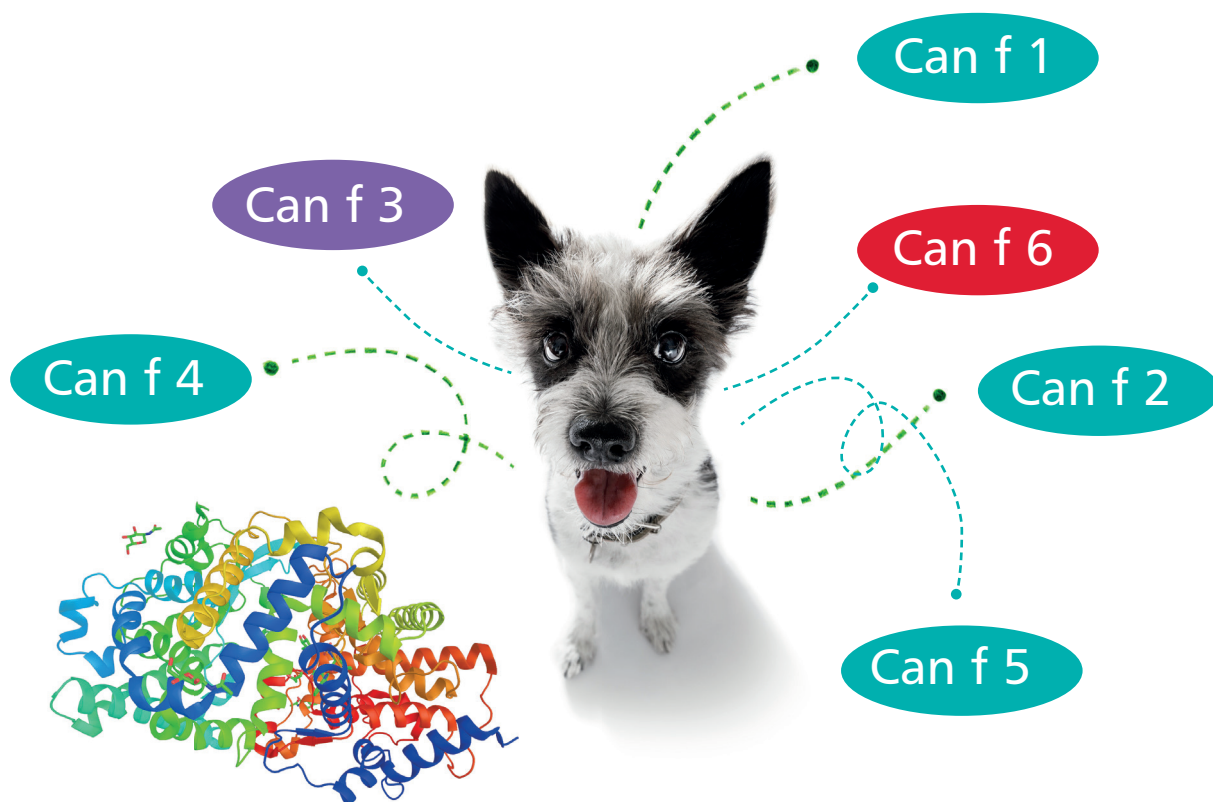


DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA ALERGII

Pomiar stężenia alergenowo-specyficznej IgE w surowicy krwi



Pomiar *in vitro* stężenia alergenowo-specyficznej IgE (sIgE) we krwi obwodowej jest powszechnie dostępną, nieuciążliwą i bezpieczną dla pacjenta, laboratoryjną metodą diagnostyki chorób alergicznych, komplementarną do ambulatoryjnej identyfikacji sIgE *in vivo* w punktowych testach skórnych, SPT (ang. skin prick test).

Jako badanie z wyboru, pomiar stężenia sIgE *in vitro* zlecany jest u małych dzieci, osób w trakcie leczenia lekami przeciwhistaminowymi lub steroidowymi, osób z defektami i chorobami skóry oraz w przypadku obaw wystąpienia reakcji anafilaktycznej w następstwie testu skórniego.

