

# Od odkrycia IgE,

poprzez nanotechnologię do medycyny spersonalizowanej

From the discovery of IgE, through nanotechnology to personalized medicine

## S U M M A R Y

It is exactly one hundred years since Dr. Ramirez described the case of the asthma attack during horseback riding in Central Park, New York, in a patient who had blood transfused from an allergic person and one year after the 50th anniversary of the discovery of immunoglobulin E (IgE). Since these events, in the diagnosis of allergic diseases, the possibility has of using skin tests or later, tests to determine the concentration of E antibodies specific (sIgE) to various allergen extracts in the blood serum has appeared. Now, we can say that we have entered a new era in allergy diagnostics with the ability to determine sIgE against allergen molecules. The availability of new tools in serological diagnostics of allergy based on allergen molecules contributed to the explanation of many mechanisms of hypersensitivity in the IgE-dependent mechanism. Molecular diagnostics of allergy increases the analytical sensitivity of sIgE tests in relation to tests testing only allergen extracts. It also allows a more precise indication of the allergen for immunotherapy in the case of multivariate allergies or the arrangement of elimination diets in the case of food allergy. Allergen molecular diagnosis, after the discovery of immunoglobulin E, is the next milestone in allergology.

Mija dokładnie sto lat od opisanego przez dr Ramireza przypadku wystąpienia ataku astmy podczas jazdy konnej w Central Parku w Nowym Jorku u pacjenta, któremu przetoczono krew od osoby uczulonej i rok od 50 rocznicy odkrycia immunoglobuliny E (IgE). Od tych wydarzeń w diagnozowaniu chorób alergicznych, pojawiła się między innymi możliwość stosowania testów skórnych czy później testów pozwalających oznaczyć w surowicy krwi stężenie przeciwciał E swoistych (sIgE) wobec różnych ekstraktów alergenowych. Obecnie, możemy powiedzieć, że wkroczyliśmy w nową erę w diagnostyce alergii mając do dyspozycji możliwość oznaczania sIgE wobec molekuł alergenowych. Dostępność nowych narzędzi w diagnostyce serologicznej alergii w oparciu o molekuly alergenowe przyczyniła się do wyjaśnienia wielu mechanizmów nadwrażliwości w alergii IgE-zależnej. Diagnostyka molekularna alergii zwiększa czułość analityczną testów mierzących sIgE w odniesieniu do testów badających jedynie ekstrakty alergenowe. Pozwala ona również na bardziej precyzyjne wskazanie alergenu do immunoterapii w przypadku uczuleń wieloważnych czy układanie diet eliminacyjnych w przypadku alergii pokarmowej. Diagnostyka w oparciu o molekuly alergenowe, po odkryciu immunoglobuliny E stanowi kolejny krok milowy w alergologii.

Majsiak E.: Od odkrycia IgE, poprzez nanotechnologię do medycyny spersonalizowanej. *Alergia*, 2019, 4; 41-46

## Odkrycie Immunoglobuliny E (IgE)

W 1919 r. dr Ramirez opublikował opis przypadku pacjenta, który nigdy przedtem nie miał objawów alergicznych, a dostał ciężkiego napadu astmy podczas jazdy konnej w Central Parku w Nowym Jorku. Pacjent ten kilka dni wcześniej miał przetoczoną krew od osoby z alergią na sierść końską. Analiza zdarzenia sugerowała, że czynnik odpowiedzialny za uczulenie i ciężki napad astmy znajdował się w przetoczonym krwi i został przeniesiony w trakcie transfuzji do organizmu osoby niealergicznego (rycyna nr 1) [1].

Dwa lata później, w 1921 r. Prausnitz i Küstner, którym zawdzięczamy właściwe zrozumienie zjawiska alergii typu natychmiastowego przeprowadzili doświadczenie. Polegało ono na śródskórnym wstrzyknięciu Prausnitzowi surowicy uczulonego na ryby Küstnera i podanie następnego dnia w to samo miejsce antygeny ryby. Zaczerwienienie i obrzęk skóry jakie wystąpiły, zasugerowały badaczom istnienie bliżej nieokreślonego czynnika, odpowiedzialnego za przenoszenie alergii drogą krwi. Czynnik ten w późniejszym okresie nazwany został przez Coca i Cooke reaginą. Wywołany odczyn, na cześć badaczy nazwano reakcją Prausnitza-Küstnera, i stosowany był jako test diagnostyczny do lat 70. XX wieku,

w celu stwierdzenia obecności w surowicy pacjenta swoistych reagin [2].

