

# Testy wieloparametrowe do diagnostyki molekularnej alergii – aktualne możliwości

## Multi-parameter tests for molecular diagnosis of allergies - current possibilities

KINGA LIS, ZBIGNIEW BARTUZI

Katedra Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych CM w Bydgoszczy UMK w Toruniu

### Streszczenie

Jednym z etapów diagnostyki chorób alergicznych jest oznaczanie stężenia swoistych immunoglobulin E (sIgE) we krwi. Proces ten można realizować zarówno przy pomocy testów jednoparametrowych (singleplex) lub wieloparametrowych (multiplex). W testach typu singleplex oznacza się sIgE dla jednego, konkretnego alergenu, pełnego ekstraktu lub pojedynczej komponenty alergenowej. Z kolei testy multiplexowe umożliwiają jednoczesny pomiar stężenia lub poziomu sIgE dla wielu alergenów, zarówno w postaci ekstraktów jak i komponent alergenowych. Do diagnostyki *in vitro* dostępnych jest wiele różnych walidowanych (IVD) zestawów testowych różniących się zarówno techniką wykonania jak i profilem alergenów. Praca ma na celu przybliżenie i zestawienie aktualnie dostępnych testów wieloparametrowych do diagnostyki *in vitro* chorób alergicznych.

**Słowa kluczowe:** diagnostyka *in vitro* alergii, testy wieloparametrowe

### Summary

Measurement of specific immunoglobulin E (sIgE) in serum is one of steps in the diagnosis of allergic diseases. This process can be carried out using either single-parameter or multi-parameter tests. In single-plex tests, sIgE is determined for one specific allergen, complete extract or single allergen component. In turn, multiplex tests allow simultaneous measurement of sIgE concentration or level for many allergens, both in the form of extracts and allergen components. A variety of validated (IVD) test kits are available for *in vitro* diagnostics, which differ in both the technique of performance and profile of allergens. We aim to present a summary of the currently available multi-parameter testing for *in vitro* diagnosis of allergic diseases.

**Keywords:** *in vitro* diagnostics of allergies, multi-parameter tests

© Alergia Astma Immunologia 2020, 25 (3): 122-140  
www.alergia-astma-immunologia.pl



### Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr n. med. Kinga Lis

Katedra Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych CM w Bydgoszczy UMK w Toruniu  
ul. Ujejskiego 75  
85-164 Bydgoszcz  
Tel. 52 36 55 552; 604732271  
e-mail: kinga.lis@cm.umk.pl, kzlis@gazeta.pl

### Wstęp

Diagnostyka alergii jest procesem złożonym i wieloetapowym. Rozpoczyna się od wywiadu klinicznego, badania fizykalnego pacjenta oraz badań dodatkowych. Badania dodatkowe mogą być realizowane zarówno w formie testów *in vivo*, polegających na ocenie skórnej reakcji organizmu na kontakt z alergenem (np. testy skórne, próby prowokacyjne) jak i testów *in vitro*, wśród których wyróżnić można diagnostykę serologiczną opartą o oznaczanie przeciwciał w klasie IgE, swoistych dla określonych alergenów (sIgE), we krwi pacjenta.

### Diagnostyka alergii oparta na oznaczaniu alergenowo-swoistych IgE (sIgE)

Diagnostyka obejmująca oznaczanie stężenia sIgE w surowicy krwi może być realizowana różnymi testami, zwalidowanymi do diagnostyki *in vitro* (IVD, ang. *in vitro* diagnostic). Zasada działania aktualnie dostępnych testów oparta jest o reakcję wykorzystującą wiązanie wystanda-

ryzowanego alergenu, który może być zawieszony w fazie płynnej lub opłaszczony na określonym nośniku w fazie stałej. Kompleks powstały po połączeniu alergenu z sIgE, następnie wykrywany przy pomocy przeciwciała detekcyjnego, skierowanego względem fragmentu stałego ludzkiej immunoglobuliny E. Intensywność reakcji wyrażona, w zależności od użytego znacznika, poprzez natężenie zabarwienia czy intensywność fluorescencji, jest proporcjonalna do stężenia IgE swoistych związanych w teście [1].

Tradycyjna diagnostyka serologiczna alergii oparta jest o oznaczanie przeciwciał IgE swoistych względem natywnych ekstraktów alergenowych. Przez ekstrakt alergenowy rozumie się mieszaninę białek alergizujących i niealergizujących pochodzących z danego źródła alergenowego [2]. Ekstrakty pochodzące ze źródeł naturalnych często są heterogeniczne i mogą zawierać wiele niealergicznych cząsteczek. Mogą różnić się składem i ilością białek alergizujących. Szczegółowy skład pełnych ekstraktów nie jest jednoznacznie możliwy do określenia i może być różny u różnych producentów i w różnych seriach pochodzących

od jednego producenta. W przypadku alergenów pokarmowych skład ekstraktu może być zależny nawet od sposobu i warunków produkcji danego pokarmu, uprawy roślin i ich przechowywania czy hodowli zwierząt. Ponadto obecność bioaktywnych cząsteczek (np. enzymów proteolitycznych) w naturalnych ekstraktach może mieć wpływ na stabilność danego ekstraktu. Możliwe jest również zanieczyszczenie ekstraktu alergenami z innych źródeł [3].

Molekularna diagnostyka alergii oparta jest na oznaczeniu w surowicy krwi swoistych IgE względem pojedynczych komponent (molekuł) alergenowych, pochodzących z danego źródła alergenowego. Przez molekułę alergenową rozumie się pojedyncze białko, w rzadkich przypadkach ugrupowania węglowodanowe, które może indukować alergiczną odpowiedź immunologiczną [2]. W diagnostyce opartej o oznaczanie swoistych IgE stosuje się komponenty natywne, pozyskiwane, dzięki różnym technikom fizykochemicznym, bezpośrednio z naturalnego ekstraktu alergenowego oraz komponenty rekombinowane, które produkowane są drogą inżynierii genetycznej i syntetyzowane są przez inny organizm niż ten, z którego pochodzą. Do wytwarzania alergenów rekombinowanych najczęściej wykorzystuje się bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) lub komórki drożdży. Stwarza to możliwość uzyskania nieograniczonych ilości doskonale oczyszczonego alergenu, o dokładnie zdefiniowanej strukturze molekularnej [3]. Na dzień 18.03.2020 w bazie danych *Allergome* sklasyfikowanych było 7533 alergeny, w tym 4980 molekuł alergenowych i 2553 źródła alergenowe [4].

Diagnostyka oparta na ekstraktach alergenowych umożliwia określenie źródła alergenów, nie umożliwia natomiast zidentyfikowania reakcji krzyżowych czy oszacowania ciężkości ewentualnej reakcji po kontakcie z danym alergenem, szczególnie w odniesieniu do alergenów pokarmowych. Diagnostyka molekularna umożliwia natomiast dokładne określenie molekuły alergenu, na którą pacjent jest uczulony, co daje możliwość zarówno precyzyjnego zidentyfikowania szkodliwego alergenu, jak określenia możliwych reakcji krzyżowych, przewidywania siły ewentualnej reakcji po kontakcie z danym alergenem, w tym ciężkich reakcji anafilaktycznych, czy też oszacowania przewidywanej skuteczności immunoterapii alergenowej. Wspomaga także ustalanie diety pacjenta, w przypadku alergii pokarmowej.

### Diagnostyka molekularna alergii

Diagnostyka molekularna alergii jest metodą mającą na celu ustalenie profilu uczuleniowego pacjenta na poziomie molekularnym. Może być ona realizowana dwoma sposobami – poprzez oznaczanie stężenia IgE swoistych dla pojedynczych molekuł alergenowych (diagnostyka monokomponentowa, jednokomponentowa, singleplex) lub równoczesny pomiar stężenia sIgE dla wielu komponent alergenowych w jednym teście (diagnostyka multikomponentowa, wielokomponentowa, multiplex).

