

# TAJEMNICE ZAMKNIĘTYCH DRZWI

CZYLI, CZY WSZYSTKIE TESTY NA ALERGIĘ  
SĄ RÓWNIE PRZYDATNE



CZY SĄ PAŃSTWO GOTOWI, ABY DOWIEDZIEĆ SIĘ WIĘCEJ, CO KRYJE SIĘ ZA TESTAMI NA IMMUNOGLOBULINY SWOISTE IGE, KTÓRE WYKONUJE PACJENT? ILE TAJEMNIC ZA TYM SIĘ KRYJE? NINIEJSZY ROZDZIAŁ JEST POŚWIĘCONY NOWOCZESNEJ LABORATORYJNEJ DIAGNOSTYCE ALERGII, A ZWŁASZCZA JEJ KLUCZOWYM ASPEKTOM. PRZYJRZYMYSIĘ TUTAJ SZĘŚCIU KROKOM PROWADZĄCYM DO IDEALNEGO LUB PRAWIE IDEALNEGO TESTU...

Malkov V.A., ekspert INUIMAI

**P**rawdopodobnie każdy z nas przynajmniej raz w życiu oddawał krew. Procedura wydaje się mało skomplikowana. Pielęgniarka pobiera krew do probówki, podpisuje ją lub nakleja kod kreskowy i umieszcza na statywie. Wszystko jest bardzo proste, ale co dalej? Dokąd trafia badana krew i co się z nią dzieje? Jakie są dalsze etapy procedury diagnostycznej? Niezależnie od tego, jaką czeka ją podróż, cała „tajemnica” odbędzie się za zamkniętymi drzwiami laboratorium...

W moim artykule proponuję dziś zajrzeć przez dziurkę od klucza i dowiedzieć się więcej o losach naszej, kilku mililitrowej „cząsteczki” krwi.

Myślę, że wielu może być zaskoczonych, jak dobrze i pieszczotliwie traktuje się probówki z krwią w laboratorium: zawsze są trzymane tylko pionowo, obracane w wygodnych i precyzyjnych wirówkach i dokładnie monitorowane pod kątem temperatury. Wszystko to jest częścią niezwykle odpowiedzialnego etapu, który naukowo nazywa się „preanalitika”. I każde dbające o wysoką jakość wyników laboratorium diagnostyczne podchodzi do tego procesu z całą powagą i odpowiedzialnością o szczegóły, ponieważ od tego zależy jakość i wartość ostatecznego wyniku, a jeśli procedura zawiedzie, to nawet najlepszy test lub sprzęt nie uratuje naszego badania.

Jednakże jakość testu i procedura wykonania jest równie ważna: ten etap nazywa się analitycznym lub „badaniem bezpośrednim”. I o ile preanalitika wymaga odpowiedzialnego podejścia i ścisłego przestrzegania instrukcji, to w przypadku samego badania pierwszorzędne znaczenie mają technologia i jakość odczynników.

Powinniśmy również zrozumieć, że głównym zadaniem każdego laboratorium, czy to w miejskiej klinice, czy w najnowocześniejszym prywatnym ośrodku, jest kreowanie dochodu. W naszym wypadku daje to tylko dwie opcje: albo wykonać tani test, który będzie praktycznie bezużyteczny dla pacjenta i dla postawienia prawidłowej diagnozy albo przeprowadzić diagnostykę wysokiej jakości, ale koszt w tym drugim przypadku będzie znacznie wyższy. Innymi słowy, cena wykonania analizy w różnych laboratoriach może być taka sama ale ich przydatność wynikająca z jakości wyniku bardzo różna.

Przyjrzyjmy się bliżej różnym systemom testowym do diagnozowania alergii. Specjaliści klinicznej diagnostyki laboratoryjnej wszystkie testy do diagnostyki alergii dzielą na dwie grupy – ImmunoCAP i te nie będące ImmunoCAP (tradycyjnie nazywamy je „panela-

mi”). I nawet nie dlatego, że ImmunoCAP jest uznanym „złotym standardem”, ale dlatego, że różnice w stosunku do wszystkich innych metod dostępnych na rynku, są tak znaczące (więcej o tym w dalszej części), że w rzeczywistości możemy dziś mówić o metodzie ImmunoCAP jako o odrębnym kierunku w alergologii [1].

