

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK KOGOVŠEK

MAGISTRSKO DELO

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH REKOMBINANTNIH PROTEINOV ZA
DIAGNOSTIKO ALERGIJ NA STRUP ČEBELE IN OSE**

MAGISTRSKI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK KOGOVŠEK

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH REKOMBINANTNIH PROTEINOV ZA
DIAGNOSTIKO ALERGIJ NA STRUP ČEBELE IN OSE**

**COMPARISON OF DIFFERENT RECOMBINANT PROTEINS FOR
THE DIAGNOSIS OF BEE AND YELLOW JACKET VENOM
ALLERGY**

MAGISTRSKI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. (UL-FFA) in somentorstvom izr. prof. dr. Petra Korošca, univ. dipl. biol. (Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik). Praktični del naloge je bil izveden v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko, Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

*"Izobrazba ni pomnjenje, je vedenje, kje poiskati, kar želiš vedeti,
in je vedenje, kako uporabiti novo znanje."*

(William Feather)

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom »Primerjava različnih rekombinantnih proteinov za diagnostiko alergij na strup čebele in ose«, samostojno izdelal, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Petra Korošca, univ. dipl. biol.

Rok Kogovšek

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	III
KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
POVZETEK.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV.....	X
1. UVOD.....	1
1.1. ALERGIJA.....	1
1.1.1. Kaj je alergija?.....	1
1.1.2. Alergeni.....	1
1.1.1. Nastanek in potek alergije.....	2
1.1.2. Alergijske bolezni.....	3
1.1.3. Sistemska anafilaksija.....	3
1.2. ALERGIJA NA STRUPE KOŽEKRILCEV.....	4
1.2.1. Taksonomija in značilnosti kožekrilcev.....	4
1.2.2. Strupi kožekrilcev.....	5
1.2.3. Navzkrižna reaktivnost.....	6
1.2.4. Rekombinantni alergen.....	6
1.3. DIAGNOSTIKA ALERGIJ NA STRUPE KOŽEKRILCEV.....	8
1.3.1. Kožni testi.....	8
1.3.2. Določanje količine specifičnih protiteles IgE (sIgE).....	8
1.3.3. Test aktivacije bazofilcev (BAT).....	9
1.4. ZDRAVLJENJE ALERGIJ NA STRUPE KOŽEKRILCEV.....	9
2. NAMEN DELA.....	11
3. MATERIALI IN METODE.....	12
3.1. VZORCI.....	12
3.2. UPORABLJENI LABORATORIJSKI MATERIAL, REAGENTI IN APARATURE.....	13
3.3. ALGORITEM DOLOČANJA REKOMBINANTNIH ALERGENOV Z OBEMA ANALITSKIMA SISTEMOMA.....	15

3.3.1.	<i>Analitski sistem ImmunoCAP</i>	16
3.3.2.	<i>Analitski sistem Immulite 2000</i>	17
3.4.	OBDELAVA PODATKOV	17
3.4.1.	<i>Statistična obdelava podatkov</i>	18
3.4.2.	<i>Izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti</i>	18
4.	REZULTATI	20
4.1.1.	<i>Diagnostična občutljivost primerjanih analitskih sistemov za rekombinantne alergene čebele</i>	20
4.1.2.	<i>Diagnostična občutljivost primerjanih analitskih sistemov za rekombinantne alergene ose</i>	22
4.1.3.	<i>Diagnostične občutljivosti primerjanih analitskih sistemov za alergene ose in čebele, glede na posamezne stopnje sistemskih reakcij po Muellerju</i>	23
4.1.4.	<i>Izračuni diagnostične specifičnosti primerjanih testov za rekombinantne alergene rApi m 1, rApi m 2 in rVes v 5</i>	24
4.1.5.	<i>Razlike v številu pozitivnih in negativnih rezultatov za alergena rApi m 1 in rVes v 5, izmerjenih s primerjanima analitskima sistemoma</i>	25
4.1.6.	<i>Korelaciji med količinami protiteles proti rApi m 1 in rVes v 5, določenimi s primerjanima analitskima sistemoma</i>	25
5.	RAZPRAVA	29
6.	SKLEP	34
7.	LITERATURA	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz principa metode, na kateri temelji analitski sistem ImmunoCAP.....	16
Slika 2: Shematski prikaz principa metode, na kateri temelji analitski sistem Immulite	17
Slika 3: Izračunane diagnostične občutljivosti primerjanih diagnostičnih testov za posamezne rekombinantne alergene čebele in njihove kombinacije. Nad stolpčnimi diagrami so prikazani izračuni χ^2 testa za ustrezen par.....	21
Slika 4: Izračunane diagnostične občutljivosti primerjanih diagnostičnih testov za posamezne rekombinantne alergen ose in njihove kombinacije. Nad stolpčnimi diagrami so prikazani izračuni χ^2 testa za ustrezen par.....	22
Slika 5: Razsevni diagram logaritmiranih vrednosti koncentracij protiteles proti rApi m 1, določenih z analitskima sistemoma Immulite in ImmunoCAP, s pripadajočo regresijsko premico.....	26
Slika 6: Razsevni diagram logaritmiranih vrednosti koncentracij protiteles proti rVes v 5, določenih z analitskima sistemoma Immulite in ImmunoCAP, s pripadajočo regresijsko premico.....	27

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Mullerjeva klasifikacija sistemskih reakcij po piku kožekrilcev	4
Preglednica II: Alergeni strupov domače čebele in navadne ose	5
Preglednica III: Demografski in klinični podatki preiskovane populacije.....	12
Preglednica IV: Rezultati meritev nativnih in rekombinantnih alergenov na sistemih Immulite in ImmunoCAP	20
Preglednica V: Diagnostični občutljivost primerjanih testov za alergen rApi m 1 in rVes v 5, po posameznih skupinah, določenih glede na stopnjo sistemske reakcije po Mullerju	23
Preglednica VI: Diagnostična specifičnost testiranih rekombinantnih alergenov	24
Preglednica VII: Število pozitivnih in negativnih rezultatov za rekombinantni alergen rApi m 1 in rVes v 5, ki smo jih določili s primerjanima analitskima sistemoma.....	25