Niedostępna dla SPT precyzja i standaryzacja pomiarów sIgE *in vitro* pozwala na wyznaczanie zależności pomiędzy stężeniem IgE specyficznej dla danego alergenu, prawdopodobieństwem uczulenia na ten alergen i nasileniem objawów klinicznych uczulenia. Czułość pomiarów sIgE *in vitro* powoduje, że prócz waloru diagnostycznego, wyłącznie one posiadają również walor prognostyczny. W piśmiennictwie i materiałach walidacyjnych testów moc diagnostyczna stężenia sIgE *in vitro* wyrażona przez powierzchnię pola pod krzywą, AUC [ang. Area Under the ROC Curve] i iloraz szans, OR (ang. odds ratio) jest większa niż testów skórnych.

ATUTY POMIARÓW sIgE IN VITRO:

- Bezpieczeństwo i mała uciążliwość dla badanego; krótkotrwały dyskomfort związany wyłącznie z pobraniem próbki krwi
- Niezależność badania od przyjmowanych leków antyhistaminowych i przeciwzapalnych
- Niezależność badania od zmian tymczasowych lub trwałych defektów skórnych (dermografizm)
- Praktycznie nieograniczona liczba identyfikowanych równocześnie sIgE
- Doskonała standaryzacja
- Waler prognostyczny obok zastosowania diagnostycznego

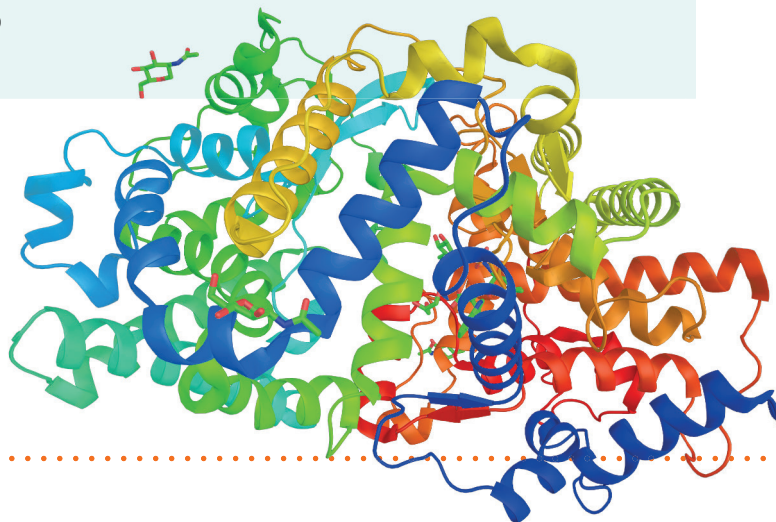
MOLEKULARNA DIAGNOSTYKA ALERGII - CRD

Skokowa zmiana w pozycjonowaniu pomiarów sIgE w diagnostyce chorób alergicznych nastąpiła w momencie narodzin diagnostyki molekularnej alergii (ang. molecular allergology) opartej na molekularnej strukturze alergenów, CRD (ang. component-resolved diagnostics).

Pełne ekstrakty źródeł alergenu wykorzystywane w tradycyjnym podejściu diagnostycznym, w diagnostyce molekularnej in vitro zostały zastąpione przez wyselekcjonowane, cząsteczkowe komponenty o udowodnionej zdolności do indukcji reakcji uczuleniowej. Dokonano funkcjonalnej redefinicji alergenu, określanego teraz jako zbiór ściśle zdefiniowanych biochemicznie i strukturalnie, immunogennych składników cząsteczkowych – antygenów molekularnych, obecnych w określonych proporcjach w pełnym ekstrakcie źródła alergenu (np. pyłku roślin, mleku itd). Epitopem alergenu molekularnego, czyli fragmentem wchodzącym w bezpośrednią interakcję z miejscem wiążącym - paratopem IgE, może być: sekwencja aminokwasów łańcucha peptydowego (epitop liniowy) lub aminokwasy z sąsiednich łańcuchów w trójwymiarowej strukturze przestrzennej (epitop przestrzenny). Epitop alergenu decydujący o immunogenności alergenu nazywa się determinantą immunodominującą. Znajomość właściwości fizycznych i chemicznych alergenów molekularnych i ich epitopów ma istotne znaczenie diagnostyczne i prognostyczne. Epitopy liniowe są termostabilne i odporne na enzymy proteolityczne, epitopy przestrzenne są termolabilne i wrażliwe na enzymy trawienne. Rozwój diagnostyki molekularnej przyspieszył dzięki możliwości uzyskiwania antygenów molekularnych metodami inżynierii białek. Rekombinantowe cząsteczki białek pozbawione są reszt cukrowych lub posiadają składniki cukrowe zmodyfikowane przez roślinne systemy ekspresyjne, co wyeliminowało wpływ krzyżowo reagujących komponent węglowodanowych białek, CCD (ang. cross-reactive carbohydrate determinants) na pomiary sIgE wykonywane in vitro.