Czy to naprawdę jest takie skomplikowane? Praktyka laboratoryjna pokazuje – to nie jest proste, ale gdy chodzi o nasze zdrowie, trzeba zacząć myśleć nieco inaczej i starać się spojrzeć na problem szerzej niż zazwyczaj.

Spróbujmy sformułować, jakie są zasadnicze różnice między diagnostyką alergii a wszystkim innym?

Co najważniejsze, nawet jeśli pacjent ma najsilniejsze objawy reakcji alergicznej, we krwi znajduje się bardzo niewiele swoistych przeciwciał przeciwko alergenowi, który wywołał reakcję, a mianowicie 100 000 razy mniej niż na przykład po ospie wietrznej, którą przechorowaliście Państwo 20 lat temu [2]. Dlatego przed producentami testów alergologicznych stoi niezwykle ważne zadanie – nie przegapić, nie przepuścić wykrycia przeciwciał, bo w przeciwnym razie, nie poznawszy przyczyny, „wróg” wygra, a my niestety przegramy. I to wszystko jest bardzo smutne, kiedy chodzi o dorosłych ale niewybaczalne, kiedy chodzi o nasze dzie-

ci. Przecież u najmłodszych pacjentów liczba takich swoistych przeciwciał jest jeszcze mniejsza niż u dorosłych.

Dlatego chcę wspólnie z Państwem przejść przez 6 zasadniczych kroków, zwracając szczególną uwagę na wszystkie krytyczne aspekty, aby zrozumieć na czym polega idealny lub prawie idealny test do diagnozowania alergii.

### KROK 1

#### WSZYSTKO CO GENIALNE, JEST PROSTE!

Tak, po raz kolejny powtarzam to zdanie, ale ono najlepiej oddaje istotę problemu. Istnieje prosta zasada: im większa jest powierzchnia, na której bezpośrednio zachodzi reakcja (miejsce, w którym są rozstawione „pułapki” na przeciwciała alergizujące obecne we krwi), tym bardziej czuły będzie wynik, tj. żaden „wróg” nie przejdzie. Jeśli porównamy standardową jednostkę powierzchni taniego testu (płytki dołkowe do ELISA) z trójwymiarową strukturą ImmunoCAP, to tak, jakby porównać działkę o powierzchni 6 arów z powierzchnią większą niż 12 boisk piłkarskich. Różnica jest nie tyle ▶

**CO NAJWAŻNIEJSZE, NAWET JEŚLI  
PACJENT MA NAJSILNIEJSZE OBJAWY  
REAKCJI ALERGICZNEJ, WE KRWI  
ZNAJDUJE SIĘ BARDZO NIEWIELE  
SWOISTYCH PRZECIWCIAŁ PRZECIWKO  
ALERGENOWI, KTÓRY WYWOŁAŁ  
REAKCJĘ, A MIANOWICIE 100 000  
RAZY MNIEJ NIŻ NA PRZYKŁAD  
PO OSPIE WIETRZNEJ, KTÓRĄ  
PRZECHOROWALIŚCIE PAŃSTWO 20  
LATEMU**

ogromna, co wręcz nieporównywalna, i jak dotąd żadna inna metoda nie była w stanie namacalnie zbliżyć się do takich wyników [3].