### Monokomponentowa diagnostyka molekularna alergii

Monokomponentowa diagnostyka molekularna alergii polega na oznaczaniu stężenia IgE swoistych dla konkretnej molekuły alergenowej w surowicy krwi. W codziennej praktyce dostępne są zestawy różnych producentów, różniące się czułością i swoistością analityczną związaną z techniczną konstrukcją testu (testy w fazie stałej lub

płynnej, różne podłoża fazy stałej, komponenty natywne lub rekombinowane, różny typ przeciwciała detekcyjnego i różny znacznik). Wynik uzyskany w testach singleplex jest zawsze wynikiem ilościowym. Techniki te wymagają relatywnie dużej objętości surowicy do wykonania badań (40-50  $\mu$ l surowicy na jeden alergen plus tzw. dodatkowa objętość martwa materiału około 100  $\mu$ l) i są stosunkowo drogie w przeliczeniu na pojedynczy wynik.

### Multikomponentowa diagnostyka molekularna alergii

Diagnostyka multikomponentowa oparta o oznaczanie swoistych IgE dla wielu różnych komponent alergenowych w jednym teście. Stała się ona możliwa dzięki zastosowaniu złożonych testów do diagnostyki *in vitro*, których konstrukcja oparta jest o matryce (macierze) alergenowe i nanotechnologię. Stosowane w tego rodzaju analizach macierze stanowią potężne narzędzie diagnostyczne, umożliwiające równoczesną analizę dużej liczby analitów w materiale biologicznym. Technologia mikromacierzy pozwala na jednoczesną analizę tysięcy parametrów w ramach jednego eksperymentu. Mikrosploty cząsteczek wychwytyjących, np. alergenów, są unieruchamiane w ściśle określonych miejscach na stałym podłożu (płytki szklane, plastikowe, celuloza) i następnie ekspozowane na próbki materiału badanego. Jeśli w badanym materiale biologicznym znajdują się adekwatne anality, wówczas są one wiązane do znajdujących się na podłożu macierzy cząsteczek. Tak powstałe kompleksy są następnie wykrywane odpowiednimi technikami immunochemicznymi, a detekcja sygnału oparta może być na fluorescencji, chemiluminescencji, spektrometrii mas, radioaktywności, densytometrii lub elektrochemii [5].

Każdy test, w którym jednocześnie oznaczane jest swoiste IgE dla więcej niż jednego alergenu, jest testem wieloparametrowym. Przy pomocy aktualnie dostępnych platform multipleksowych można w trakcie jednej analizy oznaczyć stężenie lub poziom sIgE dla kilku do kilkuset molekuł alergenowych. Są to testy fazy stałej, dające wyniki ilościowe lub półilościowe. Dostępne są panele kilkukomponentowe, lub komponentowo/ekstraktowe, wymagające około 100-200  $\mu$ l, surowicy krwi, które zazwyczaj są ukierunkowane na konkretne źródło alergenowe (Tab. I) oraz panele, w których jednocześnie oznaczamy sIgE dla kilkuset komponent alergenowych, czy też ekstraktów i komponent alergenowych, ukierunkowane na określenie indywidualnego profilu alergii danego pacjenta. Platformy umożliwiające jednoczesne wykrycie IgE swoistych dla kilkuset alergenów zwykle stosowane są w diagnostyce pacjentów multiuczulonych. Testy te zawierają w swoim składzie komponenty alergenowe z kilkudziesięciu różnych źródeł. Przy ich użyciu można wykrywać albo sIgE jedynie dla komponent alergenowych (test ISAC, Thermo Fisher Scientific, Phadia), jednocześnie IgE swoistych dla komponent i ekstraktów alergenowych (test FABER, CAAM allergy) lub też sIgE dla komponent alergenowych, ekstraktów alergenowych oraz całkowite stężenie immunoglobuliny E we krwi (test ALEX, Macroarray Diagnostics). Testy te, oprócz składu, różnią się także technologią, techniką wykonania oraz ilością materiału potrzebnego do badania.

Warto również zwrócić uwagę na to, iż wyników badań tego samego parametru otrzymanych różnymi testami do diagnostyki *in vitro* nie można porównywać. Testy te

Tabela I. Przykładowe małe panele alergenowe do diagnostyki molekularnej alergii. [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów]

<b>Polycheck Mleko + gluten</b>	
mleko krowie:	mleko (pełen ekstrakt), Bos d4 alfa-laktoalbumina, Bos d5 beta-laktoglobulina, Bos d8 kazeina, Bos d6 surowicza albumina wołowa (BSA)
gluten:	gluten (pełen ekstrakt)
<b>Polycheck Rekombinanty pyłki</b>	
Tymotka łąkowa:	Pyłek tymotki łąkowej(ekstrakt), rPhl p1 (ekspansyna), rPhl p5 (trawy grupa 5), rPhl p 7 (polkalcyna), rPhl p12 (profilina)
Brzoza:	Pyłek brzozy (ekstrakt), rBet v1 (PR-10), rBet v2 (profilina)
<b>Polycheck Komponenty jaja kurzego</b>	
jajo kurze żółtko:	jajo kurze żółtko (pełen ekstrakt)
jajo kurze białko:	jajo kurze białko (pełen ekstrakt), nGal d2 (owoalbumina), nGal d1 (owomukoid), nGal d3 (konalbumina), nGal d4 (lizozym)
<b>Polycheck Rekombinanty orzech ziemny</b>	
orzech ziemny:	orzech ziemny (pełen ekstrakt), rAra h1, rAra h2, rAra h3, rAra h6, rAra h8, rAra h9
<b>Polycheck Rekombinanty roztocze</b>	
<i>D. pteronyssinus</i> :	<i>D. pteronyssinus</i> (pełen ekstrakt), rDer p1, rDer p2, rDer p10, rDer p23
<i>D. farine</i> :	<i>D. farine</i> (pełen ekstrakt)
<b>Polycheck Insect CCD</b>	
jad pszczoły:	jad pszczoły (pełen ekstrakt)
jad osy:	jad osy (pełen ekstrakt), rVes v5 (antygen 5)
jad szerszenia:	jad szerszenia (pełen ekstrakt)
komar:	alergeny komara (pełen ekstrakt)
meszka:	alergeny meszki (pełen ekstrakt)
CCD:	CCD
<b>DPA-Dx Pediatriczny 1</b>	
mleko krowie:	nBos d4 (alfa-laktoalbumina), nBos d5 (beta-laktoglobulina), nBos d (laktoferyna), nBos d6 (surowicza albumina wołowa), nBos d8 (kazeina)
jajo kurze:	nGal d2 (owoalbumina), nGal d3 (konalbumina), nGal d4 (lizozym), nGal d1 (owomukoid)
orzeszki ziemne:	rAra h1, rAra h2, rAra h3, rAra h9
brzoza:	rBet v1
<b>DPA-Dx Mleko</b>	
mleko krowie:	nBos d4 (alfa-laktoalbumina), nBos d5 (beta-laktoglobulina), nBos d (laktoferyna), nBos d6 (surowicza albumina wołowa), nBos d8 (kazeina)
<b>DPA-Dx Orzeszki ziemne</b>	
orzeszki ziemne:	rAra h1, rAra h2, rAra h3, rAra h6, rAra h7, rAra h9, rAra h5
brzoza:	rBet v1
<b>DPA-Dx Jady owadów 2</b>	
jad pszczoły:	I1 (jad pszczoły – pełen ekstrakt), rApi m1 (fosfolipaza A2), rApi m2 (hialuronidaza), rApi m10 (ikarapina/CRP)
jad osy:	I3 (jad osy – pełen ekstrakt), rVes v5 (antygen 5), rVes v1 (fosfolipaza A1)
<b>DPA-Dx Pyłki 1</b>	
brzoza:	brzoza – pełen ekstrakt, rBet v1, rBet v2, rBet v4, rBet v6
tymotka łąkowa:	tymotka łąkowa – pełen ekstrakt, rPhl p1, rPhl p5, rPhl p7, rPhl p12

mają różną konstrukcję. Stosuje się w nich różne podłoża. Zarówno ekstrakty alergenowe, jak i komponenty alergenowe, pozyskiwane są różnymi technikami. Zastosowano także różne przeciwciała drugorzędowe oraz sposób detekcji. Inne są również sposoby kalibracji testów, minimalna czułość i maksymalna detekcja. Wszystkie te parametry wpływają na własności analityczne testu i powodują, że wyniki nimi otrzymane nie są porównywalne.

