

Трансбуккальный метод диагностики аллергии по увеличению пероксидазной активности в слюне

Д.К. Новиков¹, П.Д. Новиков¹, И.Ю. Карпук¹, Л.Л. Лазаренко², О.В. Смирнова¹, Н.С. Аляхнович¹

¹ Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

² Северо-Западный Центр доказательной медицины, Санкт-Петербург, Россия

An intrabuccal method of diagnosing allergy by increasing peroxidase activity in the saliva of

D.K. Novikov¹, P.D. Novikov¹, I.Y. Karpuk¹, L.L. Lazarenko², A.U. Smirnova¹, N.S. Alyahnovich¹

¹ Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

² NMC Molecular Medicine Spbgmu them. Acad. Pavlov, St. Petersburg, Russia

Аннотация

Описан метод диагностики аллергии на аллергены (пищевые, бытовые, лекарственные и химические вещества, стоматологические материалы, соли металлов), а также неспецифической гиперчувствительности (псевдоаллергии) ирританты и поллютанты (сигаретный дым, выхлопные газы автомобилей и др.). Для этого определяли прирост пероксидазной активности в слюне до и после провокационной пробы на больном с аллергеном или испытуемым веществом. По интенсивности окраски субстрат-хромогенной смеси, определялось наличие или отсутствие сенсibilизации лейкоцитов слизистой оболочки полости рта, т.е. аллергии и гиперчувствительности.

Ключевые слова

Аллергия, гиперчувствительность, диагностика *in vivo*, слюна.

Известно, что при аллергических заболеваниях основными эффекторными клетками являются лейкоциты – базофилы (тучные клетки), гранулоциты – эозинофилы и нейтрофилы [1, 2, 3, 4]. На поверхности всех лейкоцитов имеются Fc-рецепторы, которые связывают Fc-фрагменты иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgE, IgA), в том числе обладающие специфичностью антител. Поэтому, с одной стороны, лейкоциты с помощью этих антител могут специфично

Summary

A method for diagnosing allergy to allergens (food, home dust, drugs and chemicals, dental materials, metal salts), as well as non-specific hypersensitivity (pseudoallergy) irritants and pollutants (cigarette smoke, car exhaust fumes, etc.) was described. For this the increase of peroxidase activity was determined in the saliva before and after challenging a patient with the test substance or allergen. The presence or absence of sensitization of leukocytes of the oral mucosa (i.e. allergy and hypersensitivity) was determined according to the color intensity of substrate-chromogen mixture.

Keywords

Allergy, hypersensitivity, diagnosis *in vivo*, saliva.

взаимодействовать с антигенами-аллергенами, с другой – концентрация антител в крови снижается и нередко из-за этого они не выявляются в сыворотке крови. Базофилы и эозинофилы имеют FcεRI-рецепторы, связывающие IgE, а нейтрофилы несут Fcγ, фиксирующие IgG, и FcεRII CD23 (низкоаффинные) и лектин-галектин 3, способный связывать IgE. У больных аллергией помимо низкоаффинного рецептора FcεRII, появляются высокоаффинные – FcεRI [1, 2, 4]. После

связывания этих IgE-антител с аллергеном лейкоциты, несущие их, активируются, дегранулируют и секретируют медиаторы и ферменты: эозинофильный катионный белок, эозинофильную пероксидазу, нейтрофилы – миелопероксидазу и другие ферменты. Поэтому данные белки при аллергии присутствуют в различных биологических жидкостях (слюна, лаважная жидкость и др.). После инкубации лейкоцитов крови больных аллергией с аллергенами наблюдается прирост миелопероксидазы в надосадочной жидкости. На этой основе при диагностике аллергии разработана реакция выброса лейкоцитами крови миелопероксидазы [5, 6].

Секреция миелопероксидазы из лейкоцитов может запускаться неспецифически – хемоаттрактантами или же ирритантами и поллютантами. В слюне имеется два вида пероксидаз: миелопероксидаза, выделяемая нейтрофилами, и лактопероксидаза – клетками слюнных желез.