Jaka jest z tego korzyść? Zna-  
leżenie i zidentyfikowanie aler-  
genu przyczynowego (lub grupy  
alergenów, z których zwykle jest  
co najmniej trzy) jest trudnym za-  
daniem w tym ogromnym świecie  
alergennych cząsteczek [4]. Czasami,  
aby zrozumieć, co jest faktycznym  
źródłem alergii, lekarz i oczywiście sam pacjent zamieniają  
się w prawdziwych detektywów. Prowadzony jest dziennik  
żywieniowy, analizuje się miejsca, wyjazdy, styl życia, sezo-  
nowość rozwoju objawów, ale niezmiernie ważne miejsce  
zajmuje tu także diagnostyka alergii. I proszę mi wierzyć,  
dobre laboratoria poświęcają mnóstwo wysiłku i dużo  
środków, aby znaleźć metodę, która pomoże udzielić rze-  
telnej odpowiedzi, co przeszkadza alergikowi w prowadze-  
niu normalnego życia. Właśnie dlatego czułość testu jest  
tak ważna, kiedy jesteśmy pewni, że wynik „0” oznacza,  
rzeczywisty brak przeciwciał, a wszystkie wartości powy-  
żej zera będą powodem do zwrócenia uwagi na pacjenta  
i rozpoczęcia monitorowania potencjalnego źródła reakcji  
alergiczej, bez fałszywego odwracania wzroku.

W pediatrii jest to szczególnie ważne, ponieważ na-  
wet bardzo niskie stężenia swoistych IgE mogą mieć istot-  
ne znaczenie kliniczne.

### KROK 2

#### DOBRY TEST ROZPOCZYNA SIĘ JUŻ W FABRYCE, W KTÓREJ JEST PRODUKOWANY

W przypadku alergologii najbardziej istotną kwestią jest  
standaryzacja alergenów stosowanych do przeprowadze-  
nia testu i tutaj jesteśmy zmuszeni użyć terminu nauko-  
wego – „substancja rekombinowana” [5]. Co to znaczy?  
Jest to w rzeczywistości idealna cząsteczka, sztucznie  
zsyntetyzowana, pozbawiona wad i wykazująca wysoką  
stabilność dla każdej serii produkcyjnej, w przeciwień-  
stwie do cząsteczki naturalnej, pochodzącej z surowego  
produktu i posiadającej wszystkie swoje naturalne właści-  
wości i różnice, co ostatecznie wpływa na wynik – fałszy-  
wie ujemny lub fałszywie dodatni, który nie jest przydat-  
ny w procesie rozpoznawania czynników powodujących  
alergie i nie pomogą lekarzowi w ustaleniu prawidłowej  
diagnozy.

W przeciwieństwie do innych producentów testów  
diagnostycznych, firma Thermo Scientific (Phadia) po-  
siada w Szwecji własną linię produkcyjną systemów Im-

muCAP i jest największym na  
świecie producentem cząsteczek  
rekombinowanych. Dzięki temu  
w laboratoriach stosujących tę tech-  
nologię, pracownicy zakładów dia-  
gnostyki laboratoryjnej mogą spać  
spokojnie i śmiało spojrzeć w twarz  
lekarzom i pacjentom, pewni jako-  
ści wydanego wyniku – dzień po  
dniu, rok po roku. Czego niestety  
nie można powiedzieć o testach nie  
będących standardem ImmunoCAP,

których poprawna interpretacja jest porównywana w obrę-  
bie jednej serii produkcyjnej, przy czym niestety nie ma tu  
mowy o jakiegokolwiek możliwości kontroli stężenia prze-  
ciwciał w dłuższym okresie czasu. Jest to niezwykle waż-  
ne, ponieważ przy diagnozowaniu i leczeniu alergii bardzo  
ważne jest obserwowanie dynamiki – zmian stężenia prze-  
ciwciał we krwi pacjenta w czasie, ponieważ daje to wgląd  
w skuteczność poszukiwania alergenu i doboru środków  
terapeutycznych (dieta, zmiana środowiska i warunków  
życia, przepisywanie leków itp.).

### KROK 3

#### METODA DETEKcji

Żyjemy w epoce postępu, częstych zmian i wielkich osią-  
gnięć o małych rozmiarach. Dziś smartfon w większości  
przypadków zastąpił ogromną liczbę urządzeń – kompu-  
ter, odtwarzacz, budzik, miernik hałasu, latarkę i wszyst-  
ko, co tylko można sobie wyobrazić. A sprzęt medyczny?  
Czy pozostał na uboczu, czy też potrafi zaskoczyć? Pro-  
ponuję zwrócić uwagę na samo tylko oprzyrządowanie,  
za pomocą którego wykonywane są badania alergologicz-  
ne. Skrupulatni producenci ImmunoCAP nawet tutaj nie  
poszli na kompromis, lecz wspólnie z uznanymi liderami  
w dziedzinie budowy niesamowitych i zaawansowanych  
technologicznie gadżetów stworzyli automatyczny, wyso-  
ce precyzyjny analizator.