W latach 1966-67 zespół badawczy pracujący w Denver pod kierownictwem Teruko i Kimshige Ishizaków rozpoczął badania mające na celu określenie własności czynnika odpowiedzialnego za atopię, zwanego wówczas reaginą. Najważniejszym wnioskiem z tych badań było stwierdzenie, że czynnik ten cechuje się tak unikalnymi własnościami, różnymi od dotychczas znanych klas immunoglobulin, że należy je wyodrębnić jako nową klasę. Czynnik ten otrzymał tymczasowo nazwę „γE”. Wyniki swoich prac opublikowali w postaci artykułów w roku 1966 i 1967 w „Journal of Immunology” oraz w „Journal of Allergy” [1].

W tym samym czasie w Szwecji dwaj badacze Bennich i Johansson prowadzili badania nad własnościami surowicy pacjenta chorującego na szpiczaka wytwarzającego nieznana dotychczas immunoglobulinę. Od inicjałów chorego nazwali ją IgND. Po publikacjach Ishizaków uznali, że właściwości fizykochemiczne wyizolowanego przez nich atypowego białka szpiczaka były prawie identyczne z właściwościami γE.

Naukowcy zaczęli współpracować i po krótkim czasie, w lutym 1968 r. dla obu grup naukowców było już jasne, że



Dr n. med.  
Emilia Majsiak<sup>1, 2</sup>

Student V roku,  
wydział lekarski UM  
Martyna Pawlaczuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Polsko-Ukraińska  
Fundacja Rozwoju  
Medycyny, Lublin

<sup>2</sup> EMMA MDT sp. z o.o.,  
Lublin

## Słowa kluczowe:

diagnostyka molekularna, immunoglobulina E, diagnoza

## Key words:

molecular diagnostics, immunoglobulin E, diagnosis

unikalna struktura, właściwości antygenowe i aktywność biologiczna IgND stanowi od dawna poszukiwany czynnik odpowiedzialny za alergiczną nadwrażliwość typu natychmiastowego. W trakcie międzynarodowej konferencji WHO (1968 r.) uznano oficjalnie odkrycie piątej klasy immunoglobulin, którą oznaczono symbolem E.

Wkrótce stwierdzono, że podwyższony poziom IgE w krwi obserwuje się u osób z chorobami alergicznymi, a sytuacja, w której organizm wykazuje tendencję do nadprodukcji tych przeciwciał charakteryzuje atopię [1, 3].

Jak później zostało udowodnione, istnieje również szereg innych zespołów chorobowych, w przebiegu których może występować podwyższone surowicze stężenie IgE (m.in. w zakażeniach bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych, chorobach nowotworowych, niedoborach immunologicznych, chorobach skóry i chorobach zapalnych) [2].

Stężenie IgE w surowicy jest najniższym spośród 5 klas immunoglobulin i zależy od wieku. Przy urodzeniu jest niskie, ale stopniowo wzrasta, osiągając szczyt około 10.–15. roku życia. Od drugiej do ósmej dekady życia jej stężenie stopniowo obniża się. Białko to ma masę 190 kDa i nie posiada możliwości przenikania przez łożysko. Immunoglobulina E jest termolabilna, temperatura powyżej 56°C powoduje jej inaktywację. Czas półtrwania IgE w surowicy krwi jest krótki i wynosi zaledwie 1–5 dni [2].