POVZETEK

Alergija na strupe žuželk iz reda kožekrilcev (*Hymenoptera*) je eden najpogostejših vzrokov za težjo in potencialno usodno sistemsko anafilaktično reakcijo. Prav zaradi možnosti sistemske reakcije, do katere lahko privede pik kožekrilca, sta diagnostika in posledično zdravljenje s specifično imunsko terapijo, še kako pomembna. Poleg natančne anamneze bolnika in izvedbe kožnih testov, je eden od poglavitnih diagnostičnih postopkov za odkrivanje in potrjevanje alergije na kožekrilce, določanje koncentracije protiteles IgE proti njihovim celokupnim nativnim strupom. Težava, ki se pojavlja pri določanju teh protiteles, pa je nezadostna specifičnost diagnostičnih testov. Zato je potrebna nadaljnja poglobljena diagnostika, pri kateri lahko, zaradi napredka rekombinantne tehnologije, določamo specifična protitelesa IgE proti posameznim alergenim sestavinam strupa kožekrilcev.

V okviru magistrskega dela smo primerjali uporabnost različnih rekombinantnih alergenov za diagnostiko alergij na strupa čebele in ose. V ta namen smo uporabili nove komercialno dostopne rekombinantne alergene (Api m 1, Api m 2 in Ves v 5) analitskega sistema Immulite in že obstoječe rekombinantne alergene (Api m 1, Ves v 5 in Ves v 1), ki se uporabljajo na analitskem sistemu ImmunoCAP. Skupno smo obravnavali 205 serumskih vzorcev, ki so izvirali iz dveh skupin preiskovancev. Prva je bila monosenzibilizirana na strup čebele, druga pa na strup ose. Glede na vrsto senzibilizacije smo, po vnaprej določenem algoritmu, v vzorcih določili protitelesa IgE proti omenjenim rekombinantnim alergenom. Ugotovili smo, da sta bili diagnostični občutljivosti za rekombinantna alergena, ki predstavljata poglavitna alergena v strup čebele in ose, Api m 1 in Ves v 5, na sistemu Immulite višji (88% in 93%) kot na sistemu ImmunoCAP (71% in 82%). Specifičnosti omenjenih rekombinantnih alergenov pa so bile na obeh analitskih sistemih primerljive. Ovrednotili smo tudi uporabnost novega komercialno dostopnega rekombinantnega alergena rApi m 2, in ugotovili, da v kombinaciji z rekombinantnim alergenom Api m 1, na analitskem sistemu Immulite, še dodatno izboljša diagnostično občutljivost (95%). Dokazali smo tudi pozitivno korelacijo med določitvami rApi m 1 in rVes v 5 na obeh analitskih sistemih (Spearmanov korelacijski koeficient: 0,93 in 0,98; $P < 0,001$). Z linearno regresijo pa smo potrdili tudi zelo dobro povezanost med obema analitskima sistemoma (determinacijska koeficienta R^2 : 0,89 in 0,88).

Ključne besede:

kožekrilci; rekombinantni alergeni; diagnostična občutljivost; analitski sistem Immulite; analitski sistem ImmunoCAP

ABSTRACT

Hymenoptera venom allergy is one of the most common causes of a severe and potentially fatal systemic anaphylactic reaction. Because of potential systemic reaction that can originate from *Hymenoptera* sting, first proper diagnostic and then efficient treatment with specific immunotherapy are of the most importance. Beside patient's anamnestic data regarding insect sting and allergy skin testing, one of the main diagnostic procedures for detection and confirmation of *Hymenoptera* venom allergy is the determination of IgE antibodies concentrations against the native *Hymenoptera* venoms. However, the problem with this analytical procedure is its insufficient diagnostic specificity. Therefore further detailed diagnostics are needed. With the improvement of recombinant technology, quantitative determinations of specific IgE antibodies against particular recombinant allergenic components of the *Hymenoptera* venom became possible.

We tested the use of different recombinant allergens for diagnostics of bee and yellow jacket venom allergy. For this purpose we compared the new commercially available recombinant allergens (Api m 1, Api m 2 and Ves v 5) on the Immulite analytical system, with the already routinely used recombinant allergens (Api m 1, Ves v 5 and Ves v 1) on the ImmunoCAP analytical system. In total, 205 serum samples from two groups of patients were tested. The first patient group was monosensitised to bee venom, and the second one to yellow jacket venom. Depending on the type of sensitisation, we determined the presence and concentrations of specific IgE antibodies against appropriate recombinant allergens that were mentioned previously, according to the predetermined algorithm. We showed that the diagnostic sensitivity of the major recombinant allergens present in the bee and yellow jacket venom, determined with the Immulite analytical system, was higher, 88% and 93%, respectively, than that measured with the ImmunoCAP system, 71% and 82%, respectively. Specificities of recombinant allergens were comparable on both analytical systems. We have also evaluated the efficiency of the new commercially available recombinant allergen rApi m 2 and found that in combination with the recombinant allergen Api m 1, its diagnostic sensitivity further improved and reached 95%. Additionally, a positive correlation between measurements of rApi m 1 and rVes v 5, determined on both analytical systems, was confirmed (Spearman's correlation coefficient: 0,93 and 0,98, respectively; $P < 0,001$). Finally, with the use of linear regression, a strong

correlation between performances of both analytical systems was demonstrated (determination coefficients R^2 : 0.89 and 0.88, respectively).

