

HRVATSKE SMJERNICE ZA *IN VITRO* DIJAGNOSTIKU PREOSJETLJIVOSTI POSREDOVANE IgE PROTUTIJELIMA

ASJA STIPIĆ MARKOVIĆ, IRENA IVKOVIĆ-JUREKOVIĆ¹, SLAVICA DODIG²,
IRENA BATIŠTA³, RENATA ZRINSKI-TOPIĆ², MONIKA BARBERIĆ³, IVA TOPALUŠIĆ,
ŽELJKA BUKOVEC MEGLA⁴ i VESNA ŽIŽIĆ⁵

*Klinički bolnica Sveti Duh, Odjel za kliničku imunologiju, pulmologiju i reumatologiju,
Referentni centar za kliničku alergologiju, ¹Klinika za dječje bolesti Zagreb, Odjel za pulmologiju, alergologiju,
imunologiju i reumatologiju, ²Dječja bolnica Srebrnjak, Odjel za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku,
Referentni centar za kliničku alergologiju djece, ³Klinička bolnica Sveti Duh, Imunološki laboratorij,
⁴Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu,
Endokrinološki laboratorij i ⁵Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku,
Hematološki laboratorij, Zagreb, Hrvatska*

In vitro dijagnostika alergijskih bolesti temelji se na određivanju koncentracije ukupnih i specifičnih IgE antitijela u serumu, koncentraciji IgG antitijela, plazmatske triptaze, eozinofilnog kationskog proteina te testu aktivacije bazofilnih leukocita. Upotreba *in vitro* dijagnostičkih testova mora biti temeljena na korelaciji anamneze, kliničke slike te *in vivo* provokativnih testova. Kliničko značenje povišene serumske koncentracije ukupnih IgE antitijela u dijagnostici alergijskih bolesti jest ograničena, budući da se ona susreće i u drugim nealergijskim bolestima. Povišene koncentracije specifičnih IgE protutijela, zajedno s pozitivnom anamnezom, indikativne su za klinički značajnu alergijsku bolest. Preporučena laboratorijska metoda za određivanje koncentracije IgE protutijela u serumu jest fluoroenzimimunokemijska metoda. Povišene serumske koncentracije IgG protutijela nemaju dokazanu ulogu u dijagnostici alergije na hranu, a mogu poslužiti u procjeni uspješnosti specifične imunoterapije na alergene kukaca te procjeni rizika razvoja anafilaksije uzrokovane ovom skupinom alergena. Povišena koncentracija serumske triptaze (podtip β), indikator je degranulacije mastocita uzrokovane specifičnim alergenom. Porast koncentracije eozinofilnog kationskog proteina (EKP) nastupa tijekom kasne faze alergijske reakcije te se može koristiti u praćenju alergijskih i drugih upalnih stanja u kojima eozinofili imaju glavnu ulogu. Test aktivacije bazofilnih (BAT) leukocita temelji se na određivanju staničnih razlikovnih obilježja, CD 63 i CD203c metodom protočne citometrije. BAT je koristan u dijagnostici alergija na alergene kukaca, nutritivnih te medikamentnih alergija. Alergološka dijagnostika temeljena na ekstraktima alergena može se koristiti u monosenzibiliziranih bolesnika s jasnom kliničkom slikom te u bolesnika kojima se planira prepisati samo simptomatska terapija. U suvremenoj su kliničkoj praksi razvijenih zemalja mnogo češći polisenzibilizirani bolesnici s kompleksnom simptomatologijom te sumnjom na križnu reaktivnost. Kod ovih se bolesnika preporuča koristiti molekularnu alergološku dijagnostiku.

Ključne riječi: IgE, serumska triptaza, eozinofilni kationski protein, test aktivacije bazofila, molekularna alergološka dijagnostika

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Asja Stipić Marković, prim., dr. med.
Odjel za kliničku imunologiju, pulmologiju i reumatologiju
Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
Klinička bolnica Sveti Duh
Sveti Duh 64
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: asjastipic90@gmail.com

1. UVOD

Znakovi današnjeg vremena pokazuju kakvom se vanjskom okružju obrambeni sustav čovjeka mora prilagođavati kako bi održao integritet organizma. Živimo s činjenicom da je onečišćenje zemlje dovelo do pitanja fizičkog opstanka čovjeka. Veličina problema može se

približiti mogućnostima ljudske spoznaje slikom kolone kamiona napunjenih otpadom, koji godišnje proizvede glavni grad Hrvatske, koja se proteže od Zagreba do Rijeke (200.000 tona otpada). Dakle, s jedne strane način života u civilizaciji s obiljem antigenskih determinanti, a s druge postupno eliminiranje biološke raznolikosti (organizmu osobito važnih bakterijskih

populacija s kojima egzistira u suživotu), razlog su promjena imunološkog sustava koje rezultiraju bolestima, između ostalog i pandemijskim razmjerima prevalencije alergijskih bolesti. Svi profili stručnjaka koji se bave dijagnostikom i liječenjem alergijskih bolesti danas trebaju prihvatiti principe održivog razvoja, što znači poštovati nove znanstvene spoznaje temeljene na dokazima. Na nacionalnoj razini treba uvesti principe racionalizacije, između ostalog i harmonizaciju dijagnostičke metodologije, kako bi se zaključci o stanju bolesnika mogli uspoređivati među svim regijama zemlje i inozemstva.

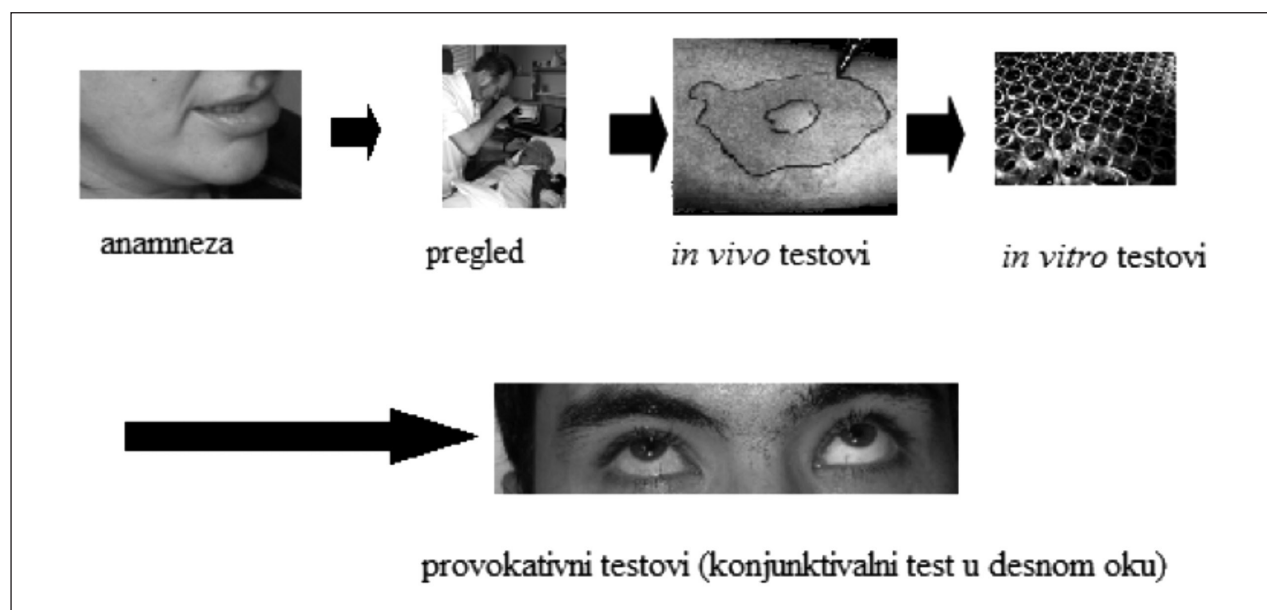
Važnost standardizacije i harmonizacije *in vivo* i *in vitro* alergološke dijagnostike

Točnost i pouzdanost dijagnostičkih postupaka koji vode ispravnoj dijagnozi bolesti, a time i izboru odgovarajućeg terapijskog modaliteta, direktno i u potpunosti su ovisni o primijenjenim laboratorijskim i kliničkim metodama, koje prema dobroj kliničkoj i laboratorijskoj praksi nužno trebaju biti standardizirane i reproducibilne. U hrvatskoj alergološkoj praksi principi standardizacije implementirani su u području tehnike kožnog testiranja, pribora za kožno testiranje, čitanja kožne reakcije i interpretacije, još od simpozija "Standardizacija dijagnostičkih postupaka u alergologiji i kliničkoj imunologiji" održanog u Zagrebu 1983. godine (1). Također se intenzivno radilo na standardizaciji alergenskih pripravaka Imunološkog zavoda u Zagrebu te je proizveden nacionalni standard za alergen *Dermatophagoides pteronyssinus* i kućni standard za alergen *Ambrosia elatior* (2,3). Alergenima je određena potentnost *in vitro* testom RAST inhibicije ali i *in*

in vivo biološkom standardizacijom (4-7). Krovna europska alergološka udruga, Europska akademija za alergologiju i kliničku imunologiju, objavila je 2012. godine standardizirane preporuke za kožno testiranje ("Praktični vodič za kožni test inhalacijskim alergenima") (8) i profesionalnim alergenima (9), a prethodno, 2009. godine prijedlog harmonizacije ubodnog kožnog testa inhalacijskim alergenima (SPT, od engl. *skin prick test*, kožni test ubodom) (10,11). Smjernice objavljuju i nacionalna udruženja alergologa i kliničkih imunologa (12). Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju je u cilju ujednačavanja kožnog testiranja u zemlji organiziralo dva edukacijska tečaja "Vještina izvođenja i interpretacije kožnih testova za procjenu IgE preosjetljivosti", a sudionicima su podijeljeni certifikati o osposobljenosti (13,14). U području standardizacije *in vitro* dijagnostike u Hrvatskoj su definirane vrijednosti ukupnog IgE za djecu i odrasle 2006. godine (15).

Dijagnostički postupnik u alergologiji

In vitro alergološka dijagnostika u kliničkoj praksi rijetko se koristi kao prvi dijagnostički korak, već je indicira i definira alergolog u skladu s kompetencijama koje mora posjedovati, a koje su definirane Preporukama Svjetske alergološke organizacije - WAO (od engl. *World Allergy Organisation*), čiji član je i Hrvatsko društvo za alergologiju kliničku imunologiju (16-18). Dijagnostički postupak se nakon uzimanja podataka u anamnezi i kliničkog pregleda započinje kožnim testiranjem kojim se izabiru alergeni za *in vitro* dijagnostiku (sl. 1).



Sl. 1. Algoritam dijagnostičkog postupka u alergologiji

Uloga alergologa je u predanalitičkoj fazi obratiti pozornost na vrijeme uzorkovanja. Vrijednosti ukupnog i specifičnog IgE (sIgE), te eozinofilnog kationskog proteina (EKP) u krvi ovise o tome radi li se o preosjetljivosti na cjelogodišnje ili sezonske alergene. Kod preosjetljivosti na sezonske alergene, vrijednosti IgE i EKP više su u vrijeme polinacije (4-6 tjedana nakon vrhunca polinacije, koncentracije su sIgE maksimalne, a zatim se smanjuju). Također, ne preporuča se određivati koncentraciju sIgE 6 mjeseci prije sezone, budući da je koncentracija sIgE znatno niža (19,20). Kod određivanja sIgE na alergene otrova opnokrilaca ili alergene lijekova, koncentracije se sIgE izrazito smanjuju s vremenom (21-23).

Postupnik *in vitro* dijagnostike u alergijskim bolestima

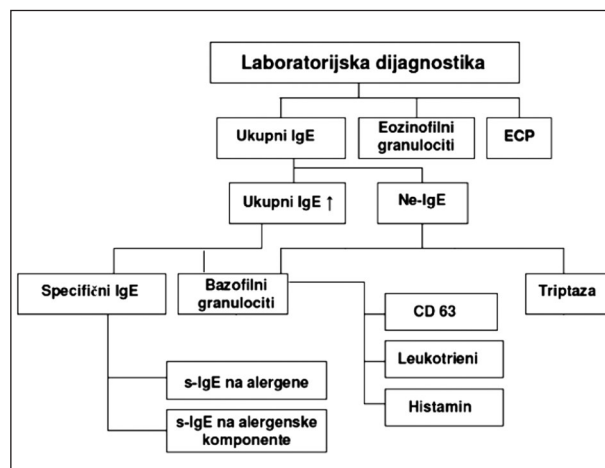
Otkriće imunoglobulina E (IgE) (Ishizaka i Johansson, 1968), omogućilo je razvoj alergološke laboratorijske dijagnostike. U Zagrebu se već 1971. godine određivao titar IgE u Imunološkom laboratoriju Bolnice Sveti Duh (24,25). Danas, određivanje koncentracije ukupnih i alergen-specifičnih IgE protutijela čini osnovu laboratorijske alergološke dijagnostike (sl. 2) (26).

Pri tome je, osim standardizacije laboratorijskih postupaka i opreme, kritično važna standardizacija alergenskih ekstrakata. Alergen mora imati definiranu potentnost *in vitro* i *in vivo*, određenu koncentraciju odabranih glavnih alergena, a izvor alergena ne smije biti kontaminiran drugim izvorima. Projektom CREATE, financiranim od Europske Unije, 2008. godine predložen je model razvoja sveobuhvatnog panela međunarodnih referentnih preparata, kojima bi se harmonizirala alergološka dijagnostika (27). Dokazano je da su tri rekombinantna alergena rBet v 1, rPhl p5a i rDer p 2 strukturno identični prirodnima i izazivaju izvrstan IgE odgovor, pa mogu biti certificirani referentni materijal. Druga skupina alergogenih proteina (rPhl p5b, rOle e1, rDer p 1, rDer f 1 i rDer f 2), kandidati su za certificirane referentne alergogene proteine nakon malih poboljšanja. Protein rPhl p 1 nije pogodan i ne može se koristiti kao referentni alergen.

