_A/L) для тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к отдельным компонентам аллергенов.

Для четырех компонентов, а именно Cor a 14 и Cor a 1 лесного ореха, Par j 2 постенницы и Phl p 7 тимopheевки, провести регрессионный анализ не представлялось возможным из-за слишком малого количества положительных ответов в тесте ALEX (менее шести положительных сывороток).

Таблица 3. Согласованность результатов теста ALEX и в тестах на аллергокомпоненты ImmunoCAP в «классах ALEX». Общая согласованность классов составила 70%

Класс (определение ALEX)	Согласованность (ALEX и ImmunoCAP)
0 (<0,3 kU/l)	98,9%
1 (0,3–1 kU/l)	14,9%
2 (1–5 kU/l)	36,3%
3 (5–15 kU/l)	43,9%
4 (>15 kU/l)	66,0%

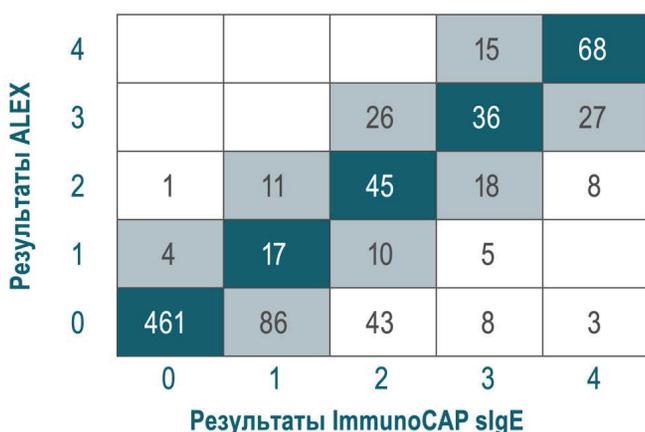


Рис. 6. Тепловая карта результатов теста ALEX и тестов ImmunoCAP приведена внизу. Уровень ложноотрицательных результатов IgE-ответа на компоненты (определен как <math><0,3 \text{ kU}_A/\text{L}</math> в тесте ALEX, но $\geq 0,3 \text{ kU}_A/\text{L}</math> в тестах ImmunoCAP) составил 33% (140/426) для теста ALEX. Ложноотрицательные результаты встречались во всем диапазоне измерений$

В случаях с *Cor a 1* и *Phl p 7* количество положительных сывороток для двух систем оказалось слишком незначительным для любых значимых выводов, в то время как для *Par j 2* и *Cor a 14* 23 из 41 образца и 13 из 40 образцов соответственно были положительными в тестах ImmunoCAP ($\geq 0,3 \text{ kU}_A/\text{L}$). Соответствующее количество положительных образцов в тесте ALEX составило 3 как для *Par j 2*, так и для *Cor a 14*, что привело к самой низкой положительной согласованности в этом исследовании, 13 и 23% соответственно.

Из оставшегося проанализированного двадцати одного компонента для двух показана высокая согласованность результатов тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE и для двух – низкая (рис. 7, 8). В случае тестов ImmunoCAP результаты выше порогового уровня теста ALEX, то есть $\geq 0,3 \text{ kU}_A/\text{L}$, считались положительными. Опять же количество положительных результатов в тестах ImmunoCAP могло бы быть выше в случае включения результатов от $0,1 \text{ kU}_A/\text{L}$ (отражая LoQ тестов ImmunoCAP на специфический IgE).

Анализ отрицательных результатов для экстрактов и результатов для компонентов в тестах ALEX и ImmunoCAP на примере лесного ореха

Для 25 из 64 исследованных образцов были получены положительные результаты в тесте ImmunoCAP для цельного аллергена лесного ореха, однако в тесте ALEX соответствующие результаты были отрицательными. Результаты анализа на IgE к компонентам для 24 из этих образцов приведены в табл. 4. Двадцать три сыворотки давали положительные результаты на любой из компонентов лесного ореха в тестах ImmunoCAP, в то время как в тесте ALEX было получено всего девять положительных результатов на компоненты лесного ореха.

Эти данные подчеркивают, что отрицательные результаты в тесте ALEX на экстракты не обязательно являются отрицательными на самом деле. Кроме того, они демонстрируют, что ложноотрицательные результаты исследований экстрактов не уравновешиваются положительными результатами ответа sIgE на компоненты, и сенсibilизация к определенным источникам аллергенов может быть полностью упущена.

CCD

Важно отметить, что ложноотрицательные показатели (табл. 5) не претерпели значительных изменений только при анализе сывороток, не содержащих sIgE к перекрестно-реактивным углеводным детерминантам, что определялось тестом ImmunoCAP на специфический IgE к MUXF3 (o214, CCD) ($n=54-56$).

Возможно, низкая чувствительность теста ALEX отчасти является следствием необходимости пятикратного разведения сыворотки (согласно протоколу теста ALEX).

Пятикратное разведение образцов в тесте ALEX позволяет ингибировать CCD. Согласно информации производителя, снижение CCD-реактивности на 85% достигается благодаря этому этапу инкубации, а при увеличении времени инкубации до 30 мин CCD-реактивность уменьшается до 95% [6].

В случае ImmunoCAP ISAC нет необходимости в разведении сыворотки, и на данный момент в чипе ImmunoCAP ISAC sIgE 112 присутствуют лишь шесть CCD-содержащих компонентов из 112. Когда будет запущен новый чип ImmunoCAP ISAC_{E112i}, в нем останется лишь четыре CCD-содержащих аллергенных компонента.

Результаты тестов ALEX и ImmunoCAP ISAC sIgE 112 на компоненты аллергенов

Для сравнения ALEX и ImmunoCAP ISAC sIgE 112 расчет согласованности классов был проведен

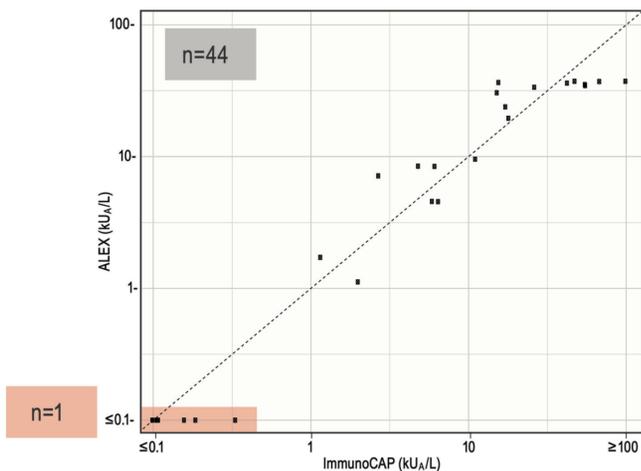


Рис. 7 а. Корреляция между результатами тестов ALEX и ImmunoCAP на специфические IgE к алергокомпонентам в kU_A/L для **Phl p 5 тимофеевки**. Все данные приведены в виде логарифмической диаграммы разброса данных

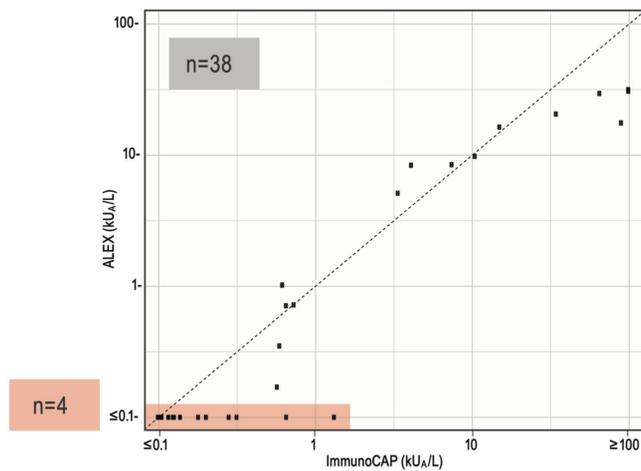


Рис. 7 с. Корреляция между результатами тестов ALEX и ImmunoCAP на специфические IgE к алергокомпонентам в kU_A/L для **Der p 1 *D. pteronyssinus***. Все данные приведены в виде логарифмической диаграммы разброса данных

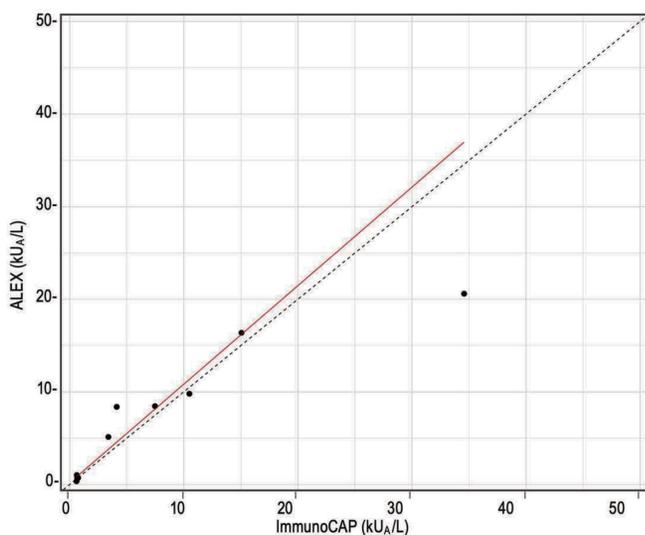


Рис. 7 б. Корреляция между результатами тестов ALEX и ImmunoCAP на специфические IgE к алергокомпонентам в kU_A/L для **Phl p 5 тимофеевки**. Представлены корреляции точечных данных, положительные для обеих систем и находящиеся в рамках измерительного диапазона теста ALEX (0,3–50 kU_A/L) (регрессионная кривая красного цвета). 20 из 44 образцов для Phl p 5 были положительны в тестах ImmunoCAP на специфический IgE ($\geq 0,3 kU_A/L$). В тесте ALEX значения для Phl p 5 составили 19