Główną koncepcją urządzenia jest podejście walk-away  
(„umieść w nim badaną próbkę i możesz odejść”), które ma  
na celu ułatwienie życia operatorowi, ale przede wszystkim  
chroni próbki pacjenta przed najważniejszym negatywnym  
czynnikiem – możliwym błędem ludzkim [6]. Urządzenie  
wykonuje wszystkie etapy procedury samodzielnie: dozuje,  
miesza, inkubuje, mierzy itd. – wszystko to bez udziału czło-  
wieka, za każdym razem w taki sam sposób i milion razy  
z rzędu; nie miewa zmęczenia pracą, problemów w rodzinie  
ani złego samopoczucia. Za każdym razem trafia prosto do  
celu, milisekunda do milisekundy – nie ma tu innej opcji.  
Wszystkie te działania są monitorowane przez „milion” ▶

czujników, a jeśli przynajmniej jeden z nich wskaże, że coś poszło nie tak, urządzenie przerwie pracę, a zatem również nie wyda wyniku. Nie można wymyślić lepszej ochrony przed możliwym błędem wywołanym czynnikiem ludzkim! Ponadto analizator jest wyposażony w wiele interesujących funkcji: ma wbudowaną lodówkę na odczynniki, a kontrola jakości odbywa się automatycznie (o tym osobno i szczegółowo nieco dalej). Ma również unikalną metodę detekcji (pomiar ilości przeciwciał) – analizę immunofluorescencyjną [7]. Upraszczając, zasada ta tkwi w naszym układzie odpornościowym i dzięki niej mierzymy tylko te przeciwciała, których potrzebujemy, unikając pomiaru przeciwciał o fałszywych wiązaniach.

Testy nie będące ImmunoCAP są pozbawione takiej automatyzacji procedury i kontroli, wykonywane są głównie ręcznie, gdyż to technik laboratoryjny sam dozuje odczynniki do setek dołków (stąd pochodzi nazwa „panel”: do diagnostyki używane są matryce laboratoryjne – plastikowe płytki z rzędami dołków). W takim przypadku ważne jest, aby nie pomylić dołków, odczynników, kolejności zakraplania, objętości substancji, obserwować temperaturę i przedziały czasowe – a wszystko to odbywa się ręcznie.

### KROK 4

#### KRZYWA KALIBRACYJNA WHO

Spróbujmy dotrzeć do sedna analizy laboratoryjnej i rozpatrzmy termin „kalibracja”. Co to jest? Jak jest otrzymywana? Do czego służy?

Kiedy umieszczamy próbkę w urządzeniu, ono przetwarza ją i odbiera sygnał z badanej próbki. Niezależnie od tego, jaką analizę przeprowadzamy i co badamy, sygnałem może być wszystko – kolor, poświata, przewodnictwo elektryczne itp. Na tej zasadzie opiera się absolutnie każda analiza.

Tylko jak zrozumieć, jakiej wartości badanego parametru odpowiada otrzymany sygnał? Oczywiście jest, że im bardziej intensywny jest sygnał, tym więcej wykryjemy poszukiwanej substancji. A konkretne liczby? I tu na ratunek przychodzi kalibracja. Przed umieszczeniem próbek pacjentów w urządzeniu umieszcza się w nim specjalnie zsyntetyzowane próbki o znanych parametrach. I, podobnie jak w szkole, tworzy się krzywą – zależność X od Y, gdzie X to znane stężenie, a Y to intensywność sygnału. Następnie, po uzyskaniu intensywności próbki pacjenta, za pomocą krzywej monitoruje się stężenie, które jej odpowiada. Jest to