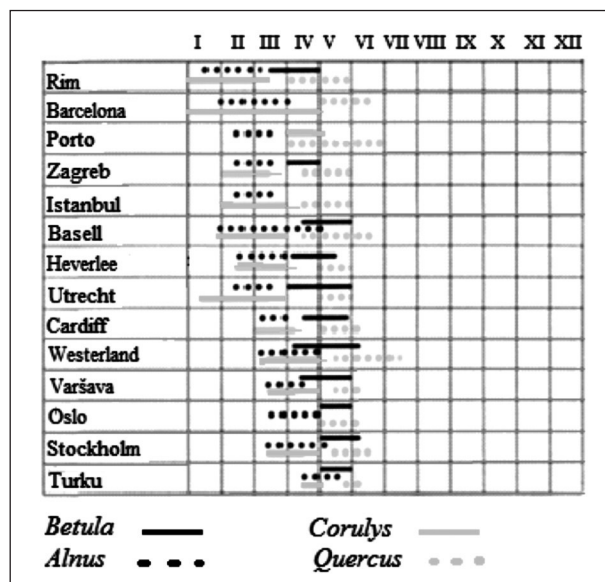
Koncentracija pojedinih inhalacijskih alergena varira ovisno o dobu godine, kako se vidi i na polenskim kartama (19,20,28) (sl. 3).

1.4. Alergološka *in vitro* dijagnostika u Republici Hrvatskoj

Danas u Republici Hrvatskoj postoji 12 laboratorija koji se bave *in vitro* dijagnostikom alergijskih bolesti, u manjem ili većem obimu (sl. 4).

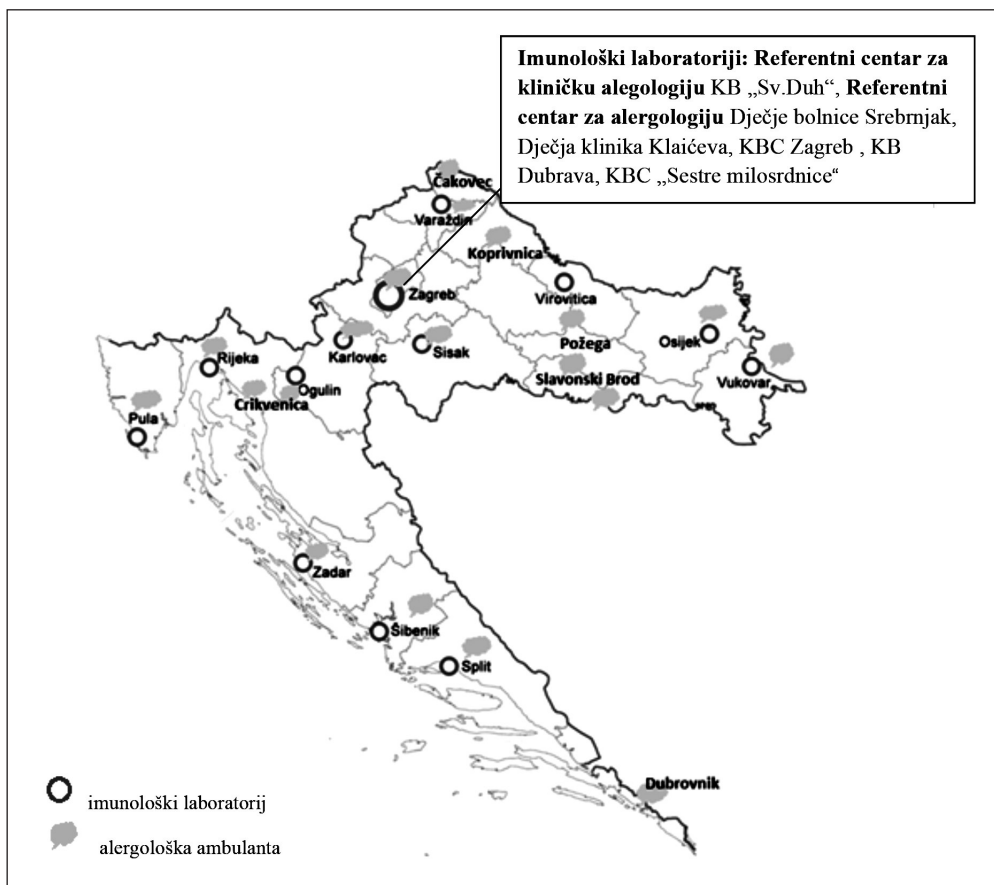


Sl. 2. Laboratorijski dijagnostički postupak kod alergijskih bolesti (preuzeto iz Dodig S. Laboratorijska dijagnostika alergija. *Pediatr Croat* 2012; 56(Supl. 1): 90-6. (26)

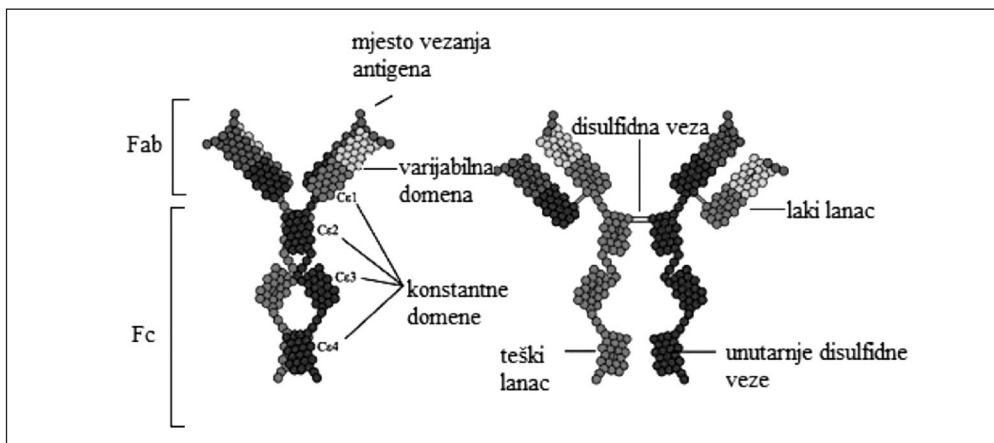


Sl. 3. Peludna karta cvjetanja stabala i trava u Zagrebu i gradovima Europe

Alergološka *in vitro* dijagnostika izvodi se u više ustanova i gradova, a alergoloških ambulanti ima značajno više u odnosu na 1990. godinu, kada ih je bilo registrirano samo 9 u 40 zdravstvenih ustanova (29). Prednosti laboratorijskih metoda su manja invazivnost (minimalna neugoda za ispitanika i bez rizika od neželjenih reakcija) te mogućnost da nadopune provokacijske testove ili ih zamijene (u osoba s dermatografizmom ili patološkim kožnim promjenama). Nedostatak tih metoda jest nemogućnost testiranja imunološke reaktivnosti ciljnih organa.



Sl. 4. Imunološki laboratoriji i alergološke ambulante u gradovima Hrvatske



Sl. 5. Struktura IgE protutijela, prikaz sprijeda i bočno

2. IMUNOGLOBULIN E

2.1. Obilježja imunoglobulina E

Od svih imunoglobulina u krvi, IgE je zastupljen u najmanjoj količini (4,1 ug/kg), budući da je gotovo sav vezan uz receptor na membrani stanica. Molekula humanog IgE građena je od četiri lanca, dva laka κ ili λ i dva teška ϵ (sl. 5). Svaki laki i teški lanac sadrži dva dijela: konstantni i varijabilni dio. Funkcionalno gledano, postoje dvije regije IgE: Fab, na koju se veže antigen te

Fc regija, kojom se IgE veže za receptore na membrani mastocita i bazofilnih granulocita (sl. 5) (30). Vezno mjesto za alergen naziva se paratop, duljine je 2 nm, dubine i širine 1 nm. Paratop uključuje varijabilne dijelove i lakog i teškog lanca (crveno). Oko 15-20 aminokiselina paratopa prepoznaju konformacijsku strukturu alergenske molekule (epitop).

Fc regija je dimer s tri domene Cε2, Cε3, Cε4. Tim fragmentom molekula IgE se usidri u membranu stanica (transmembranski dio), a dijelom ulazi u unutrašnjost

Tablica 1.

Podatci o sintezi i katabolizmu IgE (preuzeto iz Dodig S. *Imunokemija*, 2014)(30)

	Zdravi	Alergije	Mijelom IgE	Hiper-IgE
Cirkulacija	4,1 µg/kg < 117 kIU/L	stupanj senzitivacije	1,7 g/kg	
Sinteza	3,8 µg/kg/dan			>20x veća
T ½	1,8 dana	4,3 dana	5,1 dan	5,8 dana
Katabolizam	intra- i ekstravaskularno	ekstravaskularno usporava se		

1kIU = 2,4 µg/L, 100 kIU/L = 240 µg/L

stanica (intracelularni dio) koji služi kao prijenosnik signala. IgE je asimetrična i pokretljiva molekula zahvaljujući asimetrično nabranim Cε2 domenama Fc-fragmenta koje su ključne za senzibilizaciju. IgE se uglavnom sintetizira u tonzilama, adenoidnom tkivu, sluznici bronha, gastrointestinalnog trakta i peritoneuma. Sinteza IgE je sporija, a katabolizam brži od katabolizma drugih imunoglobulina. Poluživot slobodnog IgE u serumu iznosi 1,8 dana, a vezanog na stanice 14 dana. U osoba s povećanom serumskom koncentracijom IgE, katabolizam protutijela se smanjuje kako se smanjuje udio ekstravaskularnog (vezanog na stanice) IgE (tablica 1) (30). U zdravih osoba katabolizam intra- i ekstravaskularnog IgE jest uravnotežen.

Molekula IgE u svom sastavu sadrži oko 8,3 % ugljikohidrata, koji su odgovorni za križnu reaktivnost u reakciji preosjetljivosti na specifični alergen. Povećana koncentracija ukupnog i specifičnog IgE u bolesnika s alergijskim bolestima posljedica je imunološke reakcije posredovane limfocitima Th2 fenotipa (Th, od engl. *T helper*, pomoćnički limfocit T) koji proizvode proalergijske citokine (dominantno IL-4). IgE protutijela u sindromu hiper-IgE i kod bolesnika s IgE mijelomom posljedica su poremećaja regulacije sinteze i proliferacije B limfocita.

2.1.1. IgE receptori

Dvije su vrste receptora za IgE; receptori visokog afiniteta (FcεRI), te receptori niskog afiniteta za IgE (FcεRII; CD23). FcεRI, građen kao tetramer (lanci αβγ2), smješten je na membrani mastocita i bazofila (31). Gustoća receptora na membrani bazofila korelira s koncentracijom IgE u serumu, a isti su podatci dobiveni *in vitro* za mastocite (32). IgE svojim se Fc krajem veže za a podjedinicu FcεRI. Vezanje IgE na receptor dovodi do unutarstanične signalizacije aktivnošću kinaza vezanih uz β i γ podjedinice FcεRI, čime dolazi do aktivacije bazofila i mastocita te njihove degranulacije (33).

FcεRII (CD23), receptor niskog afiniteta za IgE, smješten je na membrani B i T limfocita, Langerhanovih

stanica, makrofaga, monocita, trombocita i eozinofila. Njegova je ekspresija također pojačana prisutnošću većih količina IgE u cirkulaciji. CD23 sudjeluje u modulaciji diferencijacije B limfocita, aktivacije monocita i prezentacije antigena, vežući se za antigen te prelazeći u citoplazmu stanice (tzv. solubilni, sCD23). Kod bolesnika s atopijom, pojačana je ekspresija CD23 na membrani B limfocita (34-36).

3. DEFINICIJE OSNOVNIH ALERGOLOŠKIH POJMOVA

3.1. Alergen

Alergeni su antigeni proteinskog sastava, inače bezopasne tvari koje induciraju alergijsku reakciju samo u preosjetljivih ljudi.

3.2. Izvor alergena

Izvor alergena mogu biti razne čestice, tkiva, hrana ili organizmi (npr. mačja dlaka, *D. pteronyssinus*, mlijeko, *Aspergillus fumigatus*, pelud itd.).

3.3. Alergenski ekstrakt

Alergenski ekstrakt je nepročišćena smjesa alergenskih i drugih proteina, polisaharida i lipida, dobivena ekstrakcijom iz prirodnih izvora, npr. zrna polena.

3.4. Alergenska komponenta

Alergenska komponenta je molekula (protein ili glikoprotein), identificirana pomoću specifičnog IgE (sIgE) antitijela. Alergenska komponenta može se izolirati iz prirodnog izvora (prirodni, pročišćeni alergen) ili se može proizvesti rekombinantnom DNA tehnologijom (rekombinantni alergen).

3.5. Epitop

Epitop je mjesto prepoznavanja i vezanja antitijela na ciljnu molekulu.

3.6. Kompletni alergen

Kompletni alergeni su nutritivni alergeni rezistentni na toplinu i probavne enzime, sposobni izazvati senzibilizaciju (primarni alergeni).

3.7. Sastav kompletnog alergena

Kompletni alergen je mješavina više proteina od kojih su mnogi inertni. Trodimenzionalni proteini relevantni su za indukciju sinteze IgE-a.

3.8. Glavni alergen (od engl. major allergen)

Glavni alergen je onaj alergen koji je najčešće prepoznat, tj. senzibilizira veliki broj bolesnika (prepoznaje ga >50 % IgE protutijela velikog broja seruma).

