

Šiuolaikinė molekulinė alergijos diagnostika

Sandra Sakalauskaitė¹, Edita Gasiūnienė^{1,2}, Brigita Šitkauskienė¹

¹Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Imunologijos laboratorija
Laboratory of Immunology, Lithuanian University of Health Sciences

²Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Imunologijos ir alergologijos klinika

Department of Immunology and Allergology, Lithuanian University of Health Sciences

El. paštas: sandra.sakalauskaite@lsmu.lt

Santrauka

Įvadas. Pasaulio alergijų organizacijos duomenimis, daugiau nei 20 % išsivysčiusių šalių gyventojų vargina alerginės ligos. Alergiškiems asmenims būdinga imunoglobulino E (IgE) antikūnų prieš nekenksmingus aplinkos alergenų gamyba. Įprastiniais metodais nustatant specifinius IgE (sIgE) naudojami alergenų ekstraktai. Jie susideda iš keleto komponentų, todėl nėra aišku, kokiam konkrečiam baltymui yra įsijautrinimas, neįmanoma atskirti kryžminių reakcijų, atsirandančių dėl to, kad alergenai turi bendrus IgE epitopus. Dėl šių priežasčių atsirado molekulinės alergijų diagnostikos poreikis. Ji pagrįsta pavienių alergenų komponentų identifikavimu, kurie yra tokių sudėtingų alergenų šaltinių, kaip žiedadulkės, namų dulkių erkės, kailiniai gyvūnai, maistas ir kt., sudėtyje. Mokslo ir technologijų pažanga atvėrė kelią molekulinės diagnostikos *in vitro*

tyrimų vystymuisi ir jie vis plačiau naudojami klinikiniuose rutininuose tyrimuose. Pastebėjus, kad gaunami skirtingi tyrimų rezultatai naudojant skirtingas alerginių ligų diagnostikos priemones įsijautrinimui nustatyti, atsirado poreikis palyginti atliekamų tyrimų rezultatus.

Tikslas – išryškinti tradicinės ir molekulinės alergijos diagnostikos skirtumus bei nuodugniai išanalizuoti molekulinės alergijos diagnostikos metodus ir jų panaudojimo ypatumus.

Išvados. Išanalizavus naujausius literatūros duomenis galima daryti išvadą, jog, atsiradus alerginei ligai būdingų simptomų ir nepavykus nustatyti alergeno tradiciniais odos dūrio mėginiais bei sIgE nustatymo kraujo serume metodais, vertėtų atlikti molekulinis alergijų diagnostikos tyrimus.

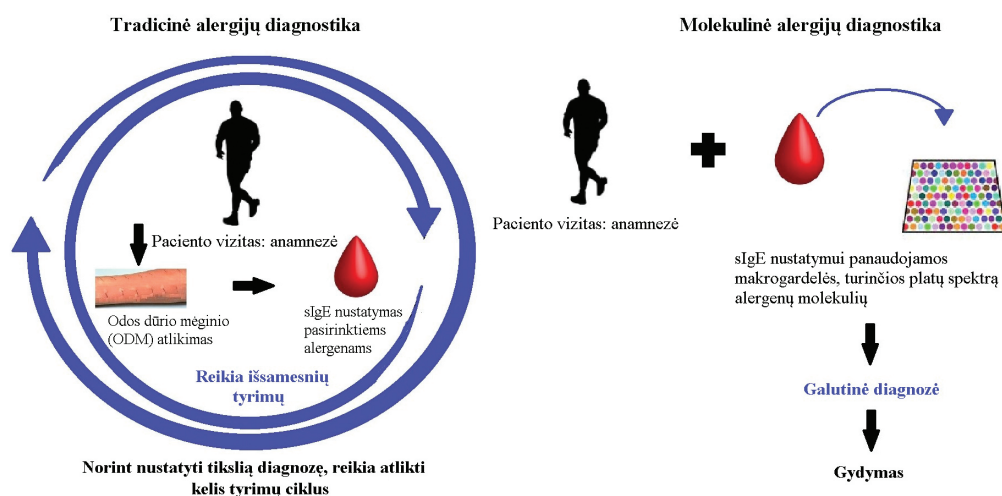
Reikšminiai žodžiai: imunologija, įsijautrinimas alergėms, imunoglobulinas E, molekulinė alergijos diagnostika.