ATUTY DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ ALERGII

- Nieosiągalna dla ekstraktów alergenowych standaryzacja i porównywalność testów
- Identyfikacja molekularnych składników alergenu stanowiących rzeczywistą przyczynę uczulenia z uwzględnieniem istotnych klinicznie składników niedoreprezentowanych w konwencjonalnych ekstraktach; różnicowanie uczulenia mono- i poliwalentnego
- Identyfikacja cząsteczek odpowiedzialnych za reaktywność krzyżową sIgE i określenie jej konsekwencji klinicznych (np. OAS)
- Identyfikacja sIgE pozostających bez wpływu na patomechanizm uczulenia (IgE anti-CCD), a zawyżających wyniki testów in vitro
- Prognozowanie charakteru i nasilenia objawów klinicznych alergii: anafilaksja, reakcja miejscowa/uogólniona; wskazanie zależności od obróbki cieplnej źródła alergenu i procesu trawienia (neodeterminanty antygenowe)
- Prognozowanie marszu alergologicznego - zmian manifestacji narządowej alergii i sukcesji uczulających alergenów
- Określanie zasadności swoistej immunoterapii alergii (SIT)
- Weryfikacja i uściślenie interpretacji testów skórnych



NOWY ALGORYTM DIAGNOSTYKI ALERGII OPARTY NA PROFILACH sIgE UZYSKANYCH W MULTIPLEKSWYCH TESTACH UWZGLĘDNIAJĄCYCH ALERGENY MOLEKULARNE

Rewolucyjny zwrot w diagnostyce alergii in vitro nastąpił w wyniku miniaturyzacji systemów pomiaru sIgE pozwalającej na jednoczesną identyfikację kilkuset alergenowoswoistych IgE, w efekcie, na uzyskanie w jednym podejściu nieosiągalnego dotychczas wglądu w repertuar sIgE u badanego. W teście o formacie multipleksu (ang. multiplex) reaktywność sIgE określana jest w stosunku do paneli alergenów molekularnych i ekstraktów alergenowych pochodzących z kilkudziesięciu źródeł.

Możliwości stworzone przez zminiaturyzowane multipleksy pozwoliły na wprowadzenie nowego paradygmatu diagnostyki alergii. Algorytm dotychczasowy: **Top-down (Z góry na dół)** ukierunkowywał dobór testowanych in vivo i in vitro alergenów w oparciu o wywiad kliniczny. Ilość alergenów wskazywanych jako potencjalna przyczyna alergii była redukowana w kolejnych etapach diagnostyki. Zgodnie z filozofią nowego algorytmu: **Bottom-up (Z dołu do góry)** analiza historii i obrazu klinicznego choroby prowadzona jest w oparciu o profil sIgE określony na wstępie procedury diagnostycznej w teście multipleksowym uwzględniającym kilkaset alergenów, w istotnym odsetku molekularnych. Lekarz dysponuje gruntowną wiedzą o profilu uczulenia, możliwych reakcjach krzyżowych, nasileniu i charakterze potencjalnych objawów; prawdopodobieństwie marszu alergicznego itd.

