

Opracowane pod patronatem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Alergologicznego przez Komisję ds. Standardów Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Alergologicznego.

Grupa robocza w składzie:

Józef Małolepszy, Wojciech Mędrala, Piotr Kuna, Marek L. Kowalski, Danuta Chmielewska

Standardy w alergologii

Część II. Oznaczanie całkowitego stężenia IgE i alergenowo-swoistych IgE w surowicy*

W 1967 r. opisano nową klasę przeciwciał, które posiadały takie same właściwości jak znane wcześniej tzw. przeciwciała reaginowe i nadano im nazwę IgE. To ważne odkrycie zapoczątkowało dynamiczny rozwój badań nad mechanizmami chorób alergicznych dzięki opracowaniu metod, pozwalających na precyzyjne określanie stężeń tych przeciwciał.

Patofizjologiczna rola IgE zależy od ich łączenia się z receptorami błonowymi określanymi jako FcεR1 oraz FcεR2 znajdującymi się na powierzchni komórek docelowych reakcji alergicznej. Ta pula IgE jest niedostępna do ilościowej oceny. Pula surowicza stanowi natomiast wygodny substrat do ilościowej ich oceny w testach *in vitro*. Opracowano testy ra-

dioimmunologiczne oraz wiele odmian testów ELISA, służących do ilościowej oceny stężeń całkowitej i alergenowo-swoistych IgE. W ostatnich latach opracowano też testy chemiluminescencyjne oraz nową odmianę testu RAST. Pomiedzy wieloma testami dostępnymi obecnie na rynku światowym istnieją różnice dotyczące wielu szczegółów natury technicznej. Tak zwaną fazą stałą, z którą związany jest alergen, mogą być: bibuła, polistyren, gąbka celulozowa, nitroceluloza lub ziarna sefadeksu. Istnieją też testy, w których łączenie się swoistych IgE z alergenem zachodzi w roztworze i dopiero kompleksy alergen-IgE ulegają związaniu ze ścianą naczynia (metoda AlaStat). Klasyfikacja testów służących do oceny IgE została przedstawiona w tabeli I.

Tabela I
Klasyfikacja testów do oceny stężeń IgE w surowicy

RODZAJ NOŚNIKA	RODZAJ DETEKCJI				
	Radioaktywność	Reakcja enzymatyczna	Reakcja enzymatyczna (fluorescencja)	Reakcja chemiluminescencyjna	Ocena wizualna
Faza płynna		ALA Stat			
Mikrocząstki	Mikroceluloza RAST				
Papier	Phadebas RAST	Phadezym RAST		Magit Lite	
Celuloza	CAP RIA		CAP FEIA		
Nitroceluloza		Abbot Matrix		Mast CLA	
Plastik					Visagnost

* Jest to przedruk opracowania zatwierzonego przez Zarząd Główny PTA, Dom Wydawniczy Benkowski 2003 (cz. I opublikowana w: Przegląd Alergiczny 2004; 1: 51-59).

1. Oznaczanie całkowitego stężenia IgE w surowicy

Większość metod oznaczania całkowitego stężenia IgE w surowicy jest wzorowana na najstarszych testach Phadebas RIST, Phadebas PRIST. W teście RIST z ziarnami sefadeksu są związane przeciwciała anty IgE. Po dodaniu surowicy pacjenta wystandaryzowanej ilości znakowanej jodem radioaktywnym IgE oraz po odwirowaniu, przeprowadza się pomiar radioaktywności próbki. W teście tym zachodzi konkurencja o ograniczoną liczbę miejsc wiążących na ziarnach sefadeksu. Jeżeli w surowicy pacjenta znajduje się dużo IgE, to również proporcjonalnie duża jej część przyłącza się do fazy stałej, skutkiem czego w odpowiednio proporcjonalnie mniejszej części przyłączeniu ulegnie IgE znakowane jodem radioaktywnym. Następnym tego jest obserwowana niska radioaktywność badanej próbki, odwrotnie proporcjonalna do stężenia IgE w badanej surowicy. Otrzymane wyniki odnosi się do krzywej standardowej, która jest wykonana przy użyciu surowic o znanych stężeniach IgE.

W teście PRIST zasada jest odmienna. Przeciwciała anty IgE związane jest z powierzchnią krążków bibułowych. Po dodaniu badanej surowicy, w następnym etapie dodaje się znakowane jodem radioaktywnym przeciwciała anty IgE, które wiąże się w ilości ściśle zależnej od ilości wcześniej zaadsorbowanego IgE. Następnie przeprowadza się pomiary radioaktywności, której wielkość jest wprost proporcjonalna do stężenia IgE w badanej próbce surowicy.