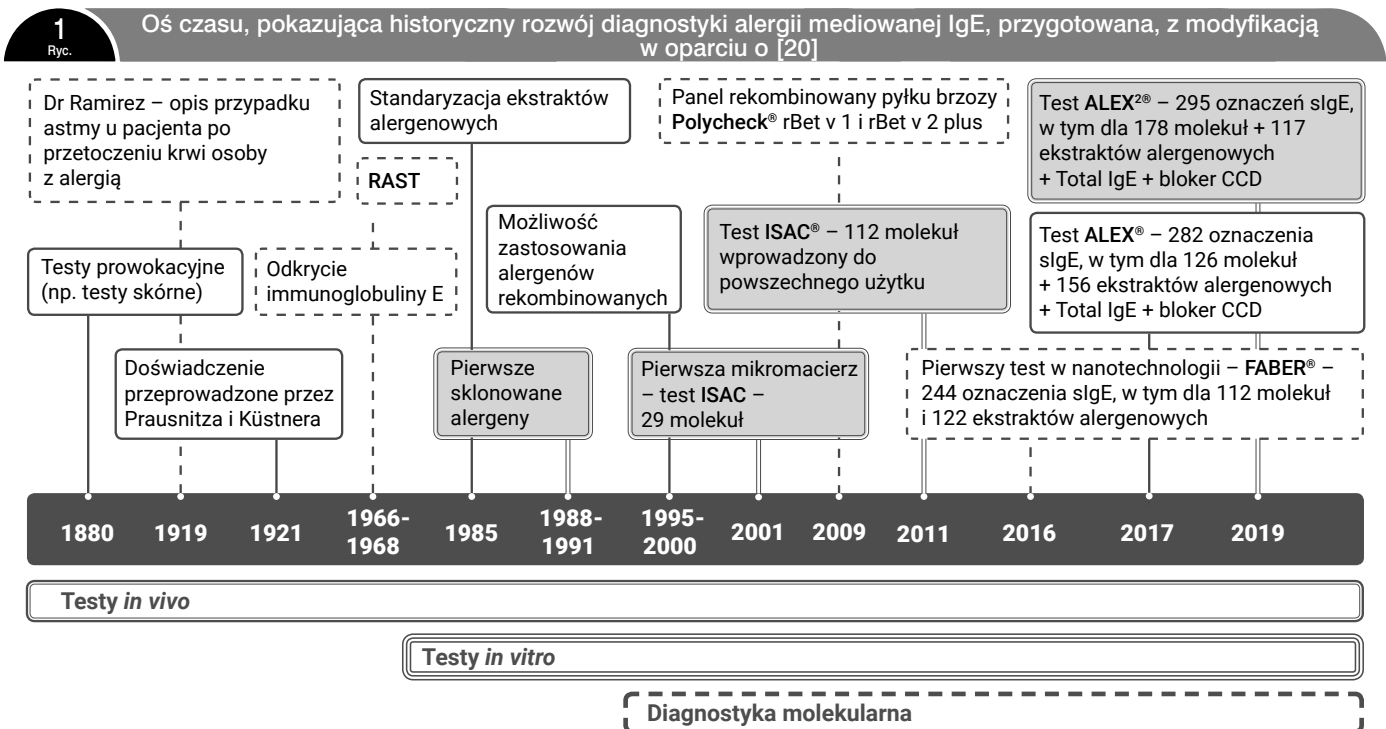
### Metody Oznaczania IgE

Podstawową metodą badania występowania reakcji alergicznej w mechanizmie IgE-zależnym są testy skórne (SPT). Od czasu pierwszej publikacji na ich temat w 1959 roku autorstwa Helmtrauda Ebrustera, test ten był jednym z podstawowych narzędzi diagnostycznych do wykrywania nadwrażliwości typu I. Do przeprowadzania testu używa się odpowiednio przechowywanych, wystandaryzowanych metodą biologiczną odczynników zawierających alergeny. SPT wykorzystywane

są w diagnozowaniu nadwrażliwości na alergeny wziewne, pokarmowe, leki czy w diagnostyce alergii zawodowej. Przed ich wykonaniem należy odstawić leki przeciwhistaminowe na okres 1-2 tygodni [4].

Kolejnym narzędziem wykorzystywanym w diagnozowaniu IgE-zależnej nadwrażliwości jest oznaczanie przeciwciał E w surowicy krwi. Pierwszą taką techniką, stosowaną do precyzyjnego oznaczania stężenia sIgE było badanie metodą radioimmunoadsorpcji (RAST). Metoda ta została opisana w 1967 roku przez Wide i wsp. i umożliwiła wprowadzenie do praktyki laboratoryjnej testu wykrywającego sIgE reagujące z poszczególnymi alergenami. W swojej pierwotnej postaci składał się z alergenu, który związany był z podłożem stałym (np. z krążkiem bibuły) i reagował ze swoistymi przeciwciałami E w badanej surowicy. W kolejnym etapie powstałe kompleksy wiązały się z przeciwciałami przeciw ludzkim IgE, znakowanymi izotopami promieniotwórczymi.

W ostatnich latach metodę tą zastąpiono metodą enzymatyczną. Gdzie zastosowano technikę opartą na wiązaniu antygeny na podłożu stałym (solid phase) zwiększając tym samym zdolność wiązania alergenu. Wprowadzono również testy, w których alergen znajduje się w fazie ciekłej, a z fazą stałą wiąże się po związaniu z przeciwciałami IgE rozpuszczonymi także w fazie ciekłej. Obecnie, w standardowej praktyce alergologicznej do oznaczeń sIgE wobec pojedynczych alergenów, najczęściej wykorzystuje się metody immunoenzymatyczne np. ELISA. Równie popularne są metody radioimmunologiczne (np. UniCAP, Phadia, obecnie ThermoFisher). Dość powszechne są także testy multiparametrowe, pozwalające ocenić z jednej próbki badanej sIgE wobec wielu alergenom (np. 6, 10, 20 czy 30 alergenów Polycheck®, Biocheck GmbH), które także są metodami immunoenzymatycznymi [5].