3.9. Sporedni alergeni (od engl. minor allergens)

Alergeni koje prepozna manje od 50 % IgE protutijela u velikom broju seruma.

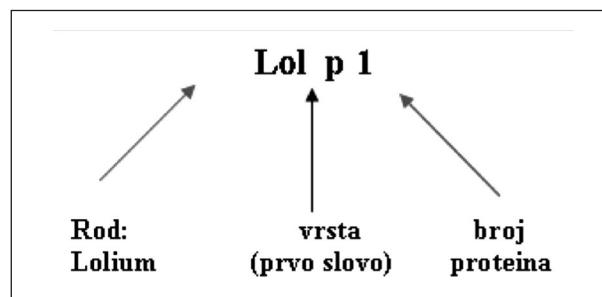
3.10. Inkompletni alergen

Inkompletni alergen izaziva alergijsku reakciju samo u prethodno senzibiliziranog bolesnika, budući da samostalno ne može dovesti do senzibilizacije (sekundarni alergen). Organizam je prethodno senzibiliziran inhalacijskim ili kontaktnim putem nekim strukturno sličnim kompletnim alergenom (križna reaktivnost). Inkompletni alergeni neotporni su na toplinu i probavne enzime.

3.11. Križna reaktivnost

Križna reaktivnost posljedica je vezanja specifičnih IgE protutijela na strukturno slične epitope različitih alergena. Najčešće se radi o križnoj reaktivnosti između:

- alergenskih molekula čiji su izvor srodne prirodne vrste (npr. alergeni trava)
- alergenskih molekula koje pripadaju istoj obitelji proteina (npr. između alergena Bet v1 polena breze i alergena Mal d1 jabuke)



Sl. 6. Nomenklatura alergena

3.12. Kosenzibilizacija

Primarna, istodobna senzibilizacija na alergene iz različitih izvora, koja nije rezultat križne reaktivnosti.

3.13. Križno reaktivne ugljikohidratne determinante

Ugljikohidratni dijelovi glikoproteina, visoko križno reaktivni sa sIgE protutijelima.

3.14. Nomenklatura alergena

Nomenklatura alergena preporučena je od Odbora za nomenklaturu Međunarodnog udruženja imunoloških društava Svjetske zdravstvene organizacije (WHO/IUIS, od engl. *World Health Organization/International Union of Immunological Societies*). Alergenski protein dobiven iz alergenskog ekstrakta označava se početnim slovima roda, prvim slovom vrste i brojem proteina prema njegovoj učestalosti izazivanja senzibilizacije, kako je prikazano na primjeru alergena iz ekstrakta trave *Lolium perenne* (višegodišnji ljulj) (sl. 6).

Početak 2000. godine počelo je organizirano prikupljanje informacija o svim poznatim alergenskim molekulama u okviru organizacije Alergome. Od tada do danas u toj bazi prikupljena je velika količina podataka, ali i prošireno djelovanje prikupljanjem informacija o izvorima alergena te o organizmima i molekulama koje se vežu uz IgE bez razvijanja alergijske reakcije. Baza je prikupila podatke iz 27 371 članka objavljenog u stručnoj i znanstvenoj literaturi.

3.15. Potentnost alergena

Potentnost alergena jest ukupna alergogena aktivnost proizvedenog ekstrakta. Potentan je onaj alergenski ekstrakt koji u preosjetljivoj osobi izaziva pozitivnu reakciju u koži. *In vitro* se dokazuje sposobnošću blokiranja specifičnog IgE (izražava se u jedinicama inhibi-

cije RAST-a). *In vivo* se dokazuje titracijskim kožnim testovima u skupini osoba preosjetljivih na određeni alergen, a izražava se, ovisno o proizvođaču, biološkim jedinicama (BU/mL, od engl. *Biologic Unit*; AU/mL, od engl. *Allergen Unit*).

4. TEMELJNI *IN VITRO* TESTOVI U DIJAGNOSTIČKOM PROCESU

Određivanje koncentracije ukupnog (uIgE) i specifičnih IgE (sIgE) središnji su dijagnostički testovi u alergologiji. Imunološki testovi, općenito, otkrivaju reakciju antigen-antitijelo (Ag-At). S obzirom da je reakcija antigen-antitijelo visoko specifična, pogodna je za dijagnostiku, jer će IgE antitijelo reagirati samo s alergenom koji je izazvao njegovu sintezu. Pokazatelji da se u laboratorijskom mediju zbila reakcija Ag-At mogu biti različiti biljezi koji se vežu za antitijelo. Ako je biljag enzim, pokreće se reakcija sa supstratom, ako je biljag izotop, može se detektirati radioaktivnost, dok se kod fluorogenih molekula otkriva fluorescencija. Različiti imunološki testovi dobili su ime prema biljegu za dokaz reakcije (37).

Napredak u alergološkoj *in vitro* dijagnostici je otkrivanje križne reaktivnosti IgE antitijela prema alergenim proteinima (komponentama) alergenskih ekstrakata iz različitih izvora. Takva dijagnostika, tzv. komponentna dijagnostika (od engl. *component resolved diagnosis*) olakšava odabir specifične imunoterapije i praćenje kliničkog tijeka bolesti. Osim testova koji određuju koncentracije IgE antitijela, u alergološkom, dijagnostičkom postupku koriste se i testovi koji mjere koncentraciju biljega eozinofilne aktivacije, kao što je eozinofilni kationskog proteina (EKP), glavni bazični protein (engl. MBP, *Major Basic Protein*), eozinofilna peroksidaza (engl. EPO, *Eosinophil Peroxidase*), neutrotoksin deriviran iz eozinofila (engl. EDA, *Eosinophil Derived Neurotoxin*) i eozinofilni protein X (engl. *Eosinophil Protein X*), koncentraciju IgG4 te triptaze u plazmi/serumu. Testovi određivanja aktivacije bazofila

(BAT, od engl. *Basophil Activation Test*) i koncentracije histamina i leukotrijena koriste se u posebnim indikacijama, a u rutinskoj praksi alergološke dijagnostike u Hrvatskoj još nisu zaživjeli (26).

Iako visoka koncentracija alergen specifičnih IgE antitijela ukazuje na veću vjerojatnost kliničke reakcije, neki alergeni uzrokuju pojavu simptoma i pri nižim koncentracijama sIgE (skladišni proteini, lipidni transferni proteini - LTP).

Specifična IgE senzibilizacija može se uspostaviti na samo jedan ili na više alergena:

- Monosenzibilizacija je preosjetljivost na jedan izvor alergena ili srodne izvore alergena (npr. alergeni grinja)
- Polisenzibilizacija je preosjetljivost na dva ili više izvora alergena

4.1. Određivanje ukupnih i specifičnih IgE protutijela

U krvi bolesnika određuje se koncentracija ukupnih i specifičnih IgE protutijela. Povišena koncentracija ukupnog IgE može ukazivati na atopijsku etiologiju, međutim, za potvrdu dijagnoze potrebno je odrediti razinu specifičnih IgE protutijela budući da uIgE može biti povišen i u raznim nealergijskim stanjima (37). S obzirom na to da je koncentracija IgE protutijela krvi i kod izrazito senzibiliziranih bolesnika niska, a glavni alergeni sadrže velik broj alergenskih komponenti, imunološki testovi moraju biti visoko osjetljivi i specifični, te imati dovoljno velik kapacitet vezanja svih prisutnih IgE protutijela (38). Kod interpretacije rezultata testova, u svrhu postavljanja točne dijagnoze, potrebno je znati domete testova, tj. njihovu dijagnostičku učinkovitost. To osim osjetljivosti i specifičnosti, uključuje i pozitivnu te negativnu predvidljivu vrijednost, kako je prikazano na tablici 2. Titar IgE antitijela izražava se u internacionalnim jedinicama po litri (U/L). Testovi određivanja IgE kalibriraju se prema WHO IgE standardu 75/502 (39).

Tablica 2.

Dijagnostička djelotvornost određivanja ukupnog i specifičnog IgE

Analit	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)	PPV (%)	NPV (%)
uIgE	97,1	93,3	94,5	96,6
Phadiatop, odrasli	70,8	90,7	72,6	89,9
Phadiatop, djeca	65,0	100,0	100,0	93,0
sIgE, djeca s astmom*	100,0	96,7	97,3	100,0
EKP, djeca s astmom	97,4	100,0	100,0	96,8

PPV - pozitivna predvidljiva vrijednost; NPV - negativna predvidljiva vrijednost; *djeca preosjetljiva na alergen grinje *Dermatophagoides pteronyssinus*
(Preuzeto iz Dodig S. Knjiga sažetaka sa simpozija HDAKI, Zagreb, 2014)(32)

Tablica 3.

Vrijednosti uIgE u dječjoj dobi.

Dob/godine	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
uIgE(kUI/L)	20,2	30,4	38,6	57,0	57,2	65,4	73,0	82,6	76,4	98,4	102,6	104,8	101,4	97,4	97,2	105,2	100,0

(Preuzeto iz Dodig S. Laboratorijska dijagnostika alergija. Paediatr Croat 2012; 56 (Supl 1): 90-96.)(26)

4.1.1. Ukupni IgE

Najstariji test za određivanje ukupnog IgE bio je radioimunosorbentni test - RIST (od engl. *Radio Immuno Sorbent Test*). Zadnjih 30-ak godina koristi se fluoroenzimokemijska metoda, u kojoj se detekcijska protutijela obilježavaju enzimom odnosno fluorokromima, a na kraju reakcije mjeri se završna fluorescencija. Normalnom koncentracijom ukupnog IgE smatraju se vrijednosti manje od 122 kU/L.

4.1.1.1. Ukupni IgE u djece

Posebnu pozornost potrebno je obratiti vrijednostima ukupnog IgE u dječjoj dobi. S rastom djeteta dolazi do porasta koncentracije IgE antitijela u krvi (40). U dojenačkoj dobi, koncentracije IgE antitijela izrazito su niske. Oko 9. godine života poprimaju vrijednosti koje se u odnosu na odraslu dob značajnije ne mijenjaju (tablica 3) (26). Temeljem određivanja ukupnog IgE ne mogu se striktno odijeliti bolesnici s atopijom od onih bez atopije. Primjerice, oko 5 % djece bez simptoma alergijske bolesti ima ukupni IgE iznad gornje granice za dob (15). S druge strane, djeca s koncentracijom ukupnog IgE >1000 kU/L, uvijek imaju i povećanu koncentraciju sIgE na neki alergen. Tako visoke koncentracije ukupnog IgE najčešće imaju bolesnici s atopijskim dermatitisom, astmom, cjelogodišnjim alergijskim rinitisom te sezonskim alergijskim dermatitisom (40). Zrinski Topić i sur. pokazali su da u djece mlađe od šest godina, niske vrijednosti uIgE (<10kU/L) nisu pouzdane za isključivanje alergijske senzibilizacije, te je sIgE mnogo bolji pokazatelj (41). Iako poviše-

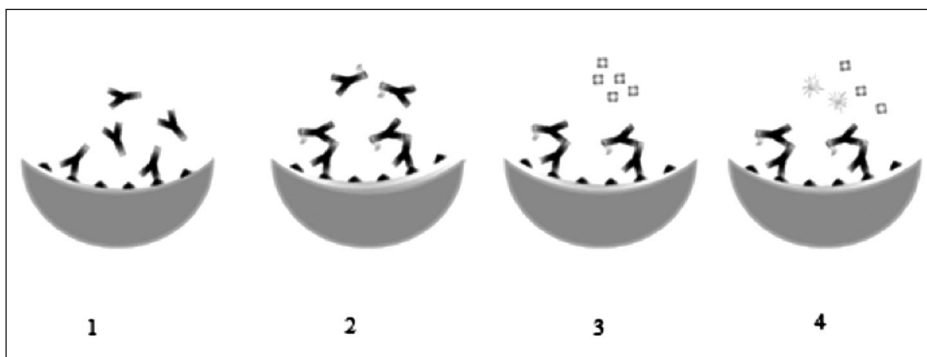
ne vrijednosti ukupnog IgE dobro koreliraju s pojavom astme, nemaju veliko značenje u probiru bolesnika s alergijskim bolestima ili procjeni težine bolesti. Dodig i sur. su 2006. godine u Hrvatskoj definirali vrijednosti ukupnog IgE za djecu i odrasle (15).

4.1.2. Specifični IgE

Najstarija metoda za određivanje sIgE je RAST (od engl. *Radio Allergo Sorbent Test*). U metodi su kao obilježivači korišteni radioaktivni izotopi. Od početne metode nastale su njene poboljšane varijante, primjenom drugih nosača (trodimenzionalnih polimera, biočipova), standardiziranih alergenskih ekstrakata i rekombinantnih alergena, te osjetljivijih obilježivača (enzima i fluorokroma) detekcijskih protutijela (npr. ImmunoCAP).

Danas se, kao i za ukupni IgE, najčešće primjenjuje metoda na hidrofilnom polimernom nosaču - immunoCAP za određivanje specifičnih IgE antitijela. Ovom je metodom moguće odrediti koncentraciju IgE protutijela specifičnih za više od 500 alergena. Alergeni su kovalentno vezani na hidrofilni polimerni nosač uklopljen u kapsulu (Immuno CAP). Alergeni reagiraju sa sIgE protutijelima iz seruma bolesnika. Nakon ispiranja, dodaju se anti-IgE protutijela obilježena beta-galaktozidazom. Dodavanjem 4-metilumbileferil-beta galaktozida, dolazi do pojave fluorescencije koja je proporcionalna koncentraciji sIgE antitijela u krvi. U odnosu na celuloznu podlogu, hidrofilni polimerni nosač može vezati oko tri puta više sIgE protutijela (sl. 7) (37).

Sl. 7. Načelo fluoroenzimokemijske sendvič metode za određivanje specifičnog IgE u serumu. 1. Alergen je vezan na čvrstom polimernom nosaču te reagira s IgE-om iz seruma; 2. Nakon ispiranja dodaje se protutijelo obilježeno enzimom/fluorokromom, 3. Dodaje se supstrat enzima; 4. Reakcija se zaustavlja i mjeri završna fluorescencija



Koncentracija sIgE protutijela izražava se razredima (I-VI) ili koncentracijom sIgE (kIU/L) (tablica 4). Iako postoji mogućnost određivanja specifične senzibilizacije prema mješavini alergena (sezonski inhalacijski alergeni, alergeni hrane), zbog određenog broja lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata, bolju dijagnostičku vrijednost ima određivanje sIgE prema specifičnom alergenu (42). Pozitivna sIgE antitijela prema mješavini alergena upućuju na senzibilizaciju na barem 1 prisutan alergen, dok negativan rezultat ne isključuje senzibilizaciju (43-45). Isto tako, pozitivna sIgE protutijela samostalno ne znače dijagnozu alergijske bolesti, budući da više od 20 % bolesnika s pozitivnim sIgE protutijelima u krvi nema kliničke simptome (46,47). U većine bolesnika s klinički manifestnom alergijom sIgE protutijela su pozitivna. Izrazito visoka koncentracija sIgE povećava vjerojatnost pojave simptoma u bolesnika izloženog alergenu, iako nije utvrđena korelacija između koncentracije sIgE i težine simptoma (48).

Koncentracija sIgE ovisi o uzročnom alergenu. Najbolju dijagnostičku vrijednost ima određivanje sIgE protutijela na inhalacijske alergene, manju prema

alergenima hrane, a najmanju prema alergenima beta-laktamskih antibiotika te alergenima otrova opnokrilaca (26). Primjerice, čak i vrlo niske vrijednosti sIgE (>0,35 kU/L) na alergene brašna, jaja ili inhalacijske alergene, u djece mlađe od 2 godine ukazuju na rizik pojave alergije u kasnijoj dobi, dok sIgE protutijela na proteine kravljeg mlijeka nisu povezana s kasnijim komplikacijama niti pri koncentracijama sIgE 0,70-3,50 kU/L (49). Određivanje sIgE na nutritivne alergene može pokazati i lažno niže vrijednosti ako se radi o labilnim alergenima, dok je za otkrivanje preosjetljivosti na alergen otrova ose potrebna visoko osjetljiva metoda s granicom detekcije sIgE od 0,10 kU/L (50). U procjeni alergije na otrov opnokrilaca treba oprezno tumačiti rezultate kožnog testa i sIgE, naročito ako je prošlo puno vremena od kliničke reakcije. Reproducibilnost ponavljanih testova nakon 2 i 6 tjedana od uboda za oba se testa pokazala lošom (51).

Iako su manje osjetljivi, testovi mjerenja koncentracije sIgE imaju veću specifičnost od kožnog testa. Nekoliko je situacija u kojima određivanje sIgE ima prednost pred kožnim testom, a odnose se na bolesnike u kojih bi kontakt s alergenom mogao izazvati tešku anafilaktičku reakciju, nesuradljive bolesnike, prisutne generalizirane kožne promjene ili izraženi dermografizam, te nemogućnost prekida terapije koja utječe na pozitivnost kožnog testa (antihistaminici, triciklički anti-depresivi, sistemski glukokortikosteroidi) (52-54). U ostalim se slučajevima dijagnoza mora temeljiti na korelaciji anamneze i fizikalnog statusa, kožnih testova i određivanja sIgE te eventualnoj primjeni provokacijskih testova (55). Najbolji su primjer alergijske reakcije na hranu, kod kojih s obzirom na dob i vrstu alergena, postoji tendencija određivanja granične koncentracije sIgE pri kojoj se očekuje klinička reakcija (tablica 5). Ipak, oko 50 % bolesnika reagira i kod nižih koncentracija sIgE, stoga anamneza i na njoj temeljena odluka o provođenju provokacijskih testova, ostaje vrlo važna u dijagnostici nutritivne alergije (56).

Tablica 4.

Razredi koncentracija specifičnih IgE protutijela

Normalne vrijednosti IgE ≤ 122 kU/l			
Razredi specifičnih IgE antitijela (CAP RAST):			
I	razred	0,35-0,70	kU/L
II	razred	0,71-3,50	kU/L
III	razred	3,51-17,50	kU/L
IV	razred	17,51-50,0	kU/L
V	razred	50,1-100	kU/L
VI	razred	>100	kU/L

Tablica 5.

Granične vrijednosti sIgE na nutritivne alergene, njihova osjetljivost i specifičnost u predviđanju kliničke reakcije.

Aergen	Granična vrijednost kIU/L	Osjetljivost	Specifičnost	PPV %	NPV %
Bjelanjak jajeta	7	61	95	98	38
Djeca <2 god	2			95	
Mlijeko	15	57	94	95	53
Djeca <2 god	5			95	
Kikiriki	14	57	100	100	36
Riba	20	25	100	100	89
Soja	30	44	94	73	82
Brašno	26	61	92	74	87

PPV - pozitivna prediktivna vrijednost, NPV - negativna prediktivna vrijednost

(Preuzeto iz Dodig S. Laboratorijska dijagnostika alergija. Paediatr Croat 2012; 56 (Supl 1): 90-96) (26)

4.2. Preporuka za metodu određivanja IgE u RH

Većina imunoloških laboratorija u Republici Hrvatskoj, kao i u drugim zemljama (od srednjoeuropskih zemalja, laboratoriji u Beču, Grazu, Zürichu, Berlinu), za *in vitro* dijagnostiku koriste fluoroenzimoimuno-kemijsku (FEIA) metodu (ImmunoCAP) (57). Ova se metodologija smatra zlatnim standardom određivanja ukupnog i specifičnog IgE (sIgE) (58).

Na temelju dokaza iz literature te preporuka međunarodnih udruženja, a s ciljem harmonizacije *in vitro* dijagnostike na teritoriju RH, Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju preporuča da ova metodologija i nadalje ostane dominantna u laboratorijskoj alergološkoj dijagnostici (59).

Naime, studija Lamberta i sur. pokazala je kako je mjerenje sIgE metodom FEIA (ImmunoCAP) izrazito točna metoda, s ponovljivim rezultatima mjerenja, pouzdanima u dijagnostici i terapiji alergijskih bolesti (60). Iako su se na tržištu pojavile i druge imunokemijske metode (kemiluminiscentne imunokemijske metode, CLIA, primjerice Immulite), istraživanja su pokazala da njihovi rezultati nisu usporedivi s rezultatima dobivenima metodom FEIA (ImmunoCAP) za sve alergenske ekstrakte. Nekoliko je studija uspoređivalo rezultate mjerenja sIgE ImmunoCAP i Immulite metodama (61,62). Studija Wanga i sur. iz 2008. godine utvrdila je da mjerenje sIgE na alergene jajeta, mlijeka, kikirikija, mačje dlake, breze te *Dermatophagoides farinae* metodom CLIA, Immulite pokazuje veće vrijednosti u odnosu na metodu FEIA, ImmunoCAP (63). U studiji Szecsija i sur. iz 2011. godine, metoda CLIA, Immulite pokazala je 62 % više vrijednosti sIgE na alergene jajeta (f1), breze (t3), mačje (e1) i pseće dlake (e5), u odnosu na FEIA, ImmunoCAP. Još značajnija razlika dobivena je za rekombinantne alergene (Gal d 1, Bet v 1, Fel d 1 te Can f 1). S druge strane, pri manjim vrijednostima sIgE-a, Immulite u usporedbi s ImmunoCAP metodom pokazuje manji izmjereni rezultat. Također, Immulite pokazuje veće vrijednosti sIgE u odnosu na ukupni IgE za sva četiri alergena (64). Rezultati studija upućuju na to da dvije metode međusobno ne koreliraju. Koncentracije sIgE u djece s alergijom na proteine jajeta mjerene FEIA metodom dobro koreliraju s kliničkom prezentacijom bolesti te bi istodobno uvođenje drugih metoda otežalo dijagnostiku i kliničku procjenu bolesnika (65). Metodom FEIA može se odrediti sIgE prema većem broju alergena (i nativnih i rekombinantnih) nego metodom CLIA. Usporede li se te dvije metode za određivanje koncentracije ukupnog IgE-a, može se zaključiti kako je gornja granica linearnosti mjerenja kod FEIA značajno veća (5000 kIU/L) nego kod metode CLIA (2000 kIU/L), što zahtijeva dodatna razrjeđivanja uzorka da bi se dobio točan - kvantitativni rezultat. To u konačnici poskuplje pojedinačnu ana-

lizu. Veoma je važan i podatak o prozonskom učinku (*hook effect*) kod ovih dviju metoda, kao uzroku lažno negativnih rezultata. Proizvođači reagensa upozoravaju da prozonski učinak kod metode FEIA nastaje kod koncentracije veće od 153 000 kIU/L, a kod metode CLIA prozonski učinak nastaje već kod koncentracije od 13 000 kIU/L. Opasnost je da se kod potonje metode dobije rezultat unutar referentnih intervala (npr. < 120 kIU/L), unatoč izrazito povećanoj koncentraciji ukupnoga IgE (>13 000 kIU/L). Za praksu je također važno da kod metode FEIA kalibriranje unutar sistema traje 6 mjeseci, dok je kod metode CLIA svakih 14 dana potrebno kalibrirati, što povećava troškove analize. Konačno, rezultate navedenih istraživanja prihvatile su brojne krovne institucije, poput *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (SAD, 2010.) (66), *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE, Velika Britanija, 2011.) (67), *PRACTAL* (europska skupina stručnjaka za astmu u djece) (68), Američka akademija za alergologiju i kliničku imunologiju (2008.) (69), Južnoafričko alergološko društvo (70).

4.3. Biočip tehnologija

Biočip tehnologija (engl. *microarray technology*, tehnologija na mikropostroju) omogućuje istodobno određivanje sIgE protutijela prema velikom broju alergena, koristeći jednu pločicu s panelom vezanih alergena te vrlo malu količinu seruma. Moguće je koristiti ekstrakte ili komponente alergena, a komercijalno je dostupan test ISAC (*ImmunoCAP Immuno-Solid Phase Allergen Chip*, Phadia). Test se temelji na reakciji alergena (panel od oko 112 alergena) s IgE protutijelima. Nastalom kompleksu dodaju se fluorescirajuća anti IgE protutijela, a intenzitet fluorescencije mjeri se laserski. Rezultati se izražavaju ISAC standardiziranim jedinicama (71). Izmjerene koncentracije sIgE dobivene biočipom dobro koreliraju s onima određivanim ImmunoCAP-metodom, iako je za male koncentracije sIgE klasični ImmunoCAP osjetljiviji. Također je uočena veća vremenska varijabilnost rezultata dobivenih metodom ISAC u odnosu na ImmunoCAP. Stoga se metodologija ISAC ne preporuča u kliničkom praćenju bolesnika, već u dijagnostici polisenzibiliziranih bolesnika, posebno onih kod kojih se sumnja na križnu reaktivnost (72-76).

4.4. Određivanje specifičnih IgG protutijela

Metodologija određivanja IgG protutijela analogna je ImmunoCAP-metodi. Temelji se na reakciji IgG antitijela iz seruma pacijenta sa specifičnim alergenima kovalentno vezanima za podlogu. Nakon ispiranja, dodaju se anti-IgG antitijela (ili antitijela specifična za IgG4 podskupinu) te se mjeri aktivnost nastalog kompleksa,

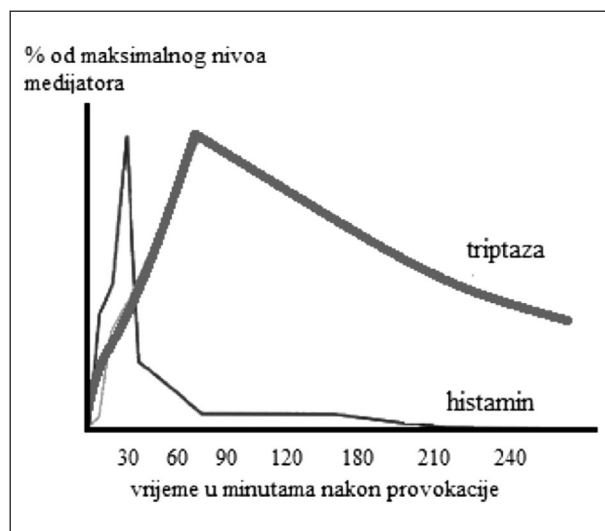
koja je proporcionalna koncentraciji specifičnih IgG protutijela (37). Alergen specifična IgG antitijela mogu se pojaviti zbog ekspozicije organizma alergenima iz okoliša ili kao posljedica specifične imunoterapije. Pojedina su istraživanja dokazala prisutnost IgG antitijela specifičnih za neke nutritivne alergene, no njihova povezanost s alergijom na hranu nije dokazana. Stoga se navedene testove ne preporuča koristiti u dijagnostici reakcija preosjetljivosti na hranu (77). Također je pokazano da za vrijeme i nakon specifične imunoterapije na alergene otrova opnokrilaca, dolazi do porasta IgG protutijela. Koncentracija IgG protutijela skromno korelira sa smanjenjem rizika anafilaksije nakon uboda opnokrilca (78). Uloga IgG protutijela nije dokazana za specifičnu imunoterapiju drugim vrstama alergena (26).

4.5. Triptaza

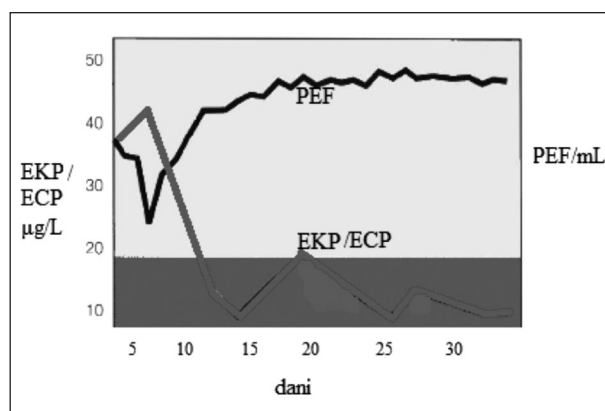
Enzim triptaza (neutralna serinska esteraza) u velikim je količinama pohranjen u sekretornim granulama mastocita. Oslobađa se nakon vezanja IgE protutijela za receptore na membrani mastocita, zajedno s histaminom i ostalim vazoaktivnim medijatorima. Smatra se biljegom aktivacije mastocita. Iako je poznato nekoliko oblika ovog enzima (I, Ia, III β , T), klinički su najznačajnije α i β triptaza. S obzirom na to da se α triptaza spontano luči iz mastocita, određivanje omjera α i β triptaze daje klinički važnu informaciju o aktivaciji mastocita pod utjecajem specifičnog alergena. Triptaza je enzimatski aktivna isključivo tvoreći kompleks s heparinom. Nakon njihovog razdvajanja, prelazi u monomerni oblik te gubi enzimatsku aktivnost. Mjerenje triptaze preporuča se provesti 15 min do 3 sata nakon anafilaktičke reakcije. Ukazuje na ranu fazu alergijske reakcije. Nakon 12-24 sata, njena se koncentracija u krvi vraća na normalu (sl. 8). Koncentracija α triptaze povećana je kod bolesnika s mastocitozom. Normalna koncentracija triptaze iznosi manje od 13 $\mu\text{g/L}$. Triptaza se također određuje fluoroenzimoimunotestom - ImmunoCAP (79-84).

4.6. Eozinofilni kationski protein

Eozinofilni kationski protein (EKP) bazični je protein smješten u granulama eozinofilnih granulocita, molekularne mase 18,5 - 22 kDa. Porast koncentracije EKP moguće je detektirati u serumu, nazalnom sekretu i sputumu tijekom kasne faze alergijske reakcije (6-24 sata nakon ekspozicije alergenu), u kojoj dominantnu ulogu imaju eozinofili (85-93). EKP također se određuje fluoroenzimoimunotestom - ImmunoCAP. EKP, kao produkt degranulacije eozinofilnih granulocita ukazuje na akutnu izloženost alergenu, odnosno intenzitet alergijske upale (sl. 9). Koncentracija EKP >20



Sl. 8. Kretanje koncentracije triptaze i histamina u krvi nakon provokacije alergenom



Sl. 9. Kretanje koncentracije EKP-a u serumu u usporedbi s vrijednostima PEF-a u kasnoj fazi alergijske reakcije (PEF, od engl. Peak Expiratory Flow, vršni protok u ekspiriju)

$\mu\text{g/L}$ ima visoku prediktivnu vrijednost za razvoj astme u male djece, kod koje se za vrijeme respiracijske infekcije razvije bronhopneumonija (4). EKP se može koristiti za praćenje učinkovitosti protuupalne terapije alergijskih bolesti (95). Ipak, zbog mnogih je predanalitičkih interferencija dijagnostička vrijednost EKP-a ograničena (96). Normalne vrijednosti EKP manje su od 16 $\mu\text{g/L}$.

4.7. Test aktivacije bazofilnih leukocita

Temelj testa aktivacije bazofilnih leukocita (BAT, od engl. *Basophil Activation Test*) jest degranulacija, potaknuta vezanjem specifičnih IgE antitijela za receptore na membrani stanica. Aktivacijom i degranulacijom bazofilnih leukocita dolazi do ekspresije CD63

i CD203c staničnih obilježja na njihovoj membrani. CD63 molekule smještene su u lizosomima zajedno s histaminom, stoga koncentracija histamina korelira s ekspresijom CD63. Ekspresija CD63 (alternativno CD 203c) molekula određuje se metodom protočne citometrije (97,99). Stupanj aktivacije bazofilnih leukocita izražava se na dva načina: 1) *bazofilnom reaktivnošću*, tj. brojem aktiviranih stanica nakon izlaganja optimalnoj koncentraciji alergena, te 2) *bazofilnom osjetljivošću*, odnosno koncentracijom alergena pri kojoj je 50 % stanica aktivirano. Kod negativnog je testa aktivacije bazofila zabilježeno oko 10 % *non-respondera* u dječjoj te oko 5 % u odrasloj populaciji. Značenje testa aktivacije bazofila za kliničkog alergologa sastoji se u sljedećem:

1. Pomoć u dokazivanju preosjetljivosti na uzročni alergen
2. Praćenje tijeka alergijske bolesti
3. Procjena stupnja težine alergijske bolesti.

Najčešće korišteni alergeni u testu aktivacije bazofilnih leukocita jesu poleni, otrovi insekata, grinja, neki alergeni hrane (mlijeko, kikiriki) te neki lijekovi (npr. rukoronij, kortikosteroidi, beta laktamski antibiotici). Najveće značenje BAT- a jest u dijagnostici preosjetljivosti na otrove insekata, u cilju identifikacije klinički značajnog alergena (99,101). Nadalje, BAT se koristi u dijagnostici alergija na lijekove (beta-laktamske antibiotike, kinolone te nesteroidne antireumatike, mišićne relaksanse, kontraste i pirazolone) (102-104). Naročito je koristan za lijekove za koje ne postoji drugi specifični test (opijati, albumini, metilprednizolon, anti-histaminici). Kod alergije na hranu (kikiriki, mlijeko), koristi se u praćenju uspješnosti specifične imunoterapije te procjeni rizika i težine reakcije, smanjujući potrebu za izvođenjem oralnih testova provokacije hranom (103,106). U praćenju tijeka alergijske bolesti, test je koristan u praćenju uspješnosti anti-IgE terapije (107), specifične imunoterapije (105), prirodnog smanjenja preosjetljivosti na alergene hrane (108) te procjeni stupnja težine alergijske reakcije na alergene kukaca (99,101). Test je koristan u dijagnostici kronične urtikarije (109).

6. POSLIJEANALITIČKA FAZA

Poslijeanalitička faza podrazumijeva tumačenje nalaza za koje je potrebno poznavati referentne vrijednosti, predanalitičke i analitičke čimbenike te patofiziologiju alergijskih bolesti. Poseban problem je križna reaktivnost te lažno pozitivni rezultati sIgE, uzrokovani specifičnom reaktivnošću prema ugljikohidratnim determinantama (110). Problem križne reaktivnosti rješava se primjenom komponentne alergološke dijagnostike, dok

bolesnici s visokim sIgE zbog reaktivnosti prema ugljikohidratnim komponentama nemaju kliničke simptome (111,112). Tablica 6 sažeto prikazuje preporuke za *in vitro* dijagnostiku s obzirom na vrstu alergena.

7. DIJAGNOSTIKA ALERGENSKIM EKSTRAKTIMA

Ekstrakti alergena mješavine su alergena i raznih drugih proteina i polisaharida, dobiveni iz prirodnih izvora. Sastav proteina u ekstraktu određuje se tehnikama razdvajanja proteina u gelu (elektroforeza i srodne tehnike (sl. 10).

7.1. Potentnost alergenskog ekstrakta

U ekstraktu alergena nalaze se proteini koji senzibiliziraju velik broj seruma bolesnika - glavni ili *major* alergeni, te sporedni (*minor*) alergeni, prepoznati u manje od 50 % velikog broja seruma. Potentnost alergenskog ekstrakta određuje se *in vivo* i *in vitro*. *In vivo* potentnost alergena izražava se biološkim jedinicama (BU/mL), a određuje koncentracijom ekstrakta koji izazove urtikiju. *In vitro* potentnost ekstrakta određuje se blokadom IgE antitijela specifičnih za alergene iz ispitivanog seruma, a iskazuje stupnjem inhibicije RAST-a.

7.2. Standardizacija alergenskog ekstrakta

Proizvodnja kvalitetnih ekstrakata alergena nužna je u dijagnostici i specifičnoj imunoterapiji alergijskih bolesti. Istraživanja su pokazala da se kvaliteta ekstrakata razlikuje među različitim proizvođačima (120,121). S obzirom na moguću varijabilnost ekstrakata alergena, za pouzdanu dijagnostiku i terapiju, potrebna je njihova standardizacija (122). U postupku standardizacije alergena preporuča se koristiti adekvatan, nekontaminirani izvor alergena. Primjerice, pokazano je da su izvori alergena za *D. pteronyssinus* prikupljeni u različitim dijelovima svijeta pokazali različit stupanj IgE senzibilizacije (123). Danas se za izražavanje potentnosti ekstrakata koristi više različitih jedinica potentnosti alergenskog ekstrakta (tablica 7).

Kod standardizacije alergena preporuča se odrediti glavni alergen te izmjeriti njegovu koncentraciju. Reakcijom alergena sa sIgE iz velikog broja seruma RAST inhibicijom najčešće se u ekstraktu identificiraju glavni alergeni. Međutim, dio alergena se ne prepozna, a njihov omjer ostaje nepoznat. Određivanje koncentracije glavnog alergena u ekstraktu smatra se ključnim za provođenje supkutane specifične imunoterapije (125,126).

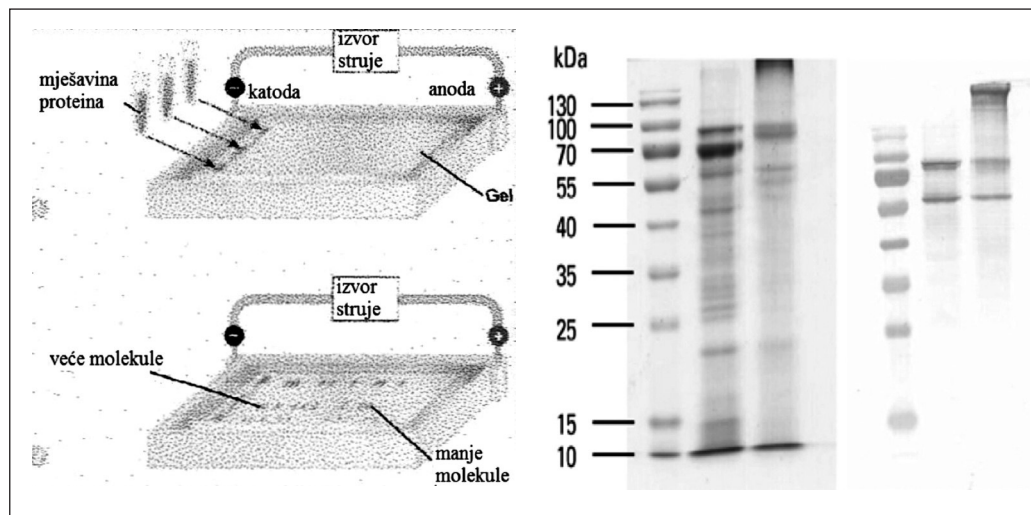
Tablica 6.

Laboratorijska dijagnostika prema vrsti alergena

VRSTA ALERGENA	PREPORUKE ZA <i>IN VITRO</i> DIJAGNOSTIČKU METODU
1. INHALACIJSKI ALERGENI	1. slgE <ul style="list-style-type: none"> • slgE na inhalacijske alergene dobro korelira s kliničkom slikom (26) • koncentracija slgE najviša je u sezoni polenacije (19,20) • preporuča se određivanje pojedinačnih, a ne grupnih inhalacijskih alergena (42,58) • panel inhalacijskih alergena ima visoku negativnu prediktivnu vrijednost u djece s bronhopneumonijama pa se može koristiti u određivanju fenotipa astme (113)
1. NUTRITIVNI ALERGENI	1. slgE <ul style="list-style-type: none"> • ne preporuča se određivanje preosjetljivosti na panele nutritivnih alergena (ISAC) ako za to ne postoji anamnestička podloga. Lažno pozitivni rezultati mogu potaknuti uvođenje nepotrebnih dijetnih restrikcija • kod bolesnika s orofaringealnim alergijskim sindromom, preporuča se odrediti slgE na križno reaktivne alergene (114) 2. BAT Kod nekih alergena (npr. kikiriki), BAT može pridonijeti procjeni težine alergijske reakcije te uspješnosti specifične imunoterapije (105-108)
3. LIJEKOVI*	1. slgE <ul style="list-style-type: none"> • testovi slgE dostupni su za lijekove velike molekulske mase (heterologi antiserum, inzulin, streptokinaza), a od manjih molekula, za penicilin. Za penicilin je specifičnost visoka, a osjetljivost niska (115-117) 2. BAT <ul style="list-style-type: none"> • koristan je u dijagnostici alergije na beta laktamske antibiotike, kinolone te nesteroidne antireumatike (100-102) • preporuča se koristiti za lijekove za koje ne postoji slgE (opijati, albumini, metilprednizolon, antihistaminici)
4. OTROVI OPNOKRILACA*	1. slgE <ul style="list-style-type: none"> • loše korelira s kliničkom slikom • u 30 % slučajeva javlja se lažna dvostruka pozitivnost na alergene ose i pčele (118,119) 2. RAST inhibicija 3. BAT <ul style="list-style-type: none"> • BAT može pridonijeti procjeni težine reakcije za vrijeme specifične imunoterapije te pomoći u diferenciranju alergena uzročnika u nejasnim slučajevima (99,103,104)
5. LATEKS*	1. slgE 2. BAT (26)

* Koncentracija slgE izrazito se smanjuje s vremenom proteklom od alergijske reakcije, preporuča se odrediti slgE 2-3 tjedna nakon incidenta, maksimalno unutar 6 mjeseci (26)

Sl. 10. Elektroforeza proteina. Proteine u ekstraktu razlikujemo prema veličini molekule



Tablica 7.

Različite jedinice kojima se definira potentnost alergenskog ekstrakta

Mjerna jedinica potentnosti alergena	Definicija mjerne jedinice
Omjer mase sirovine i volumena otapala	g/mL
Proteinsko dušična jedinica (PNU, od engl. protein- nitrogen unit)	0,01 µg protein-dušika
Jedinica ekvivalentna histaminu u testu ubodom (HEP, od engl. <i>Histamine Equivalent Prick</i>)	10 HEP odgovaraju koncentraciji alergena koja uzrokuje urtikiju jednake veličine kao 10 mg/mL histamin dihidroklorida u testu ubodom
Biološka jedinica (BU, od engl. <i>Biological Unit</i>)	Odgovara 1/1000 HEP u <i>prick</i> testu
Bioekvivalentna alergenska jedinica (BAU, od engl. <i>Bioequivalent Allergen Unit</i>)	Koncentracija otopine koja uzrokuje eritem sume ortogonalnih promjera 50 mm u intradermalnom testu

Pripremljeno prema Jeong KJ i sur. Optimization of allergen standardization. Yonsei Med J 2011; 52(3):393-400. (124)

8. DIJAGNOSTIKA ALERGENSKIM KOMPONENTAMA

Poteškoće u standardizaciji alergenskih ekstrakata dovele su do razvoja dijagnostike alergenskim komponentama, molekularne (MAD, od engl. *Molecular Allergy Diagnosis*) ili komponentne (CAD, od engl. *Component Resolved Diagnosis*) dijagnostike. Molekularna dijagnostika omogućava određivanje senzibilizacije bolesnika na molekularnoj razini, a umjesto alergenskih ekstrakata koristi pročišćene alergene iz prirodnih izvora ili proizvedene rekombinantnom DNA tehnologijom. Molekularna alergološka dijagnostika u kliničkoj se praksi koristi u posebnim indikacijama, definiranim smjernicama Svjetske alergološke organizacije (*WAO-ARIA-GALEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis, 2013.*) (127). Za *in vitro* molekularnu dijagnostiku trenutno je dostupno oko 130 pročišćenih ili kloniranih molekula alergena s poznatom trodimenzionalnom strukturom.

Molekularnu dijagnostiku moguće je provesti na *singleplex* pločici (pločica za jedan analit), gdje se analizira jedan alergen te na pločici koja omogućuje testiranje velikog broja alergena (*multiplex* - milijun analita, *low-plex* i *mid-plex* - 10 do 1000 analita po jednom testu) i dijagnostiku križne reaktivnosti (biočip, *microarray* tehnologija).

8.1. Klinička primjena molekularne alergološke dijagnostike

8.1.1. Križna reaktivnost

Mnogi su proteini strukturno vrlo slični, te se prema strukturi svrstavaju u nekoliko glavnih obitelji (tablica 8), koje su izrazito konzervirane među različitim prirodnim vrstama. Kod nekih bolesnika, alergen specifi-

čna IgE protutijela zbog strukturne se sličnosti epitopa vežu na proteine iz različitih izvora alergena, što se naziva križnom reaktivnošću (tablica 9).

Molekularna dijagnostika omogućuje razlikovanje primarne senzibilizacije od križne reaktivnosti te povećava pouzdanost pretrage. Primjer je alergijska reakcija na kikiriki, kod koje se Ara h 2 smatra primarnom senzibilizirajućom molekulom, a Ara h 8 jest biljeg križne reaktivnosti između kikirikija i peluda drveća *Fagales* (128,129).

Poseban problem je križna reaktivnost između inhalacijskih i nutritivnih alergena. Križno su reaktivni inkompletni nutritivni alergeni (PR-10 i profilin), povezani s oralnim alergijskim sindromom, dok kompletni nutritivni alergeni, otporni na toplinu i probavne enzime (skladišni proteini, lipidni transferni proteini), mogu dovesti do sistemske reakcije. MAD omogućuje detekciju primarnog senzibilizirajućeg alergena čime se izbjegavaju nepotrebni testovi oralnog opterećenja hranom i dijetne restrikcije te omogućuje ispravno propisivanje specifične imunoterapije (130,131). Mnogi ekstrakti alergena u svom sastavu sadrže križno reaktivne ugljikohidratne determinante. MAD omogućuje određivanje sIgE na MUXF (tip križno reaktivnih ugljikohidratnih determinanti) radi isključivanja klinički beznačajne reaktivnosti na križno reaktivne ugljikohidratne determinante glikoziliranih alergena (132).

8.1.2. Procjena rizika i težine alergijske reakcije

Procjena rizika i težine alergijske reakcije, osobito na nutritivne alergene, još je jedno područje primjene molekularne dijagnostike. Hrana sadrži molekule alergena, od kojih su neke otporne na zagrijavanje i probavne enzime (kompletni alergeni), dok druge nisu (inkompletni alergeni). Inkompletni alergeni uzrokuju

Tablica 8.

Glavne skupine proteina.

Obitelj proteina	Svojstva proteina	Članovi obitelji
PR-10 proteini (Bet v1 homologni)	neotporni na toplinu	pelud stabala, voće, povrće, orašasti plodovi
Profilini (Bet v2 homologni)	visoko križno reaktivni	pelud stabala, trava, korova, voće, povrće, orašasti plodovi
nsLTP	otporni na toplinu i probavu	voće, povrće, orašasti plodovi, pelud korova
Skladišni proteini	otporni na toplinu i probavu povezani s teškim sistemskim reakcijama	mahunarke, orašasti plodovi, sjemenke,
Tropomiozini	otporni na toplinu	grinje, rakovi, insekti

nsLTP, nespecifični lipidni transferrni protein

Tablica 9.

Glavne skupine križno reaktivnih alergena

KRIŽNA REAKTIVNOST MEĐU RAZNIM PROTEINIMA			
Pelud -pelud	Pelud-biljni NA	Biljni NA-biljni NA	Pelud-biljni NA- lateks
- Ole e1 homolozi - polkalcini - pektat liaza - poligalakturonaza	- profilini - PR-10 proteini (homologni s Bet v1) - nsLTP - TLP	- skladišni proteini - ns LTP - TLP	- profilin - beta-1,3-glukanaza - heveinu slični proteini

Preuređeno prema Luengo i sur. Component resolved diagnosis: When should it be used? Clinical and translational allergy 2014;4:28; NA- nutritivni alergeni ; TLP, protein sličan taumatinu ; nsLTP, nespecifični lipidni transferrni protein (130)

lokalni alergijski odgovor (oralni alergijski sindrom), dok kompletni alergeni mogu uzrokovati teže sistemske reakcije. Identifikacija alergena na koji je bolesnik senzibiliziran, poput biomarkera omogućuje predviđanje težine reakcije, savjetovanje bolesnika o izbjegavanju alergena te nepotrebnih oralnih provokacijskih testova (133).

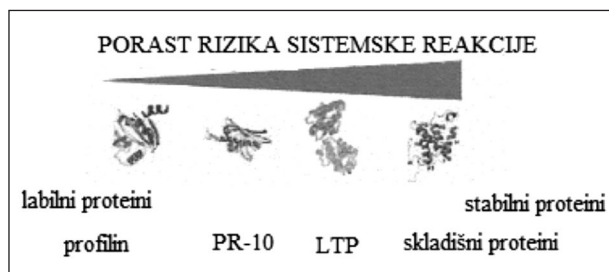
Težina alergijske reakcije na nutritivni alergen ovisi o tipu senzibilizacije (sl. 11), afinitetu vezanja IgE za alergen, karakteristikama i količini alergena te prisutnosti kofaktora (134). Primjerice, Mal d 1 (PR-10) jabuke, homologan Bet v 1 alergenu polena breze izaziva samo oralni alergijski sindrom, dok Mal d 3 (nsLTP, primar-

ni alergen jabuke) može izazvati teže reakcije. Ipak, u literaturi je opisana anafilaksija zbog senzibilizacije na Mal d1, vjerojatno stoga što tip reakcije ne ovisi samo o senzibilizirajućem alergenu (135,136).

Pregled alergogenih komponenti nutritivnih alergena iz istog izvora s različitim potencijalom razvoja teških sistemskih reakcija na hranu prikazan je na tablici 10.

8.1.2. Propisivanje specifične imunoterapije uz pomoć molekularne alergološke dijagnostike

U većine bolesnika senzibiliziranih na jedan ili nekoliko inhalacijskih alergena bez preklapanja polenacijskih sezona pravilna se dijagnoza može postaviti primjenom ekstrakata alergena. Iako je većina bolesnika senzibilizirana na glavne alergene polena (npr. Ole e1, Bet v1), u nekim je regijama glavni senzibilizirajući alergen onaj koji se inače smatra sporednim alergenom (npr. Ole e 7 i Ole e 9). MAD može pomoći identificiranju alergena uzročnika senzibilizacije, što je ključno u prepisivanju SIT, posebice stoga što su komercijalni ekstrakti standardizirani samo za glavne alergene (137,138). Sličan je primjer alergen Can f 5 iz prostate psa na koji je senzibilizirano oko 37 % bolesnika, a koji je u ekstraktu alergena pseće dlake slabo zastupljen (139). Polisenzibilizacija na inhalacijske alergene u Eu-



Sl. 11. Rizik sistemske reakcije na nutritivne alergene ovisan o vrsti proteina

Tablica 10.

Alergogene komponente iz istog izvora i rizik sistemskih reakcija

Izvor alergenske molekule	Molekule visokog rizika	Molekule niskog rizika
<ul style="list-style-type: none"> • kikiriki • lješnjak • orah • soja • voće iz roda Rosaceae • žitarice 	Ara h 1, 2, 3, 9 Cor a 8, 9 Jug r 1, 2, 3 Gly m 5, 6 Pru p 3, Mal d 3 Tri a 14, Tri a 19	Ara h 8, profilin, CCD Profilin, CCD Profilin, CCD Profilin, CCD Pru p 1, Mal d 1, profilin, CCD Profilin, CCD

Preuzeto iz Canonica GW et al. A WAO-ARIA-GA2LEN consensus document on molecular based allergy diagnostics. World Allergy Org J 2013;6:17; CCD- križno reaktivna ugljikohidratna determinanta 129

ropi vrlo je raširena. MAD ima ulogu u prepoznavanju najvažnijeg alergena uzročnika tegoba te prepisivanju ispravnog ekstrakta alergena za SIT. Kliničke su studije pokazale da je SIT jednim inhalacijskim alergenom kod polisenzibiliziranih bolesnika sigurna i učinkovita, pod uvjetom da se radi o najvažnijim senzibilizirajućem alergenima (140). MAD se također preporuča u dijagnostici alergija na otrove opnokrilaca u svrhu otklanjanja rizika lažno pozitivnog sIgE zbog križne reaktivnosti prema ugljikohidratnim antigenim determinantama te međusobne križne reaktivnosti (141).

8.1.3. Molekularna dijagnostika u tretmanu anafilaksije

Preporuča se MAD provesti u bolesnika sa sumnjom na anafilaksiju potaknutu različitim kofaktorima. Kod anafilaksije potaknute vježbanjem preporuka je odrediti sIgE na omega-5-glijadin, a kod anafilaksije uzrokovane povrćem, orašastim plodovima i žitaricama, naročito u južnoj Europi, sIgE na nespecifične transferne proteine i omega-5-glijadin, kao potencijalne kofaktore (142). Kod sumnje na anafilaksiju uzrokovanu crvenim mesom, preporuča se odrediti sIgE na galaktozu (α gal) (143). Također, smatra se da ISAC biočip tehnologija u molekularnoj dijagnostici ima mjesto u obradi idiopatske anafilaksije (144).

8.1.4. Molekularna dijagnostika u alergiji na lateks

Kod bolesnika preosjetljivih na lateks, klinički su relevantni alergeni Hev b1, 3, 5 i 6, dok senzibilizacija na Hev b 8 ne dovodi do simptoma, te nije potrebno izbjegavanje materijala koji sadrže lateks. Uloga senzibilizacije na lateks i križne reaktivnosti na nutritivne alergene u sindromu lateks-voće nije razjašnjena (145,146).

8.1.5. Preporuke za primjenu molekularne dijagnostike

U bolesnika kojima se preporuča samo simptomatska terapija, monosenzibiliziranih bolesnika te onih s jasnom kliničkom slikom MAD ne daje značajno više informacija u odnosu na tradicionalne dijagnostičke testove. U suvremenoj su kliničkoj praksi razvijenih zemalja mnogo češći polisenzibilizirani bolesnici s kompleksnom simptomatologijom te sumnjom na križnu reaktivnost. Kod tih se bolesnika preporuča koristiti molekularnu dijagnostiku. Rutinska primjena MAD posebice se preporuča u bolesnika preosjetljivih na više inhalacijskih alergena te alergene hrane (uključujući različite kliničke manifestacije bolesti: OAS, anafilaksija, astma, ekcem).

ZAKLJUČCI

1. Molekularna dijagnostika alergijskih bolesti najkorisnija je u odabiru specifične imunoterapije, procjeni križne reaktivnosti te procjeni težine alergijske reakcije u bolesnika preosjetljivih na različite alergene.
2. Rutinska primjena molekularnih metoda preporuča se u polisenzibiliziranih bolesnika, bolesnika s nejasnom kliničkom slikom ili lošim odgovorom na primijenjenu terapiju.
3. Nema jasne koristi od primjene molekularne alergološke dijagnostike u bolesnika koji su senzibilizirani na jedan alergen te imaju jasnu kliničku sliku (147).