### ISAC (*Immuno Solid-Phase Allergen Chip*; Thermo Fisher Scientific, Phadia, Szwecja)

Test ISAC jest immunoenzymatycznym testem fazy stałej opartym na technologii biochip. Biochip (mikromacierz), jest to stałe podłoże (np. płytka szklana lub plastikowa), na którym w określonej lokalizacji zostały precyzyjnie naniesione określone cząsteczki biologiczne. Technologia ta umożliwia jednoczesne wykrycie obecności wielu składników biologicznych w małej ilości badanego materiału, przy użyciu małej objętości odczynnika. W teście ISAC komponenty alergenowe naniesione w tripletach na szklaną płytkę (slajd) wiążą swoiste dla nich przeciwciała IgE z surowicy krwi pacjenta. Tak związane swoiste IgE są następnie wykrywane za pomocą znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał przeciwko ludzkiej immunoglobulinie E (anty-IgE ludzkie). Każdy slajd zawiera cztery mikromaciecze przeznaczone dla czterech pacjentów. Fluorescencja jest mierzona za pomocą skanera biochipów. Producent zaleca stosowanie laserowych urządzeń do konfokalnego skanowania, w szczególności skanera mikromacieczy CapitalBioLuxScan 10k (Capitalbio, San Diego, Kalifornia, USA). Następnie uzyskane obrazy są analizowane przy użyciu oprogramowania PhadiaMicroarray Image (MIA).

ISAC jest testem półilościowym, a wyniki poziomu swoistych przeciwciał IgE są podawane w jednostkach standa-

ryzowanych ISAC (ISU-E) i są podzielone na cztery kategorie, w zależności od poziomu: <0,3 ISU-E (nieoznaczalne); 0,3-0,9 ISU-E (niskie); 1-14,9 ISU-E (średnie/ wysokie); >15 ISU-E (bardzo wysokie). Badanie wykonywane jest w 30 µl surowicy lub osoczaheparynowanego [6]. Procedura laboratoryjna testu ISAC trwa 4 godziny. Interpretacja wyniku może być wspomaganą za pomocą zintegrowanego oprogramowania Xplain® (Thermo Fisher Scientific Inc., Phadia AB) oraz systemu eksperckiego AllerGenius® (ARMI, Genova, Włochy) [7,8]. Platformy te nie są dostępne w języku polskim.

Pierwsze multiparametrowe chipy alergenowe tego typu pojawiły się w roku 2001. Od roku 2006/2007 test ISAC jest powszechnie dostępny do diagnostyki *in vitro* [9,10]. Obecna wersja tego testu (ISAC<sub>E112i</sub>), dostępna od roku 2019, umożliwia jednoczesne oznaczanie swoistych IgE dla 112 różnych pojedynczych molekuł z 48 różnych źródeł alergenów roślinnych i zwierzęcych (Tab. II - XII).

### FABER (*patientFriendly Allergen Nano-Bead Array*; CentriAssociati di AllergologiaMolecolare CAAM allergy, Włochy)

FABER jest testem *in vitro* przeznaczonym do pomiaru poziomu swoistej IgE w surowicy lub osoczu ludzkim. Został wprowadzony do diagnostyki w 2016 roku [11]. FABER jest testem immunoenzymatycznym w fazie stałej, opartym o technologię wykorzystującą nanocząstki (nanokulki) jako nośniki alergenów. Dzięki tej technologii test FABER jest testem modyfikowalnym oraz ma możliwości wymiany jednych molekuł alergenowych na inne, w kolejnych generacjach testu, w miarę pojawiania się nowych doniesień naukowych o ich istotności klinicznej oraz odkrywania nowych molekuł alergenowych [12].

Tabela II. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER – pyłki traw. [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów]  
Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Pyłki traw		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Trawa bermudzka	Cyn d / ekstrakt	E		
	Cyn d 1 / β-ekspansyna	R	N	
Pyłek życicy	Lol p / ekstrakt			E
	Lol p 1 / β-ekspansyna	N		N
<i>Paspalum notatum</i>	Pas n / ekstrakt	E		
Tymotka łąkowa	Phl p / ekstrakt			E
	Phl p 1 / β-ekspansyna,	R	R	R
	Phl p 2 / ekspansyna	R	R	R
	Phl p 4 / Berbarine bridge eznyne		N	
	Phl p 5.0101 / Trawy grupa 5/6	R	R	R
	Phl p 6 / Trawy grupa 5/6	R	R	R
	Phl p 7 / Polkalcyna	R	R	R
	Phl p 11 / grupa Ole e 1		R	
	Phl p 12 / Profilina	R	R	
Trzcina pospolita	Phr c / ekstrakt	E		
Pyłek żyta	Sec c_pyłek / ekstrakt	E		

Tabela III. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER – pyłki drzew [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Pyłki drzew		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Akacja	Aca m / ekstrakt	E		
Bożodrzew gruczołowaty	Ail a / ekstrakt	E		
Olsza czarna	Aln g 1 / PR-10	R	R	
	Aln g 4 / Polkalcyna	R		
Brzoza	Bet v / ekstrakt			E
	Bet v 1 / PR-10	R	R	R
	Bet v 2 / Profilina	R	R	R
	Bet v 6 / reduktaza izoflawonowa	R	R	
Morwa papierowa	Bro pa / ekstrakt	E		
Leszczyna	Cor a pyłek / ekstrakt	E		E
	Cor a 1.0103 / PR-10	R	R	R
Cedr japoński	Cry j / ekstrakt			E
	Cry j 1 / liaza pektynowa	R	N	
Cyprys arizoński	Cup s / ekstrakt	E		
	Cup a 1 / liaza pektynowa	N	N	N
Buk zwyczajny	Fag s 1 / PR-10	R		
Dąb biały	Que a / ekstrakt			E
Jesion wyniosły	Fra e / ekstrakt	E		
	Fra e 1 / rodzina Ole e 1	R		
Orzech włoski	Jug r pyłek / ekstrakt	E		
Jałowiec	Jun a / ekstrakt	E		
Morwa czerwona	Mor r / ekstrakt	E		
Oliwka europejska	Ole e / ekstrakt			E
	Ole e 1 / odzina Ole e 1	N	R	N
	Ole e 2 / profilina			R
	Ole e 7 / nsLTP		N	
	Ole e 9 / 1,3 β Glukanaza	R	R	
Palma daktylowa	Pho d 2 / profilina	N		
Platan klonolistny	Pla a / ekstrakt			E
	Pla a 1 / inhibitor inwertazy	R	R	R
	Pla a 2 / poligalakturonaza	N		
	Pla a 3 / nsLTP	R	R	
Topola czarna	Pop n / ekstrakt	E		
Wiąz pospolity	Ulm c / ekstrakt	E		

Tabela IV. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER – pyłki chwastów [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Pyłki chwastów		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Szarłat szorstki	Ama r / ekstrakt	E		
Ambrozja bylicolistna	Amb a / ekstrakt	E		E
	Amb a 1 Liaza pektynowa	R	N	N
	rAmb a 4 / defensyna roślinna	R		
Bylica pospolita	Art v / ekstrakt	E		E
	Art v 1 / defensyna roślinna	R	N	N
	Art v 3 / nsLTP	R	N	
Konopie siewne	Can s / ekstrakt	E		
	Can s 3 / nsLTP	R		
Komosa biała	Che a / ekstrakt	E		
	Che a 1 / rodzina Ole e 1	R	R	
Szczyr roczny	Mer a 1 / profilina	R	R	R
Pomurnik / parietaria	Par j / ekstrakt	E		E
	Par j 2 / nsLTP	R	R	R
Babka lancetowata	Pla l / ekstrakt	E		
	Pla l 1 / rodzina Ole e 1	R	R	
Solanka kolczysta	Sal k / ekstrakt	E		
	Sal k 1 / metyloesteraza pektynowa	R	N	
Pokrzywa zwyczajna	Urt d / ekstrakt	E		