### ISAC® - mikrotechnologia

Wprowadzenie kilkanaście lat temu pierwszego testu (mikromacierzy) do oceny molekuł alergenowych otworzyło ogromne możliwości diagnostyczne alergii IgE-zależnej. Był nim test ISAC® (Phadia, obecnie TermoFisher), który z niewielkiej ilości krwi pozwalał wykryć uczulenia dla różnych białek alergenowych, wytłumaczyć rozbieżne reakcje kliniczne u osób uczulonych na to samo źródło alergenowe. Test ten, pozwalał również ograniczyć koszty diagnostyki wielu alergenów, ponieważ u pacjentów znaczenie kliniczne ma zazwyczaj więcej niż kilka alergenów [6, 7]. Mikro-ilości preparatów uczulających, w sposób zautomatyzowany były osadzone na przygotowanym szklanym podłożu, gdzie rozmiar punktu (ang. micro-spot) mikromacierzy miał wielkość pomiędzy 50 a 200 mikrometrów (1 mikrometr = 0,001 mm). Nowo powstała wtedy mikromacierz wymagała niewielkich ilości preparatów alergennych, pozwalając na pracę z wysoko oczyszczonymi naturalnymi oraz rekombinowanymi molekułami [7].

### FABER®, ALEX® - nanotechnologia

Po 20 latach wykorzystywania w badaniach biologicznych, jak również w medycynie klinicznej oraz w diagnostyce alergii, mikrotechnologię zastępuje nanotechnologia. Rozmiar punktu (ang. nano-bead) wynosi 5-7 mikrometrów średnicy, co powoduje, że obecnie możliwe jest opracowanie testów diagnostycznych o wymiarach poniżej wielkości kilku punktów na mikromacierzy. W testach wykorzystujących nanotechnologię, ilość alergenu wymagana do uzyskania wyniku zmniejszyła się w porównaniu do ilości alergenu koniecznego do testów skali micro. W punkcie mikromacierzy znajduje się ok. 100 pikogramów białek alergenów, podczas gdy w nano-rozmiarze potrzeba ich nawet do 1000 razy mniej ( $10^{-12}$  mg). Dostępność materiałów i narzędzi o nano-rozmiarach (nanometr = 0,000001 mm) pozwala zastosować ją w diagnostyce medycznej, w tym również w testach do diagnostyki alergii, umożliwiając opracowanie testów badających jednocześnie niemal 300 molekuł i ekstraktów alergenowych [7]. Tak szeroki screening, pozwala skrócić proces diagnostyczny u pacjentów z podejrzeniem choroby alergicznej [8]. Co więcej, testy w tej technologii pozwalają na zwiększanie liczby antygenów w przyszłości niemal bez ograniczeń, a to współmiernie przekładać się może na uzyskanie pełniejszej informacji o pacjencie i postawienie trafnej i szybkiej diagnozy. Testy te, dostarczają znacznych ilości danych, które mogą być wykorzystane w diagnozowaniu alergii u pacjentów w sposób bardziej kompleksowy, ale mogą być również przydatne w badaniach naukowych wyjaśniając złożony proces reakcji alergicznej [9]. Obecnie do testowania tą metodą dostępne są 2 testy, tj.: test FABER® (CAAM, Rzym, Włochy) i test ALEX® (MADx, Wiedeń, Austria).

### Molekuła alergenowa

Obecnie wiemy, że każdy alergen składa się z wielu różnych białek (inaczej molekuł, komponent). Na stronie [www.allergome.org](http://www.allergome.org) (platforma międzynarodowej społeczności naukowej o zasięgu globalnym dokumentująca wszystkie molekuły i źródła alergenowe, aktualizowana w czasie rzeczywistym) scharakteryzowano ich do tej pory ponad 3 tysiące

z różnych źródeł alergenowych. Zaznaczyć należy, że jedynie niewiele ponad 130 z tych cząsteczek jest możliwych do rutynowego oznaczania sIgE w praktyce klinicznej.