LITERATURA

1. Čvorišćec B, Sket-Janković N, Stipić A, Batišta I. Metode kožnog testiranja i kriteriji za procjenu kožnih reakcija. U: Standardizacija dijagnostičkih postupaka u alergologiji i kliničkoj imunologiji, Zagreb: Zbor liječnika Hrvatske, 1983, 36-52.
2. Treščec A, Kolevska T, Čvorišćec B i sur. Characterisation and partial purification of an Croatian national standard Dermatophagoides pteronyssinus allergen extract. Allergy 1993; 48: 454-9.
3. Kljaić-Turkalj M, Treščec A, Branović K i sur. Standardization of in-house reference extract of Ambrosia elatior (short ragweed pollen) and comparison with the international standard. Period Biol 1996; 98: 225-30.
4. Stipić-Marković A. Određivanje biološke aktivnosti polena korova Ambrosia elatior metodom titracionog kožnog testa. (magistarski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 1987, str.100.
5. Stipić-Marković A, Sket-Janković N, Čvorišćec B, Matijević Lj, Tuđman Z, Dekaris D. Reevaluation by biological standardization of known allergenic potency of a Dactylis glomerata extract. Period Biol 1986; 88: 198-9.
6. Sket-Janković N, Stipić-Marković A, Čvorišćec B i sur. Estimation of the allergenic activity of Dactylis glomerata pollen extract by inhibition of RAST assay. Period Biol 1986; 88: 195-7.
7. Stipić-Marković A, Sket-Janković N, Čvorišćec B. Određivanje potentnosti pripravka alergena Ambrosia elatior kožnim testiranjem i inhibicijom radioalergosorbentnog testa. Lijec Vjesn 1992; 114: 536.
8. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C i sur. Practical guide to prick tests in allergy to aeroallergens. Allergy 2012; 67: 18-24.
9. Van Kampen V, de Blay F, Folletti I i sur. EAACI position paper: skin prick testing in the diagnosis of occupational type I allergies. Allergy 2013; 68: 580-4.
10. Heinzerling LM, Burbach GJ, Edenharter G i sur. GA(2)LEN skin test study I: GA(2)LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. Allergy 2009; 64:1498-1506
11. Burbach GJ, Heinzerling LM, Edenharter G i sur. GA(2)LEN skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe. Allergy 2009; 64: 1507-15.
12. Rueff F, Bergmann KC, Brockow K i sur. Skin tests for diagnostics of allergic immediate-type reactions. Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology. Pneumologie 2011; 65: 484-95.
13. Zbornik radova Godišnjeg sastanka alergologa i kliničkih imunologa Hrvatske. Handout-i tečaja "Vještina izvođenja i interpretacije kožnog testa za procjenu IgE preosjetljivosti". Zagreb, 22-24. studeni 2012.
14. Zbornik radova Godišnjeg sastanka alergologa i kliničkih imunologa Hrvatske s tečajevima kožnog testiranja i plućne funkcije, Zagreb, 28-29. studeni, 2014.
15. Dodig S, Richter D, Benko B i sur. Cut-off values of total serum IgE between nonatopic and atopic children in North-West Croatia. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 639-47.
16. Popov TA, Ledford D, Lockey RF i sur. Maintenance of skills, competencies and performance in allergy and clinical immunology: time to lay the foundation for a universal approach. World Allergy Organ J 2012; 5: 45-51.
17. Kanceljak Macan B. Koje su kompetencije kliničkog alergologa? Zbornik radova simpozija "Bez alergena nema dijagnostike i liječenja alergijskih bolesti", Zagreb, 2009, str. 29-31
18. Potter PC, Warner JO, Pawankar R, Kaliner MA, Del Giacco S, Rosewasser L. Recommendations for Competency in Allergy Training for Undergraduates Qualifying as Medical Practitioners. A Position Paper of the World Allergy Organization. WAO J 2009; 2: 150-4.
19. Di Gioacchino M, Cavallucci E, Di Stefano F i sur. Influence of total IgE and seasonal increase of eosinophilic cationic protein on bronchial hyperreactivity in asthmatic grass-sensitized farmers. Allergy 2000; 55: 1030-4.
20. Špehar M, Zovko V, Šegulja D, Zrinski Topić R, Dodig S. Examination of seasonal difference in serum interleukin-17 and interleukin-5 concentrations in ragweed-sensitized children. Aerobiologia 2012; 28: 99-105.
21. Ono T, Yoshida M, Nakazono N. Immunologic reactivity on one year follow-up of subjects without allergy to Hymenoptera stings. Asian Pac J Allergy Immunol 1997; 15: 81-8.
22. Romano A, Mayorga C, Torres Mj i sur. Immediate allergic reactions to cephalosporins: cross-reactivity and selective responses. J Allergy Clin Immunol 2000; 106: 1177-83.
23. Goldberg A, Confino-Cohen R. Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol 1997; 100: 182-4.
24. Čvorišćec B, Lipozenčić J, Stipić Marković A, Paleček I. Kronološki osvrt na razvoj alergologije i kliničke imunologije u Hrvatskoj. Acta Med Croatica 2011; 65: 75-85.
25. Sket-Janković N, Valinger Z, Treščec A. Imunokemija: radioimunotest, enzimimunotest i srodne tehnike. U: Dekaris D, Čulo F i sur. (ur.). Klinička imunologija u nas. Zagreb: JAZU, 1990, 98-108.
26. Dodig S. Laboratorijska dijagnostika alergija. Paediatr Croat 2012; 56 (Suppl 1): 90-6.
27. van Ree R, Chapman MD, Ferreira F i sur. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. Allergy 2008; 63: 310-26.
28. Yman L. Botanical relation and immunological cross-reactions in pollen allergy. 2nd Edition. Uppsala, Sweden: Farmacia diagnostics AB, 1982.
29. Čvorišćec B, Buneta D, Lipozenčić J, Kanceljak-Macan B, Stipić Marković A. Imunodijagnostički postupci in vivo. U: Dekaris D, Čulo F i sur. Klinička imunologija u nas. Zagreb: JAZU, 1990, 98-108.
30. Dodig S. Imunokemija, Zagreb: Medicinska naklada, 2014.
31. MacGlashan D Jr. IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. Curr Opin Immunol 2008; 20: 717-23.
32. Rivera J, Fierro NA, Olivera A, Suzuki R. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. Adv Immunol 2008; 98: 85-120.

33. Gilfillan AM, Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev* 2009; 228: 149-69.
34. Rosenwasser LJ, Meng J. Anti-CD23. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 29: 61-72.
35. Weskamp G, Ford JW, Sturgill J i sur. ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat Immunol* 2006; 7: 1293-8.
36. Tantisira KG, Silverman ES, Mariani TJ, Xu J, Richter BG, Klanderman BJ. FCER2: a pharmacogenetic basis for severe exacerbations in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1285-91.
37. Batišta I, Stipić Marković A, Čvorišćec B. Dijagnostika alergijskih bolesti *in vitro*. *Biochem Med* 1996; 6: 213-21.
38. Lopata A. Laboratory methods in allergology. *Curr All Clin Imm* 2006; 19: 152-4.
39. Johansson SGO, Yman L. *In vitro* assays for immunoglobulin E. *Clin Rev Allergy* 1988; 6: 93-139.
40. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 73-80.
41. Zrinski Topić R, Dodig S, Živčić J, Raos M. Allergen specific immunoglobulin E in children under 6 years old with total immunoglobulin E below 10 kU/L. *Lab Med* 2011; 42: 158-60.
42. Johansson SGO. ImmunoCAP. Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 273-9.
43. Johansson SGO, Yman L. *In vitro* assays for immunoglobulin E. *Clin Rev Allergy* 1988; 6: 93-139.
44. Merrett J, Merrett TG. RAST atopy screen. *Clin Allergy* 1978; 8: 235-40.
45. Ownby DR, Anderson JA, Jacobs GL i sur. Development and comparative evaluation of a multiple-antigen RAST as a screening test for inhalant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 466-72.
46. Bousquet J, Anto J, Bachert C, Bousquet PJ, Colombo P, Cramer R. Factors responsible for differences between asymptomatic subjects and patients presenting and IgE sensitization to allergens: a GA-2LEN project. *Allergy* 2006; 61: 671-80.
47. Cramer R. The crux with a reliable *in vitro* and *in vivo* diagnosis of allergy. *Allergy* 2013; 68: 393-4.
48. Matsui EC, Sampson HA, Bahnson HT. Allergy, Allergens and Environmental Exposures. Allergen-Specific IgE as a Biomarker of Exposure Plus Sensitization in Inner-City Adolescents With Asthma. *Allergy* 2010; 65: 1414-22.
49. Kotaniemi-Syrjänen A, Reijonen TM, Romppanen J, Korhonen K, Savolainen K, Korppi M. Allergen-specific immunoglobulin E antibodies in wheezing infants: the risk for asthma in later children. *Pediatrics* 2003; 111: 255-61.
50. Guerti K, Bridts CH, Stevens WJ, Ebo DG. Wasp-venom-specific IgE: Towards a new decision threshold? *J Invest Allergol Clin Immunol* 2008; 18: 316-23.
51. Graif Y, Confino-Cohen R, Goldberg A. Reproducibility of skin testing and serum venom specific IgE in Hymenoptera venom allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96: 24-9.
52. Yunginger JW, Sweeney KG, Sturner WQ i sur. Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA* 1988; 260: 1450-2.
53. Sampson HA, Mendelsohn L, Rosen JP i sur. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992; 327: 380-4.
54. Bousquet J, Michel F-B. *In vitro* methods for study of allergy. Skin tests, techniques and interpretation. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, eds. *Principles and Practice in Allergy: In vivo Methods of Study of Allergy. Skin and Mucosal Tests, Techniques and Interpretation*. 4th ed. St Louis, MO: Mosby Year Book; 1993, 573.
55. Motala C. Position statement of Allergy Society of South Africa. Interpretation of specific IgE concentrations and skin-prick testing in the evaluation of food allergy. *Curr Allergy Clin Immunol* 2006; 19: 118.
56. Sampson HA. Utility of food specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 891-6.
57. Dodig S, Batišta I. Laboratorijska dijagnostika alergija i sigurnost bolesnika. *Medix* 2013; 106: 212-16.
58. Wall KM et al. Phadiatop – An atopy test with optimal allergen composition for most geographical regions. *JACI* 2014; 133: 44.
59. Dodig S. Što smatramo zlatnim standardom laboratorijske dijagnostike? Stipić Marković A, ur. *Knjiga sažetaka sa simpozija. Godišnji sastanak Hrvatskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju s tečajevima kožnog testa i plućne funkcije*, Zagreb, 2014.
60. Lambert C, Sarrat A, Bienvenu F i sur. The importance of EN ISO 15189 accreditation of allergen-specific IgE determination for reliable *in vitro* allergy diagnosis. *Allergy* 2015; 70: 180-6.
61. Hamilton RG, Mudd K, White MA, Wood RA. Extension of food allergen specific IgE ranges from the ImmunoCAP to the IMMULITE systems. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 107: 139-44.
62. Williams PB, Portnoy J. Comparing specific IgE values of 2 different assays. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 107: 550.
63. Wang J, Godbold JH, Sampson HA. Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1219-24.
64. Szecsi PB, Stender S. Comparison of Immunoglobulin E Measurements on IMMULITE and ImmunoCAP in Samples Consisting of Allergen-Specific Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibodies towards Allergen Extracts and Four Recombinant Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 162: 131-4.
65. Ando H, Moverare R, Kondo Y i sur. Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 583-8.
66. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy - NIAID-Sponsored Expert Panel Report; National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIH); December 2010
67. www.guidance.nice.org.uk/CG116 guidelines. Food allergy in children and young people: Diagnosis and assessment of food allergy in children and young people in primary care and community settings, 2011

68. Bernstein L, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R. Allergy Diagnostic Testing: An Updated Practice Parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100 Suppl 3: 1-148.
69. http://www.allergysa.org/ALLSA_Newsletter/2014-09-01. Inhalant allergy testing in South Africa. A New diagnostic Approach.
70. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH i sur. The European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTAL consensus report. *Allergy* 2008; 63: 5-34.
71. Hiller R, Laffer S, Harvanegg C i sur. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeeper for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16: 414-16.
72. Melioli G, Bonifazi F, Bonini S i sur. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem* 2011, 44: 1005-11.
73. Gadisseur R, Chapelle JP, Cavlier E: A new tool in the field of *in vitro* diagnosis of allergy; a preliminary results in the comparison of ImmunoCAP 250 with the ImmunoCAP ISAC. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 277-80.
74. Wohrl S, Vigl K, Zehetmayer S i sur. The performance of a component-based allergen microarray in clinical practice. *Allergy* 2006; 61: 633-9.
75. Cabrera Freitag P, Gokikoetxxea MJ, Gamboa PM, Martinez Aranguren R, Beorlegui C, Fernandez J. A study of the variability of the *in vitro* component based microarray ISAC CDR 103 technique. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2011; 21: 414-15.
76. Twaroch T. Carrier bound Alt a 1 peptides without allergenic activity for vaccination against *Alternaria alternata* allergy. *Clin Exp All* 2012; 42: 966-97.
77. Duff Hogan A, Schwartz LB. Markers of mast cell degranulation. *Methods* 1997; 13: 43-52.
78. Lin RY, Schwartz LB, Curry A i sur. Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: an emergency department-based study. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106: 65-71.
79. Foster B, Schwartz LB, Devouassoux G i sur. Characterization of mast-cell tryptase-expressing peripheral blood cells as basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 287-93.
80. Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J i sur. Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989; 83: 1551-55.
81. Schwartz LB, Sakai K, Bradford TR i sur. The alpha form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *J Clin Invest* 1995; 96: 2702-10.
82. Jogie-Brahim S, Min HK, Fukuoka Y i sur. Expression of alpha-tryptase and beta-tryptase by human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1086-92.
83. Moqbel R, Barkaus J, Bradley BL i sur. Application of monoclonal antibodies against major basic protein (MBK-13) and eosinophil cationic protein (EG1 and EG2) for quantifying eosinophils in bronchial biopsies from atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 265-73.
84. Zweiman B, Atkins PC, Moskovitz A i sur. Cellular inflammatory responses during immediate, developing, and established late-phase allergic cutaneous reactions: effects of cetirizine. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 341-7.
85. Jordan TR, Rasp G, Pfrogner E i sur. An approach of immunoneurological aspects in nasal allergic late phase. *Allergy Asthma Proc* 2005; 26: 382-90.
86. Ronchi MC, Piragino C, Rosi E i sur. Do sputum eosinophils and ECP relate to the severity of asthma? *Eur Respir J* 1997; 10: 1809-13.
87. Shields MD, Brown V, Stevenson EC i sur. Serum eosinophilic cationic protein and blood eosinophil counts for the prediction of the presence of airways inflammation in children with wheezing. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1382-9.
88. Ferguson AC, Vaughan R, Brown H i sur. Evaluation of serum eosinophilic cationic protein as a marker of disease activity in chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 23-8.
89. Joseph-Bowen J, de Klerk N, Holt PG i sur. Relationship of asthma, atopy and bronchial responsiveness to serum eosinophil cationic proteins in early childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1040-5.
90. Koh YY, Kang H, Kim CK. Ratio of serum eosinophil cationic protein/blood eosinophil counts in children with asthma: comparison between acute exacerbation and clinical remission. *Allergy Asthma Proc* 2003; 24: 269-74.
91. Yu J, Yoo Y, Kim do K i sur. Bronchial responsiveness and serum eosinophil cationic protein levels in preschool children with recurrent wheezing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94: 686-92.
92. Hyvärinen MK, Kotaniemi-Syrjänen A, Reijonen TM, Piippo-Savolainen E, Korppi M. Eosinophil activity in infants hospitalized for wheezing and risk of persistent childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 96-103.
93. Dodig S. Current laboratory diagnosis of allergy. *Rad Medical Sciences* 2008; 32: 117-28.
94. Zrinski Topić R, Dodig S. ECP - current concepts and controversies. *Biochem Med* 2011; 21: 111-21.
95. Hausmann OV, Gentinetta T, Bridts CH, Ebo DG. The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29: 555-66.
96. Glaumann S, Nopp A, Johansson SGO, Borres MP, Nilsson C. Oral peanut challenge identifies an allergy but the peanut allergen threshold sensitivity is not reproducible. *PLoS One* 2013; 8: e53465.
97. Hoffmann HJ, Frandsen PM, Christensen LH, Schiøtz PO, Dahl R. Cultured Human Mast Cells Are Heterogeneous for Expression of the High-Affinity IgE Receptor FcεRI. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157: 246-50.
98. Dodig S. Interferences in quantitative immunochemical methods. *Biochem Med* 2009; 19: 50-62.
99. Korosec P, Erzen R, Silar M, Bajrovic N, Kopac P, Kosnik M. Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1730-7.
100. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive

carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 155-61.

101. Eržen R, Košnik M, Silar M, Korošec P. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy* 2012; 67: 822-30.

102. Gamboa P, Sanz ML, Caballero MR i sur. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for *in vitro* diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1448-57.

103. Sanz ML, Gamboa PM, Antepara I i sur. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 277-86.

104. Torres MJ, Padial A, Mayorga C i sur. The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1768-75.

105. Zidarn M, Košnik M, Šilar M, Bajrović N, Korošec P. Sustained effect of grass pollen subcutaneous immunotherapy on suppression of allergen-specific basophil response; a real-life, nonrandomized controlled study. *Allergy* 2015; 70: 547-55.

106. Santos AF, Du Toit G, Douiri A i sur. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 179-86.

107. Nopp A, Johansson SGO, Ankerst J i sur. Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy* 2006; 61: 298-302.

108. Wanich N, Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA, Shreffler WG. Allergen-specific basophil suppression associated with clinical tolerance in patients with milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 789-94.

109. Kang MG, Song WJ, Park HK. Basophil Activation Test with Food Additives in Chronic Urticaria Patients. *Clin Nutr Res* 2014; 3: 9-16.

110. Nicolaou N, Custovic A. Molecular diagnosis of peanut and legume allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011; 11: 222-8.

111. Voskresensky Baričić T, Dodig S. Birch pollen associated peanut allergies in children. *Aerobiologia* 2013; 29: 85-93.

112. Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC i sur. How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents? *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 132: 132-40.

113. Fiocchi A, Besana R, Ryden AC i sur. Differential diagnosis of IgE mediated allergy in young children with wheezing or eczema symptoms using a single blood test. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93: 328-33.

114. Sampson HA, Aceves S, Bock SA i sur. Food allergy: A practice parameter update—2014. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 1016-25.

115. Blanca M, Mayorga C, Torres MJ i sur. Clinical evaluation of Pharmacia CAP System RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy. *Allergy* 2001; 56: 862-70.

116. Fontaine C, Mayorga C, Bousquet PJ i sur. Relevance of the determination of serum-specific IgE antibodies in the

diagnosis of immediate beta-lactam allergy. *Allergy* 2007; 62: 47-52.

117. Bernstein ID, Blessing-Moore J, Cox L, Lang MD; Nicklas RA. Drug Allergy: An Updated Practice Parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 105: 73e1-e78.

118. Egner W, Ward C, Brown DL, Ewan PW. The frequency and clinical significance of specific IgE to both wasp (*Vespa*) and honey-bee (*Apis*) venoms in the same patient. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 26-34.

119. Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, Burow G, Hubsch-Muller C, Enk A. *In vitro* hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006; 61: 1220-9.

120. Curin M, Reininger R, Swoboda I, Focke M, Valenta R, Spitzauer S. Skin prick test extracts for dog allergy diagnosis show considerable variations regarding the content of major and minor dog allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 154: 258-63.

121. Morrow KS, Slater JE. Regulatory aspects of allergen vaccines in the US. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001; 21: 141-52.

122. Burazer L, Milovanovic K, Milovanovic M, Vuckovic O, Velickovic TC, Gavrovic-Jankulovic M. Impact of *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body raw material on house dust mite allergy diagnosis in a Serbian population. *Med Vet Entomol* 2011; 25: 77-83.

123. May JC, Sih JT, Miller JR, Seligmann EB Jr. Optimization of parameters in protein nitrogen unit precipitation procedure for allergenic extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 63: 87-97.

124. Yeong KJ, Hong SC, Lee JS, Won Park J. Optimization of allergen standardization. *Yonsei Med J* 2011; 52: 393-400.

125. Turkeltaub PC, Rastogi SC, Baer H, Anderson MC, Norman PS. A standardized quantitative skin-test assay of allergen potency and stability: studies on the allergen dose-response curve and effect of wheal, erythema, and patient selection on assay results. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70: 343-52.

126. Ibarrola I, Sanz ML, Gamboa PM i sur. Biological characterization of glutaraldehyde-modified *Parietaria judaica* pollen extracts. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 303-9.

127. Kaul S, Lüttkopf D, Kastner B i sur. Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 141-50.

128. Ferreira F, Briza P, Inführ D i sur. Modified recombinant allergens for safer immunotherapy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006; 5: 5-14.

129. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pavenkar R i sur. A WAO-ARIA- GA2LEN consensus document on molecular based allergy diagnostics. *World Allergy Org J* 2013; 6: 1-17.

130. Luengo O, Cardona V. Component resolved diagnosis. When should it be used? *Clinical and translational allergy* 2014; 4: 28-37.

131. Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1442-60.

132. Asarnoj A, Nilsson C, Lidholm J i sur. Peanut component Ara h 8 sensitization and tolerance to peanut. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 468-72.

133. Katelaris CH. Food allergy and oral allergy syndrome. *Curr Opin Allergy Immunol* 2010; 10: 246-51.
134. Ebo DG, Hagedorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Sensitization to cross reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: Mimickers of allergy. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 137-44.
135. Wölbling F, Biedermann T. Anaphylaxis: Opportunities of stratified medicine for diagnosis and risk assessment. *Allergy* 2013; 68: 1499-1508.
136. Asero R, Pravettoni V, Anaphylaxis to plant foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13: 379-85.
137. Röseler S, Balakirski G, Plange J i sur. Anaphylaxis to PR-10 proteins (Bet v1 homologues). *Hautarzt* 2013; 64: 890-2.
138. Barber D, De La Torre F, Feo F i sur. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy* 2008; 63: 1550-8.
139. Barber D, De La Torre F, Feo F i sur. Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007; 17: 11-16.
140. Curin M, Reininger R, Swoboda I, Focke M, Valenta R, Spitzauer S. Skin prick test extracts for dog allergy show considerable variations regarding the content of major and minor dog allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 154: 258-63.
141. Calderon MA, Cox L, Casale TB, Moingeon P, Demoly P. Multiple allergen and single allergen immunotherapy strategies in polysensitized patients: looking at the published evidence. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 929-34.
142. Müller U, Schmidt Grendelmeier P, Hausmann O, Helbling A. IgE to recombinant allergens Api m1, Ves v1, Vesv5 distinguish double sensitization from cross reaction in venom allergy. *Allergy* 2012; 67: 1069-73.
143. Cardona V, Luengo O, Garriga T, Labrador Horrillo M, Sala Cunil A, Izquierdo A. Co factor enhanced food allergy. *Allergy* 2012; 67: 1316-18.
144. Tripathi A, Commins SP, Heymann PW, Platts Mills TA. Delayed anaphylaxis to red meat masquerading as idiopathic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; 2: 259-65.
145. Heaps A, Carter S, Selwood C, Moody M, Unsworth J, Deacock S. The utility of the ISAC Allergen Array in the investigation of idiopathic anaphylaxis. *Clin Exp Immunol* 2014; 177: 483-90.
146. Ott H, Schroder C, Raulf Heinsoth M i sur. Microarrays of recombinant Hevea brasiliensis proteins: a novel tool for the component resolved diagnosis of natural rubber latex allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2010; 20: 129-38.
147. Sanchez-Monge R, Blanco C, Lopez-Torrejon G i sur. Differential allergen sensitization patterns in chestnut allergy with or without associated latex fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 705-15.

SUMMARY

CROATIAN GUIDELINES FOR *IN VITRO* DIAGNOSIS OF IgE MEDIATED HYPERSENSITIVITY

A. STIPIĆ MARKOVIĆ, I. IVKOVIĆ-JUREKOVIĆ¹, S. DODIG², I. BATIŠTA³, R. ZRINSKI-TOPIĆ²,
M. BARBERIĆ³, I. TOPALUŠIĆ, Ž. BUKOVEC MEGLA⁴ and V. ŽIŽIĆ⁵

Sveti Duh University Hospital, Department of Clinical Immunology, Pulmonology and Rheumatology, Referral Center for Clinical Allergology, ¹Zagreb Children's Hospital, Department of Clinical Immunology, Allergology, Pulmonology and Rheumatology, ²Srebrnjak Children's Hospital, Department of Clinical and Laboratory Diagnosis, Referral Center for Clinical Allergology in Childhood, ³Sveti Duh University Hospital, Laboratory of Immunology, ⁴Sestre milosrdnice University Hospital Center, Clinical Department of Oncology and Nuclear Medicine, Laboratory of Endocrinology and ⁵Zagreb Children's Hospital, Department of Laboratory Diagnosis, Zagreb, Croatia

In vitro diagnostic procedure in allergology includes determination of serum levels of total and allergen specific IgE antibodies, allergen specific IgG antibodies, plasma tryptase, eosinophil cationic protein (ECP) and basophil activation test (BAT). *In vitro* tests should be used according to clinical history, physical examination, and *in vivo* methods for allergy testing. Clinical relevance of elevated total IgE in allergy diagnosis is modest, since it can be caused by other conditions. Elevated serum levels of allergen specific IgE antibodies, together with positive medical history, are indicative of clinically relevant allergy. A recommended laboratory method for total and specific IgE concentration measurement is the sandwich-type fluoroimmunoassay ImmunoCAP, considered as an ideal immunoassay. Serum levels of allergen specific IgG antibodies have no proved clinical relevance in food allergy diagnosis. They can be useful to monitor venom immunotherapy success, as well as to estimate the risk of venom induced anaphylaxis. Elevated plasma tryptase (subtype β) level is an indication of mast cell activation caused by specific allergen. It

should be obtained within 4 hours after an anaphylactic episode. Elevated level of ECP can be detected in patient blood during late phase of allergic reaction. It can be used to monitor patients with chronic allergenic and inflammatory conditions in which eosinophils play a central role. BAT includes measurement of CD 63 (cluster of differentiation) and CD 203 antigens of the molecular surface by flow cytometry. It is useful in the diagnosis of venom, food and drug allergy, estimation of severity of allergic disease and natural tolerance to allergens. *In vitro* tests based on allergen extracts can be used for *in vitro* diagnosis in monosensitized patients with clear medical history and symptomatic treatment. Molecular allergy diagnosis should be performed in special clinical indications such as diagnosis of cross reactivity, prescription of specific immunotherapy (especially in polysensitized patients with complex symptoms), diagnosis of idiopathic or cofactor induced anaphylaxis, latex allergy, and assessment of the risk of allergic reaction to specific allergen.

Key words: IgE, plasma tryptase, eosinophil cationic protein, basophil activation test, molecular allergy diagnosis