Для диагностики различных видов аллергии *in vivo* нами предлагается трансбуккальный провокационный тест. Сущность его заключается в том, что после воздействия аллергенами или неспецифическими агентами на слизистую оболочку ротовой полости, или после приема аллергена внутрь определяется прирост активности пероксидазы в слюне (ротовой жидкости) с помощью субстрат-хромогенной смеси (тетраметилбензидина и перекиси водорода).

Материал и методы

Перечень необходимого оборудования: центрифуга (3000 об/мин), стерильные пробирки 10–20 мл (20–30 шт.), микропробирки 1,5 мл с крышкой (10–20 шт.), бумажные фильтры (10 шт.), холодильник, автоматические дозаторы 20–200 мкл, планшеты плоскодонные полистироловые для иммуноферментного анализа (ИФА), автоматический ИФА анализатор.

Реактивы: физиологический 0,9% раствор хлорида натрия на фосфатном буфере (ФРФ) pH 7,2, фосфат-цитратный буферный раствор с pH 5,0, дистиллированная вода, перекись водорода 0,015% раствор, хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ), серная кислота 4%, физиологический раствор хлорида натрия 0,9%, аллергены и неспецифические индукторы – поллютанты (стоматологические материалы, растворы солей металлов, пищевые добавки, бытовые аллергены, лекарственные средства, ирританты и поллютанты – раствор экстракта сигарет, раствор газов двигателей и др.).

Показания к применению

Необходимость выявления аллергических и неспецифических реакций аллергены и неспецифические агенты.

Противопоказания

Метод не имеет абсолютных противопоказаний.

Относительные противопоказания:

1. Повреждения и заболевания ротовой полости.

2. Гипосаливация у больного – менее 1 мл слюны.

1. Подготовка аллергенов.

1.1. Аллергены используют в концентрациях, принятых для кожного тестирования (100–200 PNU/мл).

1.2. Стоматологические материалы, входящие в них металлы в виде солей NiCl₂, CrCl₃, CoCl₂, CuCl₂, TiO₂, раствор акрила, местные анестетики перед постановкой теста разводят 1:100, 1:1000 стерильным 0,9% раствором натрия хлорида.

1.3. Аллергены – красители пищевые 0,002 г в капсулах для перорального применения или 0,1% растворы – для трансбуккального; лекарственные средства в терапевтических дозах.

1.4. Для приготовления экстракта сигареты используют одну сигарету («Дымы (сигаретный) и газы (автомобильных двигателей): используют в виде водорастворимых фракций после продувания дыма в течение 5 мин (1 сгорающая сигарета или 1 л газа) через 10 мл 9% раствора хлорида натрия. Для реакции разводят 1:100, 1:200, 1:1000.

2. Провокационный тест на больном

2.1. Забор исходной слюны больного

2.1.1. Больной за 12 часов до тестирования не употребляет алкоголь, продукты с кофеином, противоаллергические лекарственные средства (антигистаминные, глюкокортикостероиды), не курит, исключает продукты с высокими аллергенными свойствами.

2.1.2. За 1 час до исследования не принимает пищу.

2.1.3. Больной полощет рот 100 мл 0,9% раствором хлорида натрия в течение 5 мин. Раствор выплевывает.

2.1.4. Через 5 мин слюну в объеме по 1 мл (два образца) собирают в микропробирки, закрывают крышкой (исходная проба №1).

3. Провокация аллергенами или поллютантами выброса пероксидазной активности лейкоцитами

3.1. Вариант 1. Трансбуккальная проба. Больной полощет рот растворами аллергенов или токсикантов 100 мл 3 мин, раствор выплевывает.

Вариант 2. Пероральная проба. Больной принимает перорально 2 мг пищевого красителя в виде порошка, в капсуле или лекарственный препарат (таблетка) запивает водой.

3.2. Через 30 мин при варианте 1 или 40 мин – 2 слюну в объеме по 1 мл (две пробы) собирают в микропробирки и закрывают крышкой (проба №2).