Dzięki klonowaniu, od końca lat osiemdziesiątych zwiększyła się ich dostępność i popularność zapoczątkowując nową erę diagnostyki, nazywaną diagnostyką alergii na bazie molekularnej [10-12].

Ze względu na rosnącą liczbę opisywanych molekuł postanowiono usystematyzować ich nomenklaturę.

**Obecnie, nazwy poszczególnych molekuł alergenowych zatwierdzone są przez Światową Organizację Zdrowia i Międzynarodową Podkomisję ds. Nazewnictwa Alergenów WHO / IUIS (Międzynarodowa Unia Towarzystw Immunologicznych).**

Kiedy dostępna jest wystarczająca dokumentacja naukowa, są one akceptowane przez tę komisję i wpisane w rejestr na oficjalnej stronie [www.allergen.org](http://www.allergen.org). Na chwilę obecną jest tam sklasyfikowanych około 960 białek.

Cząsteczki alergenów nazywane są według łacińskiej nazwy rodziny (3 litery z nazwy rodzaju i 1-2 litery z nazwy gatunku). Na przykład alergeny, które zaczynają się od Phl p, pochodzą z *Phleum pratense* (tymotka łąkowa). Do nazwy dodawana jest liczba w celu odróżnienia różnych alergenów z tego samego źródła alergenowego (np. Phl p 1, Phl p 2 itd.). Liczby są przypisane do alergenów w kolejności ich identyfikacji [13].

Bardzo istotną właściwością molekuł jest ich stopień odporności na temperaturę i procesy trawienne.

- Molekuły stabilne (odporne na działanie temperatury i enzymów trawiennych) mają zdolność silnego uczulenia i wywoływania groźnych dla życia objawów klinicznych.

- Natomiast molekuły tzw. labilne (o niskim stopniu wrażliwości na temperaturę i nieodporne na procesy trawienne) zwykle są lepiej tolerowane i wywołują łagodniejsze objawy [14, 15].

Strukturalne podobieństwo białek, nawet tych o odmiennym pochodzeniu, jest głównym czynnikiem determinującym występowanie reakcji krzyżowych i wyjaśnia reakcje w takich zespołach klinicznych, jak np.: zespół lateksowo-owocowy czy zespół zespół wieprzowina-sierść kota [16].

### Molekularna diagnostyka alergii

W ciągu ostatnich 30 lat znacznie wzrosła wiedza na temat struktury molekuł alergenowych oraz możliwości ich produkcji, co pozwoliło zmienić podejście do diagnostyki alergii [13, 17]. Możliwa stała się ocena przeciwciał E skierowanych wobec oczyszczonym naturalnym składnikom alergenów, jak również wobec uzyskiwanych metodą inżynierii genetycznej, tzw. molekułom rekombinowanym [18].

Ocena stężenia sIgE w surowicy krwi wobec molekuł alergenowych w praktyce laboratoryjnej może być przeprowadzana w oparciu o 2 różne sposoby podejścia do testowania alergenów. Pierwszy z nich to oznaczanie pojedynczych wybranych molekuł alergenowych (tzw. testy singleplex), a drugi to oznaczanie wiele molekuł



alergenowych, jednocześnie z jednej próbki badanej (tzw. testy multiplex).

### Testy singleplex

Przy użyciu testu singleplex określa się poziom IgE względem pojedynczego lub kilku wybranych alergenów, wykrywając obecność tych przeciwciał wobec alergenów, które są istotne ze względu na podejrzenie ich związku z wywiadem i objawami klinicznymi pacjenta [19]. Taka ścieżka diagnostyczna wpisuje się w model "top-down" [20]. Wśród tych testów znajdziemy m. in. test ImmunoCAP® (Phadia/Thermo Fisher Scientific) czy test 3gAllergy™/Immulite (Siemens Healthcare) [20].

### Testy multiplexowe

W przypadkach, gdzie trudno jest ustalić przyczynę objawów klinicznych pacjenta, gdzie źródło alergii jest nieznanne, tam bardziej przydatne mogą okazać się testy multiplexowe. Również osoby uczulone na kilka alergenów, czy osoby z anafilaksją z nie ustalonym alergenem jako przyczyną reakcji, mogą odnieść większą korzyść z zastosowania testów multiplexowych [21]. Taka ścieżka diagnostyczna wpisuje się w model diagnostyczny „bottom-up”, gdzie metody molekularne wykorzystywane są na samym początku diagnozowania alergii, i dopiero w dalszej kolejności są wykonywane badania oznaczeń sIgE wobec ekstraktów in vivo lub in vitro, a uzyskane wyniki poddawane są interpretacji z analizą objawów towarzyszących [11, 22].