Key words:

hymenoptera; recombinant allergens; diagnostic sensitivity; Immulite analytical system; ImmunoCAP analytical system

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

BAT	test aktivacije bazofilcev (ang. basophil activation test)
CAP	analitski sistem ImmunoCAP
CCD	navzkrižno reaktivne ogljikohidratne determinante (ang. cross-reacting carbohydrate determinants)
CI	interval zaupanja (ang. confidence interval)
FcεRI	visoko afinitetni receptor za konstantno področje Fc imunoglobulina E
IgE	imunoglobulini razreda E
IgG	imunoglobulini razreda G
IgM	imunoglobulini razreda M
IL-13	interlevkin 13
IL-4	interlevkin 4
LITE	analitski sistem Immulite
rApi m 1	rekombinantni alergen strupa čebele 1
rApi m 2	rekombinantni alergen strupa čebele 2
rVes v 1	rekombinantni alergen strupa ose 1
rVes v 5	rekombinantni alergen strupa ose 5
Sf9	celične linije insektov <i>Spodoptera frugiperda</i> 9
sIgE	specifični imunoglobulini razreda E
SIT	specifična imunska terapija
Th2	T-celice pomagalke razreda 2
VLR	velika lokalna reakcija

1. UVOD

1.1. ALERGIJA

1.1.1. Kaj je alergija?

Izraz "alergija" je leta 1906 v medicini prvič uporabil dunajski pediater Clemens von Pirquet. Opredelil ga je kot "specifično spremenjeno reaktivnost organizma", ki jo je opazil ob ponovnem cepljenju bolnikov. Danes s pojmom alergija opisujemo imunsko pogojeno preobčutljivost organizma. Preobčutljivost opredeljujejo simptomi in znaki, ki nastanejo kot posledica stika organizma z natančno opredeljenim vzročnim dejavnikom v količini, na katero se zdravi posamezniki ne odzovejo. V alergologiji, veji medicine, ki se ukvarja s preučevanjem alergij in njihovih simptomov, vzročne dejavnike, ki sprožijo preobčutljivostni imunski odziv, imenujejo alergeni (1, 2).

Preobčutljivosti lahko razdelimo v dve skupini, in sicer v imunske, ki jih imenujemo alergije in nealergijske, imenovane tudi psevdoalergije. Alergije nadalje delimo na tiste, ki so posredovane s protitelesi IgE in tiste, ki potekajo brez protiteles IgE. V skupino alergij brez protiteles IgE, spadajo alergije posredovane s protitelesi razreda IgG/IgM in alergije, ki jih posredujejo limfociti. Po Gellu in Coombsu ločimo štiri tipe preobčutljivostnih reakcij. Njihovi mehanizmi so odvisni od prisotnosti protiteles razredov IgE, IgG in IgM, različnih efektorskih imunskih celic, pomožnih sestavin sistema komplementa, ali dejavnikov, ki so posledica aktivnosti celic naravne imunske odpornosti. V skupino preobčutljivosti tipa I, imenovano tudi takojšna preobčutljivost, spadajo alergije, povzročene s protitelesi IgE. Preobčutljivost tipa II je od protiteles odvisna citotoksična preobčutljivostna reakcija. Z imunskimi kompleksi posredovana preobčutljivost predstavlja tip III, medtem ko je za tip IV značilna pozna ali celično posredovana imunska preobčutljivostna reakcija (3).

1.1.2. Alergeni

Alergeni so telesu tuje snovi, ki lahko spodbudijo imunski odziv. Večinoma so beljakovine, pogosto s stransko ogljikohidratno (sladkorno) verigo, ki je razlog za sprožitev mehanizma preobčutljivosti. Kompleksne naravne organske spojine so sposobne neposredno povzročiti takojšnjo preobčutljivost, običajno preko mehanizma s protitelesi IgE. Ostale preproste organske in anorganske spojine ter kovine, pa pogosteje povzročijo

celično posredovano alergijo ali pozno kontaktno preobčutljivost. Tudi te preproste spojine (hapteni) pa se morajo najprej vezati s proteini, da lahko delujejo kot alergeni.

Alergeni lahko v naše telo vstopijo na različne načine. Najpogosteje jih vdihamo (pelodi rastlin, pršice, živalske dlake in izločki, spore plesni ipd.), zaužijemo (hrana in pijača rastlinskega in živalskega izvora, encimi v hrani, skriti alergeni v industrijsko pripravljene hrani, zdravila, aditivi ipd.), dobimo v telo z injiciranjem (strupi žuželk, zdravila), ali pa preko kože (kemikalije, kozmetika, gumijasti izdelki, vlakna v tekstilu ipd.). Ker je alergenov v našem okolju zelo veliko, k sreči pa niso vsi enako alergogeni, jih delimo v dve skupini. V prvo spadajo poglavitni (močni) alergeni. Ob stiku z njimi več kot polovica senzibiliziranih oseb razvije alergijsko reakcijo. V skupino podrejenih (šibkih) alergenov pa sodijo tisti, ki izzovejo reakcijov približno 10% oseb, ki pridejo v stik z njimi (3, 4, 5).

1.1.1. Nastanek in potek alergije

Proces, v katerem oseba postane alergična na določeno substanco poteka v dveh fazah. Prva je faza senzibilizacije. Na začetku se oseba na molekularnem nivoju seznanja s substanco, ki je vstopila v organizem. Proti njej se nato tvorijo specifična protitelesa razreda IgE (sIgE). Proizvodnjo protiteles IgE v plazmatkah (aktivirani limfociti B) omogočajo T-celice pomagalke razreda 2 (Th2), ki, potem ko se aktivirajo, začnejo proizvajati interleukina - 4 in - 13 (IL-4, IL-13). Ta nato stimulirata plazmatke, da preklopijo proizvodnjo protiteles in začno proizvajati protitelesa razreda IgE, ki se vežejo na visoko afinitetne receptorje FcεRI, izražene na bazofilnih granulocitih v krvnem obtoku in na mastocitih v mukoznih področjih kože, gastrointestinalnega trakta in respiratornega sistema. S tem se zaključi faza senzibilizacije. Da se lahko prične druga faza, pa se mora organizem ponovno srečati s substanco, proti kateri je tvoril sIgE. Ko se to zgodi, se epitopi alergena specifično vežejo na paratope protiteles IgE, pritrjenih na bazofilnih granulocitih in mastocitih, kar jih navzkrižno poveže, s tem pa tudi receptorje FcεRI, na katere so pripeta. To nato sproži degranulacijo omenjenih celic in s tem sproščanja topnih mediatorjev vnetja, med katerimi so najpomembnejši biogeni amini (histamin), lipidni mediatorji in citokini. Sproščeni mediatorji vnetja povečajo prepustnost žilja, širijo žile, krčijo bronhialno in črevesno gladko mišičje in povzročajo lokalno vnetje. Vsi ti pojavi oz. znaki so značilni za alergijo. Glede na njihov obseg jih lahko opredelimo kot lokalno ali sistemsko alergijsko reakcijo (anafilaksija) (5, 6).