Tabela V. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER – roztocze kurzu domowego, roztocze magazynowe i karaluchy [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Roztocze kurzu domowego i roztocze magazynowe		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
<i>D. farinae</i>	Der f 1 / proteaza cysteinowa	R	N	N
	Der f 2 / rodzina NPC2	R	R	N
<i>D. pteronyssinus</i>	Der p / ekstrakt			E
	Der p 1 / proteaza cysteinowa	R	N	N
	Der p 2 / rodzina NPC2	R	R	N
	Der p 5 / nieznana	R		
	Der p 7 / roztocze grupa 7	R		R
	Der p 9 / proteaza serynowa			N
	Der p 10 / tropomiozyna	R	R	R
	Der p 11 / miozyna, łańcuch ciężki	R		
	Der p 20 / kinaza argininowa	R		
	rDer p 21 / nieznana	R		
	Der p 23 / białko z domeną perytropinopodobną	R	R	R
<i>Euroglyphus maynei</i>	Eur m 2 / roztocze Grupa 2			R
<i>Acarus siro</i>	Aca s / ekstrakt			
<i>Blomia tropicalis</i>	Blo t 5 / roztocze grupa 5	R	R	
	Blo t 10 / tropomiozyna	R		
	Blo t 21 / nieznana	R		
<i>Glycyphagus domesticus</i>	Gly d 2 / rodzina NPC2	R		
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	Lep d 2 / rodzina NPC2	R	R	
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	Tyr p / ekstrakt	E		
	Tyr p 2 / rodzina NPC2	R		
Karaluchy		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Karaluch, Karaczan prusak	Bla g / ekstrakt			E
	Bla g 1 / karaluchy grupa 1	R	R	R
	Bla g 2 / proteaza aspartylowa	R	R	R
	Bla g 4 / lipokalina	R		R
	Bla g 5 / S-transferaza glutationowa	R	R	R
	Bla g 7 / tropomiozyna		N	
	Bla g 9 / kinaza argininowa	R		
Karaluch amerykański	Per a / ekstrakt	E		E
	Per a 7 / tropomiozyna	R		R

Tabela VI. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER – mikroorganizmy i zarodniki pleśni [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Mikroorganizmy i zarodniki pleśni		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
<i>Malassezia sympodialis</i>	Mala s 5 / nieznana	R		
	Mala s 6 / cyklofilina	R		
	Mala s 11 / mitochondrialna dysmutaza nadtlenkowa	R		
Drożdże piekarnicze	Sac c / ekstrakt	E		E
<i>Alternaria alternata</i>	Alt a 1 / kwaśna glikoproteina	R	R	R
	Alt a 6 / enolaza	R	R	R
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asp f / ekstrakt			E
	Asp f 1 / rodzina mitogiliny	R	R	
	Asp f 3 / białko peroksysomalne	R	R	
	Asp f 4 / nieznana	R		
	Asp f 6/ mitochondrialna dysmutaza nadtlenkowa	R	R	
<i>Aspergillus restrictus</i>	Asp r 1 / rybotoksyna			N
<i>Candida albicans</i>	Cand a / ekstrakt			E
<i>Cladosporium herbarum</i>	Cla h / ekstrakt	E		E
	Cla h 8 / dehydrogenaza krótkołańcuchowa	R	R	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pen ch / ekstrakt	E		E
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Tri me / ekstrakt			E



Tabela VII. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER - zwierzęta domowe i hodowlane [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Zwierzęta domowe i hodowlane		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Psi mocz (w tym Can f 5)	Can f_mocz psa / ekstrakt	E		
Pies	Can f_Fel d 1 like / sekretoglobina	R		
	Can f 1 / lipokalina	R	R	N
	Can f 2 / ipokalina	R	R	R
	Can f 3 / albumina surowicza	N	N	N
	Can f / lipokalina	R	R	
	Can f 5 / esteraza argininy/kalikreina		R	R
	Can f 6 / lipokalina	R	R	
Świnka morska	Cav p / ekstrakt			E
	Cav p 1 / lipokalina	R		
Kot	Fel d 1 / sekretoglobina	R	R	N
	Fel d 2 / albumina surowicza	N	R	N
	Fel d 4 / lipokalina	R	R	
	Fel d 7 / lipokalina	R		
Mysz domowa	Mus m 1/ lipokalina	N	N	N
	Mus m 4 / albumina surowicza			N
Królik	Ory c 1/ lipokalina	R		
	Ory c 2/ lipokalina	R		
	Ory c 3 / sekretoglobina	R		
	Ory c 6 / albumina surowicza			N
Chomik dzungarski	Phod s 1/ lipokalina	R		
Chomik europejski	Cri c / ekstrakt			E
Szczur wędrowny	Rat n / ekstrakt	E		
	Rat n 1/ lipokalina			N
	Rat n 4 / albumina surowicza			N
Krowa, nabłonek	Bos d 2/ lipokalina	R		
Nabłonek, kozi	Cap h_nabłonek / ekstrakt	E		
Nabłonek, koński	Equ c 1/ lipokalina	R	R	
	Equ c 3 / albumina surowicza	N	N	N
	Equ c 4 / laferyna	R		
Koń	Equ c Myoglobin / mioglobina			N
Nabłonek, owczy	Ovi a_nabłonek / ekstrakt	E		
Owca domowa	Ovi a 6 / albumina surowicza			N
Nabłonek, świni	Sus d_nabłonek / ekstrakt	E		

Tabela VIII. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER – pokarmy pochodzenia roślinnego [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Pokarmy pochodzenia roślinnego		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Orzech arachidowy	Ara h 2 / albumina 2S	R	R	N
	Ara h 3 / globulina 11S	N	R	N
	Ara h 6 / albumina 2S	N	N	N
	Ara h 8 / PR-10	R	R	R
	Ara h 9 / nsLTP	R	R	N
	Ara h 15 / oleozyna	R		
	Ara h Aglutynina / aglutynina, Lektyny			N
Ciecierzycza	Cic a / ekstrakt	E		E
Soja	Gly m 4 / PR-10	R	R	
	Gly m 5 / globulina 7/8S	R	N	
	Gly m 6 / globulina 11S	N	N	
	Gly m 8 / albumina 2S	N		
	Gly m 1 / nsLTP			N
	Gly m Aglutynina / aglutynina, Lektyny			N
	Gly m TI / inhibitor trypsyny			N
Soczewica	Len c / ekstrakt	E		E
Fasola biała	Pha v / ekstrakt	E		E
Groszek zielony	Pis s / ekstrakt	E		
	Pis s 3 / enolaza			N
Owies	Ave s / ekstrakt	E		
Komosa ryżowa	Che q / ekstrakt	E		E
Gryka zwyczajna	Fag e / ekstrakt	E		E
	Fag e 2 / albumina 2S	N	N	
Jęczmień	Hor v / ekstrakt	E		E
Nasiona łubinu	Lup a / ekstrakt	E		E
Ryż	Ory s / ekstrakt	E		E
Proso	Pan m / ekstrakt	E		
Żyto	Sec c_mąka / ekstrakt	E		
Pszenica zwyczajna	Tri a 14 / nsLTP	R	R	E
	Tri a 19 / Omega-5-Gliadyna	R	R	
	Tri a aA_TI / Inhibitor $\alpha$ -amylazy i trypsyny	N	N	
	Tri a Gliadin / Gliadyna			N
	Tri a 7k-LTP / nsLTP			N
	Tri a 18 / rodzina hewein			N

	Tri a 28 / inhibitor $\alpha$ -amylazy			N
Pszemica orkisz	Tri s / ekstrakt	E		
Amarantus	Ama cr / ekstrakt			E
Len zwyczajny	Lin us / ekstrakt			E
Szarańczyn strąkowy	Cer si / ekstrakt			E
Kukurydza	Zea m / ekstrakt	E		E
	Zea m 14 / nsLTP	R		N
Papryka	Cap a / ekstrakt	E		
Kminek	Car c / ekstrakt	E		
Oregano	Ori v / ekstrakt	E		
Pietruszka	Pet c / ekstrakt	E		
Anyż	Pim a / ekstrakt	E		
Gorczyca	Sin a / ekstrakt	E		E
	Sin a 1 / albumina 2S	E		
Kiwi zielone	Act d / ekstrakt			E
	Act d 1 / proteaza cysteinowa	N	N	N
	Act d 2 / TLP	N	N	N
	Act d 5 / kiwelina	N	N	N
	Act d 8 / PR-10		R	
	Act d 10 / nsLTP	N		N
Kiwi złote	Act c / ekstrakt			E
	Act c 11 / PR-10			N
	Act c / chitinaza IV			N
Papaja	Car p / ekstrakt	E		
	Cari p chymopapaina / proteaza cysteinowa			N
	Cari p papaina / proteaza cysteinowa			N
Pomarańcza	Cit s / ekstrakt	E		
Mandarynka	Cir c / ekstrakt			E
Melon	Cuc m / ekstrakt			E
	Cuc m 2 / profilina	R		
Figa	Fic c / ekstrakt	E		
Truskawka	Fra a - ekstrakt			E
	Fra a 1 + Fra a 3 / PR-10+LTP	R		
Jabłko	Mal d / ekstrakt			E
	Mal d 1 / PR-10	R	R	R
	Mal d 2 / TLP	N		
	Mal d 3 / nsLTP	R		