Dostępne wśród testów multiplexowych są: test ImmunoCAP® ISAC® (Phadia/Thermo Fisher Scientific), platforma diagnostyczna FABER® (CAAM - Centri Associati di Allergologia Molecolare) oraz test ALEX® (Macro Array Diagnostics – MAD-X).

Wymienione testy multiplexowe umożliwiają oznaczenie sIgE wobec więcej niż 100 alergenów w trakcie jednej analizy, co pozwala na uzyskanie obszernych indywidualnych profili uczuleniowych pacjentów. Możemy powiedzieć, że test multiplexowy zastępuje ponad 100 testów jednocześnie [23].

### Testy multiplexowe celowane

Przy okazji testów multiplexowych można też wspomnieć, że dostępne są również „celowane” (krótkie) panele do diagnostyki molekularnej. Testy te, umożliwiają wykonanie podczas jednej analizy kilku dobranych przez producenta molekuł alergenowych, celem np. oszacowania skuteczności immunoterapii (np. testy Polycheck®, Biocheck GmbH).

Zarówno oznaczanie sIgE wobec molekuł alergenowych w oparciu o testy singleplex, jak i testy multiplex, są już niemal rutynowymi procedurami diagnostycznymi, zastępując wcześniej stosowane testy w oparciu o ekstrakty alergenowe. Spowodowane jest to ciągłym udoskonalaniem testów do oznaczania sIgE wobec molekuł, jak również już powszechnym ich dostępem. Diagnostyka molekularna IgE, zarówno w oparciu testy singleplex, jak i multiplex zwiększa czułość diagnostyczną poszczególnych testów i wzbogaca interpretację kliniczną [20].

Obydwa sposoby z powodzeniem mogą być zaliczone do narzędzi wykorzystywanych w medycynie precyzyjnej poprawiających jakość stawianej diagnozy w polialergiach

pokarmowych, wziewnych, czy w przypadkach anafilaksji o nieznannej etiologii [22, 24].

### Testy multiplexowe do diagnostyki molekularnej

#### Test ISAC®

Test ISAC® – (The Immuno-Solid phase Allergen Chip) był pierwszym narzędziem pozwalającym oznaczyć półilościowo przeciwciała IgE przeciwko 112 molekułom alergenowym w pojedynczym teście. Do wykonania oznaczeń sIgE przy pomocy tego testu wykorzystać można osocze lub surowice (30 µl). Podczas inkubacji obecne w surowicy pacjenta sIgE wiążą się z odpowiednimi molekułami alergenowymi umocowanymi na szklanej powierzchni. Zobrazowanie powstania kompleksu sIgE – molekula alergenowa, możliwe jest za sprawą dodania znakowanego barwnikiem przeciwciała przeciw-ludzkiego anti-IgE. Wykorzystanie skanera umożliwia odczytanie wyniku. Wynik stężenia IgE badanego przy pomocy testu ISAC® wyrażany jest w Międzynarodowych Jednostkach Standardowych (ISU), zakres pomiaru wynosi 0,3–100 ISU dla IgE (ISU-E). Ten zakres w przybliżeniu odpowiada zakresowi stężeń wynoszącemu 0,3–100 kilogramów jednostek międzynarodowych swoistego dla alergenu przeciwciała na objętość jednostkową próbki (kUA/l) IgE (1 kUA/l jest równa 2,4 ng/ml). Wykonanie testu trwa łącznie około 4 godzin. W przypadku testu ISAC® konieczne jest kolekcjonowanie surowicy, ponieważ każdy test zawiera cztery mikromacierze, dając wyniki dla czterech próbek na test [10, 25]. Mikromacierz ta, została opracowana przez VBC-GENOMICS Bioscience Research GmbH (LLC, Wiedeń, Austria). W 2001 roku przedstawiła ona test ISAC® zawierający 29 molekuł, przeznaczony na początku jedynie do badań naukowych. Od 2009, test ten był dalej rozwijany, produkowany i sprzedawany przez firmę Phadia - aktualnie Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Szwecja. Test ISAC® został udostępniony do komercyjnego użytkowania w 2011 roku, ostatecznie z liczbą 112 molekuł alergenowych [20].