**KONTROLA JAKOŚCI TO NAJLEPSZY NA ŚWIECIE URZĄD CELNY, KTÓRY WYPUSZCZA Z LABORATORIUM TYLKO PRAWDZIWE I WIARYGODNE WYNIKI. MUSIMY WIEDZIEĆ, ŻE KONTROLE JAKOŚCI SĄ DWIE – WEWNĘTRZNA I ZEWNĘTRZNA, I NIE MOŻNA SIĘ OBEJŚĆ BEZ JEDNEJ CZY DRUGIEJ.**

podstawa podstaw każdego testu laboratoryjnego – od oznaczania glukozy i cholesterolu po hormony i diagnostykę alergii. Powiedzieć, że to jest ważne, to nic nie powiedzieć. To jest fundament, bez niego nic nie będzie. Nudne i nieinteresujące... jak cała ta rutynowa praca. Pamiętajmy jednak, że rutynowa praca laboratoryjna oznacza wiarygodne wyniki pacjentów na co dzień.

W świecie medycznym istnieje jeden supervisor, a mianowicie Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), która stara się uporządkować i doprowadzić całą różnorodność w świecie medycyny do jednolitego standardu, aby każdy człowiek, który zwrócił się do lekarza w Caracas, we Władywostoku czy w Glasgow, otrzymał wysokiej jakości wykwalifikowaną opiekę w pełnym i równym zakresie. Takie same podejście WHO ma również w odniesieniu do wykonywania testów laboratoryjnych: bystre umysły zdały sobie sprawę, że kiedy testowana jest ludzka surowica, nie można wziąć ot tak roztworu chemicznego i skalibrować go, należy zastosować kalibratory „ludzkiego” pochodzenia, i tylko wtedy można mówić o wiarygodnym wyniku [8]. ImmunoCAP jest systemem testów do diagnostyki alergii, który wykorzystuje wyłącznie prawidłową metodę kalibracji urządzeń we wszystkich laboratoriach świata – zgodnie ze standardami WHO.

### KROK 5.

#### KONTROLA JAKOŚCI (WEWNĘTRZNA I ZEWNĘTRZNA)

Jakość, jakość, jakość – jak mantra wylatuje ze wszystkich możliwych i niemożliwych miejsc, słyszymy o tym ciągle i wszędzie, z powodu i bez. Produkty, usługi, mieszkania – wszędzie jakość. Nie uwierzycie Państwo, ale w medycynie też – zewsząd jakość. A teraz na poważnie. Kontrola jakości to najlepszy na świecie urząd celny, który wypuszcza z laboratorium tylko prawdziwe i wiarygodne wyniki. Musimy wiedzieć, że kontrole jakości są dwie – wewnętrzna i zewnętrzna, i nie można się obejść bez jednej czy drugiej [9].

Wewnętrzna – przy każdym uruchomieniu wraz z próbkami pacjentów poddajemy kontroli próbki o znanym stężeniu i sprawdzamy, co ostatecznie wyszło. Jeśli wynik kontroli mieści się w określonym przedziale, wówczas wykonanie jest uważane za udane, jeśli nie, to nie zobaczymy wyników innych pacjentów, dopóki nie zrozumiemy, co poszło nie tak i nie powtórzymy pełnego cyklu z pominięciem przyczyny błędu. Wygląda dość rzetelnie, ale co jeśli błąd jest na ▶

poważniejszym poziomie, a cały system wraz z kontrolą wewnętrzną nie działa poprawnie? To się zdarza, na szczęście nie często, ale konsekwencje są poważniejsze: błędne wyniki mogą przez długi czas pozostać niezauważone i zostać wydane pacjentom. Tutaj na ratunek przychodzi zewnętrzna kontrola jakości (EQA – zewnętrzna ocena jakości). Jest oparta na zupełnie innej zasadzie, a mianowicie: co miesiąc, zgodnie z harmonogramem, do laboratorium trafiają próbki o nieznanym stężeniu alergenów (tj. stężenie oczywiście jest znane, ale nie specjalistom kontrolowanego laboratorium), testy kontrolne są wykonywane według rutynowej procedury i ich wyniki wysyłane do centrum analitycznego.