LABORATORYJNA DIAGNOSTYKA ALERGII W OFERCIE DIAGNOSTYKI

W zakresie laboratoryjnej diagnostyki alergii opartej na pomiarach sIgE in vitro Diagnostyka oferuje testy dla pojedynczych alergenów - monopleksy (ang. monoplex, singleplex) i dla zestawów alergenów - multipleksy (ang. multiplex) liczących od 5 do ponad 280 elementów (najczęściej 5, 10 lub 20). Multipleksy krótkie są typowymi immunoblotami (dot-blotami); multipleksy długie mają format mikromacierzy lub nanomacierzy. Zestaw testowy ma postać chipu. Systemy zminiaturyzowane oferują pełne zestawy alergenów istotnych diagnostycznie, natomiast skład multipleksów krótszych dobierany jest zgodnie z założonym kryterium: drogą wnikania – alergeny wziewne-oddechowe (m.in. wytwory skóry zwierząt; pyłki roślin) lub pokarmowe; kategorią (np. pyłki roślin, jady owadów, antybiotyki); wiekiem (panel pediatryczny) lub częstością wywoływania alergii (mieszany panel atopowy). Bez względu na rodzaj (monopleks/multipleks) i format, w oferowanych testach stosowane są alergeny diagnostyczne w postaci klasycznego ekstraktu pojedynczego źródła (np. pyłku tymotki), multialergenowego miks ekstraktów (np. pyłku kilku traw) lub alergenów molekularnych (np. Phl p 1 i Phl p 5 tymotki, Bet v 1 pyłku brzozy). Dodatkowym elementem w multipleksach ekstraktów alergenowych bywają CCD odpowiedzialne za nieswoiste zawiązanie pomiarów sIgE in vitro.

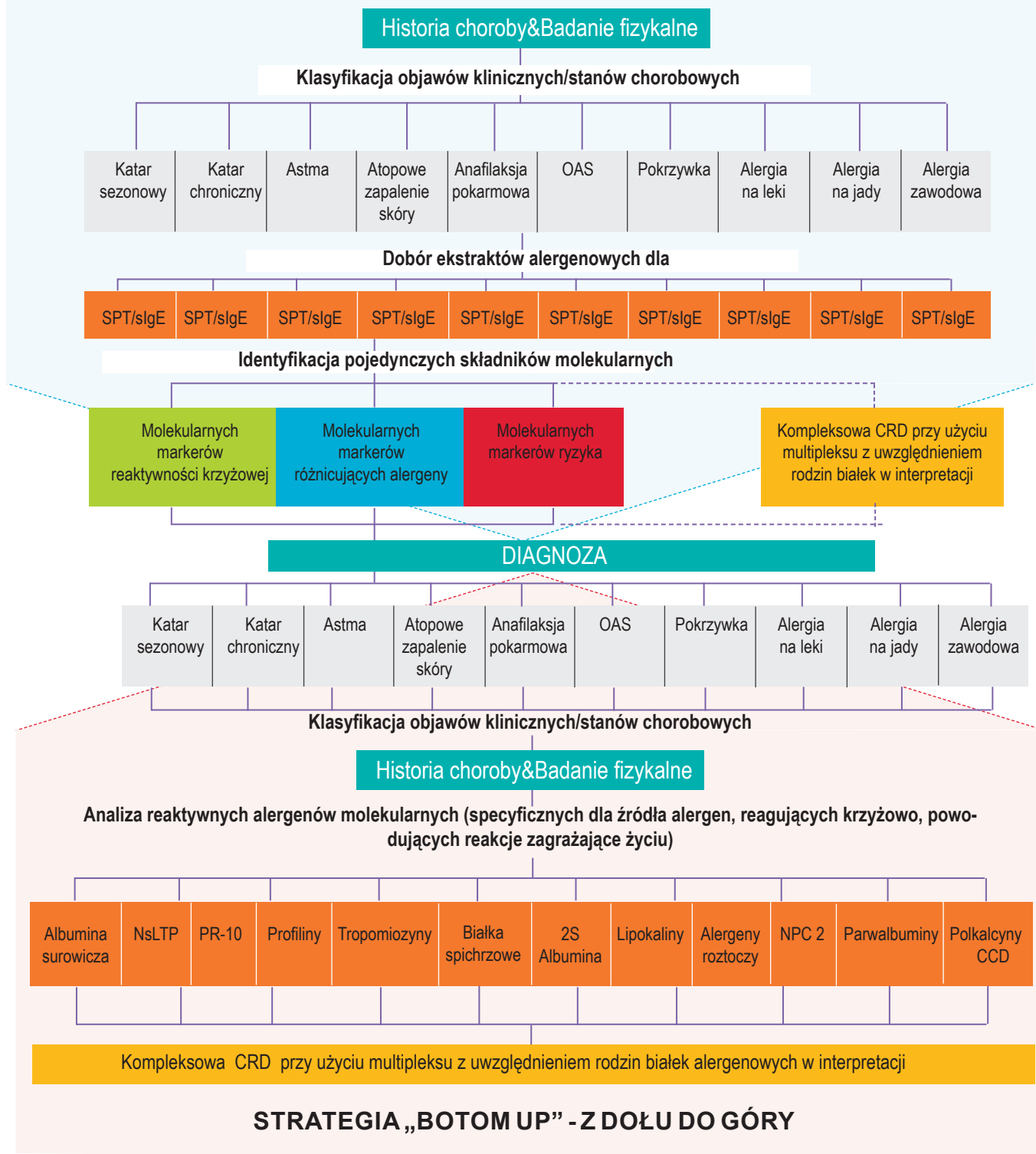
Dla klasycznego algorytmu diagnostycznego, Top down, Diagnostyka oferuje przesiewowe testy multipleksowe w formie blotów, zawierające 5 do 30 alergenów w postaci ekstraktów; kilkuelementowe bloty zawierające wyjściowe ekstrakty alergenowe i alergeny molekularne (np. mleka, pyłku roślin itd.) oraz oznaczenia pojedynczych sIgE dla ponad stu alergenów w formie ekstraktów i alergenów molekularnych.