#### Test FABER®

Test FABER® – (Friendly Allergen nano-Bead Array) powstał przy zaangażowaniu wielu instytucji pod nadzorem Centrum Alergologii Molekularnej w Rzymie (CAAM, Włochy). Platforma diagnostyczna FABER® została oficjalnie zaprezentowana w dniach 13-15 października 2016 we Włoszech, podczas czwartego Spotkania Ekspertów dotyczącego Alergii Pokarmowej i Anafilaksji (FAAM). FABER® pozwala oznaczyć sIgE wobec 122 ekstraktów i 122 molekuł alergenowych pochodzących ze 123 różnych źródeł alergenowych, tj. pokarmy, rośliny, zwierzęta i inne. Dolną granicą wykrywalności testu (LoD) jest 0,01 FIU. Wyniki swoistych IgE wobec alergenów prezentowane poniżej lub równe 0,1 FIU/ml na teście FABER® to wyniki negatywne. Wyniki znajdujące się w przedziale powyżej 0,01 do 0,30 FIU/ml to wyniki graniczne, natomiast wyniki pozytywne to wszystkie wyniki powyżej 0,30 FIU/ml [7, 26].

Test FABER® jako pierwszy połączył zalety „tradycji” (oznaczanie sIgE wobec ekstraktów alergenowych) z zaletami „nowoczesności” (molekuły alergenowe). Cechą szczególną tej platformy diagnostycznej jest indywidualna interpretacja wyniku online w systemie CDRS. Pacjent otrzymuje wynik w postaci wydrukowanej „tradycyjnej”, ale oprócz tego otrzy-



## DIAGNOSTYKA

muje dostęp do własnego konta na stronie [www.caam-allergy.com](http://www.caam-allergy.com), gdzie ma wgląd do swojego profilu uczuleniowego wraz z opisem poszczególnych grup białek, dróg narażenia na nie, czy wreszcie innych źródeł, w których mogą występować molekuly homologiczne stanowiące potencjalne źródła uczulenia w wyniku reakcji krzyżowych. Niedawno wydano wersję tego samego narzędzia - CDRS PRO, która oferuje lekarzom specjalistom oprócz dostępu do wyniku pacjenta i jego interpretacji, dodatkowo jeszcze przydatne informacje, materiały do samokształcenia i przykłady przypadków przydatnych do ćwiczenia umiejętności interpretacji wyników w oparciu o diagnostykę molekularną. Moduł CDRS i CDRS PRO dzięki zaawansowanym technologiom informatycznym i platformom komunikacyjnym, dostępny jest przy użyciu urządzeń mobilnych, tj.: komputer, laptop czy smartfon [7, 26, 27].

### Test ALEX®

Test ALEX® - (Allergy Explorer) zaprezentowany został po raz pierwszy w 2017 roku przez firmę Macro Array Diagnostics na konferencji EAACI w Helsinkach. Umożliwia ilościową ocenę *in vitro* specyficznych przeciwciał E wobec 282 alergenów, w tym wobec 156 ekstraktów oraz 126 molekułom alergenowym, a także półilościowy pomiar całkowitego stężenia immunoglobulin E z jednej próbki badanej. Na teście można oznaczyć sIgE w zakresie od 0,1 kU/l do 50 kU/l. Za wynik dodatni uważany jest wynik powyżej 0,3 kU/l. ALEX® umożliwia także oznaczenie całkowitego IgE w zakresie od 1 kU/l do 2500 kU/l (wyniki odnoszone są do standardu WHO 11/234 dla całkowitego IgE). Do wykonania oznaczenia potrzeba 100 µl surowicy lub osocza (z wyjątkiem osocza EDTA) [9].

Test ten stanowi obecnie najszersze badanie przesiewowe sIgE wobec potencjalnych alergenów, a wspomnieć należy, że wkrótce zostanie zaprezentowana jego kolejna odsłona ALEX2®, gdzie możliwych będzie do testowania 295 alergenów, w tym 178 molekuł i 117 ekstraktów alergenowych [28]. Bardzo dużą zaletą testu ALEX® jest obecność w jego składzie inhibitora CCD (Cross-reactive Carbohydrate Determinants), dzięki któremu można zablokować możliwość przyłączania się przeciwciał skierowanych wobec reszt węglowodanowych do źródeł, w których składzie one występują, co w znacznym stopniu przyczynia się do redukcji otrzymania wyników fałszywie dodatnich oraz poprawia specyficzność testu oceniającego stężenie IgE.

