

## Diagnostyka chorób alergicznych

JERZY KRUSZEWSKI

Klinika Chorób Infekcyjnych i Alergologicznych IMW CSK WAM w Warszawie

Od kilku lat w alergologii można zaobserwować narastającą tendencję przewagi badań dotyczących leczenia nad badaniami dotyczącymi diagnostyki. Taki trend występuje też w innych dziedzinach medycyny. Zasadniczą przyczyną wydaje się komercjalizacja medycyny. Z ekonomicznego punktu widzenia bardziej opłacalne jest przeznaczanie nakładów przede wszystkim na profilaktykę i leczenie. W alergologii wynika to też z braku istotnych dokonań w zakresie diagnostyki, które można by określić mianem postępu. Ostatnim ważnym osiągnięciem było opracowanie i wdrożenie metod oznaczania alergenowo swoistych IgE w surowicy, co miało miejsce na początku lat 70. XX wieku. Każdy z późniejszych sygnałów, o których spekulowano, że są zapowiedzią „rewolucji” w diagnostyce alergologicznej, okazywał się mało znaczącym epizodem.

### Innowacje w diagnostyce alergologicznej *in vivo*

Od lat prace w zakresie diagnostyki chorób alergicznych koncentrują się na doskonaleniu obecnie stosowanych metod pod kątem poprawy ich sprawności diagnostycznej i mają bardziej charakter innowacji niż postępu. Kilka ciekawych prac tego rodzaju przedstawiono na warszawskim kongresie EAACI 2009 i moim zdaniem warto szerzej je omówić.

Praca badaczy meksykańskich zwróciła uwagę na ciekawy problem nierównoważności mocy wyciągów *Dermatophagoides pteronyssinus* stosowanych dla celów diagnostyki uczuleń na ten alergen w USA i Europie [1]. Wcześniejsze badania autorów przy użyciu techniki zahamowania RAST wykazały, że wyciągi europejskie cechowała moc na poziomie tylko 36-44% standardu amerykańskiego (standard FDA – 10000 AU/ml). W obecnym badaniu, przy użyciu techniki punktowych testów skórnych (PTS), autorzy porównali wyciągi 6 różnych wytwórców: 2 meksykańskich, 3 europejskich i 1 ze Stanów Zjednoczonych, potraktowanego jako standard (standard FDA – 10000 AU/ml). Wykazano, że w porównaniu z wyciągiem amerykańskim, moc wyciągów europejskich i meksykańskich różniła się istotnie i zawierała się w przedziale odpowiednio: 5400-6126 AU/ml i 2099-7444 AU/ml, co oznacza, że w Stanach Zjednoczonych stosowane są wyciągi *Dermatophagoides pteronyssinus* o zdecydowanie większej mocy, a zatem umożliwiające wykrywanie słabszych uczuleń. Zdaniem autorów może to mieć znaczenie

dla kwalifikacji oraz porównywania efektu immunoterapii wyciągami *Dermatophagoides pteronyssinus* między Stanami Zjednoczonymi a Meksykiem i Europą. Trzeba podkreślić, że takie różnice, zwłaszcza między Europą a Stanami Zjednoczonymi, mogą być usprawiedliwione, bowiem wyciągi te mogą spełniać kryteria wyciągów optymalnych dla odpowiednich regionów, tzn. posiadających moc pozwalającą na właściwą klasyfikację chorych na uczulonych i nieuczulonych. Warto jednak zwrócić uwagę, że, choć niższa o blisko połowę od amerykańskich, moc 3 wyciągów europejskich nie różniła się między sobą tak bardzo jak moc wyciągów meksykańskich.

Podobny problem dotyczący równoważności wyciągów do PTS z alergenem psa, ale już tylko w regionie Europy, podejmowała praca badaczy austriackich [2]. Wyciągi 6 europejskich wytwórców różniły się aż 20-krotnie pod względem całkowitego stężenia białka. Posługując się techniką SDS-PAGE stwierdzono aż 15-krotnie różnice mocy w zakresie alergenów Can f 1 i Can f 2, przy czym w wyciągu jednego z wytwórców nie wykryto żadnej aktywności w zakresie tych alergenów. Również w zakresie alergenu Can f 3 (albumina psa) obserwowano istotne różnice i, co ciekawe, w wyciągu jednego z wytwórców wykryto albuminę ludzką. Niewątpliwie wnioski z pracy sygnalizują niewielką wiarygodność komercyjnych wyciągów europejskich wytwórców w diagnostyce alergii na alergeny psa, co w praktyce może być przyczyną istotnych problemów diagnostycznych. Praca dowodzi też, że ciągle istnieją problemy ze standaryzacją niektórych wyciągów alergenowych.