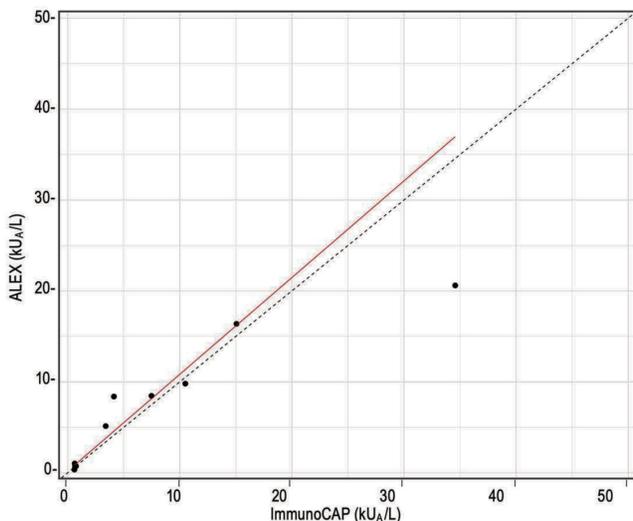


Рис. 7 д. Корреляция между результатами тестов ALEX и ImmunoCAP на специфические IgE к алергокомпонентам в kU_A/L для **Der p 1 *D. pteronyssinus***. Представлены корреляции точечных данных, положительные для обеих систем и находящиеся в рамках измерительного диапазона теста ALEX (0,3–50 kU_A/L) (регрессионная кривая красного цвета). 18 из 38 образцов для Der p 1 были положительны в тестах ImmunoCAP на специфический IgE ($\geq 0,3 kU_A/L$). В тесте ALEX значения для Der p 1 составили 14

двумя способами при допущении, что каждая система выдает «истинные» результаты. Ложноотрицательные результаты для ALEX относительно теста ImmunoCAP ISAC sIgE 112 были на уровне 15,8% (59/374), в то время как отрицательные результаты для ImmunoCAP ISAC sIgE 112 относительно теста ALEX составили 9,5% (33/348) (табл. 6, рис. 9).

В целом результат согласованности двух систем оказался справедливым. Общая согласованность по классам варьировала в рамках 61–97% для исследованных компонентов, в подавляющем большинстве составляя свыше 80%. Наименьшая согласованность в классах 1–3 (между 19 и 51%), вероятнее всего,

наблюдалась из-за низкой чувствительности теста ALEX, не превышающей значения 39 kU_A/L в 407 положительных точках данных при уровне приблизительно 100 ISU-E в тесте ImmunoCAP ISAC 112 (рис. 10). Согласованность в рамках класса 4, то есть для уровня sIgE выше 15 kU_A/L , составила 78%.

Общая чувствительность теста ALEX

Во всех сравнениях была выявлена более низкая чувствительность теста ALEX по сравнению с тестами ImmunoCAP, что отражено в уровне ложноотрицательных результатов, полученных при проведении теста ALEX (см. табл. 6).

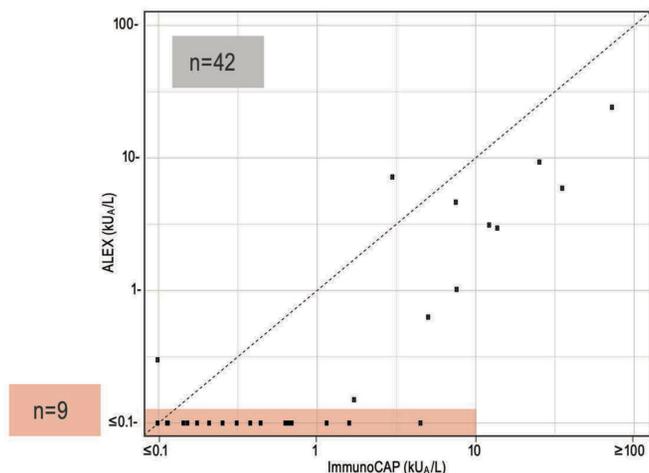


Рис. 8 а. Корреляция между результатами тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к аллергокомпонентам в kU_A/L для **Жуг r 1 лесного ореха**. Все данные приведены в виде логарифмической диаграммы разброса данных

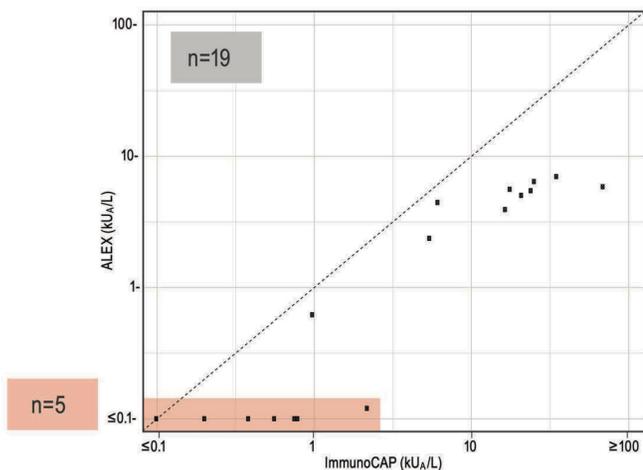


Рис. 8 с. Корреляция между результатами тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к аллергокомпонентам в kU_A/L для **Gal d 2 белка куриного яйца**. Все данные приведены в виде логарифмической диаграммы разброса данных

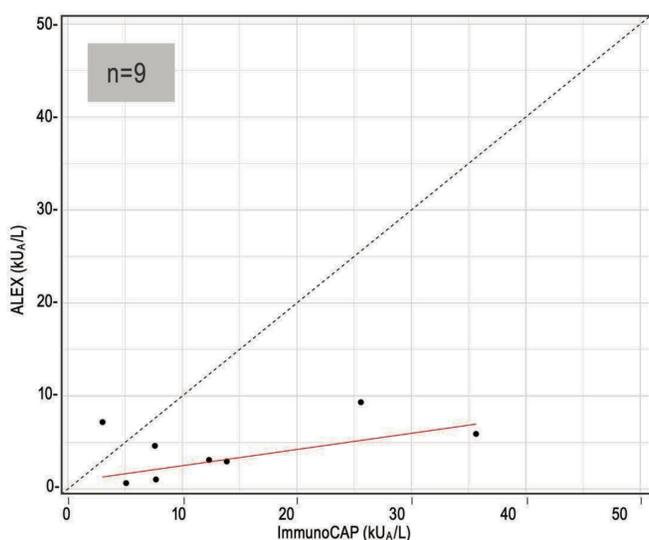


Рис. 8 б. Корреляция между результатами тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к аллергокомпонентам в kU_A/L для **Жуг r 1 лесного ореха**. Представлены корреляции точечных данных, положительные для обеих систем и находящиеся в рамках измерительного диапазона теста ALEX (0,3–50 kU_A/L) (регрессионная кривая красного цвета). 19 из 42 образцов были положительными в тестах ImmunoCAP sIgE к Жуг r 1 ($\ge 0,3 kU_A/L$). В тесте ALEX соответствующие значения для Жуг r 1 составили 10

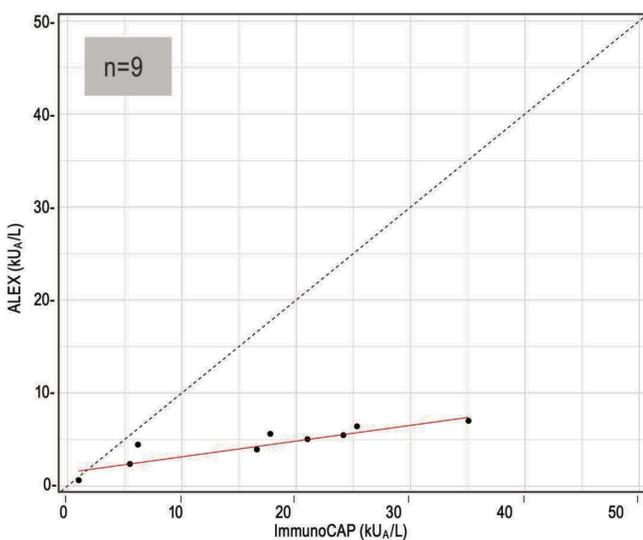


Рис. 8 д. Корреляция между результатами тестов ALEX и ImmunoCAP на специфический IgE к аллергокомпонентам в kU_A/L для **Gal d 2 белка куриного яйца**. Представлены корреляции точечных данных, положительные для обеих систем и находящиеся в рамках измерительного диапазона теста ALEX (0,3–50 kU_A/L) (регрессионная кривая красного цвета). 15 из 19 образцов были положительными в тестах ImmunoCAP sIgE к Gal d 2 ($\ge 0,3 kU_A/L$). В тесте ALEX соответствующие значения для Gal d 2 составили 10

Обсуждение

Согласно информации производителя, многокомпонентный тест ALEX является альтернативой широко распространенным на рынке тестам для определения уровня общего и специфических IgE ImmunoCAP и ImmunoCAP ISAC. При прямом сравнении технической производительности ALEX с тестами ImmunoCAP была выявлена недостаточная чувствительность теста ALEX как для цельных аллергенов (55% ложноотрицательных результатов, 234/423 положительных результатов

ImmunoCAP), так и для компонентов аллергенов (33% ложноотрицательных результатов, 140/426 положительных результатов ImmunoCAP). Кроме того, динамический диапазон ALEX существенно ниже и не превышает 36 kU_A/L для цельных аллергенов и 38 kU_A/L для компонентов аллергенов. Уровни в тестах ImmunoCAP на специфический IgE для этих же образцов составили $\ge 100 kU_A/L$ и до 150 kU_A/L соответственно. При этом тест ALEX продемонстрировал более низкие результаты во всем динамическом диапазоне как для цельных аллергенов, так и для специфических компонентов аллергенов. В частно-

Таблица 4. Сравнение результатов исследования sIgE-ответа на компоненты аллергенов на двух платформах при использовании сыворотки с отрицательным ответом на экстракт лесного ореха в тесте ALEX, но положительным в тестах ImmunoCAP на целый аллерген

Метод	Количество положительных образцов для компонентов									
	sIgE к экстракту	sIgE к лю-бому комп.	Cor a 1		Cor a 8		Cor a 9		Cor a 14	
Порог	≥0,3	≥0,3	≥0,1	≥0,3	≥0,1	≥0,3	≥0,1	≥0,3	≥0,1	≥0,3
ImmunoCAP	24	23/24	8	2	18	17	12	10	13	5
Компоненты ALEX	0	9/24	НД	0	НД	5	НД	5	НД	0

Примечание. Показаны оба порога (0,1 и 0,3 kU_A/L) для тестов ImmunoCAP на специфический IgE к компонентам аллергенов.