Mango	Man i / ekstrakt	E		
Banan	Mus a / ekstrakt	E		
Wiśnia	Pru av / ekstrakt	E		
Brzoskwinia (skórka)	Pru p / ekstrakt			E
Brzoskwinia (miąższ)	Pru p / ekstrakt			E
Brzoskwinia	Pru p 1 / PR-10		R	
	Pru p 3 / nsLTP	R	R	R
	Pru p 7 / białko regulujące gibereliny			N
Morela	Pru ar / ekstrakt			E
Granat	Pun g / ekstrakt			E
	Pun g 1 / nsLTP			N
	Pun g 5 / rodzina Hewein			N
	Pun g 7 / białko regulujące gibereliny			N
Gruszka	Pyr c / ekstrakt	E		
Borówka czarna	Vac m / ekstrakt	E		
Winogrona	Vit v / ekstrakt			E
	Vit v 1 / nsLTP	N		
Cebula	All c / ekstrakt	E		E
Czosnek	All s / ekstrakt	E		E
Seler	Api g 1 / PR-10	R	R	R
	Api g 2 / nsLTP	R		
	Api g 6 / nsLTP	R		
Marchew	Dau c / ekstrakt	E		E
	Dau c 1 / PR-10	R		
Awokado	Pers a / ekstrakt	E		E
Ziemniak	Sol t / ekstrakt	E		E
	Sola t 1 / patatyna			N
Pomidor	Sola l / ekstrakt	E		
Pomidor miąższ	Sola l / ekstrakt			E
Pomidor nasiona	Sola l / ekstrakt			E
Pomidor	Sola l 6 / nsLTP	N		N
Por	All p / ekstrakt			E
Szparag	Aspa o / ekstrakt			E
Burak zwyczajny (liście)	Beta v / ekstrakt			E
Ogórek	Cuc s / ekstrakt			E
Koper włoski (bulwa)	Foe v / ekstrakt			E
Sałata	Lac s / ekstrakt			E

Bakłażan	Sala m / ekstrakt			E
Szpinak	Spi o / ekstrakt			E
Orzech nerkowca	Ana o / ekstrakt	E		
	Ana o 2 / globulina 11S	R	R	
	Ana o 3 / albumina 2S	R	R	R
Orzech brazylijski	Ber e / ekstrakt	E		E
	Ber e 1 / albumina 2S	N	R	
Orzech piniowy	Pin p / ekstrakt			E
Orzech pekan	Car i / ekstrakt	E		
Orzech laskowy	Cor a 1.0401 / PR-10	R	R	
	Cor a 8 / nsLTP	R	R	N
	Cor a 9 / globulina 11S	N	N	N
	Cor a 11 / lobulina 7/8S	N		R
	Cor a 14 / albumina 2S	N	R	
Orzech włoski	Jug r 1 / albumina 2S	N	R	
	Jug r 2 / globulina 7/8S	N		N
	Jug r 3 / nsLTP	R	N	N
	Jug r 4 / globulina 11S	N		
	Jug r 6 / globulina 7/8S	N		
Makadamia	Mac i / ekstrakt	E		
	Mac i_2S Albumina / albumina 2S	N		
Pistacja	Pis v ekstrakt			E
	Pis v 1 / albumina 2S	R		
	Pis v 2 / podjednostka 11S Globuliny	N		
	Pis v 3 / globulina 7/8S	N		
Kasztan jadalny	Cas s / ekstrakt			E
Migdał	Pru du / ekstrakt	E		E
Nasiona dyni	Cuc p / ekstrakt	E		
Nasiona słonecznika	Hel a / ekstrakt	E		
Nasiona maku	Pap s / ekstrakt	E		
	Pap s_2S Albumina / albumina 2S	N		
Sezam	Ses i / ekstrakt	E		E
	Ses i 1 / albumina 2S	N	N	
Nasiona kozieradki pospolitej	Tri fo / ekstrakt	E		

Tabela IX. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER – pokarmy pochodzenia zwierzęcego i Alpha Gal [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Pokarmy pochodzenia zwierzęcego		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Mleko krowie	Bos d_mleko / ekstrakt	E		E
	Bos d 4 / $\alpha$ -laktoalbumina	N	N	N
	Bos d 5 / $\beta$ -laktoglobulina	N	N	N
	Bos d 8 / kazeina	N	N	N
	Bos d lactoferrin / transferyna		N	N
Mleko ośle	Equ as / ekstrakt			E
Mleko woła domowego	Bub b / ekstrakt			E
Mleko wielbłądzie	Cam d / ekstrakt	E		E
Mleko kozie	Cap h_mleko / ekstrakt	E		E
Mleko końskie	Equ c_mleko / ekstrakt	E		E
Mleko owcze	Ovi a_mleko / ekstrakt	E		E
Białko jaja kurzego	Gal d_białko jaja kurzego / ekstrakt	E		E
	Gal d 1 / owomukoid	N	N	N
	Gal d 2 / owoalbumina	N	N	N
	Gal d 3 / owotransferyna	N	N	N
	Gal d 4 / lizozym typu C	N		N
Żółtko jaja kurzego	Gal d_żółtko jaja kurzego / ekstrakt	E		E
	Gal d 5 / albumina surowicza/alpha-livetin	N	N	N
Jajo kacze	Ana p / ekstrakt			E
Jajo indyjskie	Mel g / ekstrakt			E
Bocznik ostrygowaty	Ple o / ekstrakt			E
<i>Anisakis pegreffii</i>	Ani pe / ekstrakt			E
<i>Anisakis simplex</i>	Ani s 1 / inhibitor proteazy serynowej	R	R	R
	Ani s 3 / tropomiozyna	R	R	R
Krab	Chi spp. / ekstrakt	E		
Śledź atlantycki	Clu h / ekstrakt	E		
	Clu h 1 / $\beta$ -parwalbumina	N		
Garnela pospolita	Cra c 6 / troponina C	R		
Karp	Cyp c 1 / $\beta$ -parwalbumina	R		
Dorsz atlantycki	Gad m / ekstrakt	E		E
	Gad m 1 / $\beta$ -parwalbumina	N	R	
	Gad m 2+3 / $\beta$ -Enolase&Aldolase	N		
Homar	Hom g/Hom g / ekstrakt	E		E
Krewetka	Lit s / ekstrakt	E		
	Pan b / ekstrakt	E		
Krewetka tygrysia	Pen m 1 / tropomiozyna	N	N	
	Pen m 2 / kinaza argininowa	R	N	
	Pen m 3 / miozyna, łańcuch lekki	R		

	Pen m 4 / białko sarkoplazmatyczne wiążące wapń	R	N	
Krewetka biała	Lit v 1 / tropomiozyna			N
Kałamarnica	Lol spp / ekstrakt	E		
Ośmiornica zwyczajna	Oct v / ekstrakt			E
Omulek	Myt e / Myt g / ekstrakt	E		E
Ostryga	Ost e / ekstrakt	E		
Kalmar	Uro du 1 / tropomiozyna			N
Małż	Pec spp. / ekstrakt	E		
	Rud spp. / ekstrakt	E		
	Ven ga 1 / tropomiozyna			N
Ślimak	Hel as 1 / tropomiozyna			N
Płaszczka kolczasta	Raj c / ekstrakt	E		
	Raj c_Parwalbumina / $\alpha$ -parwalbumina	R		
Łosoś	Sal s / ekstrakt	E		E
	Sal s 1 / $\beta$ -parwalbumina	R		
Makrela atlantycka	Sco s / ekstrakt	E		
	Sco s 1 / $\beta$ -parwalbumina	R		
Tuńczyk	Thu a / ekstrakt	E		E
	Thu a 1 / $\beta$ -parwalbumina	R		
Miecznik	Xip g 1 / $\beta$ -parwalbumina	R		
Morszczuk zwyczajny	Mer mr 1 / parwalbumina			N
Sardela europejska	Eng e / ekstrakt			E
Sola zwyczajna	Sol so / ekstrakt			E
Świerszcz domowy	Ach d / ekstrakt	E		
Wołowina	Bos d mięso / ekstrakt	E		E
	Bos d 6 / albumina surowicza BSA	N	N	N
	Bos d Gelatin / żelatyna			N
Mięso, końskie	Equ c mięso / ekstrakt	E		
Mięso, kurze	Gal d mięso / ekstrakt	E		E
Szarańcza wędrowna	Loc m / ekstrakt	E		
Mięso indycze	Mel g / ekstrakt	E		E
Mięso królicze	Ory mięso / ekstrakt	E		E
Mięso owcze	Ovi a mięso / ekstrakt	E		E
Wieprzowina	Sus d mięso / ekstrakt	E		E
	Sus d 1 / albumina surowicza	R		N
Mącznik młynarek	Ten m / ekstrakt	E		
<b>Alpha Gal</b>		<b>ALEX<sup>2</sup></b>	<b>ISAC<sub>E112i</sub></b>	<b>FABER</b>
Alpha Gal	Alpha -Gal / Gal-alpha-1,3-Gal		N	
Marker alfa-Gal	Bos d CA			N