4. Ход реакции

- в шесть лунок планшета для ИФА вносят по 100 мкл 0,9% раствора хлорида натрия (пробы дублируют);
- в первую лунку добавляют 100 мкл слюны, собранной до проведения провокационного теста, перемешивают, получается разведение слюны 1:2;
- во вторую лунку вносят 100 мкл разведенной (1:2) слюны из первой лунки, перемешивают – получают разведение 1:4;
- во третью лунку вносят 100 мкл разведенной (1:4) слюны из второй лунки, перемешивают – получают разведение 1:8, 100 мкл отсасывают и выливают;
- процедуру повторяют в такой же последовательности с 4-6 лунками для слюны, полученной после провокационной пробы.
- все пробы дублируют.
- внесение проявляющего раствора. Во все лунки планшета для ИФА к разведенной слюне добавляют по 100 мкл хромоген-субстратной смеси (0,015% перекись водорода и ТМБ, разведенными фосфат-цитратным буфером с рН 5,0). Проявляющий раствор готовят непосредственно перед внесением;
- инкубируют при комнатной температуре в течение 10-25 мин до появления выраженного окрашивания синего цвета (на этом этапе реакцию оценивают визуально по интенсивности окраски от "-" до "++++" по сравнению с контролем);
- реакцию останавливают внесением 50 мкл 4% серной кислоты, цвет раствора изменяется на желтый.

5. Учет результатов

Реакцию оценивают через 10 минут на фотометре при длине волны 450 нм.

Реакция считается положительной, если оптическая плотность пробы после провокационного теста превышает оптическую плотность пробы до провокационного теста не менее, чем в 2 раза, и она не меньше 0,200 единиц оптической плотности.

Возможные ошибки и их устранение:

Интенсивное окрашивание в лунке отрицательного контроля:

- недостаточное разведение слюны;
- проверить правильность приготовления и активность проявляющего раствора.

Статистическая обработка и представление данных. Для статистического анализа применяли непараметрический метод (критерий Краскела – Уоллиса - KW-H, с последующим апостериоральным сравнением методом Ньюмана-Кейлиса). Для определения статистической значимости, в анализе таблиц сопряженности использовали критерий Р. Фишера (pF). Различия считали достоверными при вероятности $p < 0,05$ и мощности метода (β) 20%.

Результаты и обсуждение

Определение аллергии на стоматологические материалы

В ходе клинической апробации мы провели испытания метода на специфичность у больных с аллергией на металлические изделия и лекарства. Оказалось, что повышение пероксидазной активности наблюдается на специфичный, но не на контрольный аллерген. Реакций у больных без аллергии не наблюдалось, но в единичных случаях у больных были положительные реакции на лекарства которые им вводили или они принимали ранее, и ионы металлов, входящие в металлические изделия, с которыми они контактировали на протяжении своей жизни.

Для решения поставленной задачи нами были сформированы группы больных с лекарственной аллергией и непереносимостью металлических изделий, с положительными, реакциями по результатам аппликационных тестов (АП), к солям NiCl_2 , CrCl_3 , CoCl_2 , CuCl_2 а также к акрилу и новокаину.

Для определения аллергии мы использовали стандартную иммуноферментные тест-системы фирм EUROIMMUN (для выявления антител к Ni-HSA, Cr-HSA, Co-HSA, Cu-HSA, акрил-HSA) и Dr. Foocke (для выявления антител к новокаину).

Для клинической апробации метода нами обследовано 254 больной с достоверной сенсибилизацией к: Ni^{2+} – 51, Cr^{3+} – 45, Co^{2+} – 39, Cu^{2+} – 36, акрилу – 48, новокаину – 35. Для постановки этиологического диагноза изучали анамнез заболевания, проводили специфическое аллергологическое обследование *in vivo* и *in vitro*. Аллергию считали достоверно установленной при совпадении данных анамнеза с результатами специфического аллергологического обследова-

дования *in vivo* и *in vitro*, а также установление больным причинно-следственной связи между возникновением симптомов аллергии и фактом контакта с аллергеном.