1.1.2. Alergijske bolezni

Alergija sama po sebi ni bolezen, temveč le mehanizem, ki vodi v alergijsko bolezen. Alergijske bolezni ima skoraj četrtina prebivalcev našega planeta, njihova pogostnost pa z razvojem in urbanizacijo še narašča. Največkrat se začnejo že v mladosti, ali celo zgodnjem otroštvu. Večina teh bolezni predvsem zmanjšuje kakovost življenja. V atopičnih posameznikih, to so osebe, ki so nagnjene k preobčutljivostnim odzivom, se lahko razvijejo različne oblike alergijskih bolezni. Njihove klinične in patološke značilnosti so odvisne od anatomskega področja stika z alergenom, narave alergena, koncentracije mastocitov v tarčnih organih in sprejemljivosti oz. reaktivnosti tarčnih organov na sproščene mediatorje vnetja. Najpogostejše alergijske bolezni so: alergijski rinitis (seneni nahod), bronhialna astma, atopični dermatitis (ekcem) in urtikarija. Med nevarne, lahko tudi življenjsko ogrožajoče alergijske bolezni, pa sodita astma in sistemska anafilaksija (3, 5).

1.1.3. Sistemska anafilaksija

Anafilaksija je najtežja in potencialno smrtno nevarna sistemska alergijska reakcija. V življenju naj bi jo vsaj enkrat doživel 0,1% ljudi. Smrtnost oseb ob anafilaktični reakciji je približno 0,3%. Po podatkih Nacionalnega inštituta za javno zdravje je bilo v Republiki Sloveniji v letih 1997 – 2012 evidentiranih 10 smrti zaradi anafilaksije, od tega 7 po piku žuželk. V povprečju je vsako leto hospitaliziranih več kot 100 bolnikov z glavno diagnozo sistemske anafilaksije (7).

Sistemska anafilaktična reakcija se, odvisno od vrste alergena, razvije v časovnem oknu od nekaj minut do dveh ur. Ob vstopu alergena v telo, se pričnejo iz aktiviranih mastocitov in bazofilnih granulocitov v velikih količinah sproščati mediatorji vnetja, ki, kot smo že omenili, povzročijo povečano propustnost kapilar, edem sluznic in krčenje gladkih mišic. Najbolj prizadenejo organe, v katerih je količina mastocitov največja, srce, žilje, dihala, prebavila in kožo. Simptomi anafilaksije se običajno izrazijo nekaj minut po izpostavitvi alergenu in lahko trajajo nekaj ur. Njihova izrazitost je odvisna tudi od količine in načina vstopa alergena v telo. Intenzivnost anafilaksije razdelimo na štiri stopnje, in sicer glede na simptome, ki so prisotni pri prizadeti osebi. Opredelitev stopnje anafilaksije je zelo pomembna, saj sta od nje odvisna vrsta in način zdravljenja. Najpogostejše skupine

alergenov, ki povzročajo anafilaksijo, so strupi kožekrilcev ter določena hrana in zdravila (3).

1.2. ALERGIJA NA STRUPE KOŽEKRILCEV

1.2.1. Taksonomija in značilnosti kožekrilcev

Red kožekrilcev (*Hymenoptera*) obsega preko 100.000 vrst žuželk, mednje pa sodijo nekatere izmed najbolj prepoznavnih, npr. čebele, ose in mravlje. Dve, s stališča povzročanja alergij najpomembnejši družini tega rodu na področju Republike Slovenije, sta: prave čebele (*Apidae*) in prave ose (*Vespidae*). V družino *Apidae* spadajo čebele in čmrlji. Čmrlj le redko piči in, za razliko od čebele, v koži po piku ne pusti žela. Alergijska reakcija na njegov strup je običajno posledica senzibilizacije na strup čebele, saj sta si oba zelo podobna. Piki čebel so najpogostejši v toplejši polovici leta, vendar pa so mogoči tudi izven tega obdobja. V družino *Vespidae* uvrščamo ose in sršene. Tudi v tem primeru sta si strupa podobna, zato je možna navzkrižna reaktivnost. Piki os in sršenov se dogajajo poleti in jeseni, saj zimo preživijo le njihove matice (3, 8).

Preglednica I: Muellerjeva klasifikacija sistemskih reakcij po piku kožekrilcev (9).

Stopnja	Znaki in simptomi
I. stopnja	Generalizirana koprivnica, srbenje, oslabelost, anksioznost
II. stopnja	Poleg znakov I. stopnje še vsaj dva od naslednjih: angioedem, stiskanje v prsih, bolečina v trebuhu, slabost, bruhanje, omotica
III. stopnja	Poleg znakov II. stopnje še vsaj dva od naslednjih: dušenje, disfagija, stridor, hripavost, zmedenost, dizartrijska
IV. stopnja	Poleg znakov II. stopnje še vsaj dva od naslednjih: hipotenzija, kolaps, inkontinenca urina, inkontinenca blata, izguba zavesti, cianoza

Kožekrilci po naravi niso agresivni. Pikajo le v obrambi, kadar so ogroženi sami, oziroma so ogoržena njihova prebivališča. Pik kožekrilca je boleč zaradi toksičnih peptidov in biogenih aminov, ki so prisotni v strupu. Običajno nastane na mestu pika srbeča oteklina, ki ima premer nekaj centimetrov in izgine v dveh urah. V primeru pika v vrat ali usta pa lahko, sicer povsem normalna oteklina, oteži dihanje ali celo povzroči zadušitev.

Najpogostejša oblika reakcije na strup kožekrilcev je velika lokalna reakcija (VLR). Zanj je značilna oteklina, s premerom >10 cm, ki vztraja več kot en dan. Ostale sistemske preobčutljivostne reakcije na pike kožokrilcev pa razdelimo glede na njihovo resnost v različne stopnje. Poznamo več različnih klasifikacij sistemskih preobčutljivostnih reakcij. Med najpogosteje uporabljene sodi klasifikacija po Muellerju (Preglednica I) (3, 9, 8).