Dla testów ImmunoCAP została stworzona oddzielna globalna struktura – Quality Club (Klub Jakości). Jest to niezwykle odpowiedzialny i ważny system kontroli, którego celem jest podtrzymanie stabilnie wysokiej jakości testów ImmunoCAP na całym świecie. Żaden producent nie ImmunoCAP nie ma własnego zewnętrznego systemu kontroli jakości. W naszym kraju, w przeciwieństwie do reszty świata, zewnętrzny system kontroli jakości nie jest obowiązkowy i dlatego, chcąc zaoszczędzić pieniądze, wielu producentów testów innych niż ImmunoCAP nie zajmuje się takimi kwestiami.

### KROK 6

#### PODSUMOWUJĄCY, CZYLI WYCIĄGAMY WNIOSKI

Szanowni podobnie myślący, właśnie tak chcę się do Państwa zwrócić, ponieważ jeśli czytacie tę ostatnią część tekstu, to nie może być inaczej. Mam nadzieję, że nie nudziście się Państwo i udało mi się przybliżyć podstawy laboratoryjnej diagnostyki alergii oraz wskazać obowiązkowe atrybuty wysokiej jakości rzetelnego testu. Teraz powtórzę je krótko.

- **Czułość:** ważne jest dla nas, aby test mógł wychwycić nawet minimalną liczbę przeciwciał. Czułość zależy bezpośrednio od powierzchni reakcji.
- **Rekombinowane białka** zawarte w odczynnikach umożliwiają stworzenie wystandaryzowanego i stabilnego testu, który ponadto jest wysoce specyficzny.
- **Wykonanie badań** należy powierzyć automatycznemu analizatorowi (z detekcją metodą immunofluorescencyjną), ponieważ tylko w tym przypadku stworzymy warunki wykluczające wpływ czynnika ludzkiego.

- **Kalibrujemy nasz test** tylko z uwzględnieniem zaleceń WHO.
- **Kontrola jakości** zarówno wewnętrzna, jak i zewnętrzna – zdecydowanie potrzebujemy obie.
- **Właściwa preanalitka** (wszystko, co ma miejsce bezpośrednio przed samą analizą) oraz **postanalitka** (interpretacja wyników).

Chcę Państwa zapewnić, że takie osobliwości testów nie są znane od dziś – to doświadczenie specjalistów od kilkunastu lat. Wszystko, co jest skomplikowane, tak naprawdę jest proste, jeśli się w tym dobrze zorientować. ●

#### PRZYPISY

Park KH, Lee J, Lee SC, et al. Comparison of the ImmunoCAP Assay and AdvanSur AlloScreen advanced multiplex specific IgE detection assay. *Yonsei Med J.* 2017;58(4):786–792.

Sampson HA. Utility of food-specific ige concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(5):891–896.

NCCLS. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. NCCLS; 2004. Document EP17-A.

Salo PM, Arbes SJ Jr, Crockett PW, et al. Exposure to multiple indoor allergens in US homes and its relationship to asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(3):678–684.

Douladiris N, Garib V, Focke-Tejkl M, et al. Detection of genuine grass pollen sensitization in children by skin testing with a recombinant grass Pollen hybrid. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019;30(1):59–65.

Gadisseur R, Chapelle JP, Cavalier E. A new tool in the field of in-vitro diagnosis of allergy: preliminary results in the comparison of ImmunoCAP 250 with the ImmunoCAP ISAC. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(2):277–280.

Иммунохимический анализ в лабораторной медицине. Учебное пособие / Под ред. В.В. Долгова. М.-Тверь: Издательство «Триада», 2015. 418 с.

Thorpe SJ, Heath A, Fox B, et al. The 3rd international standard for serum IgE: international collaborative study to evaluate a candidate preparation. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(9):1283–1289.

Schneider F, Maurer C, Friedberg RC. International Organization for Standardization (ISO) 15189. *Ann Lab Med.* 2017;37(5):365–370.