Больные были разделены на 6 групп по сенсibilизации к каждому из вышеуказанных аллергенов.

Первую группу составили 51 больной с сенсibilизацией к Ni^{2+} . Во вторую группу вошли 45 больных с сенсibilизацией к Cr^{3+} . В третью группу включили 39 больных с аллергией на Co^{2+} . К четвертой группе отнесли 36 больных с сенсibilизацией к Cu^{2+} . В пятую группу вошли 48 больных с сенсibilизацией к акрилу, а в шестую – вошли 35 больных с сенсibilизацией к новокаину.

Результаты обследования больных опытной и контрольной групп представлены в таблице 1.

Средняя оптическая плотность измерений пероксидазной активности в слюне больных опытной и контрольной групп представлена в таблице 2.

В случае диагностики аллергии на стоматологические материалы слюна предпочтительнее не только из-за легкости ее сбора, но она также имеет важное значение в патогенезе аллергии, так как является агрессивной биологической

средой, в которой находятся и подвергаются биодеградации стоматологические материалы, и таким образом дают представление о статусе заболевания в полости рта в целом, в отличие от анализа других методов обследования, которые характеризуют только определенные звенья патогенеза. Наши исследования доказывают, что пероксидаза слюны, может использоваться в качестве биомаркера аллергии на стоматологические материалы.

II Определение аллергии на табачный дым, экстракт сигарет

Характеристика больных. Исследование проведено на базе аллергологического и пульмонологического отделений УЗ «Витебская областная клиническая больница» и кафедре клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» в 2013-2014 годах.

Для разработки метода и оценки влияния сигаретного дыма на повышение пероксидазной активности в слюне нами проведено пилотное исследование. Была набрана группа добровольцев ($n=6$; возраст 37 (23;47)) без респираторной патологии с различным статусом курения: 3 человека

Таблица 1. Результаты обследования методом измерения пероксидазной активности слюны больных опытной и контрольной групп к аллергенам-гаптенам

Аллергены	опытная группа		контрольная группа	
	положительные	отрицательные	положительные	отрицательные
$NiCl_2$ (n=51)	38(74,5%)	13(74,5%)	3(7,5%)	37(92,5%)
$CrCl_3$ (n=45)	35(78%)	10(20%)	4(10%)	36(90%)
$CoCl_2$ (n=39)	31(79,5%)	8(20,5%)	2(5%)	38(95%)
$CuCl_2$ (n=36)	30(83%)	6(17%)	6(15%)	34(85%)
Акрил (n=48)	39(81%)	9(19%)	4(10%)	36(90%)
Новокаин (n=35)	26(74%)	9(26%)	1(2,5%)	39(97,5%)

Таблица 2. Средняя оптическая плотность результатов измерения пероксидазной активности больных опытной и контрольной групп

Аллергены	опытная группа – 1		контрольная группа – 2		P_{1-2}
	Количество больных	Средняя оптическая плотность	Количество больных	Средняя оптическая плотность	
$NiCl_2$	51	1120	40	575	$P<0,01$
$CrCl_3$	45	1250	40	430	$P<0,01$
$CoCl_2$	39	1240	40	620	$P<0,01$
$CuCl_2$	36	1425	40	540	$P<0,01$
Акрил (n=48)	48	980	40	375	$P<0,05$
Новокаин (n=35)	35	935	40	480	$P<0,05$

курящих, 1 человек курил ранее (не курит более 10 лет), 2 добровольца никогда не курили. Все участники дали и собственноручно заполнили добровольное информированное согласие.

Для диагностики аллергии к табачному дыму в качестве токсиканта использовали метод по изложенной выше методике. Провокацию повышения пероксидазной активности проводили выкуриванием одной сигареты с задержкой дыма в ротовой полости в течение 10-15 секунд.

Результаты исследования представлены в таблице 3. Оказалось, что курильщики не реагировали на сигаретный дым повышением пероксидазной активности. В этой группе наблюдали некоторое снижение оптической плотности, видимо за счет гиперсаливации под влиянием курения.