### Nowe alergeny i determinanty alergenowe

W kilku prezentowanych doniesieniach opisano nowe alergeny lub nowe ich determinanty, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce. W innych oceniano wiarygodność diagnostyczną stosowanych metod w zależności od jakości użytych materiałów, swoistości wykorzystywanych alergenów, możliwych reakcji krzyżowych oraz składu i mocy wyciągów do testowania. Dotyczyło to też ocen jakości alergenów i technik stosowanych w metodach oznaczania alergenowo swoistych IgE.

Huynh i wsp. określili skład jednego z dostępnych na rynku ekstraktów jadu trzmieła (*Bombus terrestris*) oznaczonego jako I205 [3]. Stwierdzili, że najwięcej białek

wiązających się ze swoistymi IgE występowało we frakcjach o ciężarze od 10 do 100 kDa. Posługując się techniką IMMULITE® 2000 3gAllergy™, wykazali, że ponad 90% surowic pacjentów uczulonych na jad pszczoły reagowało również z ekstraktem jadu trzmieła. Badany ekstrakt praktycznie w jednakowym stopniu, ponad 90%, hamował swoiste reakcje z jadem pszczoły i jadem trzmieła. Moim zdaniem badania te potwierdziły słuszność dotychczasowych zaleceń o możliwości diagnozowania uczulenia na jad trzmieła przy użyciu jadu pszczoły i odwrotnie.

Standardyzacji składu wyciągów do badania uczulenia na pyłek drzewa oliwnego poświęcona była praca badaczy hiszpańskich [4]. Autorzy oceniali 3 alergeny pyłków: Ole e 1, Ole e 2 i Ole e 9 otrzymywane z pyłków oliwki europejskiej (*Olea europaea*) przy użyciu filtracji w żelu oraz różnych metod chromatograficznych. Do oceny ich zawartości w wyciągach stosowano metodę ELISA i przeciwciała monoklonalne: 5A3 mAb dla Ole e 1, dwa rodzaje mAbs 5F2 i 3H8 dla Ole e 2 i 8D5 mAb dla Ole e 9. W 16 różnych wyciągach aktywność Ole e 1 wahała się w zakresie 20-66%, Ole e 2 – 0,015-3,71%, a Ole e 9 – 0,43-337%. Metoda okazała się przydatna w ocenie jakości wyciągów, w których zawartość poszczególnych alergenów różniła się znacznie, a zawartość alergenu Ole e 1 była 32 razy wyższa niż Ole e 9, i aż 450 razy wyższa niż Ole e 2. Choć w polskich warunkach alergeny te traktujemy jako egzotyczne, praca zwraca również uwagę na konieczność kontroli mocy wyciągów i lepszej ich standaryzacji.

Nadwrażliwość na orzechy włoskie nadal pozostaje dużym problemem w diagnostyce alergologicznej *in vivo* i *in vitro*, ponieważ u części chorych badania nie potwierdzają uczulenia. Podejrzewa się, że jedną z przyczyn może być jakość testowanych wyciągów, które mogą nie zawierać lub tracić (w trakcie obróbki) aktywność w zakresie niektórych alergenów. W jednym z badań sprawdzono, czy przyczyną takiej sytuacji może być brak oleozyny, jednego z białek ostatnio zidentyfikowanego jako alergen orzechów i ziaren [5]. Podjęto próbę wyizolowania naturalnej oleozyny orzecha włoskiego, wytworzenia jej rekombinantu oraz oceny alergogenności, a także zdolności do reakcji ze swoistymi IgE obu form pod kątem wykorzystania diagnostycznego. Białko naturalne uzyskiwano przy użyciu metody spektrometrii masowej, a rekombinant dzięki izolacji odpowiedniego cDNA. Ich zdolności do wiązania się ze swoistymi IgE oceniono na podstawie reakcji z 37 surowicami chorych reagujących na orzechy włoskie, u których PTS były ujemne. Okazało się, że najważniejszym z uzyskiwanych białek oleozynowych było białko o masie ok. 12 kDa, z którym reagowało aż 30 z 37 testowanych surowic. Inne z wyizolowanych białek, o masie odpowiednio 3, 20 i 62 kDa, miały mniejsze znaczenie. Badania wykazały zatem, że oleozynę należy uznać za jeden z głównych alergenów orzecha włoskiego, gdyż reagowało z nią ponad 50% testowanych surowic. Jej brak w stosowanych obecnie wyciągach może być ważną przyczyną fałszywie negatywnych wyników PTS.

Badacze hiszpańscy podjęli bardzo ciekawe badania z zakresu alergii na leki, mianowicie – badania nad opracowaniem stabilnych roztworów mniejszych determinant

amoksycyliny (kwasu amoksylicowego i diketopiperazy) do testów skórnych [6]. Opracowano ww. roztwory i scharakteryzowano ich skład przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Przy użyciu PTS oraz badania RAST i testu aktywacji bazofilów stwierdzono jednak, że testowanie ww. roztworami nie poprawia istotnie możliwości diagnostyki u chorych z nadwrażliwością na aminopenicyliny i benzylopenicyliny w porównaniu do dotychczas stosowanych reagentów.

Badacze chińscy przedstawili analizę zależności wielkości wyniku PTS z wynikiem badania alergenowo swoistych IgE dla roztoczy kurzu domowego (Der p i Der f) w grupie 226 mieszkańców Pekinu chorych na alergiczny nieżyt nosa [7]. Stwierdzili wprost proporcjonalną zależność wielkości odczynu w PTS od wartości stężeń alergenowo swoistych IgE w surowicy. Dla średnic bąbli 0-3, 3-4, 4-5 i  $\geq 5$  mm zgodność z wynikiem alergenowo swoistych IgE wynosiła odpowiednio 53,8%, 72,4%, 77,4%, i 100%. Autorzy słusznie uważają, że wynik PTS pozwala wiarygodnie przewidywać wynik badania alergenowo swoistych IgE w przypadku uczulenia na roztocza kurzu domowego.

Kończąc przegląd metod diagnostycznych *in vivo*, warto zauważyć ciekawą pracę polskich autorów dotyczącą bezpieczeństwa wykonywania swoistej prowokacji donosowej [8]. Znając dane o współwystępowaniu alergicznego nieżytku nosa i astmy, można było przypuszczać, że skuteczna swoista prowokacja donosowa może mieć niekorzystny wpływ na dolne drogi oddechowe. Okazało się jednak, że u chorych na całoroczny alergiczny nieżyt nosa bez astmy, taka prowokacja, mimo pozytywnego wyniku w zakresie nosa, nie wpływała istotnie w czasie do 2 godzin na parametry spirometryczne takie jak: FEV1%VC, FEV1, PEF i MEF25-75. Można zatem uznać, że wykonywanie swoistej prowokacji donosowej u chorych bez astmy jest bezpieczne.

## Doskonalenie metod oznaczania IgE

Kilkanaście prac poświęconych było doskonaleniu metod oznaczania alergenowo swoistych IgE w surowicy. Udoskonalanie ma już swoją historię. Jedną z ważniejszych modyfikacji było zastąpienie w latach 80. XX wieku izotopowego znacznika przeciwciał znacznikiem enzymatycznym. Stworzyło to możliwości wykonywania badania w każdych warunkach, a zatem przyczyniło się do jego upowszechnienia. Obecnie modyfikacje polegają na próbach wykorzystania wyników badań nad coraz lepszym poznaniem nowych, istotnych determinant poszczególnych alergenów. Metody te osiągnęły już bardzo wysoką sprawność diagnostyczną, znaczny stopień zautomatyzowania i miniaturyzacji oraz możliwość jednoczesowego badania przeciwciał dla wielu alergenów. Niżej omówiono kilka z nowszych metod oznaczania swoistych IgE, które oceniano głównie pod kątem przydatności w alergii pokarmowej, jak również inne badania *in vitro*, które ocenia się pod kątem zastosowania w praktyce.

Mahler i wsp. przedstawili możliwości diagnozowania przy użyciu jednej z najnowszych metod wykrywania alergenowo swoistych IgE w surowicy – metody ALFA (*Allergy Lateral Flow Assay*) [9]. Pozwalała ona na szybką ocenę

IgE swoistych dla alergenów wziewnych, a celem obecnej prezentowanej pracy była ocena jej przydatności dla wykrywania IgE swoistych dla alergenów pokarmowych. W porównaniu do innej metody – ALLERG-O-LIQ System – czułość i swoistość metody ALFA dla 10 alergenów pokarmowych badanych w 41 surowicach wynosiła odpowiednio 85,7% oraz 100%, co wydaje się potwierdzać jej wysoką praktyczną użyteczność również w zakresie tej grupy alergenów.

Inną ciekawą metodą badania alergenowo swoistych IgE jest metoda ImmunoCAP® ISAC firmy VBC Genomics/Phadia, wykorzystująca mikrotechnikę CRD (*Component-Resolved Diagnosis*) opartą na wykorzystaniu oczyszczonych lub rekombinowanych alergenów. W jednym z badań porównano wyniki oceny tą metodą 103 oczyszczonych lub rekombinowanych alergenów w 22 surowicach uzyskanych od 16 pacjentów z wynikami metody ImmunoCAP® 250 Phadia i wynikami PTS [10]. Badania potwierdziły wysoką zgodność wyników, zwłaszcza obu metod badania alergenowo swoistych IgE. Dla 136 różnych alergenowo swoistych IgE wykrytych metodą ImmunoCAP® 250 Phadia zgodność dotyczyła 132 alergenów. W zasadzie wyniki metody ImmunoCAP® ISAC pozwoliły postawić identyczne rozpoznanie, jakie ustalono na podstawie wyniku PTS u wszystkich 16 chorych, choć u 1 chorego wynik w zakresie orzecha ziemnego i laskowego nie był zgodny.

Chuang i wsp. ocenili możliwość wykrywania w surowicy IgE swoistych dla roztoczy kurzu domowego przy użyciu peptydów charakterystycznych dla głównych alergenów roztoczy Der p 1 i Der f 1 oraz Der p 2 i Der f 2 [11]. Peptydy te wykorzystuje metoda IMMULITE® 2000 3gAllergy™, a uzyskane wyniki wykazały wysoką zgodność oznaczeń z wynikami PTS. W odniesieniu do poszczególnych peptydów zgodność ta występowała na poziomie 88-92% i nie różniła się istotnie w odniesieniu do oznaczeń z użyciem dotychczas stosowanych całościowych komponentów alergenowych roztoczy kurzu domowego.

Badacze japońscy podjęli próbę wyjaśnienia przyczyn trudności i poprawy możliwości diagnostycznych w przypadku nietolerancji pszenicy [12]. Wykazali, że wzbogacenie klasycznej diagnostyki oznaczania swoistych dla pszenicy przeciwciał w klasie IgE o oznaczanie swoistych IgE dla białka, omega-5-gliadyny, istotnie poprawia możliwości wykrycia uczulenia. Białko to może być u części chorych istotnym alergenem uczulającym.

Wiadomo, że jedną z przyczyn fałszywie dodatnich (zawyżonych) wyników oznaczeń alergenowo swoistych IgE, zwłaszcza dla alergenów pyłków roślin i jądów owadów, jest obecność w surowicy (u części chorych) przeciwciał klasy IgE dla łańcuchów węglowych obecnych w glikoproteinach (CCD – *Cross-Reactive Carbohydrate Determinants*). Fizjologiczne i kliniczne znaczenie tych przeciwciał nie zostało dotychczas wyjaśnione. Autorzy jednego z doniesień podjęli próbę wyeliminowania tego zjawiska poprzez preinkubację badanej surowicy z reagentem opracowanym na bazie inaktywowanej bromelainy i końskiej peroksydazy [13]. Porównując wyniki oznaczeń w surowicach dla 7 alergenów (orzech ziemny, białko jaja, mleko, dorsz, kot, pies i roztocza kurzu domowego) oraz

6 glikolizowanych alergenów rekombinowanych (rBet v 1, rBet v 2, rPhl p 1, rPhl p 7, rPhl p 12, rFel d 1), przed i po inkubacji z reagentem, autorzy stwierdzili, że takie postępowanie jest godne polecenia. Zastosowany reagent okazał się stosunkowo stabilny i w temp. 4°C zachowywał aktywność co najmniej przez 1 miesiąc, a szacunkowy wzrost kosztów wprowadzenia takiej modyfikacji autorzy ocenili na poniżej 0,1 € na 1 oznaczenie.

Borer-Reinhold i wsp. podkreślili, że proponowane normy dla poziomu tryptazy w surowicy – do 11,4 ng/ml – mają ograniczone znaczenie diagnostyczne, a wyniki oznaczeń nie zawsze potwierdzają ewidentnie anafilaktyczną przyczynę ostrej systemowej reakcji alergicznej lub pseudoalergicznego [14]. Autorzy na podstawie własnej analizy u 31 chorych zaproponowali odnośnienie aktualnego wyniku do indywidualnej wartości bazowej, np. z oznaczenia po upływie 5 godzin od zdarzenia. Tylko u 40% chorych w ostrej fazie reakcji stwierdzano poziomy tryptazy powyżej przyjętej normy – 11,4 ng/ml, natomiast u 68% wzrost przekraczał 150% wartości oznaczenia po upływie 5 godzin. Choć wnioski są ciekawe, warto zauważyć, że wiarygodne oznaczanie poziomu tryptazy wymaga spełnienia wielu warunków, jest dość trudne i drogie, a możliwość szybkiego uzyskania wyniku w Polsce jest ograniczona i badanie to rzadko jest wykorzystywane w praktycznej diagnostyce.

### Inne nowości warte podkreślenia

Z innych doniesień warto też wspomnieć propagowany w Polsce Test Kontroli Astmy – użyteczny i uznany wskaźnik aktualnego nasilenia astmy – coraz częściej jest wykorzystywany jako narzędzie oceniające wartość innych, w tym laboratoryjnych, wskaźników proponowanych do monitorowania tej choroby. Badania autorów czeskich w tym zakresie dotyczyły 138 chorych na astmę w wieku 11-70 lat, u których wartości Testu Kontroli Astmy zawierały się w przedziale 7-25 pkt. (średnio 20,2 pkt.) [15]. Stwierdzono, że spośród porównywanych testów: stężenia NO w wydychanym powietrzu, wartości FEV1 i MEF25-75, testu odwracalności obturacji, stężenia ECP i IgE w surowicy, istotna negatywna korelacja wyniku Testu Kontroli Astmy dotyczyła stężenia tlenu azotu (NO) w wydychanym powietrzu z pozytywną wartością FEV1 i MEF25-75. Aktualny wynik stężenia NO w wydychanym powietrzu, pozwalający wiarygodnie ocenić stan kliniczny ok. 75% chorych na astmę, wskazuje na zależność nasilenia objawów astmy od nasilenia stanu zapalnego dróg oddechowych, cechującego astmę. Niestety, mimo coraz większej dostępności metody, nadal nie ma zgodności, co do zasad praktycznego wykorzystywania oznaczania stężenia NO w wydychanym powietrzu.

Natomiast badacze z Turcji stwierdzili, że w ataku astmy, w odróżnieniu do wydychanego powietrza, średni poziom NO w surowicy i moczu jest wysoce statystycznie niższy w porównaniu z okresem stabilnym astmy [16]. Autorzy zastanawiali się nad przyczynami tej sytuacji oraz możliwością jej wykorzystania w diagnostyce.

**Omówione streszczenia zjazdowe**

(Allergy, Supplement 90. 2009; Vol. 64):

1. Larenas-Linnemann D i wsp. The biologic potency by skin prick testing (SPT) of a US diagnostic allergen extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* is twofold higher compared to European and Mexican extracts. (Abstract 16, p. 8)
2. Curin M i wsp. Skin prick test extracts for dog allergy diagnosis show considerable variations regarding the content of major and minor dog allergens. (Abstract 683, p. 273)
3. Huynh K i wsp. Evaluation of bumblebee venom for the diagnosis of hymenoptera venom allergy. (Abstract 15, p. 7-8)
4. Arilla M i wsp. Characterisation of *Olea europaea* pollen extracts for clinical use. (Abstract 682, p. 272)
5. Santos A i wsp. Oleosin, the missing link in the diagnosis of allergy to walnut. (Abstract 56, p. 27)
6. Ariza A i wsp. Minor determinants of amoxicillin in the evaluation of immediate allergic reactions to amoxicillin. (Abstract 51, p. 24-25)
7. Wang X i wsp. The association between skin prick test and serum specific IgE of dust mites in Chinese with allergic rhinitis. (Abstract 284, p. 127)
8. Krzych-Falta E i wsp. Effect of nasal allergen challenge tests on the functional status of the lower airways. (Abstract 13, p. 7)
9. Mahler M i wsp. Evaluation of an allergy lateral flow assay for the detection of specific IgE to food allergens. (Abstract 65, p. 31)
10. Gadisseur R i wsp. A new diagnostic tool for in vitro allergy. (Abstract 63, p. 30-31)
11. Chuang T i wsp. Clinical comparisons of major house dust mite (HDM) allergens in a specific IgE assay. (Abstract 281, p. 126)
12. Ebisawa M i wsp. Omega-5-gliadin allergen-specific IgE antibodies in the diagnosis of wheat allergy. (Abstract 17, p. 8)
13. Giroux F i wsp. Validation of a simple method to overcome the interference of cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) in specific IgE assays. (Abstract 18, p. 8-9)
14. Borer-Reinhold M i wsp. A definite increase of serum tryptase within normal limits indicates a systemic allergic reaction. (Abstract 14, p. 7)
15. Krcmova I i wsp. Asthma control test, FeNO, functional parameters, ECP and their correlation. (Abstract 770, p. 301-302)
16. Kucukosmanoglu E i wsp. Total nitrite levels in plasma and urine in children with acute asthma attacks. (Abstract 767, p. 301)