Таблица 5. Общая чувствительность теста ALEX

Цельные экстракты	ALEX vs ImmunoCAP sIgE экстракты	55% ложноотрицательных
Компоненты аллергенов	ALEX vs ImmunoCAP sIgE компоненты	33% ложноотрицательных
Компоненты аллергенов	ALEX vs ImmunoCAP ISAC 112	16% ложноотрицательных
	ImmunoCAP ISAC 112 vs ALEX	9,5% ложноотрицательных

Таблица 6. Согласованность между результатами теста ALEX на компоненты аллергенов и теста ImmunoCAP ISAC 112 на компоненты аллергенов (согласно «классам ALEX»)

Класс (определение ALEX)	Согласованность ALEX и ImmunoCAP ISAC	Согласованность ImmunoCAP ISAC и ALEX
0 (<0,3 kU/l)	97,7%	96,0%
1 (0,3–1 kU/l)	19,3%	33,3%
2 (1–5 kU/l)	42,7%	47,0%
3 (5–15 kU/l)	51,0%	49,0%
4 (> 15 kU/l)	78,0%	65,2%

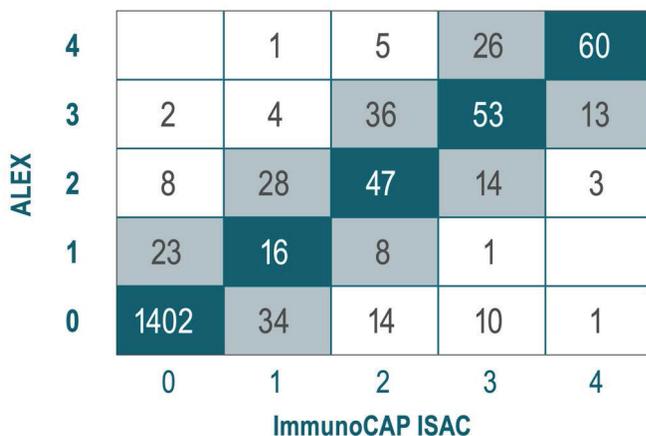


Рис. 9. Тепловые карты результатов тестов ALEX и ImmunoCAP ISAC 112. Уровень ложноотрицательных результатов для теста ALEX относительно теста ImmunoCAP ISAC 112 составил 15,8% (59/374), в то время как уровень ложноотрицательных результатов для теста ImmunoCAP ISAC 112 относительно теста ALEX составил 9,5% (33/348)

сти, при сравнении тестов ALEX и ImmunoCAP для цельных аллергенов общая согласованность классов была на уровне 53% и колебалась в промежутке 4–40% для положительных классов, варьируя от 23

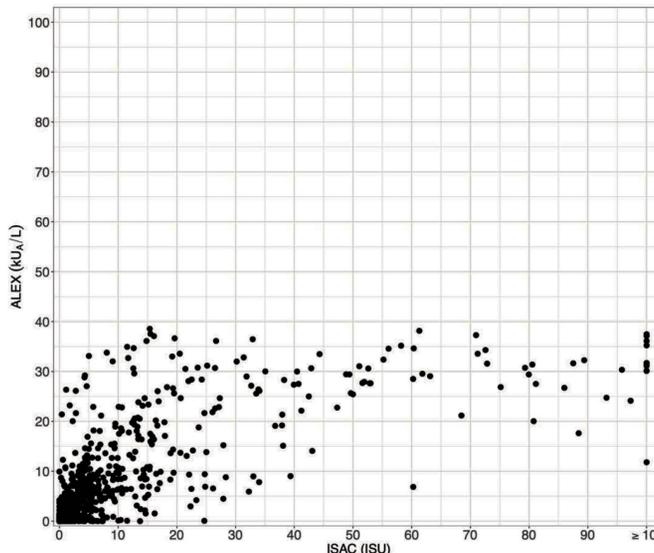


Рис. 10. Результаты уровня sIgE к компонентам аллергенов в тесте ALEX не превышают значения 39 kU_A/L в 407 положительных точках данных, в то время как тест ImmunoCAP ISAC 112 определяет специфический IgE приблизительно до 100 ISU-Е. На графике отсутствуют тринадцать положительных точек данных (сокращены)

до 80% согласованности положительных результатов для исследованных 11 экстрактов. Несколько лучшая картина наблюдалась для компонентов аллергенов: здесь общая согласованность в рамках класса составила 70%, варьируя в диапазоне 15–66% для положительных классов. Ложноотрицательные результаты, полученные при анализе ответа на экстракт лесного ореха, лишь подтверждают выводы, сделанные выше.

В то же время при сравнении отрицательных результатов была показана высокая согласованность ALEX и тестов ImmunoCAP на специфический IgE, составившая 99,7% для цельных аллергенов и 98,9% для компонентов аллергенов соответственно. Это свидетельствует об отсутствии очевидных проблем с фоном у теста ALEX.

Таким образом, тест ALEX® tIgE, sIgE к цельным аллергенам и компонентам аллергенов характеризуется низким динамическим диапазоном, слабой чувствительностью и согласованностью с одноком-

понентными тестами ImmunoCAP. В сравнении с чипом ImmunoCAP ISAC sIgE 112 согласованность выше, но чувствительность и динамический диапазон все так же остаются на низком уровне.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. ALEX – Allergy explorer. The smart way to explore allergy. Доступно на www.macroarraydx.com.
2. ImmunoCAP total IgE Direction for Use 52- 5292 – EN/08. Доступно на <https://dfu.phadia.com/Data/Pdf/5be5621c-89c2320848d710f6.pdf>.
3. ImmunoCAP Specific IgE Direction for Use 52 – 5291 – EN/09. Доступно на <https://dfu.phadia.com/Data/Pdf/5be441b889c2320848d6fb28.pdf>.
4. ImmunoCAP ISAC sIgE 112 Directions for Use 81 0002 – 62/02. Доступно на www.thermofisher.com#.
5. Ekaterina Manuilova, Andre Schuetzenmeister, Fabian Model (2014). mcr: Method Comparison Regression. R package version 1.2.1. Available at <https://CRAN.R-project.org/package=mcr>.
6. ALEX – Allergy Explorer Instruction for Use. Доступно на www.macroarraydx.com.

Информация об авторах / Information about the authors

C. Nerelius, PhD, Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Rapskatan 7P, P.O. Box 6460, 751 37 Uppsala, Sweden.
E-mail: charlotte.nerelius@thermofisher.com

M. Andersson, Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Rapskatan 7P, P.O. Box 6460, 751 37 Uppsala, Sweden.
E-mail: mats.andersson@thermofisher.com

L. Søgaard, Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Diagnostics ApS, CVR.nr. 27640745, Gydevang 33, 3450 Allerød.
E-mail: lone.sogaard@thermofisher.com

M. Schwanbeck, Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Rapskatan 7P, P.O. Box 6460, 751 37 Uppsala, Sweden.
E-mail: maria.schwanbeck@thermofisher.com

S. Kofler, PhD: Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Diagnostics Austria GmbH, Dresdner Straße 89, 1200 Vienna, Austria.
E-mail: stefan.kofler@thermofisher.com

M. Berthold, PhD: Cyxone AB, Adelgatan 21, 211 22 Malmö, Sweden.
E-mail: malin.berthold@cyxone.com

Участие авторов

- Концепция и дизайн исследования – CN, MB, SK.
- Получение результатов / оценка производительности тестов – MS, LS.
- Статистическая обработка результатов – CN, MB, MA.
- Повторная статистическая обработка – CN, MB, MA, SK.
- Написание текста – CN, MB, SK.
- Редактирование – CN, MB, SK.

Дополнительные утверждения

Авторы согласны на публикацию данной работы.

Все авторы ознакомились с окончательным вариантом текста и подтвердили свое согласие на публикацию статьи. Авторы заявляют, что приведенный порядок авторов утвержден каждым из них, а также что статья не была опубликована или принята к публикации в другом журнале.

Информация об источниках финансирования

Исследование было профинансировано компанией Thermo Fisher Scientific, ImmunoDiagnostics.

Конфликт интересов

Все авторы являются (или являлись на момент подготовки текста статьи) сотрудниками компании Thermo Fisher Scientific, ImmunoDiagnostics.

DOI: 10.36691/RAJ.2020.17.1.008

Comparative study of Allergy Explorer (ALEX) versus ImmunoCAP platforms

C. Nerelius¹, M. Andersson¹, L. Søgaard², M. Schwanbeck¹, S. Kofler³, M. Berthold⁴

¹ Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Rapsgatan 7P, P.O. Box 6460, 751 37 Uppsala, Sweden

² Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Diagnostics ApS, CVR.nr. 27640745, Gydevang 33, 3450 Allerød, Denmark

³ Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Diagnostics Austria GmbH, Dresdner Straße 89, 1200 Vienna, Austria

⁴ Cyxone AB, Adelgatan 21, 211 22 Malmö, Sweden

ABSTRACT. Objective. In this study, technical performance of the new multiplex ALEX test was compared with results from ImmunoCAP single tests (tIgE, sIgE) and the multiplex platform ImmunoCAP ISAC sIgE 112.