Из двух некурящих добровольцев у одного оптическая плотность не изменилась, у второго повысилась. Второй некурящий доброволец является пассивным курильщиком.

У курильщика в анамнезе наблюдали резкий рост оптической плотности.

Таким образом, в процессе контакта ротовой полости с сигаретным дымом произошло повышение пероксидазной активности у ранее курившего добровольца и пассивного куриль-

щика. У некурящего участника при первом контакте с сигаретным дымом повышение пероксидазной активности не произошло в связи с отсутствием сенсibilизации. У курильщиков без респираторной патологии, вероятно, вырабатывается толерантность к сигаретному дыму и повышения пероксидазной активности так же не происходит.

Результаты пилотного исследования позволили провести испытание метода с использованием модельного раствора имитирующим действие токсиканта экстрактом сигареты.

После получения согласия в исследование включали больных с ХОБЛ средней степени тяжести (критерии GOLD, n=27), больных с аллергической формой БА (критерии GINA, n=25). Контрольная группа состояла из здоровых волонтеров без респираторной патологии (n=12). Демографическая и клиническая характеристика больных представлена в таблице 4.

Группы были однородны по возрасту, продолжительности заболевания, количеству обострений. Они различались по полу, статусу курения и индексу массы тела. В группе больных с ХОБЛ преобладали мужчины с высоким статусом курения и низким индексом массы тела, что соответствует общемировой статистике.

Таблица 3. Динамика оптической плотности в пробах слюны до и после выкуривания волонтерами сигареты

Испытуемые		Оптическая плотность	
		проба №1	проба №2
Курильщики	1	0,714	0,246
	2	0,802	0,485
	3	2,326	1,489
Не курящие	4	1,339	1,430
	5	0,522	1,139
Курильщик в анамнезе	6	0,592	2,708

Таблица 4. Демографическая и клиническая характеристика больных

Показатели	ХОБЛ n=27	БА n=25	Контрольная группа n=12
Возраст, г.	47(40;63)	43 (35;61)	43(75;57)
Пол, м/ж	18/9*	12/13	4/8
Длительность заболевания, г.	11(5;15)	13 (4;21)	0
Статус курения, да/нет	20/7*	12/13	5/7
Сенсibilизация к бытовым и/или пылевым (да/нет/не определяли)	1/2/24*	21/3/1*	1/11/0*
Число обострений за последний год	3 (2;4)	3 (2;3)	0
Индекс массы тела, кг/м ²	24,3±2,5*	27±5,5	25,3±3,9

Примечание: данные представлены как Me (25;75), * p<0.05.

Сенсибилизацию к бытовым и пыльцевым аллергенам оценивали провокационными внутрикожными (с коммерческими водно-солевыми экстрактами бытовых аллергенов) и скарификационными (с коммерческими водно-солевыми экстрактами пыльцевых аллергенов) тестами.

Двадцати четверым больным с ХОБЛ и одному с БА не проведено тестирование в связи с наличием противопоказаний: хроническое легочное сердце с явлениями недостаточности, выраженная эмфизема легких, пневмосклероз, артериальная гипертензия высокой степени, сахарный диабет 2 типа субкомпенсация.

Использовали метод по изложенной выше методике. В качестве токсиканта использовали раствор экстракта сигареты.

Для интерпретации результатов теста использовали ROC кривую (Receiver Operating Characteristic Curve) для расчета оптимального порога отсечения (optimal cut-off value).

Результаты. По результатам эксперимента оптимальный порог процента прироста пероксидазной активности равен 100% при оптимальных чувствительности Se 72% специфичности Sp 79% AUC 0,776 $p < 0,05$.

В группе ХОБЛ (n=27) реакция была положительна у 19 человек, в группе БА у 20 больных (n=25). Статистических различий между группами по количеству положительных реакций не было: $p_{\text{БА-ХОБЛ}} F > 0,05$. В контрольной группе (n=12) реакция была положительна у 4 ($p_{\text{БА-контроль}} F = 0,01$; $p_{\text{ХОБЛ-контроль}} F = 0,041$). Следовательно, у больных БА и ХОБЛ повышение пероксидазной

активности на токсиканты наблюдается чаще, чем у доноров.