Tabela X. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112r</sub>, FABER – owady i jady owadów [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Owady i jady owadów				
Mrówka ognista	Sol spp. / ekstrakt	E		
Jad pszczeleli	Api m / ekstrakt	E		
	Api m 1 / fosfolipaza A2	N		N
	Api m 4 / melityna			N
	Api m 10 / ikarapina wariant 2	R		
Jad szerszenia	Dol spp / ekstrakt	E		
Jad kłecanki rdzaworożnej	Pol d / ekstrakt	E		E
	Pol d 5 / antygen 5	R		
Jad osy pospolitej	Ves v / ekstrakt	E		E
	Ves v 1 / fosfolipaza A1	R		
	Ves v 5 / antygen 5	R		
Komar	Aed c / ekstrakt			E
Europejski obrzeżek gołębi	Arg r 1/ lipokalina	R		

Tabela XI. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112r</sub>, FABER – latex [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

Latex, fikus		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Lateks	Hev b / ekstrakt			E
	Hev b 1 / REF (czynnik wydłużania gumy)	R	R	R
	Hev b 3 / SRPP (białko małych cząsteczek gumy)	R	R	R
	Hev b 5 / nieznaną	R	R	R
	Hev b 6.02 / proheweina	R	R	R
	Hev b 7.02 / patatyna			R
	Hev b 8 / profilina	R	R	R
	Hev b 10 / SOD, Fe/Mn-SOD			R
	Hev b 11 / chitynaza klasy I	R		R
Fikus	Fic b / ekstrakt	E		



Tabela XII. Zestawienie składu alergenowego testów ALEX<sup>2</sup>, ISAC<sub>E112i</sub>, FABER – markery CCD i albumina surowicy ludzkiej [dane uzyskane od producentów/dystrybutorów testów].

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

markery CCD		ALEX <sup>2</sup>	ISAC <sub>E112i</sub>	FABER
Homolog ludzkiej laktoferyny	Hom s LF / CCD marker	R		R
Bromelaina ananasa	Ana c 2 / CCD marker			N
Peroksydaza chrzanowa	Arm r HRP / CCD marker			N
CCD	MUXF3 / CCD marker		N	
<b>Człowiek</b>				
Człowiek	Hom s HSA / albumina surowicza			N

Nanocząstki to według aktualnej definicji cząstki, których przynajmniej jeden wymiar mieści się w zakresie od 1 do 100 nm. Mogą one powstać naturalnie (w efekcie erozji skał lub związków organicznych), mogą być to produkty uboczne działalności człowieka, lub mogą być tworzone celowo nanocząstki o żądanej wielkości i strukturze (tzw. nanocząstki projektowane). Nanocząstki projektowane mogą być wytwarzane z różnych materiałów: złota, srebra, platyny, węgla, kobaltu, miedzi, krzemu i innych materiałów. Aktualnie nanocząstki są coraz częściej wykorzystywane w medycynie; zarówno w diagnostyce jak i terapii. Leki i testy diagnostyczne, wykorzystujące tę technologię wpisują się w trend medycyny spersonalizowanej [13].

Charakterystyczną cechą nanocząstek jest wysoki stosunek powierzchni do objętości cząsteczki ( $6 \times 10^8 \text{ m}^{-1}$  dla nanocząstek o średnicy 10nm), dzięki czemu na niewielkiej powierzchni podłoża stałego można umieścić znaczne ilości nanocząsteczek. Stosunek ten jest tym większy im mniejsza jest średnica nanocząstki. W zależności od materiału, nanocząstki mają zdolność wiązania na swojej powierzchni różnych molekuł biologicznych (np. alergenów), dzięki czemu stają się ich nośnikami. Proces pozyskiwania cząstek o pożądanych własnościach fizycznych i chemicznych lub biologicznych określa się mianem funkcjonalizacji. Funkcjonalizacja wpływa na zdolność oddziaływania nanocząstek z określonymi substancjami chemicznymi lub biologicznymi [14].

Nanocząstki, będące nośnikami różnych biomolekuł (np. alergenów) można unieruchamiać w fazie stałej (np. na określonym podłożu reakcyjnym), co daje możliwość tworzenia złożonych testów fazy stałej do diagnostyki *in vitro*. Na jednym podłożu fazy stałej można unieruchamiać nanocząstki, będące nośnikami różnych biomolekuł, co umożliwi konstruowanie złożonych platform testowych przeznaczonych do jednoczesowej multianalizy, wykonanej w niewielkiej objętości materiału biologicznego (np. surowicy krwi pacjenta). Możliwa jest również wymiana pojedynczych nanocząsteczek, nośników określonej substancji (np. alergenu), w teście na inne, a co za tym idzie skład skonstruowanych w oparciu o takie nanokulki testów wieloparametrowych można modyfikować w zależności od potrzeb, w miarę tworzenia kolejnych edycji testu. Ponadto istotne jest, że czynniki funkcjonalizujące (np. alergeny) nanoszone są na powierzchnię nanocząstek przed ich unieruchomieniem w fazie stałej, co powoduje, iż możliwe

jest zastosowanie najbardziej optymalnych warunków, koniecznych do ich naniesienia na powierzchnię nanokulki. W odniesieniu do testów, służących do oznaczania sIgE, koniugację alergenów z nanokulkami przeprowadza się przy użyciu zoptymalizowanych, dla konkretnych alergenów protokołów, uwzględniających ich cechy biochemiczne. Ponadto kontrolowana jest funkcja związanych alergenów i, gdy to konieczne, stosuje się kombinację różnych warunków unieruchomienia, w celu zwiększenia liczby epitopów dostępnych na powierzchni cząsteczki i użytecznych do poprawy wydajności wykrywania swoistego IgE w materiale badanym. Dodatkowo ze względu na małe rozmiary nanocząstek możliwe jest osiągnięcie dużej gęstości tych nośników na małej powierzchni matrycy testu, co również zwiększa jego wydajność [12,14, 15,16]. W diagnostyce mutiparametrowej alergii technologię tę zastosowano w dwóch dostępnych platformach diagnostycznych – teście FABER i teście ALEX, które omówiono poniżej.

**FABER (FABER 244)** jest nowym, zaawansowanym multipleksowym testem immunologicznym *in vitro*, opartym o technikę nanotechnologii, służącym do pomiaru poziomu swoistego IgE we krwi. Na matrycy testu naniesiono 244 alergeny, w tym 122 komponenty alergenowe oraz 122 pełne ekstrakty alergenowe (Tab. II - XII) sprzężone z chemicznie aktywowanymi nanocząstkami. Badanie jest wykonywane w 100  $\mu\text{l}$  surowicy lub osocza pacjenta. Poziom swoistych IgE, oznaczonych w teście FABER, wyrażony jest w jednostkach arbitralnych testu (FIU). Wartości  $\leq 0,01$  FIU/ml są uważane za ujemne, poziomy sIgE w przedziale  $>0,01$  do  $<0,30$  FIU/ml uważa się za wątpliwe, zaś wartości  $\geq 0,30$  FIU/ml traktowane są jako dodatnie. Interpretacja testu jest wspierana przez centralny system raportowania cyfrowego (system dynamicznej wizualizacji online). System ten stanowi dla pacjenta źródło informacji o wykrytych alergenach i komponentach alergenowych, dla których zaobserwowano dodatnie poziomy swoistych IgE, co ułatwia pacjentowi zrozumienie wyniku badania [16].

#### **ALEX (ALLERGY EXPLORER, MacroArray Diagnostics GmbH (MADx), Wiedeń, Austria)**

ALEX jest to immunologiczny, mikromacierzowy test oparty na nanotechnologii. Jest najnowszym multipleksowym testem do diagnostyki alergologicznej *in vitro*. Dzięki zastosowaniu technologii nanokulek test ALEX jest testem modyfikowalnym, podobnie jak FABER. Ma on możliwość

wymiany jednych molekuł alergenowych na inne w kolejnych generacjach testu, w miarę pojawiania się nowych doniesień naukowych o ich istotności klinicznej oraz odkrywania nowych molekuł alergenowych. Jedną z głównych wartości dodanych ALEX jest możliwość jednoczesnego pomiaru stężenia swoistych IgE dla całych ekstraktów alergenowych jak i odpowiednich molekuł alergenowych oraz całkowitej immunoglobuliny E [23].

Pierwsza wersja testu ALEX została wprowadzona do diagnostyki *in vitro* w 2017 roku i dawała możliwość równoczesnego pomiaru stężenia IgE swoistych dla 282 alergenów, w tym dla 126 komponent alergenowych i 156 ekstraktów alergenowych oraz dodatkowo profil ten uzupełniało o znaczenie stężenia całkowitej immunoglobuliny E. Aktualna wersja testu ALEX<sup>2</sup>, dostępna od 2019 roku, umożliwia jednoczesny pomiar stężenia swoistych immunoglobulin E dla 295 alergenów, w tym 178 molekuł i 117 ekstraktów, pochodzących z większości rodzin aeroalergenów i alergenów pokarmowych reagujących krzyżowo (tab. II -XII). Istotną cechą testu ALEX<sup>2</sup> nadal pozostaje możliwość jednoczesnego pomiaru stężenia zarówno swoistych IgE dla ekstraktów i komponent alergenowych jak i stężenia całkowitej immunoglobuliny E (tIgE) we krwi. ALEX (ALEX<sup>2</sup>) jest testem ilościowym w odniesieniu do swoistych IgE i półilościowym dla całkowitej IgE. Zmierzony stężenie immunoglobulin wyrażone jest w kU<sub>A</sub>/L dla sIgE oraz kU/L dla tIgE. Zakres pomiarowy testu ALEX dla specyficznej IgE wynosi 0,3-50 kU<sub>A</sub>/L, a dla całkowitej IgE 1-2500 kU/L. Wyniki dla IgE swoistych wyrażone zostały w klasach 0-4, gdzie poszczególnym klasom przypisano stężenia sIgE odpowiednio: klasa 0 (<0,3 kU<sub>A</sub>/L; wynik negatywny lub graniczny), klasa 1 (0,3-1 kU<sub>A</sub>/L; stężenie niskie), klasa 2 (1-5 kU<sub>A</sub>/L; stężenie średnie), klasa 3 (5-15 kU<sub>A</sub>/L; stężenie wysokie) i klasa 4 (>15 kU<sub>A</sub>/L; stężenie bardzo wysokie). Test jest wykonywany w 100 μl surowicy lub osocza, za wyjątkiem osocza EDTA. Procedura wykonania zajmuje 3,5 godziny [12,16].

Unikatową cechą testu ALEX (ALEX<sup>2</sup>) jest zastosowanie inhibitora przeciwciał przeciwko krzyżowo reagującym grupom wodorowęglanowym (cross-reacting carbohydrate determinants, CCDs). CCDs są to węglowodanowe reszty glikoprotein (nieobecne w białkach ssaczy), które mogą indukować syntezę swoistych IgE i reagować z nimi, lecz nie są w stanie wywołać degranulacji komórki tucznej. W większości przypadków nie przyczyniają się one do wywołania objawów klinicznych choroby alergicznej oraz nie dają pozytywnych wyników w testach skórnych. Wyjątek stanowić może uczulenie na glikoproteiny zawierające α-1,3-galaktozę, występujące między innymi w ślinie kleszcza. Przeciwciała anti- CCDs mogą stanowić natomiast przyczynę wyników fałszywie dodatnich w testach alergologicznych *in vitro*, co utrudnia kliniczną interpretację wyniku badania laboratoryjnego. Szacuje się, że problem ten może dotyczyć nawet 30% pacjentów. Źródłem CCDs, pobudzającym syntezę swoistych przeciwciał anti-CCD w klasie IgE są najczęściej alergeny pyłków roślin oraz jady owadów błonkoskrzydłych [17,18,19].

Rozwiązaniem problemu przeciwciał anti-CCD jest albo zastosowanie w teście rekombinowanych alergenów, pozbawionych determinant węglowodanowych na skutek braku obróbki potranslacyjnej lub dodanie nadmiaru glikokoniugatów, konkurujących z wiązaniem przeciwciał anti-CCD (bloker anti-CCD). Stosowanie blokera/inhibitora przeciwciał anti-CCD ma na celu związanie znajdujących

się w materiale badanym przeciwciał IgE przeciwko reagującym krzyżowo grupom węglowodanowym, co ostatecznie ma ograniczyć ilość uzyskiwanych w teście wyników fałszywie dodatnich. Odczynnik blokujący zawiera zwykle mieszaninę cząsteczek CCD pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, które wiążą swoiste względem siebie przeciwciała. IgE anti-CCD związane z wolnymi CCDs (CCDs/IgE anti-CCD) zostają w tej postaci usunięte z płytki testowej w kolejnych etapach płukania, przewidzianych procedurą testu. Inhibitor grup CCD musi być tak skonstruowany, aby nie blokował przeciwciał innych niż anti-CCD. Dlatego, pomimo iż możliwe byłoby zastosowanie dowolnych glikoprotein pochodzenia roślinnego, to znacznie lepiej sprawdzają się w tej funkcji inhibitory zawierające syntetyczne grupy CCD [20]. W teście ALEX (ALEX<sup>2</sup>) zastosowano syntetyczny bloker przeciwciał anti-CCD (ProGlycAn CCD-Blocker), będący wysokooczyszczoną glikoproteiną bromelajny, poddaną częściowej proteolizie (dzięki której zawiera nie więcej niż 4 reszty aminokwasowe), którą sprzężono z albuminą surowicy ludzkiej. Taka konstrukcja gwarantuje brak epitopów dla sIgE innych niż CCD oraz, dzięki zastosowaniu jako nośnika albuminy surowicy ludzkiej, pozwala uniknąć wiązania przeciwciał IgE innych niż anti-CCD [21].

Standardowa procedura testu ALEX (ALEX<sup>2</sup>) przewiduje inkubację surowicy zmieszanej z inhibitorem przeciwciał anti-CCD na płycie testowej bez wcześniejszego przygotowania. W tych warunkach skuteczność hamowania przeciwciał anti-CCD wynosi 85%. Jednakże wprowadzenie dodatkowej, trwającej 30 minut, inkubacji próbki z odczynnikiem blokującym przed właściwą procedurą testu ALEX (ALEX<sup>2</sup>) zwiększa skuteczność blokowania przeciwciał anti-CCD obecnych w materiale badanym do 95% [22].

Detekcja płytek testu ALEX (ALEX<sup>2</sup>) przeprowadzana jest za pomocą dedykowanego urządzenia obrazującego ImageXplorer, współpracującego z oprogramowaniem analitycznym Raptor (MADxRaptor Software). Raptor przeprowadza analizę ilościową dla alergenowo-swoistych IgE (sIgE) oraz półilościową analizę dla całkowitej IgE (tIgE) oraz generuje wynik [23]. Wynik testu dodatkowo automatycznie wzbogacony jest krótkim opisem własności komponent reagujących krzyżowo, dla których stwierdzono obecność swoistych przeciwciał IgE. Jest to narzędzie wspomagające interpretację uzyskanego wyniku.