### „Celowane” panele do diagnostyki molekularnej alergii

Diagnostyka molekularna alergii to nie tylko obszerne testy multiparametrowe, ale także testy panelowe umożliwiające diagnostykę celowaną. Stanowią one pewną alternatywę cenową pomiędzy pojedynczymi oznaczeniami sIgE, a testami multipleksowymi. Wśród nich znajdziemy na przykład: testy Polycycheck® Rekombinanty Roztocze (na których badane są 2 ekstrakty roztoczy kurzu domowego Der p i Der f oraz molekuly Der p 1, Der p 2, Der p 10 oraz Der p 23), Polycheck® Rekombinanty Pyłki (na których badany jest ekstrakt brzozy Bet v oraz molekuly Bet v 1 i Bet v 2, oraz ekstrakt tymotki łąkowej Phl p i molekuly Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 oraz Phl p 12) czy Polycheck® Rekombinanty Orzech Ziemny (na których badany jest ekstrakt orzecha ziemnego Ara h oraz molekuly Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8 oraz Ara h 9).

### Ograniczenia metod do oznaczania sIgE w surowicy

Należy pamiętać, że wykrycie sIgE w surowicy wobec molekuł alergenowych, tak samo jak jest to w przypadku oznaczeń sIgE wobec ekstraktów alergenowych, nie świadczy o chorobie alergicznej, a jest dowodem uczulenia [29].

**Występowanie przeciwciał E ma znaczenie kliniczne w potwierdzeniu choroby alergicznej jedynie w obliczu współistnienia objawów alergii. Dlatego też, wyniki sIgE wobec ekstraktów alergenowych, jak i molekuł muszą być zawsze interpretowane w oparciu o wywiad kliniczny i objawy danego pacjenta [20].**

Obecność tych przeciwciał w surowicy uznana została jako czynnik ryzyka rozwoju choroby alergicznej, albowiem udowodniono np. w przypadku tymotki łąkowej, że przeciwciała E swoiste tego alergenu alergenowi mogą być obecne w surowicy pacjentów na kilka lat przed pojawieniem się objawów alergii [26, 30].

Otrzymany wynik ujemny dla molekuł alergenowych, powinien być interpretowany w odniesieniu do ekstraktu alergenowego. Wynika to z faktu, że badając tylko kilka istotnych klinicznie molekuł z danego ekstraktu alergenowego, może zaistnieć sytuacja, że uczulac będzie inna molekula budująca ten alergen, ale nie badana danym testem [26]. Uzyskanie wyniku negatywnego dla ekstraktu i jego molekuł z dużym prawdopodobieństwem wyklucza alergię w mechanizmie IgE-zależnym [20, 31].

### Podsumowanie

Niewątpliwie rozwój nowych metod i narzędzi badawczych w alergologii przyczynia się do usprawnienia procesu diagnostycznego chorób o podłożu IgE-zależnym. Diagnostyka w oparciu o molekuly alergenowe w odniesieniu do diagnostyki opartej o ekstrakty alergenowe zwiększa czułość analityczną i diagnostyczną testów *in vitro* do pomiaru sIgE w surowicy krwi. Pomaga ona w przewidywaniu ryzyka reakcji anafilaktycznych w odniesieniu do poszczególnych molekuł i ich rodzin, jak również w identyfikacji swoistych molekuł dla danego źródła alergenowego (wykrycie uczulenia pierwotnego) i molekuł reagujących krzyżowo (tzw.: panalergenów). Wśród zalet użycia metod multipleksowych w diagnostyce alergii należy wymienić umożliwienie oceny złożonych często profili uczuleniowych w alergiach wieloważnych. Ponadto, badania te stanowią kompleksowy przesiew, zwłaszcza jeśli nieznana jest etiologia reakcji anafilaktycznej z udziałem IgE. Uzyskany wynik ujemny w oparciu o multiparametrowe testy łączące diagnostykę w oparciu o ekstrakty i molekuly alergenowe, z dużym prawdopodobieństwem wyklucza udział IgE, jako przyczyny objawów nadwrażliwości [11]. Wszystkie te cechy, powodują, że diagnostyka alergii na poziomie molekularnym utworzyła drogę medycyny spersonalizowanej w alergii, pozwalając na diagnozowanie, rozpoznawanie i ocenę choroby alergicznej, podejmowanie decyzji o wyborze leczenia, pomaganie w doborze działań w zakresie medycyny zapobiegawczej, dostarczanie informacji o charakterze predykcyjnym i wprowadzanie zindywidualizowanych terapii leczniczych [32]. ■

Prace nadesłano  
12.11.2019  
Zaakceptowano do  
druku 14.11.2019

Konflikt interesów nie występuje.  
Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.