Повышение пероксидазной активности в слюне больных экспериментальных групп представлено в таблице 5.

Обнаружены достоверные различия в группах $p_{KW} = 0,001$. Максимальное повышение пероксидазной активности в слюне обнаружено в группе больных с БА 135(91;236)% ($p_{\text{БА-контроль}} < 0,001$). В группе больных с ХОБЛ 112(89;208)% ($p_{\text{ХОБЛ-контроль}} < 0,001$; $p_{\text{ХОБЛ-БА}} > 0,05$). У доноров без респираторной патологии наблюдали незначительный прирост МПО – 5(0;12)%

Учитывая различия в группах по статусу курения, нами проанализированы результаты теста среди курильщиков (табл. 6).

В группе больных с ХОБЛ у курильщиков выявлен меньшее повышение пероксидазной активности, чем у некурящих больных с ХОБЛ. Возможно, более низкие цифры прироста активности пероксидазы связаны с адаптацией больных к токсикантам, гиперреактивность выражена слабее.

Возможность использования предложенных тестов диагностики гиперчувствительности оценивали, рассчитывая показатели диагностической чувствительности Se, специфичности Sp и точности Ac (табл. 7).

Положительные результаты теста с выявленной in vitro гиперчувствительностью к токсикантам считали истинно положительными TP (True Positives), а отрицательные – ложноотрицательными FN (False Negatives).

Таблица 5. Прирост пероксидазной активности в слюне после провокации раствором экстракта табака

Токсикант	ХОБЛ (n=27)	БА (n=25)	Контрольная группа (n=12)
Водный экстракт табака (1:100)	112(89;208)%*	135(91;236)%*	5(0;12)%*

Примечание: * $p < 0,05$ достоверные отличия между группами

Таблица 6. Прирост пероксидазной активности в слюне после провокации раствором экстракта табака у курильщиков

Токсикант	ХОБЛ (n=27)		БА (n=25)		Контрольная группа (n=12)	
	курящие (n=20)	не курящие (n=7)	курящие (n=12)	не курящие (n=13)	курящие (n=5)	не курящие (n=7)
Водный экстракт табака (1:100)	98(57;136)%*	197(142;233)%*	131(73;172)%	144(115;255)%	9(0;14)%	0(0;7)%

Примечание: * $p < 0,001$ достоверные отличия между группами ХОБЛ курильщики и ХОБЛ некурящие

Отрицательные результаты у больных контрольной группы считали истинно отрицательными TN (True Negatives), а положительные – ложноположительными FP (False Positives).

Диагностическую специфичность теста (Sp) – способность теста давать отрицательные результаты у здоровых людей рассчитывали по формуле 1:

$$Sp = \frac{TN}{TN+FP} \times 100\%$$

Диагностическую чувствительность теста (Se) – способность теста выявить аллергию у больных рассчитывали по формуле 2:

$$Se = \frac{TP}{TP+FN} \times 100\%$$

Диагностическую точность теста (Ac) – способность теста правильно отличать больных от здоровых рассчитывали по формуле 3:

$$Ac = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \times 100\%$$

Высокая диагностическая чувствительность метода – Se в группе ХОБЛ 70% и Se в группе БА 80% позволяет использовать метод в качестве скрининга для выявления больных с хроническими обструктивными заболеваниями.

III Определение аллергии на пищевые красители и бытовые аллергены

Характеристика больных. Исследование проведено на базе аллергологического отделения УЗ «Витебская областная клиническая больница» и кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государ-

ственный ордена Дружбы народов медицинский университет» в 2012-2015 годах.

После получения согласия и заполнения опросника по пищевой и/или бытовой аллергии в исследование включали больных аллергологического отделения ВОКБ (бронхиальная астма / аллергический ринит) и/или наличием пищевой непереносимости в анамнезе и/или с подозрением на аллергию к пищевым красителям (ПК).

Диагноз аллергического заболевания верифицировался по жалобам, анамнезу, положительным при предшествующих обследованиях кожным пробам с бытовыми/пыльцевыми аллергенами, данным спирометрии и объективного обследования).

Непереносимость пищевых красителей у респондентов проявлялась приступами бронхоспазма, высыпаниями и зудом.

Из исследуемой группы исключены лица, получившие специфическую десенсибилизацию аллергеном домашней пыли в прошлом.

Контролем служили здоровые добровольцы без наличия каких-либо жалоб/проявлений/данных анамнеза по сенсibilизации к бытовым и пищевым аллергенам и отсутствием установленных аллергических заболеваний.

Из контрольной группы исключены лица с отягощенным наследственным анамнезом.

По данным опроса и анамнеза 54 человека вошли в исследуемую подгруппу 1 (с подозрением на наличие пищевой аллергии и/или

Таблица 7. Расчет диагностических коэффициентов для метода диагностики аллергии по повышению пероксидазной активности в слюне у больных с обструктивными заболеваниями

Группы больных	TP	FN	TN	FP	Se,(95% до- верительный интервал)	Sp,(95% до- верительный интервал)	Ac,(95% до- верительный интервал)
Больные с ХОБЛ (n=27) и контрольная группа (n=12)	19	8	8	4	70(58-80)%	67(40-87)%	70(52-82)%
Больные с БА (n=25) и контрольная группа (n=12)	20	5	8	4	80(67-89)%	67(40-86)%	76(58-88)%

Примечание: TP – истинно положительные результаты, FN – ложноотрицательные результаты, TN – истинно отрицательные результаты, FP – ложно положительные результаты; отличия между результатами обследования опытной и контрольной группами р < 0,05 по всем токсикантам.

Таблица 8. Демографическая характеристика больных

Показатели	Исследуемая		Контрольная	
	Подгруппа 1 n=51	Подгруппа 2 n=12	Подгруппа 1 n=17	Подгруппа 2 n=8
Возраст, г.	38 [34; 41] *	37 [28; 45] *	30 [24; 36]	29 [18; 40]
Пол, м/ж	45/9	6/6	16/8	6/2

Примечание: данные представлены как М [-ДИ; +ДИ], * р < 0.05.

реакциями на пищевые красители в анамнезе); 12 участников с наличием верифицированной сенсibilизации к бытовым аллергенам составили подгруппу 2. Набраны две контрольные подгруппы (24 и 8 человек соответственно).

Демографическая характеристика пациентов представлена в таблице 8.

Пероральная провокационная проба (ППП) проводилась лицам исследуемой и контрольной подгруппы 1 – с 2 мг пищевого красителя (ПК) (тартразина или диоксида титана), лицам исследуемой и контрольной подгруппы 2 – с 0,05 мл 0,01% раствора аллергена домашней пыли (100 PNU в 1ml). У 6 человек слюна собиралась до и через 40 мин без проведения ППП.

Сбор слюны, анализ прироста пероксидазной активности в слюне проводились соответственно описанной выше методики.

Для исключения ложноположительных реакций контролем положительной реакции считалась начальная оптическая плотность пробы до провокационного теста не меньше 0,600 единиц, хотя бы в одном из приготовленных разведений. При отсутствии прироста пероксидазной активности или уменьшения оптической плотности опытной пробы результат считался отрицательным и приравнивался нулю.

Для интерпретации результатов теста использовали ROC кривую (Receiver Operating Characteristic Curve) для расчета оптимального порога отсечения (optimal cut-off value) (MedCalc – version 15.6.1).

Статистическая обработка и представление данных. Полученные данные не имели характер нормального распределения. Для статистического анализа применяли непараметрический метод (критерий Манна-Уитни (M-U)). Значение показателей приводятся в виде среднего арифметиче-

ского и доверительного интервала М [-ДИ; +ДИ]; медиана и величины интерквартильного размаха Me (25%;75%). Различия считали достоверными при вероятности $p < 0,05$.

Результаты исследования. У 50% лиц с подозрением на аллергию к ПК (исследуемая подгруппа 1) после ППП с тартразином или диоксидом титана отмечался прирост пероксидазной активности ротовой жидкости более чем на 30% (табл. 9).

Эти показатели достоверно превышали результаты ППП в контрольных подгруппах (13,6% и 12,5%) (Тест M-U $p_1=0,005$; $p_2=0,006$ соответственно).

Обнаружено увеличение пероксидазной активности слюны после ППП с раствором аллергена д. пыли у всех лиц с верифицированной бытовой сенсibilизацией (исследуемая подгруппа 2). Из них у 83 % прирост пероксидазной активности слюны после ППП был выше, чем 30%.

У лиц с наличием аллергических реакций на бытовые аллергены и пищевые красители в анамнезе абсолютные показатели прироста пероксидазной активности слюны были выше, чем у лиц контрольных подгрупп (Тест M-U $p_1=0,0025$; $p_2=0,004$ соответственно).

При проведении контрольных проб без применения какого-либо аллергена или плацебо, прироста пероксидазной активности слюны не наблюдалось.

Диагностическая точность метода (у лиц с известной сенсibilизацией на бытовые аллергены) составила 85(59-95)%, чувствительность 91(67-99)% и специфичность 78(49-88)% ($p=0,002$).

При применении метода у лиц с подозрением на аллергию к ПК диагностическая точность составила 61(50-67)%, чувствительность 90(75-97)% и специфичность 42(33-46)% ($p=0,003$).

Таблица 9. Прирост пероксидазной активности в слюне после провокационной пробы с пищевыми красителями и аллергеном домашней пыли в исследуемой и контрольной подгруппах 1 и 2

Вид провокационной пробы	Пищевой краситель		Аллерген дом. пыли	
	Исследуемая подгруппа 1 n=52	Контрольная подгруппа 1 n=22	Исследуемая подгруппа 2 n=12	Контрольная подгруппа 2 n=8
Подгруппы, число участников				
Результаты				
Положительный (абс/%)	26/50	3/13,6	10/83	1/12,5
Прирост пероксидазной активности в 8-кратном разведении слюны (%) М [-ДИ; +ДИ]	31,8 [19,0; 44,6]*	5,5 [-0,4; 11,4]	68,8 [14,9; 122,7]**	9,1 [-0,7; 17,6]

* - $p_1=0,039$ по критерию M-U; ** - $p_2=0,005$ по критерию M-U.

Выводы

Трансбуккальный метод диагностики аллергии позволяет диагностировать ее на аллергены (стоматологические материалы, соли металлов, пищевые добавки), а также неспецифическую

гиперчувствительность (псевдоаллергию) на ирританты и токсиканты – сигаретный дым, выхлопные газы автомобилей путем определения прироста пероксидазной активности в слюне до и после провокационной пробы на больном.

Литература

1. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология: руководство. М.: Мед. лит., 2009, 464 с.
2. Новиков П.Д. Иммунодиагностика. Витебск, 2006, 250 с.
3. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. ГЭОТАР-Медиа, 2009, 380 с.
4. Monteseirin J. Neutrophils and asthma. J Investing Allergol Clin Immunol 2009; Vol. 19(5): 340-354.
5. Новиков П.Д., Новикова Н.Д. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2002; №1: 63-68.
6. Титова Н.Д. Применение реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами для диагностики аллергии к пищевым добавкам. Клиническая лабораторная диагностика 2011; №2: 42-45.

Сведения об авторах:

Новиков Дмитрий Кузьмич – профессор, д.м.н., зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета.
Новиков Павел Дмитриевич – д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета.
Карпук Иван Юрьевич – к.м.н., доцент, докторант кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.

Лазаренко Людмила Леонидовна – врач аллерголог-иммунолог стоматологической поликлиники №22 и Северо-Западного Центра доказательной медицины.

Смирнова Оксана Владимировна – к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета.

Аляхнович Наталья Сергеевна – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.

210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, E-mail: all-vgmu@mail.ru

Поступила 17.09.2015 г.