Począwszy od lat 70. do laboratoriów diagnostycznych stopniowo są wprowadzane różne testy bazujące na technice ELISA. Wprowadzenie tych testów znacznie ułatwiło i spopularyzowało oznaczanie IgE. W technice tej, zamiast stosowania radioaktywnych izotopów znakujących przeciwciała anty IgE, wykorzystuje się enzymy takie jak peroksydaza lub fosfataza alkaliczna. Technika ta jest wzorowana na testach PRIST. Na fazie stałej jest związane przeciwciała anty IgE i po dodaniu badanej surowicy oraz kolejno anty IgE znakowanego enzymem dodaje się substrat, który jest przekształcony do barwnego produktu. W następnym etapie bada różne wskaźniki reakcji barwnej, co koreluje z całkowitym stężeniem IgE w badanej próbce surowicy.

Całkowite stężenie IgE w surowicy wyraża się w jednostkach międzynarodowych (UI) w 1 ml. Jedna jednostka międzynarodowa odpowiada 2,4 ng przeciwciała.

W surowicy osób zdrowych stwierdza się niskie stężenia IgE – od 0,4 do 80 UI/ml. U większości dorosłych chorych na astmę atopową stwierdza się wyższe od podanej normy całkowite stężenie IgE. U dzieci chorych na atopową astmę oskrzelową podwyższone całkowite stężenia IgE występują zdecydowanie częściej, jednak stwierdzenie prawidłowego stężenia IgE nie wyklucza atopowego podłoża choroby. Z kolei stwierdzenie podwyższonych całkowitych stężeń IgE nie musi świadczyć o atopii, istnieje bowiem wiele niealergiczyńskich zespołów chorobowych, w których hiperimmunoglobulinemia E należy do obrazu chorobowego. Do schorzeń tych zalicza się: zespół WiskottAldricha, zespół hiperimmunoglobulinemii E, chorobę Hodgkina, szpiczak IgE, polekowe śródmiąższowe zapalenie nerek, zespół nerczycowy, pęcherzyce, marskość alkoholową wątroby, aspergillozę oskrzelowopłucną oraz zakażenia pasożytnicze, itp.

2. Oznaczanie alergenowo-swoistych IgE w surowicy

Atopowe tło schorzenia można potwierdzić *in vitro*, jeśli wykazana zostanie obecność swoistych IgE. Wielu producentów oferuje stopniowe identyfikowanie stanu alergizacji pacjenta i należy uznać, że jest to korzystne z ekonomicznego punktu widzenia. Badania przesiewowe w tym zakresie dotyczą możliwości wykrycia alergenowo-swoistych IgE przeciwko wybranym zestawom alergenów. Stwierdzenie negatywnego wyniku w badaniu przesiewowym zapobiega niepotrzebnemu mnożeniu badań na obecność swoistych IgE przeciwko konkretnemu alergenowi, który został uprzednio ujęty w badaniu przesiewowym. W sytuacji, gdy badanie przesiewowe daje wynik pozytywny, potwierdza to obecność swoistych IgE przeciwko jednemu lub kilku z grupy badanych alergenów, jednak nie daje to możliwości precyzyjnego ich określenia. Aby odpowiedzieć na to pytanie, należy oznaczyć swoiste IgE przeciwko wybranym pojedynczym alergenom występującym w zestawie.

W celu oznaczania alergenowo-swoistych IgE przeciwko pojedynczym wybranym alergenom posługujemy się metodą, w której z fazą stałą związany jest pojedynczy alergen, a zasady wykonania badania są identyczne jak opisane powyżej. Stężenia alergenowo-swoistych IgE wyrażone mogą być w klasach od 0 do 4 (w zależności od ustalonych arbitralnych stężeń), a w teście CAP FEIA od 0 do 5. Im wyższa klasa, tym wyższe stężenie alergenowo-swoistych IgE.

Oznaczanie swoistych IgE ma ogromne znaczenie w diagnostyce chorób alergicznych. Zwykle można stwierdzić związek pomiędzy typowymi objawami chorobowymi, pozytywnymi wynikami testów skórnych z określonym alergenem i obecnością swoistych dla tego alergenu IgE w surowicy. Należy jednak zauważyć, że istnieją pewne wyjątki od tej reguły. Żaden test dostępny na rynku nie cechuje się stuprocentową czułością. Na ogół czułość ta w przypadku alergenów zewnątrzpodochodnych sięga od 90 do 94%. Oznacza to, że tylko, lub aż u takiego odsetka pacjentów ewidentnie uczulonych na określony alergen (typowe objawy i dodatni wynik PTS) można wykazać w surowicy obecność alergenowo-swoistej IgE. Inną sytuacją może być obecność alergenowo-swoistej IgE i dodatniego wyniku PTS przy braku typowych objawów klinicznych, co może dotyczyć od 10 do 15% osób bez jakichkolwiek objawów klinicznych choroby atopowej. Osoby te zalicza się do grupy zwiększonego ryzyka rozwoju choroby atopowej. Jeszcze inną przyczyną braku typowych objawów klinicznych przy obecności alergenowo-swoistych IgE może być ograniczona swoistość tego badania wynikająca z braku pełnej selektywności przeciwciał. Znany jest bowiem fakt, że wielu pacjentów uczulonych na pyłki traw, u których „stwierdza się” swoiste dla alergenu pszenicy IgE, nie ma żadnych objawów chorobowych w czasie ekspozycji na ten alergen, co podkreśla konieczność ostrożnej i wnikliwej interpretacji wyniku wobec możliwości występowania wyników fałszywie dodatnich. Na podstawie wyżej wymienionych sytuacji można jeszcze raz potwierdzić tezę o potrzebie ustalania precyzyjnej diagnozy na podstawie wielu elementów diagnostycznych, z których żaden pojedynczo nie posiada stuprocentowej wartości diagnostycznej.