Materials and methods. Eleven whole allergen extracts and corresponding allergen components from different allergen groups were used for the analysis of 64–66 patients' sera by all three platforms.

Results. For the whole allergens, 55% false negative results were obtained with the ALEX test comparing to the ImmunoCAP sIgE tests while for allergen components the ALEX test gives 33% false negative results when compared to ImmunoCAP sIgE test results. Additionally, the ALEX test is characterized by a low dynamic range – the platform demonstrated no results above 36 kU_A/L for samples giving ≥100 kU_A/L using ImmunoCAP Specific IgE tests in the analysis of sIgE response to the whole allergens. For the allergen components, ALEX showed no results above 38 kU_A/L for samples of up to 150 kU_A/L according to ImmunoCAP Specific IgE test results. Comparing to ImmunoCAP single plex tests, ALEX show low dynamic range and poor agreement in quantitative results for tIgE and sIgE both for whole allergens and allergen components, while in the comparison with ImmunoCAP ISAC sIgE 112 platform, the agreement is better, but the sensitivity and dynamic range are still low.

Conclusions. The ALEX test has some serious limitations in its performance comparing to both types of ImmunoCAP platforms.

Keywords: sIgE, tIgE, chip-based tests, ImmunoCAP, ALEX

For citation: C. Nerelius, M. Andersson, L. Søgaard, M. Schwanbeck, S. Kofler, M. Berthold. Comparative study of Allergy Explorer (ALEX) versus ImmunoCAP platforms. Russian Journal of Allergy. 2020;17(1):76-84. DOI: 10.36691/RAJ.2020.17.1.008

Background

The ALEX[®] chip is a multiplex test that combines simultaneous measurement of total IgE (tIgE) and specific IgE (sIgE) to allergen extracts and allergen components in one assay. In total 282 analytes are measured, 156 extracts and 125 components, and total IgE. As compared to ImmunoCAP[™] ISAC 112, 81 allergen components are overlapping, 44 are unique to the ALEX test, while 31 are only present on the ImmunoCAP ISAC test. The manufacturer of the ALEX test claims that the assay gives semi-quantitative results for tIgE up to 2500 kU/L, for sIgE to allergen extract and allergen components the test is said to give quantitative results up to 50 kU_A/L [1].

ImmunoCAP single-analyte tests for total IgE, allergen extracts and allergen components all generate quantitative results, with traceability to the WHO standard [2, 3]. The ImmunoCAP ISAC carries 112 allergen components and generates semi-quantitative results (ISAC standardized units/ISU) [4].

Purpose

To evaluate the technical performance of the ALEX test in measuring total IgE, sIgE to whole allergen extracts and allergen components in comparison with results from ImmunoCAP single tests (total IgE, sIgE) and the multiplex platform ImmunoCAP ISAC sIgE 112.

For correspondence

Charlotte Nereliu, PhD, Thermo Fisher Scientific, Phadia
E-mail: charlotte.nereliu@thermofisher.com

Статья поступила 04.12.2019 г.
Принята к печати 11.02.2020 г.
Рекомендована к публикации
Е.С. Феденко

Study design and methods

Eleven whole allergens and their corresponding allergen components representing different allergen groups (seasonal/perennial inhalant allergens, food allergens of animal and plant origin) were selected based on proven clinical relevance and for representation on both the ALEX and ImmunoCAP platforms.

Samples from Phadia AB's Diagnostic Sample Unit were selected for known sIgE positivity to the selected whole allergens, and for their respective components present on the microarrays. Samples with multiple extract positivity and with sIgE spanning the range from 0.35 to 50 kU_A/L were chosen.

In total, 64–66 serum samples were analyzed using the ALEX test, ImmunoCAP Specific IgE whole allergen tests, the ImmunoCAP Total IgE test and the ImmunoCAP ISAC sIgE 112 chip. 19–50 of the samples were also analyzed using ImmunoCAP Specific IgE allergen component tests (n=25), representing the selected whole allergens (Tab. 1).

Table 1. List of selected whole allergens and allergen components analyzed for each platform. Full ImmunoCAP product names are available at the end of the document

Whole allergen extracts (n=11)	Corresponding components common to the ALEX test and ImmunoCAP Allergens (n=25)	Components common to the ALEX and ImmunoCAP™ ISAC sIgE 112 test 2 (n=26)
House dust mite	Der p 1, Der p 2, Der p 10, Der p 23	Der p 1, Der p 2, Der p 10, Der f 1, Der f 2
Wheat	Gliadin	–
Peach	Pru p 3	Pru p 3
Olive pollen	Ole e 1	Ole e 1
Timothy	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12
Wall Pellitory	Par j 2	Par j 2
Egg	Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3	Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 5
Milk	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8
Hazelnut	Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 14	Cor a 1, Cor a 8, Cor a 9
Walnut	Jug r 1	Jug r 1, Jug r 2

All assays were performed according to each manufacturers' instructions by professional laboratory technicians. ALEX tests were run at Thermo Fisher Scientific's Service laboratory, Allerød, Denmark, all other assays in the R&D department in Uppsala, Sweden.

Statistical Analyses

The agreement between the different test systems was evaluated for samples with at least six positive test results on both the ALEX and ImmunoCAP tests. A linear regression analysis was performed following the method comparison procedure of Passing-Bablok [5]. The analyses were done separately for each allergen and in the measuring range relevant for the ALEX test (0.3–50 kU_A/L for sIgE; 1–2500 kU/L for total IgE) according to the manufacturer. Overall positive and negative agreement was calculated as well as class agreement based on classes defined for the ALEX test.

Results

Total IgE

ImmunoCAP Total IgE test results for serum samples (n=65) ranged between 7 and 7900 kU/L, while the ALEX test results ranged between 12 and 654 kU/L. The correlation between the ALEX test and ImmunoCAP test results was poor above 500 kU/L (Figure 1). According to the manufacturer, the measuring range of the ALEX test is 1–2500 kU/L, generating semiquantitative results [1]. The ImmunoCAP Total IgE test gives quantitative results [2] (Fig. 1).

Allergen extracts: ALEX versus ImmunoCAP Whole Allergens

Agreement in classes

According to the manufacturers both the ALEX test and ImmunoCAP Specific IgE tests generate quantitative results [1, 3]. Nevertheless, to allow easy comparison over

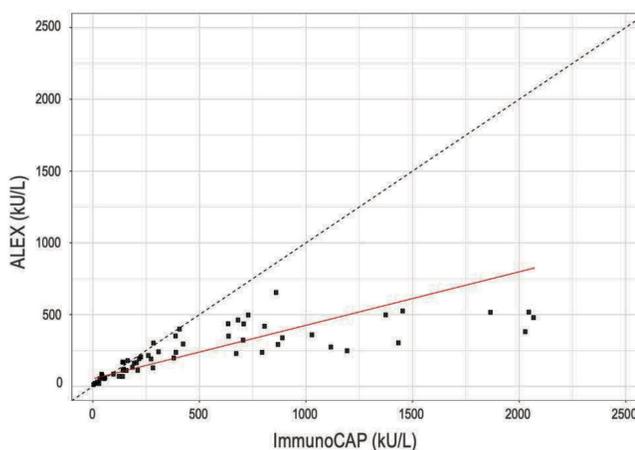


Figure 1. Correlation of total IgE results for the ALEX test versus ImmunoCAP tests showing data points up to 2500 kU/L (n=58) with ImmunoCAP. Seven data points giving results above 2500 kU/L with ImmunoCAP are omitted. The regression line is shown in red

the entire measuring range, allergen extract results were transformed into classes as defined for ALEX (Tab. 2, Fig. 2). The agreement of the ALEX test data with ImmunoCAP test data was calculated per class. Correlations of all results are shown in Fig 3 a and 3 b.

Table 2. Absolute agreement of the ALEX test results versus ImmunoCAP test results by classes defined for ALEX. The overall class agreement was 53%

Class (ALEX definition)	Agreement ALEX vs ImmunoCAP™
0 (<0,3 kU/l)	99,7%
1 (0,3–1 kU/l)	4,0 %
2 (1–5 kU/l)	16,2%
3 (5–15 kU/l)	23,4 %
4 (>15 kU/l)	38,8 %

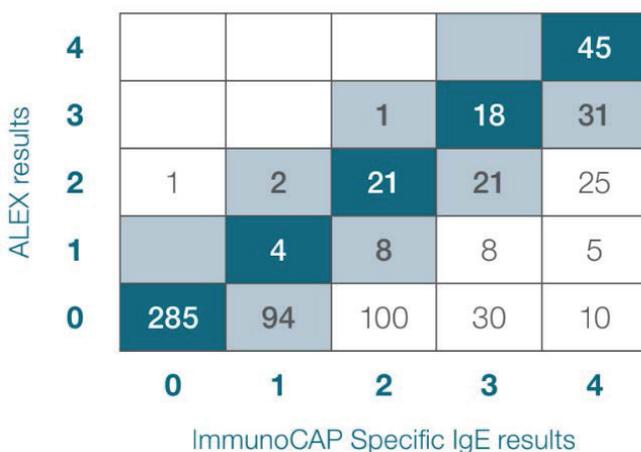


Figure 2. Heat map of the ALEX test vs ImmunoCAP test results. The false negative rate, defined as <math><0.3 \text{ kU}_A/\text{L}</math> in the ALEX test but $\geq 0.3 \text{ kU}_A/\text{L}</math> in ImmunoCAP tests, was 55% (234/423 positive ImmunoCAP results) for the ALEX test. False negatives were found over the whole measuring range$

Quantitative comparisons

Quantitative correlations of individual allergen extract test results were also performed. Fig. 4 and Fig. 5 show two examples each of allergen extracts with good and poor agreement, respectively, when comparing the ALEX test results to ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results. ImmunoCAP test results were considered positive above the threshold set for the ALEX test, i.e. $\geq 0.3 \text{ kU}_A/\text{L}$. Note: The number of positive test results for ImmunoCAP tests would be higher if results down to $0.1 \text{ kU}_A/\text{L}$ (representing the LoQ of ImmunoCAP Specific IgE tests) were included).

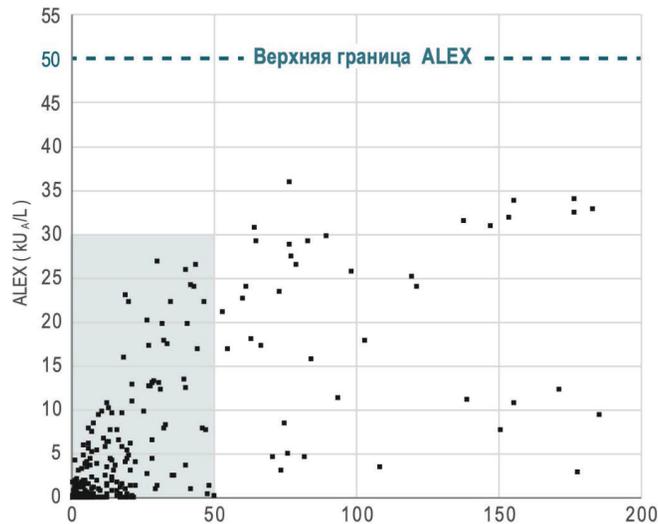


Figure 3 a. Correlation of all ALEX and ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results (n=709 data points). Samples with up to $203 \text{ kU}_A/\text{L}$ sIgE according to ImmunoCAP sIgE test results generate ALEX test results up to $36 \text{ kU}_A/\text{L}$

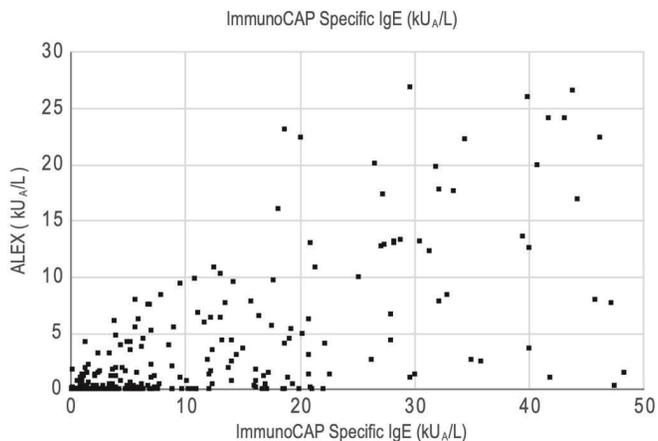


Figure 3 b. The shaded area of Fig. 3 a shown in enlargement

Allergen components: ALEX versus ImmunoCAP Allergen Components

The overall agreement of component sIgE results of the ALEX test versus ImmunoCAP tests was analyzed by transforming results into “ALEX classes”. Twenty-five components from the 11 chosen allergen extracts were analyzed using 19–50 serum samples each (Tab. 1). Agreement of the ALEX test data with ImmunoCAP test data was calculated per class (Tab. 3, Fig. 6).

As the manufacturer of the ALEX test states that the test gives quantitative results [1], correlations between results in kU_A/L using the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE tests for individual allergen components were also performed.

For four components, namely Cor a 14 and Cor a 1 from hazelnut, Par j 2 from wall pellitory and Phl p 7 from timothy pollen, it was not possible to perform regression analyses since too few positive responses were obtained with the ALEX test (less than six positive sera).

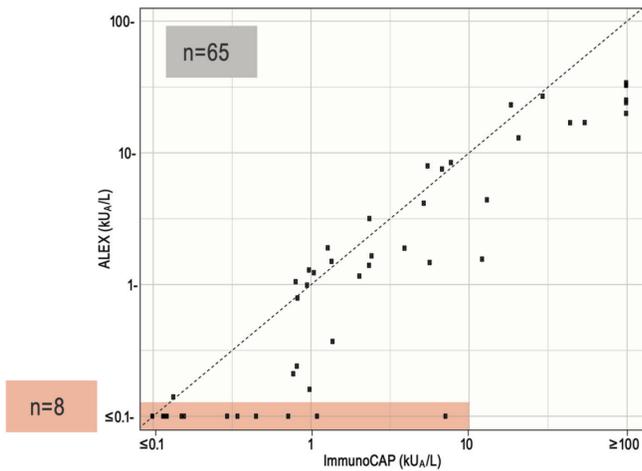


Figure 4 a. Correlation of the ALEX test vs ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results in kU_A/L for *D. pteronyssinus* extract. The complete set of data points is depicted in logarithmic scatter plot

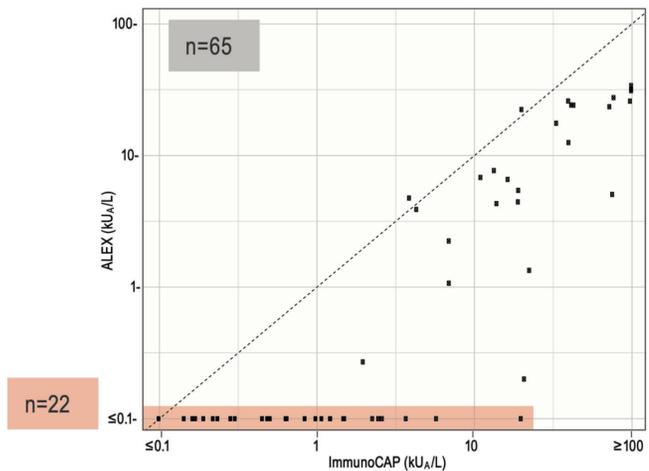


Figure 4 c. Correlation of the ALEX test vs ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results in kU_A/L for **timothy grass** extract. The complete set of data points is depicted in logarithmic scatter plot

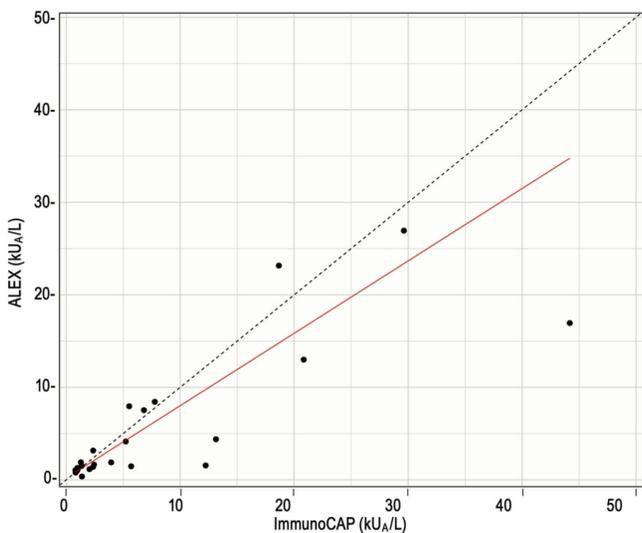


Figure 4 b. Correlation of the ALEX test vs ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results in kU_A/L for *D. pteronyssinus* extract. Correlations of datapoints positive in both systems, and within the ALEX test measuring range of 0.3–50 kU_A/L (regression line in red). For *D. pteronyssinus* (house dust mite, d1) 39 samples out of totally 65 samples were positive on ImmunoCAP Specific IgE tests ($\ge 0.3 kU_A/L$). The corresponding number for the ALEX test was 31

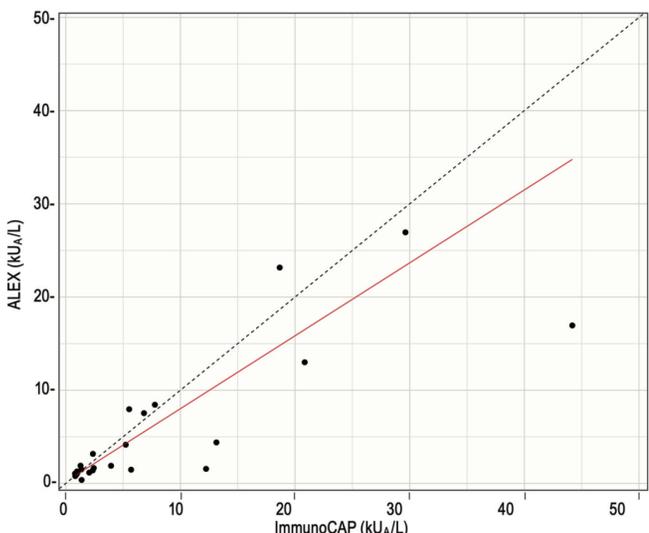


Figure 4 d. Correlation of the ALEX test vs ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results in kU_A/L for **timothy grass** extract. Correlations of datapoints positive in both systems, and within the ALEX test measuring range of 0.3–50 kU_A/L (regression line in red). For timothy, 47 out of totally 65 samples were positive on ImmunoCAP Specific IgE tests ($\ge 0.3 kU_A/L$). The corresponding number for the ALEX test was 25

For Cor a 1 and Phl p 7 the number of sera positive in both systems were too few to draw any meaningful conclusions, while for Par j 2 and Cor a 14, 23/41 samples and 13/40 samples, respectively, were positive in ImmunoCAP tests ($\ge 0.3 kU_A/L$). The corresponding numbers of positive samples on the ALEX test were three for both Par j 2 and Cor a 14, resulting in the poorest positive agreement in this study, 13% and 23%, respectively.

Out of the remaining twenty-one components analyzed, two examples of components with good and two with poor agreement when comparing the ALEX to ImmunoCAP Specific IgE Allergen Component test results

are shown (Fig. 7 and Fig. 8). For ImmunoCAP tests, results were considered positive above the threshold set for the ALEX test, i.e. $\ge 0.3 kU_A/L$. Again, the number of positive test results for ImmunoCAP tests would be higher if results down to $0.1 kU_A/L$ (representing the LoQ of the ImmunoCAP Specific IgE tests) were included).

Analysis of negative extract results in the ALEX test vs. component results in the ALEX and ImmunoCAP tests: Hazelnut example

Out of 64 samples tested, 25 generated positive results with ImmunoCAP hazelnut whole allergen test but were

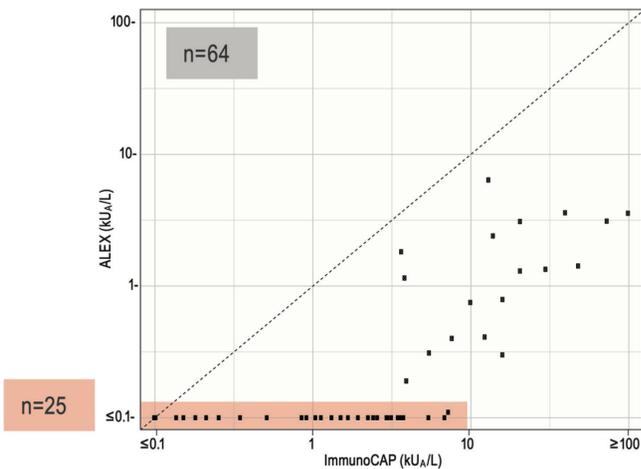


Figure 5 a. Correlation of the ALEX vs ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results in kU_A/L for **Hazelnut** extract. The complete set of data points is depicted in logarithmic scatter plot

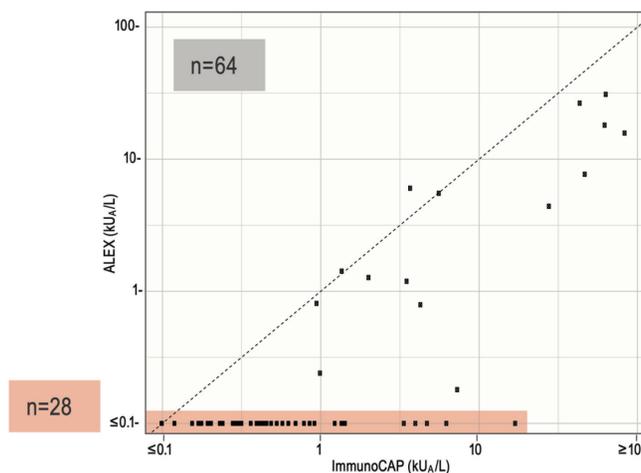


Figure 5 c. Correlation of the ALEX vs ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results in kU_A/L for **Olive pollen** extract. The complete set of data points is depicted in logarithmic scatter plot

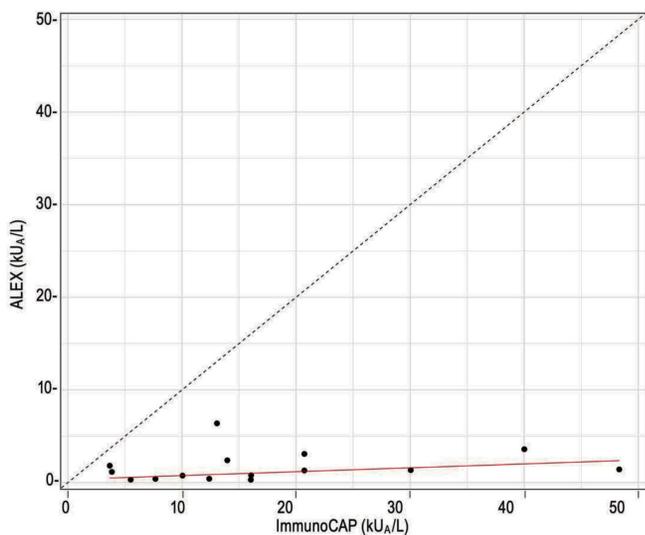


Figure 5 b. Correlation of the ALEX vs ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results in kU_A/L for **Hazelnut** extract. Correlations of datapoints positive in both systems, and within the ALEX test measuring range of 0.3–50 kU_A/L (regression line in red). For hazelnut, 42 samples out of 64 were positive using ImmunoCAP Specific IgE tests ($\geq 0.3 kU_A/L$). For the ALEX test results, the corresponding number was 17

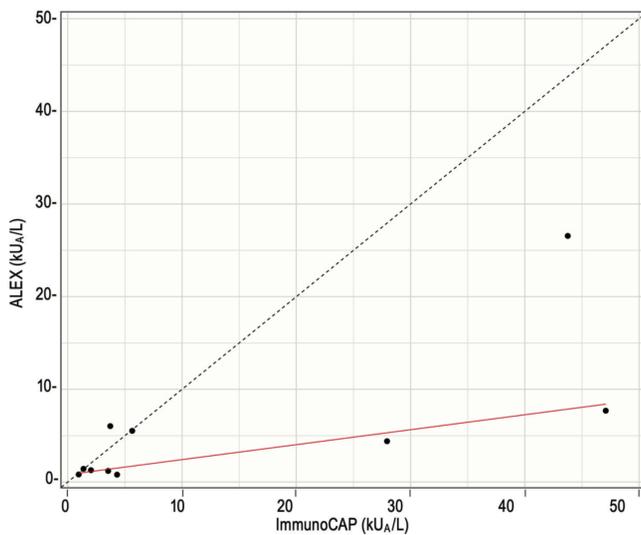


Figure 5 d. Correlation of the ALEX vs ImmunoCAP Specific IgE whole allergen test results in kU_A/L for **Olive pollen** extract. Correlations of datapoints positive in both systems, and within the ALEX test measuring range of 0.3–50 kU_A/L (regression line in red). 41 samples out of 64 were positive using ImmunoCAP Specific IgE tests ($\geq 0.3 kU_A/L$). For the ALEX test results, the corresponding number was 13

Table 3. Agreement of the ALEX test component results versus ImmunoCAP Allergen Component test results in “ALEX classes”. The overall class agreement was 70%

Class (ALEX definition)	Agreement ALEX vs ImmunoCA)
0 (<0,3 kU/L)	98,9%
1 (0,3–1 kU/L)	14,9%
2 (1–5 kU/L)	36,3%
3 (5–15 kU/L)	43,9%
4 (>15 kU/L)	66,0%

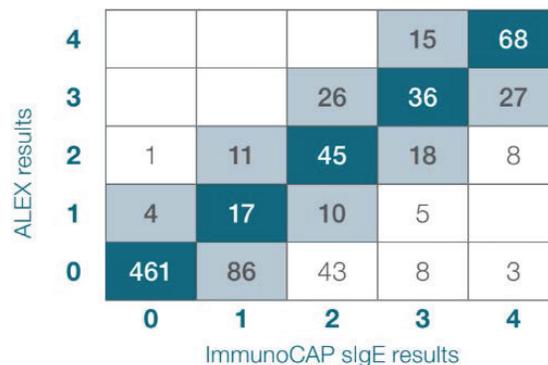


Figure 6. Heat map of the ALEX test vs ImmunoCAP test results. The false negative rate for components IgE (defined as $< 0.3 kU_A/L$ in the ALEX test but $\geq 0.3 kU_A/L$ in ImmunoCAP tests), was 33% (140/426) for the ALEX test. False negatives were found over the whole measuring range

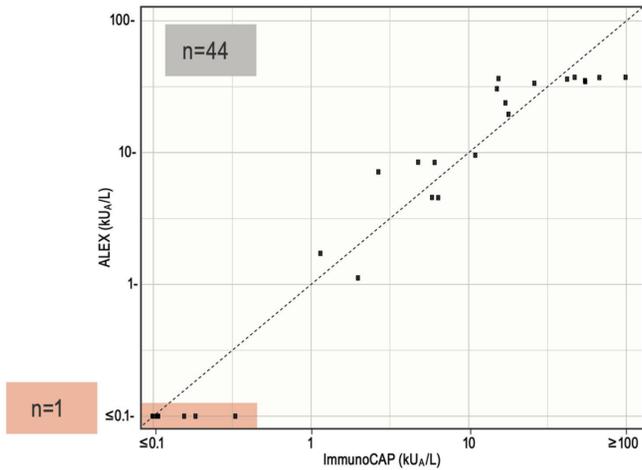


Figure 7 a. Correlation of the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE Allergen component test results in kU_A/L for **Phl p 5** from timothy grass. All data points are depicted in logarithmic scatterplot

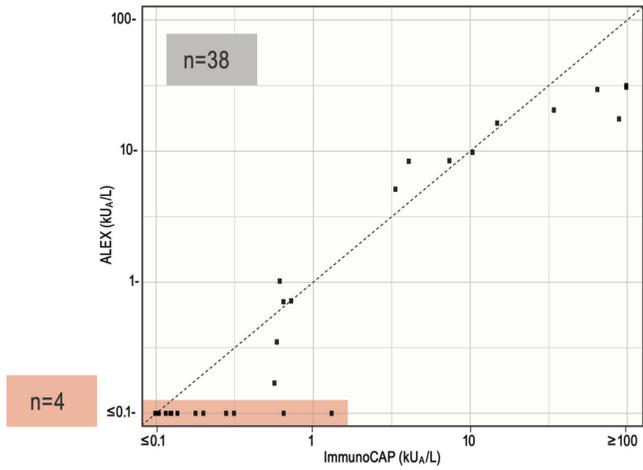


Figure 7 c. Correlation of the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE Allergen component test results in kU_A/L for **Der p 1** from *D. pteronyssinus*. All data points are depicted in logarithmic scatterplot

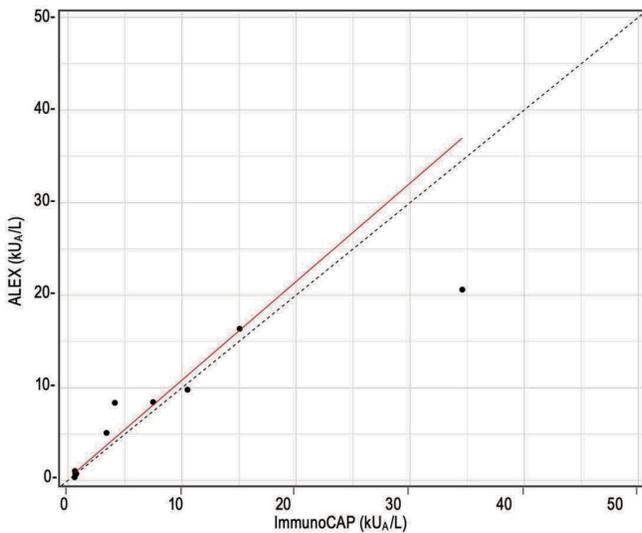


Figure 7 b. Correlation of the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE Allergen component test results in kU_A/L for **Phl p 5** from timothy grass. Correlations of datapoints positive in both systems, and within the measuring range of 0.3–50 kU_A/L defined for the ALEX test (regression line in red). 20 out of 44 samples for sIgE to Phl p 5 were positive on ImmunoCAPs Specific IgE tests ($\ge 0.3 kU_A/L$). The corresponding number on the ALEX test was 19

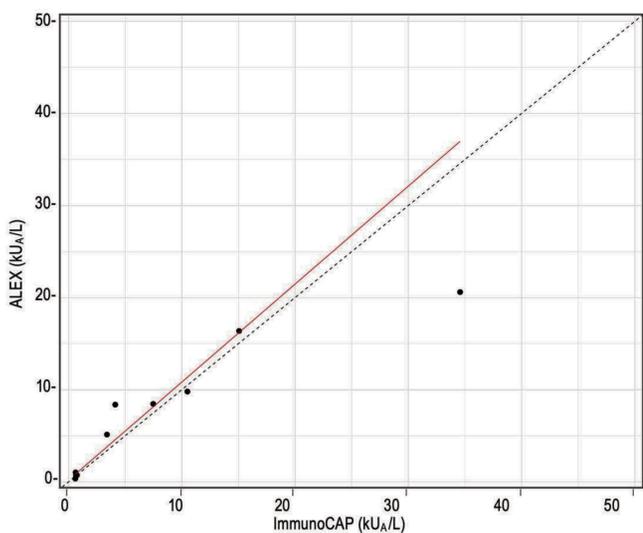


Figure 7 d. Correlation of the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE Allergen component test results in kU_A/L for **Der p 1** from *D. pteronyssinus*. Correlations of datapoints positive in both systems, and within the measuring range of 0.3–50 kU_A/L defined for the ALEX test (regression line in red). 18 out of 38 samples for sIgE to Der p 1 were positive on ImmunoCAPs Specific IgE tests ($\ge 0.3 kU_A/L$). The corresponding number on the ALEX test was 14

negative using the ALEX test. The results for component IgE analyses for 24 of these samples are shown in Tab. 4. Twenty-three sera were positive for any hazelnut component on ImmunoCAP tests, while ALEX generated positive hazelnut component results in only nine.

The results underline that negative ALEX extract test results are not necessarily truly negative. In addition, they demonstrate that false negative extract results are not counter balanced by component sIgE positivity, but that sensitizations to certain allergen sources can be missed entirely.

CCD

It is important to note, that the false negative rates (see. Tab. 5) did not change significantly when only analyzing sera lacking sIgE to cross-reactive carbohydrate

determinants as determined by ImmunoCAP Specific IgE MUXF3 (o214, CCD) (n=54–56).

It is possible that the lower sensitivity of the ALEX test, at least partly, is a consequence of the necessary 5x dilution of sera in the protocol for the ALEX assay.

The 5x dilution of samples in the ALEX assay is the step that allows for CCD inhibition. According to the manufacturer, 85% reduction of CCD-reactivity is achieved by this incubation, which is said to increase to 95% if incubation is prolonged by 30 minutes [6].

When running the ImmunoCAP ISAC, no serum dilution is required, and to date only six CCD-containing allergen components are among the 112 present on the ImmunoCAP ISAC sIgE 112 chip. When the new ImmunoCAP ISAC_{E1121} test is launched only four CCD-containing allergen components will remain.

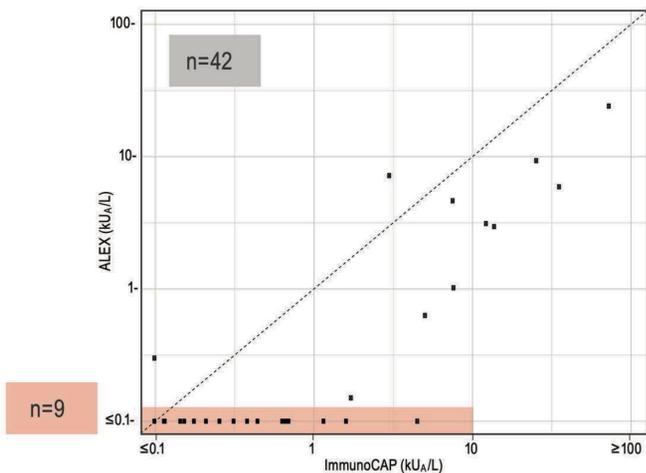


Figure 8 a. Correlation of the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE Allergen Component results in kU_A/L for **Jug r 1** from walnut. All data points are depicted in logarithmic scatterplot

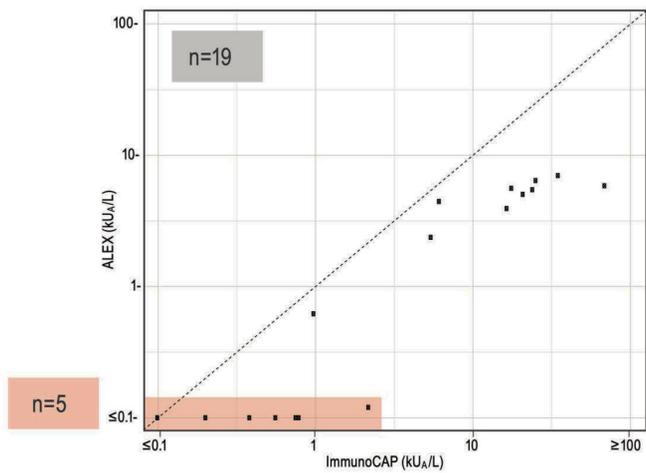


Figure 8 c. Correlation of the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE Allergen Component results in kU_A/L for **Gal d 2** from hen's egg white. All data points are depicted in logarithmic scatterplot

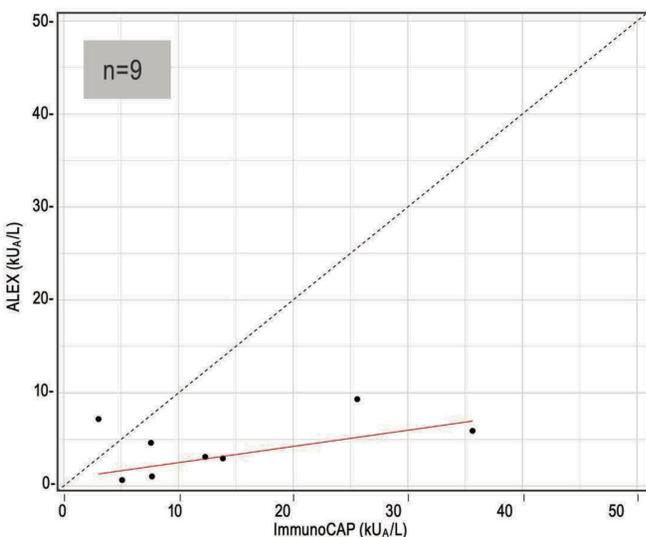


Figure 8 b. Correlation of the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE Allergen Component results in kU_A/L for **Jug r 1** from walnut. Correlations of data points positive in both systems, and within the measuring range of 0.3–50 kU_A/L defined for the ALEX test (regression line in red). 19/42 samples were positive for sIgE to Jug r ImmunoCAP Specific IgE ($\ge 0.3 kU_A/L$). The corresponding positive number for the component on ALEX was 10

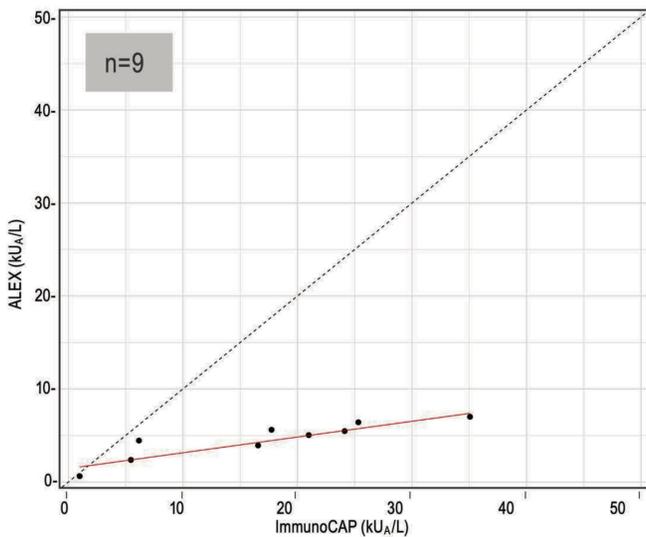


Figure 8 d. Correlation of the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE Allergen Component results in kU_A/L for **Gal d 2** from hen's egg white. Correlations of data points positive in both systems, and within the measuring range of 0.3–50 kU_A/L defined for the ALEX test (regression line in red). 15/19 samples were positive for sIgE to Gal d 2 ImmunoCAP Specific IgE ($\ge 0.3 kU_A/L$). The corresponding positive number for the components on ALEX was 10

Table 4. Comparison of component sIgE results in the two platforms for sera negative to hazelnut extract on the ALEX test, but positive using ImmunoCAP whole allergen tests. Both 0.1 and 0.3 kU_A/L cut-offs for ImmunoCAP Specific IgE allergen component test results are shown