1.2.2. Strupi kožekrilcev

Količina strupa, ki se ob piku sprosti v telo, je odvisna od vrste kožekrilca. Čebele običajno sprostijo med 50-140 µg strupa, ose, ki so sposobne pčiti večkrat, pa manj, v povprečju med 1,7-3,1 µg/pik. Poznavanje sestave strupa kožekrilcev in strukture alergenov sta ključnega pomena za diagnostiko in zdravljenje tovrstnih alergij (Preglednica II).

Preglednica II: Alergeni strupov domače čebele in navadne ose (10).

Alergen	Ime	Molekulska masa (kDa)
Domača čebela (<i>Apis mellifera</i>)		
Api m 1	fosfolipaza A2	16
Api m 2	hialuronidaza	39
Api m 3	kisla fosfataza	43
Api m 4	melitin	3
Api m 5	dipeptidilpeptidaza IV	100
Api m 6		8
Api m 7	serinska proteaza CUB	39
Api m 8	karboksilesteraza	70
Api m 9	serinska karboksipeptidaza	60
Api m 10	ikarapin - različica 2	50-55
Api m 11	poglavitni protein "royaljelly"	50 (deglikolizirana oblika)
Api m 12	vitelogenin	200
Navadna osa (<i>Vespula vulgaris</i>)		
Ves v 1	fosfolipaza A1	34
Ves v 2	hialuronidaza	38
Ves v 3	dipeptidilpeptidaza IV	100
Ves v 5	antigen 5	23
Ves v 6	vitelogenin	200

Strukture in sekvence večine poglavitnih alergenov so dobro poznane. Do sedaj so sekvencirali že 75 alergenov iz strupov reda kožekrilcev, od tega 12 iz strupa domače čebele (*Apis mellifera*) in 5 iz strupa navadne ose (*Vespula vulgaris*) (Preglednica II). Razvoj rekombinantne tehnologije pa je omogočil proizvodnjo posameznih sestavin strupov. Alergeni v strupu kožekrilcev so v večini glikoproteini, veliki 10 - 50 kDa in vsebujejo 100 - 400 aminokislinskih ostankov. Med poglavitne alergene strupa čebele sodijo: fosfolipaza A2, hialuronidaza in melitin. V strupu ose pa so glavni alergeni: fosfolipaza A1, hialuronidaza in antigen 5 (8).

1.2.3. Navzkrižna reaktivnost

Tako za diagnostiko kot za terapevtske namene uporabljamo izvlečke celokupnega nativnega strupa posamezne vrste kožekrilcev. Težava, ki se pojavlja pri tem pa je navzkrižna reaktivnost, ki je posledica navzkrižno reagirajočih protiteles IgE, usmerjenih proti homolognim epitopom proteinov v dveh različnih vrstah strupov. Navzkrižna reaktivnost je lahko prisotna tako v primeru strupov različnih vrst žuželk iste družine, kakor tudi strupov žuželk iz različnih družin. Alergeni sestavini strupov, ki pogosto povzročata navzkrižno reaktivnost, sta dipeptidilpeptidaza in hialuronidaza. Aminokislinsko zaporedje je v strupih čebele in ose v približno 50% enako. Zato je hialuronidaza poglavitna navzkrižno reaktivna sestavina. Posledično pri posameznikih, pri katerih diagnostika kaže senzibiliziranost tako na strup ose kot čebele, ne moremo razlikovati med resnično dvojno senzibiliziranostjo in navzkrižno reaktivnostjo. Druga pogosta sestavina strupov kožekrilcev, zaradi katere lahko pride do navzkrižne reaktivnosti, so ogljikohidratne determinante (CCD). Večina alergenov v strupih čebele in ose so glikoproteini, ki vsebujejo enega ali več oligosaharidov, vezanih na protein. Ti pogosto vsebujejo α -1,3-fukozilirano N-vezavno mesto, strukturo, ki jo imenujemo navzkrižno reaktivna ogljikohidratna determinanta ali CCD. CCD so v kar 50% odgovorne za lažno ugotovljeno dvojno senzibiliziranost na strup čebele in ose (8, 11, 12, 13).

1.2.4. Rekombinantni alergeni

Metoda priprave rekombinantnih proteinov je razmeroma preprosta in cenovno ugodna. Rekombinantne alergene iz strupov kožekrilcev lahko proizvajajo v bakterijskih ali evkariontskih sistemih za izražanje genov. V bakterijskih sistemih, med katerimi je najpogosteje uporabljan ekspresijski organizem *Escherichia coli*, nastanejo neglikozilirani

proteini. Neglikozilirani rekombinantni proteini sicer ne vsebujejo potencialno navzkrižno reaktivnih epitopov. Odsotnost glikozilacije pa lahko vpliva na njihovo zvijanje ter posledično na njihovo terciarno strukturo in s tem na epitopsko funkcionalnost. Proizvodnja rekombinantnih proteinov v evkariontskih ekspresijskih sistemih je v primerjavi z bakterijskimi dražja in zahtevnejša. Običajno kot ekspresijske organizme uporabljajo kvasovke ali z bakulovirusom okužene celične linije insektov. V tovrstnih sistemih za proizvodnjo rekombinantnih alergenov nastanejo glikozilirani proteini. Ob glikozilaciji se ohranita tako struktura rekombinantnih proteinov kot funkcionalnost njihovih epitopov. Vendar pa zaradi ogljikohidratnih determinant, ki so prisotne tako v nativnih kot tudi v glikoziliranih rekombinantnih alergenih, lahko pride do vezave protiteles IgE na tovrstne epitope, kar ima lahko za posledico lažno pozitivne rezultate. Zaradi te slabosti, so strupe kožekrilcev začeli proizvajati v celičnih linijah insektov Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Omenjeni insekti namreč ne vsebujejo encima, ki povzroči nastanek α -1,3-fukoze, ki je poglobitna neželena struktura na N-glikozirajočem vezavnem mestu. Rekombinantni alergeni, ki jih izrazijo in proizvajajo v takem sistemu, imajo primerljivo strukturo in epitopsko funkcionalnost z nativnimi alergeni, poleg tega pa so, zaradi pomanjkanja α -1,3-fukoznega encima, brez neželenih CCD (14, 15, 16).