ĮVADAS

Atliekant tradicinius tyrimus įsijautrinimui alergenams nustatyti – odos dūrio mėginius ir specifinių IgE (sIgE) tyrimą kraujo serume, dažniausiai naudojami alergenų ekstraktai, kurie yra įvairių alergenų molekulių mišiniai. Skirtingi gaminioje naudoja įvairias šių komponentų koncentracijas bei papildomas medžiagas, kurios turi įtakos ekstraktų kokybei. Taip pat gali būti, kad ekstraktuose gali trūkti kai kurių alergenų arba, priešingai, jie gali būti užsiteršę papildomais baltymais. Be to, atliekant sIgE kraujo serume tyrimą ne visuomet galima nustatyti kryžminių reakcijų tikimybę. Išvardyti trūkumai ir siekis gerinti medicinos kokybę paskatino molekulinės alergijų diagnostikos (MAD) vystymąsi [1, 2]. Šie metodai vis dažniau naudojami kasdieniams klinikiniams tyrimams. Jie leidžia atlikti gilesnę ligos analizę, papildančią tradicinius sIgE nustatymo būdus [3]. MAD yra pagrįsta atskirų alergenų molekulių, kurios yra tokių sudėtingų alergenų šaltinių kaip žiedadulkės, namų dulkių erkės, kailiniai gyvūnai, maistas ar vabzdžių nuodai sudedamosios dalys, identifikavimu. Nustačius įsijautrinimą atskiriems alergenų molekulių komponentams, galima atskirti tikrąjį įsijautrinimą nuo kryžminių reakcijų, kurios atsiranda dėl struktūrinių baltymų panašumų, nors jie ir priklauso

so skirtingoms šeimoms [2, 4, 5]. Be to, MAD leidžia greičiau atrinkti pacientus, tinkančius specifinei alergenų imunoterapijai, kuri yra brangus ir ilgai užtrunkantis procesas [5]. Tradiciškai diagnozuojant alergiją (žr. pateikto paveikslo kairę dalį) pirmiausia išanalizuojama alerginių simptomų anamnezė, kuri yra pagrindas renkantis ribotą skaičių alergenų ekstraktų, skirtų tiksliniams provokacijos bandymams, dažniausiai odos dūrio mėginiams atlikti. Paskui imamas kraujo serumo mėginys sIgE prieš įtariamus alergenų šaltinius nustatyti. Geriausiu atveju pacientas gauna pirmuosius gydymo pasiūlymus pagal odos dūrio mėginio rezultatus. Paprastai reikia bent vieno, bet dažnai kelių papildomų apsilankymų, kad gydymas būtų pritaikytas prie sIgE tyrimo rezultatų ir (ar) būtų atlikti tolesni tiksliniai tyrimai siekiant tiksliau nustatyti pacientų įsijautrinimo alergenams profilį ir toliau koreguoti gydymą. Naudojant makrogardeles (žr. pateikto paveikslo dešinę dalį), jau per pirmą vizitą būtų iš karto išanalizuojama anamnezė ir nustatomas visas molekulinis sIgE reaktyvumo profilis. Todėl gydytojas specialistas gali greičiau paskirti tikslų gydymą, atsižvelgdamas į klinikinę informaciją ir visą įsijautrinimo profilį. Tradicinės ir molekulinės alergijų diagnostikos skirtumai aiškiai matomi paveiksle.

Alergijos diagnozavimas



Pav. Tradicinio alergijos diagnozės nustatymo palyginimas su alergijos diagnostika naudojant makrogardelės (modifikuota pagal [1])

Fig. Comparison of traditional and molecular allergy diagnostics in allergy diagnosis

1. Specifinių IgE prieš pavienes molekules nustatymo metodai

Pastaruosiu metu naudojami sIgE prieš alergenų komponentus nustatymo metodai gali būti vienkomenčiai (pvz. fluorescenciniai ar fermentiniai metodai, kuomet imunologinės reakcijos vyksta ant celiuliozinių polimerų), daugiaparametrai (pvz. imunobloto tyrimai, kai naudojant membranines juostas nustatomas sIgE prieš pasirinktus alergenų ir/ar jų komponentus) arba multipleksiniai metodai (nanotechnologijomis pagrįsti imuniniai tyrimai: naudojamas alergenų nanogranulių rinkinys, makrogardelėse nustatomas platus alergenų molekulių spektras) [6]. Vis dažniau atsiranda studijų, rodančių, jog imunodiagnostikoje daugiau privalumų turi pirmiausia atliekamas plataus spektro sIgE nustatymas, palyginti su vienkomponente analize [2, 7]. Tyrimo metodų aprašymų ir palyginimų santrauka pateikiama lentelėje 1.