Method	Number of samples positive for components									
	sIgE to extract	sIgE sIgE to any comp	Cor a 1		Cor a 8		Cor a 9		Cor a 14	
Cut-off	$\ge 0,3$	$\ge 0,3$	$\ge 0,1$	$\ge 0,3$	$\ge 0,1$	$\ge 0,3$	$\ge 0,1$	$\ge 0,3$	$\ge 0,1$	$\ge 0,3$
ImmunoCAP	24	23/24	8	2	18	17	12	10	13	5
ALEX components	0	9/24	НД	0	НД	5	НД	5	НД	0

Table 5. Summary of the overall sensitivity of the ALEX test

Whole extracts	ALEX vs ImmunoCAP sIgE extracts	55% false negatives
Allergen components	ALEX vs ImmunoCAP sIgE components	33% false negatives
Allergen components	ALEX vs ImmunoCAP ISAC 112	16% false negatives
	ImmunoCAP ISAC 112 vs ALEX	9,5% false negatives

Table 6. Agreement of the ALEX test component results versus ImmunoCAP ISAC 112 Allergen Components test results and vice versa (according to “ALEX classes”)

Class (ALEX definition)	Agreement ALEX vs ImmunoCAP ISAC	Agreement ImmunoCAP ISAC vs ALEX
0 (<0,3 kU/l)	97,7%	96,0%
1 (0,3–1 kU/l)	19,3%	33,3%
2 (1–5 kU/l)	42,7%	47,0%
3 (5–15 kU/l)	51,0%	49,0%
4 (> 15 kU/l)	78,0%	65,2%

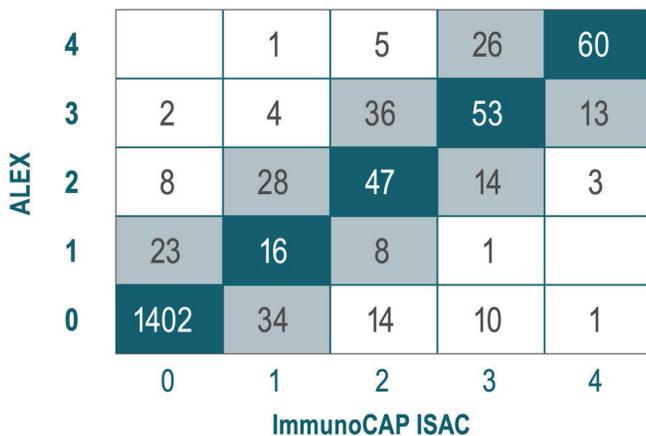


Figure 9. Heat map of the ALEX test vs ImmunoCAP ISAC 112 Components test results. The false negative rate for the ALEX test vs the ImmunoCAP ISAC 112 test was 15.8% (59/374) while the false negative rate for the ImmunoCAP ISAC 112 test vs the ALEX test was 9.5% (33/348)

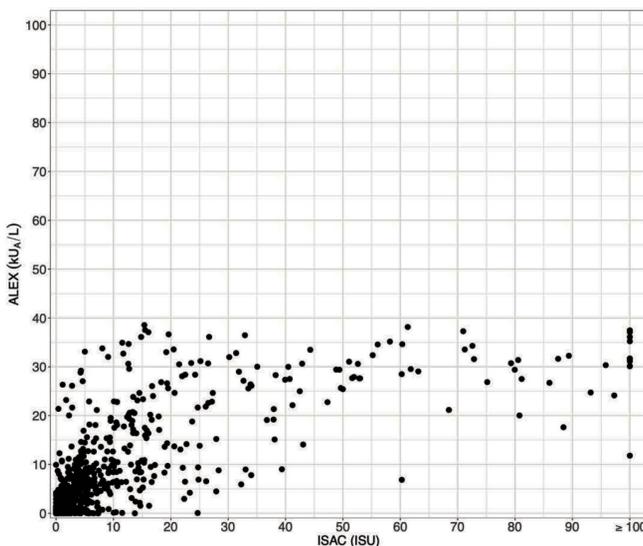


Figure 10. The ALEX test results for component sIgE level off and do not reach values above 39 kU_A/L among 407 positive data points, while the ImmunoCAP ISAC 112 test detects Specific IgE up above 100 ISU-E. Thirteen positive data points are lacking in the plot (truncated)

ALEX vs ImmunoCAP ISAC sIgE 112 component test results

For the comparison between ALEX and ImmunoCAP ISAC sIgE 112, class agreement was calculated in two ways, assuming that either system gives the “true” results. False negative results for the ALEX vs the ImmunoCAP ISAC sIgE 112 test was 15.8% (59/374), while the false negative rate for the ImmunoCAP ISAC sIgE 112 vs the ALEX test was 9.5% (33/348) (Tab. 6, Fig. 9).

Overall, the result agreement is fair between the two systems. The overall class agreement ranges from 61–97% for the studied components, the vast majority being above 80%. The lower agreement in classes 1–3 (between 19 and 51%) is most likely due to a lower sensitivity of the ALEX test, results did not reach values above 39 kU_A/L among 407 positive data points, while the ImmunoCAP ISAC 112 test detects Specific IgE up above 100 ISU-E (Fig. 10). The agreement within class 4, i.e. sIgE levels above 15 kU_A/L, is 78%.

Overall sensitivity of the ALEX test

Throughout the comparisons, the ALEX test was found to be less sensitive than ImmunoCAP tests as indicated by the rate of false negative results for the ALEX test (Tab. 5).

Discussion

According to the manufacturer, the ALEX multiplex test is an alternative to ImmunoCAP and ImmunoCAP ISAC tests, widely used on the market for measurement of total and specific IgE levels. A direct comparison of the technical performance of ALEX with ImmunoCAP tests revealed a lack of sensitivity of the ALEX test for both whole allergens (the false negative rate 55%, 234/423 positive ImmunoCAP results) and allergen components (the false negative rate 33%, positive ImmunoCAP results). In addition, the dynamic range of ALEX is significantly lower: no results reached values above 36 kU_A/L for whole allergens and 38 kU_A/L for allergen components. Levels in ImmunoCAP specific IgE tests for the same samples were ≥100 kU_A/L and up

to 150 kU_A/L, respectively. At the same time, the ALEX test showed lower results in the entire dynamic range for both whole allergens and specific allergen components. In particular, when comparing ALEX and ImmunoCAP tests for whole allergens, overall class agreement was 53%, ranging from 4 – 40% for positive classes and positive quantitative agreement ranged from 23% to 80% for the 11 extracts studied. A slightly better picture was observed for allergen components: overall class agreement was 70% ranging from 15–66% for positive classes. False negative results obtained by analyzing the response to hazelnut extract provide additional confirmations for the conclusions stated above.

At the same time, comparison of negative results demonstrated a high agreement between the ALEX and ImmunoCAP Specific IgE tests showing 99.7% agreement for extracts and 98.9% agreement for components for negative results, respectively. These data testify no apparent background problems in the ALEX test.

Thus, the ALEX® tIgE, sIgE to whole allergens and allergen components tests show low dynamic range and

poor agreement with quantitative results comparing to ImmunoCAP singleplex tests. In comparison with the ImmunoCAP ISAC sIgE 112 chip, the agreement is better, but the sensitivity and dynamic range are still lower.

REFERENCES

1. ALEX – Allergy explorer. The smart way to explore allergy. Доступно на www.macroarraydx.com.
2. ImmunoCAP total IgE Direction for Use 52-5292 – EN/08. Доступно на <https://dfu.phadia.com/Data/Pdf/5be5621c-89c2320848d710f6.pdf>.
3. ImmunoCAP Specific IgE Direction for Use 52-5291 – EN/09. Доступно на <https://dfu.phadia.com/Data/Pdf/5be441b889c2320848d6fb28.pdf>.
4. ImmunoCAP ISAC sIgE 112 Directions for Use 81 0002 – 62/02. Доступно на www.thermofisher.com#.
5. Ekaterina Manuilova, Andre Schuetzenmeister, Fabian Model (2014). mcr: Method Comparison Regression. R package version 1.2.1. Available at <https://CRAN.R-project.org/package=mcr> 3.
6. ALEX – Allergy Explorer Instruction for Use. Доступно на www.macroarraydx.com.

Information about the authors

C. Nerelius, PhD, Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Rapskatan 7P, P.O. Box 6460, 751 37 Uppsala, Sweden.

E-mail: charlotte.nerelius@thermofisher.com

M. Andersson, Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Rapskatan 7P, P.O. Box 6460, 751 37 Uppsala, Sweden.

E-mail: mats.andersson@thermofisher.com

L. Søgaard, Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Diagnostics ApS, CVR.nr. 27640745, Gydevang 33, 3450 Allerød.

E-mail: lone.sogaard@thermofisher.com

M. Schwanbeck, Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Rapskatan 7P, P.O. Box 6460, 751 37 Uppsala, Sweden.

E-mail: maria.schwanbeck@thermofisher.com

S. Kofler, PhD: Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Diagnostics Austria GmbH, Dresdner Straße 89, 1200 Vienna, Austria.

E-mail: stefan.kofler@thermofisher.com

M. Berthold, PhD: Cyxone AB, Adelgatan 21, 211 22 Malmö, Sweden.

E-mail: malin.berthold@cyxone.com

Authors' contribution

- Research concept and design – CN, MB, SK.
- Obtaining the results/Evaluating test performance – MS, LS.
- Statistical analysis of the results – CN, MB, MA.
- Additional statistical analysis – CN, MB, MA, SK.
- Writing the manuscript – CN, MB, SK.
- Editing the manuscript – CN, MB, SK.

Additional statements

The authors agree to the publication of this work.

All authors reviewed the final version of the text and confirmed their consent to the publication of the article. The authors declare that the given order of authors is approved by each of them and the article was not published or accepted for publication in another journal.

Information on sources of financing

The study was funded by Thermo Fisher Scientific, ImmunoDiagnostics.

Conflict of interest

All authors are (or were at the time of preparation of the article) employees of Thermo Fisher Scientific, ImmunoDiagnostics.