Prvi komercialno dostopni rekombinantni alergen za diagnostiko alergij na kožekrilce je bil poglobitni alergen čebeljega strupa, Api m 1. Na trgu se je pojavil leta 2009, in sicer za uporabo na analitskih sistemih ImmunoCAP (fosfolipaza A2; i208). Njegova največja omejitev je nizka občutljivost, ki se, glede na različne vire, giblje med 57 in 79% (17). Občutljivost nativnih ali nekomercialno dostopnih rApi m 1, pa, glede na navedbe v različnih virih, lahko znaša tudi >90% (15, 16, 18).

Prvi komercialno dostopni rekombinantni alergen iz strupa ose, Ves v 5, pa je postal za rutinsko uporabo dostopen leta 2010. Tudi ta je bil proizveden za analitski sistem ImmunoCAP (antigen 5; i209). Njegova občutljivost je, v primerjavi z rApi m 1, višja in znaša med 85 in 90% (17). S proizvodnjo dodatnega rekombinantnega alergena Ves v 1 (fosfolipaza A2; i211) in z določanjem kombinacije obeh omenjenih rekombinantnih alergenov strupa ose, pa se je občutljivost Ves v 5 povečala na 92 do 96% (17).

Leta 2013 so postali rekombinantni alergeni dostopni za rutinsko uporabo tudi na analitskem sistemu Immulite. Poleg določanja protiteles IgE proti rApi m 1 (a45) in rVes v

5 (a670), lahko na omenjenem sistemu izvajamo tudi detekcijo in kvantifikacijo protiteles IgE proti rApi m 2 (a46).

1.3. DIAGNOSTIKA ALERGIJ NA STRUPE KOŽEKRILCEV

V diagnostiki alergij na strupe kožekrilcev je bistvena natančna klinična anamneza bolnika. V diagnostičnem procesu je namreč najprej potrebno ugotoviti, ali je bolnik imel alergijsko reakcijo ter katera žuželka ga je picila. V nadaljnjem procesu diagnostike in potrditve povzročitelja pa uporabljamo teste *in vivo* in *in vitro*. V primeru testiranja *in vivo* se poslužujemo kožnih vbodnih testov, v primeru preiskav *in vitro* pa določamo količine sIgE proti izvlečkom celokupnega nativnega strupa kožekrilcev v krvi. Ker je identiteta žuželke, ki je povzročila reakcijo ob piku, običajno neznana že ob anamnezi, oz. so rezultati opravljenih diagnostičnih testov nejasni, negativni, ali pogosto dvojno pozitivni, moramo uporabiti dodatna diagnostična testiranja. V takšnih primerih imamo na voljo test aktivacije bazofilcev in uporabo rekombinantnih alergenov iz strupov kožekrilcev (2, 3).

1.3.1. Kožni testi

Po priporočilih se kožni testi izvajajo vsaj dva tedna po reakciji na pik kožekrilca, saj se s tem izognemo verjetnosti lažno negativnih rezultatov zaradi refraktorne faze. Izvedemo jih vbodno ali intradermalno. Pri kožnih vbodnih testih vnašamo strupe v koncentracijah od 0,01 do 100 µg/mL, na volarno stran podlahti, medtem ko pri intradermalnih testih injiciramo strup v razponu od 0,001 do 1 µg/mL. Občutljivost vbodnih testov je tudi pri najvišjih uporabljenih koncentracijah strupa manjša od občutljivosti intradermalnih testov, zato je priporočljivo, da negativne kožne vbodne teste potrdimo še z intradermalnimi (8).

1.3.2. Določanje količine specifičnih protiteles IgE (sIgE)

Začetki metod *in vitro* za merjenje količine sIgE zoper določen alergen segajo v leto 1967, ko so opisali prvo med njimi. Današnje sodobne metode za kvantitativno določanje koncentracij sIgE omogočajo popolno avtomatizacijo in standardizacijo procesov. V rutini se za določanje sIgE pogosto uporabljata dva analitska sistema, in sicer ImmunoCAP-FEIA (Termo Fisher Scientific, Uppsala, Švedska) ter Immulite (Siemens AG, Erlagen, Nemčija). Merilno območje obeh je od 0 do 100 kU/L, referenčna vrednost za količino sIgE pa je <0,35 kU/L (2).

Določanje količine sIgE je smiselno nekaj dni ali tednov po piku žuželke, ko koncentracija sIgE zopet naraste, saj je lahko takoj oz. nekaj dni po piku, nizka ali celo nezaznavna. V prvi fazi diagnostičnega postopka *in vitro* določamo koncentracije sIgE proti izvlečkom celokupnega nativnega strupa kožekrilcev. Nadaljnja poglobljena analiza pa vključuje določanja koncentracij sIgE proti posameznim alergenom iz strupov kožekrilcev, ki so vrstno-specifični (8).

1.3.3. Test aktivacije bazofilcev (BAT)

To je metoda, pri kateri merimo obseg izražanja specifičnih molekularnih označevalcev na površinah bazofilnih granulocitov v periferni krvi s pretočnim citometrom. Vzorec odvzete krvi preiskovanca stimuliramo z določeno količino alergena, ki navzkrižno poveže protitelesa IgE na površinah omenjenih celic. To sproži zlitje znotrajceličnih granul, ki vsebujejo histamin, na svojih površinah pa izražajo označevalec CD63, s plazemsko membrano. Posledica tega zlitja pa je izražanje molekul CD63 na zunanjem delu membran bazofilnih granulocitov, kar izmerimo s pretočno citometrijo. Test BAT uporabljamo za diagnostiko alergij na strupe kožekrilcev v primerih, ko ugotovimo neskladnosti med anamnezo in rezultati potrditvenih testov (kožni testi, določanje koncentracij sIgE v serumu). Uporabljamo ga tudi za napovedovanje neželenih stranskih učinkov imunske terapije pri bolnikih, ki so preobčutljivi na strup določenega kožekrilca (19).

1.4. ZDRAVLJENJE ALERGIJ NA STRUPE KOŽEKRILCEV

Na osnovi kliničnih podatkov lahko ocenimo, kakšna je verjetnost, da bo bolnika znova pičila enaka žuželka in bo zaradi tega življenjsko ogrožen. Kadar je verjetnost ponovnega pika majhna, reakcija ob ponovnem piku pa ni bila huda, zadostuje, da bolnika podučimo o ukrepih, ki zmanjšajo možnost ponovnega pika ter o samopomoči v primeru, da do tega kljub temu pride. Če je bolnik ob piku doživel hudo anafilaktično reakcijo (III. ali IV. stopnja), mu svetujemo zdravljenje s specifično imunoterapijo (SIT). Njen namen je zmanjšati tveganje za nastanek življenjsko ogrožajoče preobčutljivostne reakcije v primeru ponovnega pika. SIT je namreč uspešna pri kar 90% bolnikov, saj ti ob ponovnem piku ne doživijo več anafilaktične reakcije, pri preostalih pa je ta reakcija blažja kot je bila pred tovrstnim zdravljenjem.

Imunsko terapijo izvajamo s podkožnim vbrizgavanjem prečiščenega strupa kožekrilca. Začetno fazo izvedemo v bolnišnici, vzdrževalni odmerek pa dosežemo v 1 do 4 dneh. Tega nato apliciramo v čedalje daljših intervalih. Zdravljenje s SIT traja od 3 do 5 let. Bolniki, ki prejemajo SIT 5 let brez zapletov, so v 90% (strup ose) oz. 80% (strup čebele) zaščiteni pred sistemskimi reakcijami za obdobje celotnega življenja (3, 20).

2. NAMEN DELA

Do sedaj so bili za rutinsko določanje alergij na strup čebele in ose na voljo le rekombinantni alergeni Api m 1, Ves v 1 in Ves v 5 za analitski sistem ImmunoCAP. V letu 2013 pa so postali komercialno dostopni tudi rekombinantni alergeni Api m 1, Api m 2 in Ves v 5 za analitski sistem Immulite. Diagnostična občutljivost in potencialna uporabnost slednjih še nista bili ovrednoteni v nobeni študiji. Zato je namen oz. cilj našega dela:

- Primerjati diagnostično občutljivost in specifičnost komercialno dostopnih rekombinantnih alergenov Api m 1 in Ves v 5 z analitskima sistemoma ImmunoCAP in Immulite.
- Preveriti moč ujemanja rezultatov po uporabi rApi m 1 in Ves v 5 na obeh analitskih sistemih.
- Primerjati diagnostično občutljivost rekombinantnih alergenov Api m 1 in Ves v 5 na obeh analitskih sistemih, po skupinah bolnikov razdeljenih glede na težo njihove sistemske reakcije po piku.
- Ovrednotiti občutljivost, specifičnost ter morebitno diagnostično uporabnost novega komercialno dostopnega rekombinantnega alergena rApi m 2 na sistemu Immulite.
- Opredeliti uporabnost novih rekombinantnih alergenov v rutinski diagnostiki alergij na strupa čebele in ose.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

Za ovrednotenje diagnostične občutljivosti rekombinantnih alergenov smo uporabili 205 serumskih vzorcev bolnikov. Pridobili smo jih iz arhiva zamrznjenih vzorcev, ki jih shranjujejo v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Izbrali smo le tiste, za katere je bila znana anamneza bolnikov. V posamezni anamnezi je bila opisana žuželka, zaradi katere je prišlo do neželene reakcije, prav tako pa je bila, na podlagi simptomov, ki so se izrazili ob piku, opredeljena tudi stopnja alergijske reakcije po Muellerju. Anamneza bolnikov je bila ob odvzemu krvi potrjena z meritvijo sIgE proti nativnemu strupu čebele in ose, in sicer na analitskem sistemu ImmunoCAP. Tako smo, na osnovi obstoječih podatkov za 205 izbranih serumskih vzorcev, oblikovali dve skupini monosenzibiliziranih preiskovancev. V prvo smo uvrstili 95 oseb, ki so bile senzibilizirane na strup čebele in 110 takih, ki so bile senzibilizirane le na strup ose.

Za opredelitev specifičnosti rekombinantnih alergenov Api m 1 in Ves v 5 pa smo uporabili še vzorce serumov 49 zdravih oseb, ki niso bile senzibilizirane na strup čebele ali ose.

Preglednica III: Demografski in klinični podatki preiskovane populacije (N = 205).

Demografski in klinični podatki preiskovane populacije		
	Čebela	Osa
N	95	110
Povprečna starost	51 (23-83)	49 (21-78)
Moški: ženske	37:58	56:54
Stopnja reakcije (po Muellerju):		
VLR	13	12
I.	11	14
II.	23	22
III.	30	29
IV.	18	33

Rezultati povezani z izbranimi vzorci, ki so bili pridobljeni za namen tega magistrskega dela, so bili objavljeni v članku revije *Clinical & Experimental Allergy* (21). Del meritev, povezanih z alergijo na strup ose, pa je bil uporabljen v doktorski disertaciji z naslovom: »Celostna obravnava diagnostike bolnika z alergijo po piku kožekrilcev (*Hymenoptera*)«, avtorja Julija Gyula Šelba, dr. med.