3. Znaczenie oznaczania alergenowo-swoistych IgE w diagnostyce chorób atopowych

Podstawowe znaczenie w diagnostyce chorób atopowych ma właściwie przeprowadzony wywiad chorobowy, w którym należy uwzględnić obecność typowych objawów, ich nasilenie, dynamikę dobową, sezonów, ustalić zbieżność pomiędzy nimi a ekspozycją na podejrzany alergen.

W przypadkach objawów chorobowych wywoływanych przez aeroalergeny, podstawowe znaczenie diagnostyczne mają PTS z wyciągami tych alergenów, bowiem cechuje je wyższa swoistość i czułość, względna łatwość wykonania, jak również niższe koszty w porównaniu do oznaczeń alergenowo-swoistych IgE. Oznaczenia IgE są uzasadnione u małych dzieci i to nie tylko z powodu trudności wykonywania, ale przede wszystkim ograniczonej wiarygodności PTS. W praktyce zatem stosunkowo rzadko pojawia się potrzeba wykonywania oznaczeń IgE. Należy podkreślić, że w przypadkach ewidentnie dodatnich testów skórnych poszukiwanie tzw. potwierdzenia za pomocą badania obecności alergenowo-swoistych IgE na te same alergeny jest postępowaniem nieuzasadnionym.

W przypadkach schorzeń alergicznych, spowodowanych alergenami pokarmowymi „złotym standardem” diagnostycznym jest wykonanie podwójnie ślepej doustnej próby prowokacyjnej kontrolowanej *placebo*. W przypadkach trudności z jej wykonaniem można ją zastąpić innymi próbami prowokacyjnymi, takimi jak próba otwarta lub pojedyncza ślepa próba prowokacyjna. Na podstawie tych prób można ocenić obiektywnie związek dolegliwości ze spożyciem badanych alergenów pokarmowych. Wobec tak zdefiniowanych układów odniesienia w alergii na pokarmy, badanie alergenowo-swoistych IgE cechuje się niską czułością, zwłaszcza dla pokarmów zwierzęcych i nieco wyższą dla roślinnych i w takich przypadkach rola oznaczeń alergenowo-swoistych IgE ma często charakter drugorzędny lub uzupełniający.

W alergii na jady owadów błonkoskrzydłych oznaczenie alergenowo-swoistych IgE ma duże znaczenie (metoda rutynowa), nawet w przypadkach dodatnich testów skórnych. Ma to znaczenie zwłaszcza w kwalifikacji chorych do immunoterapii swoistej jadami. Czułość tych oznaczeń jest wysoka i przekracza 80%.

Oznaczanie alergenowo-swoistych IgE w przypadkach uczuleń na leki rzadko znajduje zastosowanie. Oznaczanie alergenowo-swoistych IgE w przypadkach podejrzeń uczuleń na penicylinę uznano za metodę o zadowalającej czułości, lecz mniejszej od testów skórnych. Nieco mniejszą wartość ma oznaczanie swoistych IgE w przypadkach uczulenia na inne antybiotyki betalaktamowe, takie jak amoksylicyna i cefalosporyny. Jednakże należy podkreślić, że w takich przypadkach wartość diagnostyczna testów skórnych jest również dużo mniejsza niż dla penicyliny, a wykonanie rozstrzygającej próby prowokacyjnej z lekiem może być niebezpieczne. Stąd w przypadkach potrzeby określenia uczulenia na te leki, w przypadku ujemnych wyników testów skórnych należy dążyć do oznaczenia obecności swoistych IgE, bowiem stwierdzenie ich obecności może znacznie zwiększyć odsetek prawidłowych rozpoznań. W przypadkach uczulenia na lateks, określanie alergenowo-swoistych IgE ma również duże znaczenie, ponieważ cechuje się wysoką czułością przekraczającą 90%, choć w diagnostyce preferuje się PTS.

Wnioski

1. Badanie alergenowo-swoistych IgE w surowicy stanowi cenne uzupełnienie diagnostyki alergologicznej zwłaszcza w sytuacji, gdy wykonanie punktowych testów skórnych jest niemożliwe.
2. Wartość diagnostyczna tego badania jest podobna jak w przypadku punktowych testów skórnych.