### Przydatność testów wieloparametrowych

Alergologia molekularna (MA) znacznie poprawiła jakość diagnostyki alergii, dając możliwość odróżnienia prawdziwych uczuleń od reakcji krzyżowych, wyboru immunoterapii swoistej dla alergenu i stratyfikacji ryzyka w przypadku alergii pokarmowej [24]. Zastosowanie diagnostyki wieloparametrowej, w oparciu o szerokie platformy diagnostyczne, jako pierwszego badania dodatkowego, przed testami skórnymi i diagnostyką opartą o oznaczenie pojedynczych swoistych IgE w surowicy może, z kolei, wydatnie skrócić czas konieczny do postawienia diagnozy i podjęcia skutecznego leczenia [25].

Aktualnie dysponujemy szeroką gamą komponent alergenowych, dostępnych do diagnostyki monokomponentowej oraz testami do diagnostyki wieloparametrowej. W zależności od historii klinicznej pacjenta skorzystać możemy albo z testów zawierających w składzie od kilku do kilkudziesięciu alergenów albo z multiparametrowych platform

diagnostycznych (kilkaset alergenów w jednym teście). Krótkie panele wieloalergenowe, zawierające optymalne kombinacje odpowiednich składników danego źródła alergenowego, stanowią dobry wybór w przypadku dobrze zdefiniowanej, podejrzewanej przyczyny alergii lub kwalifikacji do immunoterapii. Każdy profil tego typu jest zazwyczaj dobrze dostosowany do konkretnego wskazania. W przypadkach uczulenia na wiele alergenów z różnych źródeł lepsze będzie zastosowanie platform kilkaset alergenowych (ISAC, ALEX, FABER).

Aktualnie możemy zastosować multipleksy, umożliwiające oznaczenie sIgE tylko dla komponent alergenowych (ISAC/ISAC<sub>E112i</sub>) lub takie, które łączą w sobie tradycyjną diagnostykę opartą o ekstrakty alergenowe z nowoczesną diagnostyką komponentową (FABER), bądź też umożliwiającą jednoczesny pomiar stężenia swoistych IgE dla ekstraktów alergenowych, molekuł alergenowych i całkowitego stężenia IgE (ALEX/ALEX<sup>2</sup>). Wybór testu powinien opierać się o dane pochodzące z wywiadu klinicznego i historii choroby pacjenta. Składy alergenowe platform do diagnostyki molekularnej alergii nie są takie same (tab. II - XII). Test zawsze powinien być dobierany do indywidualnych potrzeb danego pacjenta, szczególnie jeśli weźmie się pod uwagę, iż diagnostyka molekularna alergii pozwala na indywidualne podejście do chorego, wpisujące się w popularny aktualnie kanon medycyny spersonalizowanej. Połączenie diagnostyki opartej o pełne ekstrakty z diagnostyką komponentową dodatkowo uzupełnione o całkowite stężenie

IgE, wydaje się mieć ogromne znaczenie w zindywidualizowanej diagnostyce pacjenta alergicznego, pozwalając stworzyć pełen profil choroby i opracować plan terapeutyczny dostosowany do potrzeb danej osoby.

Według Alessandri i wsp. [12] idealny system do diagnostyki alergii *in vitro* powinien zawierać wszystkie białka o potencjale alergizującym, na które może być narażony pacjent. Każda komponenta alergenowa powinna zawierać wszystkie epitopy, które mogą być rozpoznawane przez swoiste IgE. Dodatkowo cząsteczki te w czasie prowadzenia procedury analitycznej powinny być dostępne z każdej strony, aby umożliwić reakcję wszystkich epitopów danego antygeny ze swoistymi przeciwciałami. Ponadto każdy system powinien być łatwo modyfikowalny i wolny od czynników powodujących zarówno reakcje fałszywie dodatnie jak i fałszywie ujemne. W rzeczywistości osiągnięcie takiego idealnego stanu jest niestety niemożliwe.

Aktualnie dostępny jest szeroki wachlarz różnych testów do diagnostyki chorób alergicznych *in vitro*, aby móc w pełni wykorzystać ten potencjał, należy doskonale orientować się w możliwościach poszczególnych, współcześnie oferowanych testów. Dlatego wiedza o aktualnych możliwościach diagnostycznych, zastosowanej technologii i panelu alergenowym dostępnych testów multiparametrycznych do diagnostyki molekularnej alergii *in vitro* może być niezwykle użyteczna podczas dobierania możliwie jak najbardziej dopasowanego testu laboratoryjnego do potrzeb określonego pacjenta.

## Piśmiennictwo

- Kleine-Tebbe J, Thilo J. Molecular allergy diagnostics using IgE singleplex determinations: methodological and practical considerations for use in clinical routine. *Allergo J Int* 2015; 24: 185-197.
- Molecular Allergy Diagnostics Innovation for a Better Patient Management. Kleine-Tebb J, Jakob T (ED.), Springer International Publishing, 2017: 111-156, 169-200.
- Schmidta M, Hoffmann DR. Expression systems for production of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 264-270.
- <http://www.allergome.org> dostęp (18.03.2020)
- Templin MF, Stoll D, Schrenk M i wsp. Protein microarray technology. *Trends Biotechnol.* 2002; 20: 160-166.
- Westwood M, Ramaekers B, Lang S i wsp. ImmunoCAP® ISAC and Microtest for multiplex allergen testing in people with difficult to manage allergic disease: a systematic review and cost analysis. *Health Technol Assess* 2016; 20: 1-175.
- <http://www.phadia.com/en-ZA/Products/Software-and-Services/ImmunoCAP-ISAC-Explain/> (18.02.2020)
- Melioli G, Spenser C, Reggiardo G i wsp. Allergenius, an expert system for the interpretation of allergen microarray results. *World Allergy Organ J* 2014; 7: 15-23.
- Bartuzi Z. Diagnostyka molekularna w alergii na pokarmy. *Alergia* 2017; 3: 13-17.
- Bojcukova J, Vlas T, Forstenlechner P i wsp. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clin Transl Allergy* 2019; 9: 31-36.
- Mari A, Alessandri C, Giangrieco I i wsp. Introducing FABER test for allergy diagnosis: food molecule- and extract-based allergenic preparations in the newest and broadest nanotechnology IgE test. [https://www.eaaci.org/meetings/FAAM2016-Abstracts/abstracts/FAAM\\_2016\\_OP11.pdf](https://www.eaaci.org/meetings/FAAM2016-Abstracts/abstracts/FAAM_2016_OP11.pdf). (31.01.2020)
- Alessandri C, Ferrara R, Bernardi ML i wsp. Diagnosing allergic sensitizations in the third millennium: why clinicians should know allergen molecule structures. *Clin Transl Allergy* 2017; 7: 21-29.
- Orzechowska A, Szymańska R. Nanotechnologia z zastosowaniami biologicznymi – wprowadzenie. *Wszechświat* 2016; 117: 60-69.
- Lizoń A, Drożdż R. Nanocząstki metali w zastosowaniach diagnostycznych i terapeutycznych. *Przeg Lek* 2018; 75: 457-463.
- Nikalje AP. Nanotechnology and its applications in medicine. *Med Chem* 2015; 5: 81-89.
- Popescu FD, Vieru M. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules. *World J Methodol* 2018; 8: 17-36.
- Kochuyt AM, Van Hoeyveld EM, Stevens EA. Prevalence and clinical relevance of specific immunoglobulin E to pollen caused by sting-induced specific immunoglobulin E to cross-reacting carbohydrate determinants in Hymenoptera venoms. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 441-447.
- 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; 129: 286-295.
- Altmann F. Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis. *Allergo J Int* 2016; 25: 98-105.
- Majsiak E. Krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe (CCD) i bloker CCD w diagnostyce alergii. *Alergia* 2017; 4: 24-27.
- [www.proglycan.com](http://www.proglycan.com) (19.02.2020)
- ALEX-Product Characteristics [www.macroarraydx.com](http://www.macroarraydx.com) (18.02.2020)
- Heffler E, Puggioni F, Peveri S i wsp. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organ J* 2018; 11: 7-14.
- Villalta D, Tonutti E, Bizzaro N i wsp. Recommendations for the use of molecular diagnostics in the diagnosis of allergic diseases. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2018; 50: 51-58.
- Mothes-Luksch N, Jordakieva G, Hinterhölzl L i wsp. Allergy diagnosis from symptoms to molecules, or from molecules to symptoms: a comparative clinical study. *World Allergy Organ J* 2018; 11: 22-33.