1.1 Vienkomponentė analizė

Molekulinei vienkomponentei analizei specifiniams IgE nustatyti yra būdinga tai, kad kiekvienos analizės metu matuojama viena analizė [6]. Šio tipo diagnostika labai susijusi su klinikiniu požiūriu „iš viršaus į apačią“: pacientas apsilanko pas gydytoją alergologą klinikinį imunologą, jam atliekamas odos dūrio mėginys ir prireikus ištiriami specifiniai IgE pasirinkti alergenų grupei, o vėliau gilinamasi ieškant alergenų komponentų, kad būtų gautas tikslus IgE profilio vaizdas [8]. Bendras vienkomenčių analizių principas nesikeičia daugelį metų: serume esantys sIgE susiriša su kietoje ar skystoje fazėje esančiu alergenais, prie šio kompleksio prisijungę IgE antikūnai aptinkami pažymėtu anti-IgE reagentu. Šių reakcijų inkubaciniai laikotarpiai yra atskiriami plovimais buferiniu tirpalu [6]. Dauguma tokių sIgE kraujo serume nustatymo metodų apima imunofermentinį (angl.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA), fluorescuojančių fermentų imunofermentinius (angl. *Fluorescent enzyme immunoassay*, FEIA), chemiluminescencinius arba radioalergosorbentinius tyrimus (angl. *radioallergosorbent test*, RAST). Nuo 2010 m. pastaruosius buvo rekomenduojama nutraukti, nes atsirado jautresnių metodų [2, 8]. Vienkomponentės metodikos yra kiekybinės, gerai automatizuotos ir nebrangios, tačiau tiriant tokiu būdu dalis įsijautrinimo atvejų gali būti nepastebėti arba neteisingai interpretuoti, tačiau galima sakyti, kad tai yra diagnostikos pagrindas [4]. Pastaraisiais metais ImmunoCAP (*Thermo Fisher Scientific*, Švedija) diagnostinė sistema tapo standartu, tačiau reikia paminėti, kad aptikti sIgE parodo įsijautrinimą, o ne alergiją [8]. Vienkomponentės analizės privalumai, palyginti su multipleksine analize, yra analitinis jautrumas ir didesnis jautrumas žemiems sIgE lygiams kraujo serume [2].

ImmunoCAP

Tradiciiniu tyrimu laikomas specifinių IgE nustatymas prieš pavienes alergenų, jų komponentus arba alergenų mišinius. Šio tyrimo metu IgE antikūnai, esantys paciento kraujo serume, susiriša su imobilizuotais alergenais ir tuomet susidarę kompleksai aptinkami fluorescuojančiais antrinais antikūnais. Šis metodas tapo atskaitos standartu IgE aptikti *in vitro*, nes jis suteikia didelį jautrumą ir specifumą, taip pat turi kiekybinį rodmenį, kurį galima išreikšti standartizuotais vienetais [9].

1.2 Daugiaparametrė analizė

Imunobloto tyrimai

Imunobloto tyrimų grupę sudaro keli alergenų šaltinių nustatymo vienu metu testai (angl. *multiple allergen simultaneous tests*, MAST). Kaip pavyzdys galėtų būti EUROLINE

(Euroimmun, Vokietija) sistema, kurios technika leidžia greitai ir efektyviai nustatyti sIgE naudojant imunobloto juostas, kuriose yra optimizuoti atitinkamų alergenų komponentų ir ekstraktų deriniai. Kiekviena juostų paletė yra pritaikyta konkrečiai indikacijai: įkvepiamiesiems, vabzdžių nuodų ar maisto produktų alergenams – iš viso 54 alergenams. Taigi, vienu bandymu galima nustatyti sensibilizacijos profilį, naudojant mažą kraujo serumo kiekį [8]. Atlikus palyginimą su „ImmunoCAP“ nustatyta rezultatų koreliacija naudojant įkvepiamuosius ar maisto alergenus [14].

1.3 Multipleksinė analizė

Multipleksinė analizė naudojama atliekant alergijos diagnostikos tyrimus „iš apačios į viršų“, t. y. taikant strategiją „nuo molekulių iki klinikinių požymių“. Tai leidžia nustatyti platesnį sensibilizacijos alergenams profilį, kai pirmiausia atliekamas įsijautrinimo daugeliui molekulių tyrimas, ir remdamasis gautais rezultatais gydytojas sprendžia apie tolesnę gydymo eigą. Multipleksinė analizė atliekama, kai reikia nustatyti įsijautrinimą daugiau nei dvylikai molekulių [4]. Vienu metu, naudojant labai nedidelį kiekį serumo (iki 100 µl), galima ištirti paciento įsijautrinimą daugeliui alergenų (iki 250), todėl pakanka vieno tyrimo. Tačiau aiškinantis kiekvieno įsijautrinimo klinikinę reikšmę gali kilti problemų: pacientas gali nerimauti dėl gautų teigiamų įsijautrinimo rezultatų, nors simptomų nėra; esant labai mažam sIgE kiekiui, naudojamas metodas yra per mažai jautrus ir įsijautrinimą neaptinkama. Esant tokiai situacijai reikalinga vienkomententė analizė [10]. Kaip multipleksinių tyrimų panaudojimo naujovę galima įvardyti imuninės terapijos efektyvumo stebėseną. sIgE profilio kitimas per tam tikrą laiką padėtų kontroliuoti gydymą, suteiktų žinių apie terapijos efektyvumą [8].

ImmunoCAP ISAC

Vieni pirmųjų multipleksinės analizės metodų yra ISAC (*Thermo Fisher Scientific*, Švedija). Jis leidžia testuoti 112 skirtingų molekulių, tiek rekombinantinių, tiek natyviųjų, panaudojant vos 30 µl serumo, plazmos ar kapiliarinio kraujo [4, 6]. Rinkinyje naudojama daugiau nei 100 alergenų komponentų, bet ne alergenų ekstraktų. Dėl gebėjimo aptikti bendrą jautrumą ir atskirti kryžmines reakcijas tai yra labai gera priemonė daugeliui alergenų įsijautrinusiems pacientams. Šie rezultatai gali prisidėti prie nuodugnios analizės rezultatų, gautų standartiniais klinikiniais testais – ODM ar sIgE prieš alergenų ekstraktus [11]. Kaip kietoji fazė tyrimui naudojama iš anksto aktyvuota, su aminorais reaguojanti, polimerine danga dengta stiklo plokštelė (100 pg alergeno imobilizuota į lusto vieną taškelį (taškelio dydis 200 µm), su trimis pasikartojimais). Kiekvienoje stiklo plokštelėje yra keturios mikroschemos, kurios parodo keturių mėginių rezultatus vienoje skaidrėje [6].

Analizė susideda iš dviejų žingsnių:

1. IgE antikūnai, esantys paciento mėginyje, susiriša su imobilizuotais alergenų komponentais.

2. Konjugato / pažymėto anti-IgE antikūno susirišimas: nuplovus nespecifinius antikūnus, įdedami fluoroforu pažymėti anti-IgE antikūnai, kurie atpažįsta su alergenu susirišusius IgE

antikūnus. Tuomet atliekamas fluorescencijos intensyvumo matavimas ir vaizdo apdorojimas, prieš tai nuplovus nesusirišusius antikūnus [6].

Atliekant alergijos maistui tyrimus ir vertinant skirtingais metodais gautų rezultatų koreliacijas pastebėta, kad šio metodo specifiskumas didesnis nei jautrumas, todėl atsiranda skirtumų tarp odos dūrio mėginio ir specifinių IgE nustatymo naudojant alergenų ekstraktus testų rezultatų. Pavyzdžiui, išsiaiškinta, kad sutapimai gaunami tiriant alergiją pienui, kiaušiniams bei riešutams, o nesutapimai – tiriant alergiją vaisiams: kiviams, melionams, ananasams [12]. Problemų tiriant vaisių alergenus „ImmunoCAP ISAC“ diagnostikos priemone pastebėjo ir D'Amelio su kolegomis, kurie nustatė nepagrįstą jautrumą persikams ir obuoliams [13]. Tačiau vienkomententės analizės „ImmunoCAP“ ir multipleksinės ISAC testų rezultatai nustatant jautrumą žolės žiedadulkėms puikiai koreliavo [8].

ALEX² makrogardelės

ALEX² (MacroArray Diagnostics, Austrija) makrogardelė – nanogranulių pagrindu sukurta platforma, skirta įsijautrinimo alergenams profiliui nustatyti [15]. Ypač tinka polisensibilizaciją bei žiedadulkių ir maisto sindromą turintiems pacientams, nes toje pačioje mikroschemoje derinama antrojo ir trečiojo lygio alergijos diagnostika [16]. ALEX² yra ELISA pagrįstas imunologinis tyrimas. Alergenų ekstraktai arba molekuliniai alergenų komponentai, kurie yra sujungti su nanodalelėmis, sistemingai nusėda ant kietosios fazės, sudarančios makroskopinį masyvą. Pirmiausia, dalelių surišti alergenai reaguoją su specifiniais IgE paciento mėginyje. Po inkubacijos nespecifiniai IgE nuplaunami. Procedūra tęsiama įdedant fermentu pažymėtų anti-IgE antikūnų, kurie sudaro kompleksą su dalėlėmis, surišusiomis specifinius IgE. Po antrojo plovimo etapo pridedama substrato, kurį su antikūnu surištas fermentas paverčia netirpiomis spalvotomis nuosėdomis. Galiausiai, fermento ir substrato reakcija sustabdoma įdedant blokuojančio reagento. Nuosėdų kiekis yra proporcingas specifinio IgE koncentracijai paciento mėginyje. Po laboratorinio tyrimo procedūros gaunamas vaizdas ir analizė naudojant „ImageXplorer“ įrenginį. Bandymo rezultatai analizuojami naudojant „MADx Raptor Analysis“ programinę įrangą ir pateikiami sIgE atsako vienetais (kU/l). Bendrojo IgE rezultatai taip pat pateikiami IgE atsako vienetais (kU/l).

ALEX² nuo prieš tai aprašytos ISAC skiriasi tuo, jog naudojami ir alergenų ekstraktai (157), ir atskiri molekuliniai komponentai (126). Analizės metu taip pat naudojamas kryžminių reakcijų (CCD) inhibitorius [4]. Techniniu požiūriu tai reiškia, jog ALEX² atlieka vieną kiekvieno alergeno nustatymą, o ISAC – tris pakartojimus kiekvienai molekulei. Tyrimai parodė, kad nepaisant metodologinių skirtumų sIgE nustatymo prieš žolės žiedadulkių (Phl p 1, Phl p 5), beržo (Bet v1), namų dulkių erkių (Der p 1, Der p 2) ir kačių (Fel d 1) alergenus rezultatai buvo koreliuojantys [3]. Silpnesnės koreliacijos nustatytos tiriant įsijautrinimą migdolų ar lazdyno riešutų alergenams [9]. ALEX² testas – gana naujas metodas, todėl analizės efektyvumas (ypač ekstraktų) turi būti toliau tiriamas platesniu mastu [4, 8].

1 lentelė. Diagnostikos metodų apibendrinamoji lentelė (pagal [17])
Table 1. Summary table of diagnostic methods (according to [17])

Analizės rūšis			Privalumai	Trūkumai
Standartiniai klinikiniai metodai	Odos dūrio mėginys	<i>In vivo</i> tyrimas	Greiti rezultatai Didelis jautrumas, mažas klaidingai neigiamų atsakymų lygis	Mažas specifiškumas Didelė stiprių alerginių reakcijų rizika Turi būti nevartojami antihistamininiai vaistai atliekant procedūrą Paciento oda turi būti lygi, nepažeista egzemos Negalima naudoti vaikams, jaunesniems nei 2 metai Reikalingas apmokytas personalas tyrimui atlikti
Vienkomponentė analizė	Immuno-CAP	Fluorescencinis metodas	Tinkamas įsijautrinimo stebėsenai Didelis jautrumas Kiekybinis tyrimas Galima naudoti natūralius ir rekombinantinius baltymus, taip pat neapdorotus ekstraktus	Vienam alergenui reikia 40 µl kraujo Vienas alergenai vienam tyrimui Aptinka mažo afiniteto antikūnus, kurie gali būti kliniškai nereikšmingi
Multipleksinė analizė	ISAC	Fluorescencinis metodas	Nėra trikdžių esant dideliu bendram IgE kiekiui Lygiagrečiai galima ištirti 112 alergenų Suderinti natūralūs ir rekombinantiniai alergenai Reikia tik 30 µl serumo ar plazmos	Nerekomenduojama naudoti įsijautrinimo monitoringui Rankinis metodas Mažiau jautrus Gali būti trikdžių tarp IgE ir IgG Pusiaus kiekybinis tyrimas
	ALEX ²	Kolorimetrinis metodas	157 ekstraktų alergenai ir 126 molekuliniai komponentai Reikia 100 µl serumo, plazmos arba veninio kraujo	Analizės efektyvumas (ypač ekstraktų) turi būti plačiau ištirtas

1.4 Molekulinių alergenų komponentų kūrimas

Molekulinėi diagnostikai naudojami natūralūs išgryninti alergenai, išgauti iš natūralių alergenų šaltinių, bei rekombinantiniai alergenai, pagaminti naudojant rekombinantinės DNR technologiją. Kaip natūralūs šaltiniai naudojami žiedadulkių grūdėliai ar namų dulkių erkutės, iš kurių chromatografijos būdu išgryninamos alergenų molekulės. Gaminant rekombinantinius alergenus dažniausiai naudojami prokariotai (*Escherichia coli*), rečiau eukariotai – mielės (*Pichia pastoris*) [6]. Alergenų molekulės ar jų komponentai pasižymi homogeniškumu ir gera kokybės kontrole. Detalios fizikocheminės savybės aprašomos identifikuojant baltymus ir aminorūgščių sekas masių spektrometrijos metodu, o kiekybinis nustatymas atliekamas didelio efektyvumo skysčių chromatografijos atvirkščiosios fazės metodu. Homogeniškumo tyrimai atliekami nustatant baltymų izoelektrinį tašką naudojant natrio dodecilsulfato-poliakrilamido gelio elektroforezę (angl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-*

phoresis, SDS-PAGE) nudažant sidabru, atliekant imuno-blotą. Agregacijos tirpale tyrimas atliekamas naudojant dydžio išskyrimo chromatografiją ir nustatant dinaminės šviesos sklaidą, o biologinis aktyvumas *in vitro* nustatomas atliekant bazofilų aktyvumo testą (BAT) ir imunoformentinį tyrimą (ELISA) [18]. Tradiciniams tyrimams naudojami ekstraktai yra neapdoroti, jų sudėtyje gali būti lipidų, baltymų ar polisacharidų, likusių po ekstrakcijos proceso, be to, nėra aiški kiekvieno atskiuro alergeno komponento koncentracija tirpale [6].

1.5 Molekulinės diagnostikos privalumai

Nustatant įsijautrinimą alergenų ekstraktams tiek tradiciniais alergijų diagnostikos metodais, tiek molekuliniais – atskiromis molekulėmis, kartais išryškėja skirtumų (nurodyti 2 lentelėje). Gali būti, kad ekstraktų tyrimas neigiamas, o atlikus išsamią molekulinę analizę nustatomas teigiamas rezultatas [19]. Tačiau, kad ir kaip būtų, pavienių alergenų tyrimuose gaunami rezultatai mažiau skiriasi nei naudojant alergenų ekstraktus [10].

2 lentelė. Priežastys, dėl kurių atsiranda skirtingomis diagnostikos sistemomis gautų rezultatų skirtumai [8]
Table 2. The reasons for differences in results obtained by different diagnostic systems [8]

Testų nesutapimas	Priežastis (1)	Priežastis (2)
Alergenų ekstraktas rodo teigiamą, bet molekuliniai testai neigiamą atsakymą	Molekulės, su kuriomis jungiasi serume esantis IgE, yra tik ekstrakto, bet nėra molekuliniuose testuose	Molekuliniai testai mažiau analitiškai jautrūs nei ekstraktų tyrimai
Alergenų ekstraktų tyrimas neigiamas, o molekulinis tyrimas teigiamas	Ekstrakte komponentų, su kuriais rišasi serume esantis IgE, nėra arba jų labai mažai	Ekstraktų tyrimas mažiau jautrus nei molekulinis
Alergenų ekstrakto tyrimas teigiamas, tačiau jo komponentai neigiami	Serumo IgE rišasi tik su kryžmiškai reaguojančiomis arba mažomis alergenų molekulėmis	–
Alergenų ekstraktas rodo mažesnę kiekį IgE nei molekulinis tyrimas	Konkrečių molekulių, prie kurių jungiasi serumo IgE, ekstrakto mažai	–

Nustačius įsijautrinimą molekulinio lygmeniu, atskiriamas tikrasis įsijautrinimas nuo kryžminių reakcijų, todėl pacientui gali būti pritaikytas efektyvesnis gydymas. Tai ypač svarbu esant alergijai maisto produktams. Skirtingi maisto produktai yra sudaryti iš įvairių molekulių, kurios yra atsparios arba neatsparios karščiui ar virškinimui. Aiškus molekulinis stabilumas ir ligos istorijos duomenys padeda gydytojui įvertinti vietinių ir sisteminių reakcijų riziką. Labilūs alergenai yra susiję su vietinėmis reakcijomis (pvz. burnos alergijos sindromas (OAS)), nes termiškai apdoroti tokie maisto produktai dažniausiai yra toleruojami. Tačiau įsijautrinimas stabiliems alergenų komponentams lemia sunkesnes ir net gyvybei grėsmingas alergines reakcijas. Tokiu būdu išsiaiškinama, kokių produktų vengiama be reikalo [19].

IŠVADOS

Naujausi atliekami tyrimai rodo, jog esant simptomams, būdingiems alerginei ligai, ir nepavykus nustatyti alergeno tradiciniais metodais (ODM bei sIgE nustatymo kraujo serume) vertėtų atlikti molekulinis alergijų diagnostikos tyrimus. Visais atvejais gauti įsijautrinimo tyrimų rezultatai turi sutapti su klinikiniais požymiais. Tik teisingai nustatius sIgE, antgeno šaltinį bei atskyrus kryžmines reakcijas, galima individualiai parinkti tinkamiausią klinikinį paciento gydymą. Didėjanti molekulinis tyrimų paklausa skatina naujų diagnostikos sistemų radimąsi, todėl svarbu atlikti koreliacinius tyrimus, kurie atskleistų kiekvieno metodo privalumus ir silpnynes.

Gauta: 2022 10 07 **Priimta spaudai:** 2023 01 04

Summary

THE MODERN MOLECULAR ALLERGY DIAGNOSTICS

Sandra Sakalauskaitė, Edita Gasiūnienė, Brigita Šitkauskienė

Introduction. According to the World Allergy Organization, more than 20% of the population in developed countries suffers from allergic diseases. Allergic individuals are characterized by producing immunoglobulin E antibodies against harmless environmental allergens. Conventional methods use allergen extracts to determine specific IgE (sIgE). Extracts are composed of several components, so it is unclear to which specific protein the sensitization is. Also, it is impossible to distinguish cross-reactions due to common IgE epitopes in allergens. For these reasons, the necessity for molecular allergy diagnostics arose. For these reasons, the necessity for molecular allergy diagnostics arose. It is based on identifying allergen components from allergen sources

such as pollen, house dust mites, fur animals, food, and so on. Advances in science and technology have opened up the development of molecular *in vitro* diagnostics and are increasingly used in routine clinical trials. The discrepancies between the results from different tools for determining sensitization have made it necessary to perform a comparative analysis. A patient's medical history is required to properly interpret the sIgE profiles against individual allergen molecules or evaluate which sensitization is clinically relevant.

The aim – to highlight the differences between traditional and molecular allergy diagnostics and to thoroughly analyze molecular allergy diagnostic methods and the features of their use.

Conclusions. After analyzing the latest literature data, it can be concluded that in the presence of symptoms typical of an allergic disease and failing to identify the allergen by traditional methods (SPT and sIgE determination in blood serum), molecular allergy diagnostic tests should be performed.

Keywords: immunology, immunoglobulin E, molecular allergy diagnostics, sensitization to allergens.

LITERATŪRA

- Huang H-J, Campana R, Akinfenwa O, Curin M, Sarzsinszky E, Karsonova A, et al. Microarray-Based Allergy Diagnosis: Quo Vadis? Front Immunol [Internet]. 2020 Feb 12 [cited 2021 Sep 27]; 11: 1. Available from: /pmc/articles/PMC7928321/
- Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI Molecular Allergy User's Guide. Pediatr Allergy Immunol [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Aug 26]; 27(suppl 23): 1–250. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pai.12563>
- Bojcukova J, Vlas T, Forstenlechner P, Panzner P. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. Clin Transl Allergy [Internet]. 2019; 9(1): 1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13601-019-0270-y>
- Buzzulini F, Da Re M, Scala E, Martelli P, Conte M, Brusca I, et al. Evaluation of a new multiplex assay for allergy diagnosis. Clin Chim Acta [Internet]. 2019; 493(February): 73–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.025>
- Dona DW, Suphioglu C. Egg allergy: Diagnosis and immunotherapy. Int J Mol Sci 2020; 21(14): 1–35.
- Popescu F-D, Vieru M. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules. <http://www.wjgnet.com/> [Internet]. 2018 Nov 29 [cited 2021 Aug 26]; 8(3): 17–36. Available from: <https://www.wjgnet.com/2222-0682/full/v8/i3/17.htm>
- Mothes-Luksch N, Jordakieva G, Hinterhölzl L, Jensen AN, Hallmann PK, Kundi M, et al. Allergy diagnosis from symptoms to molecules, or from molecules to symptoms: A comparative clinical study. World Allergy Or-

- gan J [Internet]. 2018 Sep 11 [cited 2021 Dec 6]; 11(1): 1–11. Available from: <https://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40413-018-0199-y>
8. Ansotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, Caraballo L, Villa E, Ebisawa M, et al. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J* 2020; 13(2).
9. Keshavarz B, Platts-Mills TAE, Wilson JM. The use of microarray and other multiplex technologies in the diagnosis of allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* [Internet]. 2021; 127(1): 10–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anai.2021.01.003>
10. Kleine-Tebbe J, Jappe U. Molecular allergy diagnostic tests: development and relevance in clinical practice. *Allergol Sel* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2021 Aug 23]; 1(2): 169. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26684914/>
11. Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, Maggi E, Mussap M, Passalacqua G, et al. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem* 2011 Aug 1; 44(12): 1005–11.
12. Maesa J-M, Dobrzynska A, Baños-Álvarez E, Isabel-Gómez R, Blasco-Amaro J-A. ImmunoCAP ISAC in food allergy diagnosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Aug 31]; 51(6): 778–89. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cea.13871>
13. D'Amelio CM, Goikoetxea MJ, Martínez-Aranguren R, García BE, Gómez F, Fernández J, et al. Is the performance of ImmunoCAP ISAC 112 sufficient to diagnose peach and apple allergies? *Ann Allergy Asthma Immunol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Sep 2]; 116(2): 162–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26684914/>
14. Konopka E, Ceregra A, Maciorkowska E, Surowska B, Trojanowska I, Roszko-Kirpsza I, et al. Specific IgE Antibodies in Young Children with Atopic Dermatitis--Correlation of Multiple Allergen Simultaneous Immunoblot Test and ImmunoCap System. *Clin Lab* 2016; 62(5): 815–21.
15. Üzülmöz Ö, Kalic T, Breiteneder H. Advances and novel developments in molecular allergology. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2020; 75(12): 3027–38.
16. Heffler E, Puggioni F, Peveri S, Montagni M, Canonica GW, Melioli G. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: A novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organ J* 2018; 11(1): 1–8.
17. Foong R-X, Dantzer JA, Wood RA, Santos AF. Clinical Commentary Review Improving Diagnostic Accuracy in Food Allergy. 2021 [cited 2021 Aug 24]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.09.037>
18. Himly M, Nandy A, Kahlert H, Thilker M, Steiner M, Briza P, et al. Standardization of allergen products: 2. Detailed characterization of GMP-produced recombinant Phl p 5.0109 as European Pharmacopoeia reference standard. *Allergy* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Aug 26]; 71(4): 495–504. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.12824>
19. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, Van Hage M, Baena-Cagnani CE, et al. A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J* [Internet]. 2013 [cited 2022 Sep 20]; 6(1): 1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26684914/>