Dla nowatorskiego algorytmu diagnostycznego, Bottom up, Diagnostyka proponuje obecnie dwa testy multipleksowe: Alex w formie nanomacierzy, uwzględniający 296 elementów (117 pełnych ekstraktów alergenowych i 178 składników molekularnych) oraz ImmunoCAP® ISAC, uwzględniający 112 składników molekularnych z 51 źródeł alergenowych. W komentarzach obu testów alergeny molekularne przypisywane są do rodzin białek o znanych właściwościach biochemicznych, fizycznych, określonej immunogenności i reaktywności krzyżowej.

Listę badań wraz z zestawami alergenów w przypadku paneli podano na stronie www.diagnostyka.pl, w folderze **Badania laboratoryjne w alergologii: www.diag.pl/lekarz/materialy-do-pobrania/**

Opisy badań znajdują się na stronie www.diagnostyka.pl w zakładce **Katalog badań**

STRATEGIA TOP-DOWN – Z GÓRY NA DÓŁ



Wybrane piśmiennictwo:

- Balińska-Miśkiewicz W.: Diagnostyka molekularna alergii pokarmowej - czy wiemy więcej? *Postępy Hig Med Dosw (online)*, 2014, 68: 754-767.
- Nowakowska-Swirta E, Wiszniewska M, Walusiak-Skorupa J: Zastosowanie alergenów rekombinowanych w diagnostyce zawodowej alergii na lateks. *Medycyna Pracy*, 2015;66: 85-97.
- Siwak E i wsp.: Alergeny roztoczy. *Postępy Hig Med Dosw (online)*, 2014, 68: 369-374.
- Sekerkoca A, Polackova M, Stritz I: Detection of Phl p1, Phl p 5, Phl p 7 and Phl p 12 specific IgE antibodies in the sera of children and adult patients allergic to Phleum pollen. *Allergology International*, 2012, 61: 339-346.
- Goswami K i wsp.: Qualitative Assessment of Allergen Skin Test and In vitro Allergen Specific Immunoglobulin E (IgE) Measurement as a Method of Detection of Allergic Symptoms. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 2016. 5(12): 614-619
- Matricardi P, Kleine-Tebbe J. i wsp.: Allergology from extract to molecules: Integrating tradition with innovation, *MOLECULAR ALLERGOLOGY USER'S GUIDE*, EAACI 2016.

Kontakt z Działem Obsługi Klienta DIAGNOSTYKI: