

OPRACOWAŁ: MICHAŁ PODKALICKI

# Przyczyny rozbieżności między wynikami testów *in vivo* a *in vitro* W DIAGNOSTYCE ALERGII IGE-ZALEŻNEJ

PRZEPROWADZONE NA SZEROKĄ SKALĘ POLSKIE BADANIA EPIDEMIOLOGICZNE W RAMACH PROJEKTU ECAP WYKAZAŁY, ŻE POLSKA NALEŻY DO JEDNYCH Z NAJBARDZIEJ ZALERGIZOWANYCH SPOŁECZEŃSTW ŚWIATA.

Około 40% respondentów zadeklarowało występowanie u nich cechy alergii, a u ponad 40% badanych wykazano dodatnie wyniki testów skórnych na powszechnie występujące alergeny<sup>[2]</sup>. Nic więc dziwnego, że choroby alergiczne określane są często mianem „epidemii XXI wieku”.

## Biologia przeciwciał IgE

Przeciwciała IgE wykazują duże powinowactwo do receptorów Fc. Receptory Fc zlokalizowane są na komórkach układu odpornościowego. Z tego powodu zdecydowana większość IgE znajduje się na powierzchni mastocytów, makrofagów i bazofili głównie w obrębie błony śluzowej układu oddechowego, pokarmowego i skóry właściwej. Przeciwciała związane biorą udział w powstaniu reakcji natychmiastowej – typ I nadwrażliwości według Gella i Coombsa. W testach

skórnych objawia się ona rumieniem i obrzękiem po podaniu alergenu.

Wolne przeciwciała IgE krążące w surowicy, wykrywane w testach serologicznych, stanowią niewielki ułamek całkowitej puli dostępnych IgE. Różny jest również czas półtrwania związanych oraz krążących przeciwciał IgE<sup>[3,4]</sup>.

Różnice wynikające z biologii przeciwciał IgE sprawiają, że mogą występować pojedyncze przypadki niezgodności między testami skórnymi, a serologicznymi.

Czułość testów serologicznych w odniesieniu do testów skórnych, według różnych danych literaturowych, waha się w przedziale od 74 do 92,2%<sup>[5,6]</sup>. Należy jednak pamiętać, że swoiste IgE występują również u ok. 15% zdrowych osób bez objawów klinicznych<sup>[7,8]</sup>. Dlatego każdy wynik, niezależnie od zastosowanej metody, musi być oceniany razem z objawami klinicznymi pacjenta.

## Standaryzacja alergenów

Brak standaryzacji alergenów to kolejna możliwa przyczyna występowania rozbieżnych wyników. Producenci testów diagnostycznych pozyskują materiał do produkcji ekstraktów alergenów (bądź już gotowe ekstrakty) od różnych dostawców, co nie gwarantuje jednakowego składu poszczególnych komponentów alergenowych. Z tego powodu ten sam rodzaj alergenu, użyty w teście skórnym i teście serologicznym, może się od siebie znacząco różnić pod względem reaktywności, co sprawia, że standaryzacja staje się niemożliwa.

Ekstrakty alergenowe produkowane są zwykle z „surowego”, nieprzetworzonego materiału. Ważne jest, aby producenci testów dbali o wysoką jakość i możliwie dużą powtarzalność pomiędzy różnymi partiami. Dodatkowo w procesie kontroli jakości powinna być zawsze oceniana obecność najważniejszych komponentów alergenowych odpowiedzialnych za występowanie reakcji alergicznej.

TABELA 1. PODZIAŁ DOSTĘPNYCH METOD DIAGNOSTYKI ALERGII.

Diagnostyka <i>in vivo</i>	Diagnostyka <i>in vitro</i>	Testy aktywacji bazofili (BAT):
Testy skórne: • punktowe* • śródskórne* • płatkowe  Testy prowokacyjne: • dooskrzelowe • donosowe • doustne • dospojówkowe  Próby ekspozycyjne  Diety eliminacyjne	Serologiczne • całkowite IgE** • alergenowo-specyficzne IgE**  Eozynofile we krwi obwodowej i wydzielinach  Trypsyna w surowicy  Stężenie i aktywność inhibitora C1 esteraazy, składowych C1q, C2, C4 dopełniacza	Test uwalniania histaminy (HRT)  Test uwalniania tryptazy (TRT)  Test wytwarzania leukotrienów (CAST)  Ocena markerów aktywacji bazofili metodą cytometrii przepływową (ekspresja CD63 i/lub CD203c)  Ocena aktywacji eozynofili (stężenie ECP)  Ocena aktywacji limfocytów (ocena ekspresji CD69, CD3 metodą cytometrii przepływową)
*detekcja IgE związanych na powierzchni komórek	**detekcja wolnych (krążących) IgE	Diagnostyka <i>ex vivo</i>

W przeszłości podejmowane były próby standaryzacji alergenów, zarówno do celów diagnostycznych jak i terapeutycznych, jednak nie przyniosły one zadowalających rezultatów<sup>[9]</sup>. Pewną nadzieję wiąże się z europejskim projektem CREATE (*Development of certified reference material for allergenic products and validation of methods for their quantification*), którego głównym celem było stworzenie międzynarodowych standardów rekombinowanych alergenów opartych na cechach ich natywnych odpowiedników. Dzięki projektowi udało się zidentyfikować 3 rekombinowane alergeny (rBet v 1, rPhl p 5a, rDer p 2) o takich samych właściwościach jak naturalne wzorce oraz 5 alergenów o bardzo zbliżonych cechach (rPhl p 5 b, rOle e1, rDer p 1, rDer f 1, rDer f 2)<sup>[10]</sup>.

## Reagująca krzyżowo determinanta węglowodanowa (CCD)

Alergeny to w przeważającej części białka, spośród nich wiele to glikoproteiny. Obok najczęściej występujących epitopów białkowych spotykamy również epitopy cukrowe, rozpoznawane przez przeciwciała IgE. Reagujące krzyżowo determinanty węglowodanowe (CCD, Cross-reactive carbohydrate determinants) to motywy cząsteczki cukru przyłączonej do danego alergenu. Mają one zdolność do indukcji produkcji

TABELA 2. ZALETY I WADY TESTÓW SKÓRNYCH I SEROLOGICZNYCH.

Testy skórne	Testy serologiczne
<b>Zalety</b>	<b>Wady</b>
Szybkie w wykonaniu, relatywnie tanie	Droższe od testów skórnych
Wysoka czułość diagnostyczna	Niższa czułość
<b>Wady</b>	<b>Zalety</b>
Wymagają dużego doświadczenia personelu	Nie wymagają dużego doświadczenia personelu
Metoda manualna, z subiektywną oceną wyniku	Możliwość automatyzacji, obiektywna ocena wyniku
Nie mogą być wykonywane w miejscu aktywnego zapalenia skóry, dermatografizmu	Wynik testu nie zależy od chorób skóry, dermatografizmu
Czułość zależy od reaktywności skóry (niższa u osób starszych, dzieci)	Czułość testu nie jest zależna od reaktywności skóry
Wymagają odstawienia leków przeciwhistaminowych, trójpierścieniowych leków antydepresyjnych	Nie wymagają odstawienia leków przeciwhistaminowych, trójpierścieniowych leków antydepresyjnych
Mogą być przyczyną systemowej reakcji organizmu, wstrząsu anafilaktycznego	Brak ryzyka wystąpienia systemowej reakcji organizmu, wstrząsu anafilaktycznego
Nie powinny być wykonywane w czasie ciąży	Brak przeciwwskazań do badania u kobiet w ciąży
Dla każdego alergenu niezbędne wykonanie nakłucia na skórze	Możliwość badania swoistych IgE dla wielu alergenów z jednego pobrania próbki krwi - testy wieloparametrowe
Trudne do wykonania u małych dzieci	Badanie może być wykonane nawet u małych dzieci, u których z powodu braku współpracy wykonanie testów skórnych jest trudne

reklama

EUROIMMUN POLSKA Sp. z o.o.



## Profile 10-alergenowe – Testy paskowe

- **4 profile wziewne:** zwierzęta, drzewa, alergeny domowe, trawy i chwasty
- **4 profile pokarmowe:** nabiał i orzechy, mąka i mięso, owoce, warzywa
- **aż 80 unikatowych alergenów**
- **marker reakcji krzyżowych (CCD) w każdym profilu**
- **możliwość automatyzacji inkubacji i odczytu pasków**

➔ [www.euroimmun.pl](http://www.euroimmun.pl)



➤ przeciwciał IgE charakteryzujących się wysoką reaktywnością krzyżową.

Pomimo dużej różnorodności CCD (już 3 cząsteczki cukru pozwalają na stworzenie ok. 1000 różnych kombinacji (11, 12)), pewne wspólne motywy są obecne na glikoproteinach pochodzenia roślinnego (pyłki, warzywa, owoce, lateks) czy jądach owadów błonkoskrzydłych (osa, pszczoła, trzmiel).

Obecność przeciwciał anti-CCD w surowicy pacjenta może być przyczyną fałszywych wyników w testach serologicznych. U pacjentów nie uczulonych na dany alergen, obecność przeciwciał anti-CCD może prowadzić do powstania wyniku fałszywie pozytywnego, natomiast u pacjentów uczulonych na dany alergen, może być przyczyną zawyżenia wyniku swoistych IgE<sup>[13-15]</sup>.

Przeciwciała anti-CCD są obecne u około 20% osób cierpiących na alergię<sup>[16,17]</sup>. Główną przyczyną produkcji przeciwciał przeciwko CCD jest obecność reszt  $\alpha$  1,3-fukozy i  $\beta$  1,2-ksylozy w łańcuchu cukrowym N-glikanów<sup>[18]</sup>, które nie są obecne w sszanych glikozylowanych białkach<sup>[19-21]</sup>.

Przeciwciała anti-CCD nie mają znaczenia klinicznego<sup>[22]</sup>, głównie z powodu małego powinowactwa do receptorów Fc oraz monowaletnego charakteru struktur CCD. Większość glikoprotein zbudowana jest jedynie z jednego łańcucha węglowodanowego, co nie jest wystarczające do aktywacji receptorów błonowych, a tym samym uwolnienia



m.in. histaminy<sup>[11,12,16,23]</sup>. Z tego powodu przeciwciała IgE anti-CCD nie wpływają na wyniki w testach skórnych.

W niektórych testach serologicznych obecnych na rynku istnieje możliwość oceny przeciwciał anti-CCD obok swoistych IgE przeciwko ekstraktom alergenowym. Najczęściej wykorzystywanymi substratami do oceny przeciwciał anti-CCD są takie roślinne związki jak: bromelina, peroksydaza chrzanowa czy oksydaza askorbinowa, zapewniające doskonale źródło najczęściej spotykanych motywów CCD, a tym samym detekcję przeciwciał u pacjenta.

Dodatni wynik testu serologicznego z jednoczesnym występowaniem przeciwciał anti-CCD podpowiada lekarzowi, aby bardziej krytycznie niż zazwyczaj podszedł do oceny wyniku, w szczególności gdy: uzyskano dodatni wynik dla wielu alergenów pochodzenia roślinnego, alergii na lateks bez ekspozycji zawodowej, wyniku, który nie koreluje z obrazem klinicznym pacjenta czy np. podwójnego uczulenia na jad pszczoły i osy w testach serologicznych.

Przy diagnostyce alergii IgE-zależnej warto zwrócić uwagę na zalety i ograniczenia poszczególnych metod diagnostycznych. Natomiast przy ustalaniu diagnozy nie należy kierować się wyłącznie wynikami testów, ale przede wszystkim objawami klinicznymi pacjenta.

#### PIŚMIENNICTWO

- Pawankar R., Canonica GW, Holgate S.T., Lockey R.F., WAO White Book on Allergy, 2011.
- Samolinski B., Raciborski F., Epidemiology of allergic diseases in Poland - ECAP study, *Allergy*, 2008;63:626-7.
- Penichet M.L., Jensen-Jarolim E., Cancer and IgE Introducing the Concept of Allergo-Oncology, Chapter 2: Humana Press, 2010.
- Leffell M., Donnenberg A., Rose N., Handbook of Human Immunology 1 ed.: Boca Raton FL: CRC Press.
- Kelso J.M., Sodhi N., Gosselin V.A., Yunginger J.W., Diagnostic performance characteristics of the standard Phadebas RAST, modified RAST, and Pharmacia CAP system versus skin testing, *Ann Allergy*, 1991 Nov;67(5):511-4.
- Pastorello E.A., Incorvaia C., Ortolani C., Bonini S., Canonica G.W., Romagnani S. et al., Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: I. Definition of levels distinguishing patients with symptomatic from patients with asymptomatic allergy to common aeroallergens, *J Allergy Clin Immunol*, 1995 Nov;96(5 Pt 1):580-7.
- Lavins B.J., Dolen W.K., Nelson H.S., Weber R.W., Use of standardized and conventional allergen extracts in prick skin testing, *J Allergy Clin Immunol*, 1992 Mar;89(3):658-66.
- Hahtela T., Jaakonmaki I., Relationship of allergen-specific IgE antibodies, skin prick tests and allergic disorders in unselected adolescents, *Allergy*, 1981 May;36(4):251-6.
- Chong Neto H.J., Rosario N.A., Studying specific IgE: in vivo or in vitro, *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2009 Jan-Feb;37(1):31-5.
- Chapman M.D., Ferreira F., Villalba M., Cromwell O., Bryan D., Becker W.M. et al., The European Union CREATE project: a model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines, *J Allergy Clin Immunol*, 2008 Nov;122(5):882-9 e2.
- Malandain H., IgE-reactive carbohydrate epitopes--classification, cross-reactivity, and clinical impact, *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2005 Apr;37(4):122-8.
- Malandain H., IgE-reactive carbohydrate epitopes--classification, cross-reactivity, and clinical impact (2nd part), *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2005 Sep;37(7):247-56.
- Foetisch K., Westphal S., Lauer I., Retzek M., Altmann F., Kolarich D. et al., Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants, *J Allergy Clin Immunol*, 2003 Apr;111(4):889-96.
- Vieths S., Luttkopf D., Reindl J., Anliker M.D., Wuthrich B., Ballmer-Weber B.K., Allergens in celery and zucchini, *Allergy*, 2002;57 Suppl 72:100-5.
- Sten E., Stahl Skov P., Andersen S.B., Torp A.M., Olesen A., Bindslev-Jensen U. et al., Allergenic components of a novel food, Micronesian nut Nangai (*Canarium indicum*), shows IgE cross-reactivity in pollen allergic patients, *Allergy*, 2002 May;57(5):398-404.
- Mari A., IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity, *Int Arch Allergy Immunol*, 2002 Dec;129(4):286-95.
- van Ree R., Aalberse R.C., Demonstration of carbohydrate-specific immunoglobulin G4 antibodies in sera of patients receiving grass pollen immunotherapy, *Int Arch Allergy Immunol*, 1995 Feb;106(2):146-8.
- Iacovacci P., Afferni C., Butteroni C., Pironi L., Puggioni E.M., Orlandi A. et al., Comparison between the native glycosylated and the recombinant Cup a1 allergen: role of carbohydrates in the histamine release from basophils, *Clin Exp Allergy*, 2002 Nov;32(11):1620-7.
- Faye L., Gomord V., Fitchette-Laine A.C., Chrispeels M.J., Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing alpha 1-->3 fucose or beta 1-->2 xylose, *Anal Biochem*, 1993 Feb 15;209(1):104-8.
- Lauriere M., Lauriere C., Chrispeels M.J., Johnson K.D., Sturm A., Characterization of a xylose-specific antiserum that reacts with the complex asparagine-linked glycans of extracellular and vacuolar glycoproteins, *Plant Physiol*, 1989 Jul;90(3):1182-8.
- Ramirez-Soto D., Poretz R.D., The (1-->3)-linked alpha-L-fucosyl group of the N-glycans of the *Wistaria floribunda* lectins is recognized by a rabbit anti-serum, *Carbohydr Res*, 1991 Jun 25;213:27-36.
- van der Veen M.J., van Ree R., Aalberse R.C., Akkerdaas J., Koppelman S.J., Jansen H.M. et al., Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins, *J Allergy Clin Immunol*, 1997 Sep;100(3):327-34.
- Altmann F., The role of protein glycosylation in allergy, *Int Arch Allergy Immunol*, 2007;142(2):99-115.