3.2. UPORABLJENI LABORATORIJSKI MATERIAL, REAGENTI IN APARATURE

Merilni pripomočki:

- merilni valj, 1.000 mL
- merilni valj, 500 mL
- vibracijski mešalnik, Vibromix 104 EV (Tehtnica, Slovenija)
- destilirana voda
- pipeta Eppendorf Reference, 100-1000 μ L (Eppendorf, Nemčija)
- pipetni nastavki ep T. I. P. S., 50-1000 μ L (Eppendorf, Nemčija)
- plastične epruvete, 12 \times 70 mm (Labortechnika Golias, Slovenija)

Aparature ter pripadajoči reagenti in sistemske raztopine:

- Analizator ImmunoCAP Phadia 100 (CAP) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA):
 - nativni strup: Common wasp (Yellowjacket), *Vespula spp.* (koda i3, 16 določitev)
 - nativni strup: Honey bee, *Apis Mellifera* (koda i1, 16 določitev)
 - rekombinantni alergen: rApi m 1 phospholipase A2, Honey bee, *Apis Mellifera* (koda i208, 10 določitev)
 - rekombinantni alergen: rVes v 1 phospholipase A1, Common wasp, *Vespula Vulgaris* (koda i211, 10 določitev)
 - rekombinantni alergen: rVes v 5 Common wasp, *Vespula Vulgaris* (koda i209, 10 določitev)
 - konjugat s specifičnimi IgE (6 vial za 96 določitev)

- kalibracijske raztopine za specifične IgE (za 1 kalibracijsko krivuljo, 6 vial s koncentracijami od 0 do 100 kU IgE/L)
 - diluent za vzorce (6 vial po 3 mL)
 - specifični Anti-IgE (nosilec za 16 ImmunoCAP)
 - ImmunoCAP raztopina za kontrolo kakovosti, nivo 1 (6 vial po 4 mL)
 - ImmunoCAP raztopina za kontrolo kakovosti, nivo 2 (6 vial po 4 mL)
 - razvijalna raztopina (6 vial po 100 mL)
 - raztopina za zaustavitev reakcije (6 vial po 100 mL)
 - spiralna raztopina (2 plastenki po 5 L)
 - kalibrator Fluoro C (6 vial)
 - set za vzdrževanje (za 10 postopkov)
- **Analizator Immulite 2000** (LITE) (Siemens AG, Erlangen, Nemčija):
 - rekombinantni alergen: 3gAllergy rVes v 5 (koda a670, 20 določitev)
 - rekombinantni alergen: 3gAllergy rApi m 1 (koda a45, 20 določitev)
 - rekombinantni alergen: 3gAllergy rApi m 2 (koda a46, 20 določitev)
 - diluent za vzorce (1 viala po 25 mL)
 - tekočina za spiranje sonde (2 plastenki po 200 mL)
 - kemiluminiscentni substrat (2 plastenki po 205 mL)
 - Immulite 2000 Systems, Specific IgE Universal Kit (600 določitev), ki vsebuje:
 - z biotinom obdane polistirenske kroglice (3 × 200 določitev)
 - kartuša z reagentom (30 mL)
 - adjustor AB (2 viali po 2,75 mL)
 - adjustor L (2 viali po 2 mL)
 - adjustor H (2 viali po 2 mL)
 - raztopina za kontrolo kakovosti, nivo 1 (2 viali po 1 mL)
 - raztopina za kontrolo kakovosti, nivo 2 (2 viali po 1 mL)
 - reakcijske epruvete (za enkratno uporabo)

3.3. ALGORITEM DOLOČANJA REKOMBINANTNIH ALERGENOV Z OBEMA ANALITSKIMA SISTEMOMA

V vseh 205 serumskih vzorcih pacientov so bile predhodno izmerjene koncentracije protiteles IgE proti strupu čebele (i1) in strupu ose (i3) na sistemu ImmunoCAP. Nadaljnja diagnostika z uporabo rekombinantnih alergenov pa je bila odvisna od tega, ali je bil, glede na rezultate analize s celokupnim strupom, bolnik monosenzibiliziran na strup čebele ali ose.

Vzorci bolnikov, monosenzibiliziranih na strup čebele, smo uporabili za izvedbo naslednjih testov:

- Meritve koncentracij sIgE proti rekombinantnemu alergenu Api m 1, s sistemom CAP (rApi m 1 CAP [i208]).
- Meritve koncentracij sIgE proti rekombinantnemu alergenu Api m 1, s sistemom LITE (rApi m 1 LITE [a45]).
- Meritve koncentracij sIgE proti rekombinantnemu alergenu Api m 2, s sistemom LITE (rApi m 2 LITE [a46]).

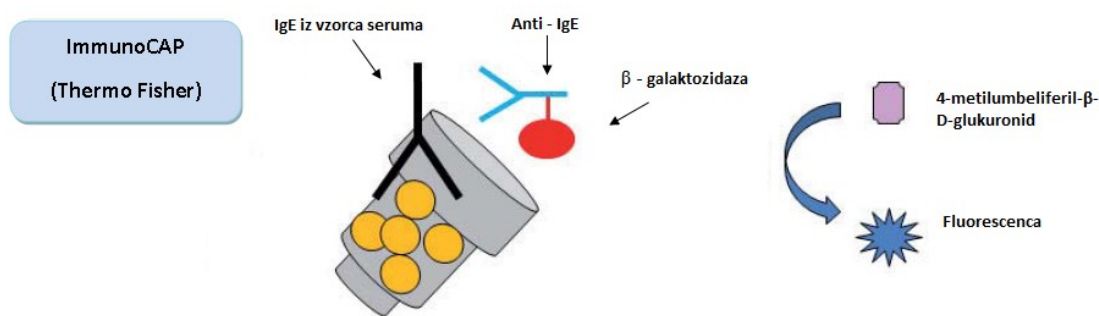
Vzorci bolnikov, monosenzibiliziranih na strup ose, smo uporabili za izvedbo naslednjih testov:

- Meritve koncentracij sIgE proti rekombinantnemu alergenu Ves v 5, s sistemom CAP (rVes v 5 CAP [i209]).
- Meritve koncentracij sIgE proti rekombinantnemu alergenu Ves v 5, s sistemom LITE (rVes v 5 LITE [a670]).
- Meritve koncentracij sIgE proti rekombinantnemu alergenu Ves v 1, s sistemom CAP (rVes v 1 CAP [i211]). Na ta način smo testirali le tiste vzorce, ki so bili negativni na sIgE proti rVes v 5 ($< 0,35$ kU/L) na sistemu CAP.

Poleg serumskih vzorcev bolnikov z znano alergijo smo testirali še 49 zdravih oseb (kontrola), ki smo jim z obema sistemoma (LITE in CAP) določili količine sIgE proti rApi m 1 in rVes v 5 ter dodatnih 50 vzorcev zdravih oseb, v katerih smo izmerili koncentracije sIgE proti rApi m 2 s sistemom LITE.

3.3.1. Analitski sistem ImmunoCAP

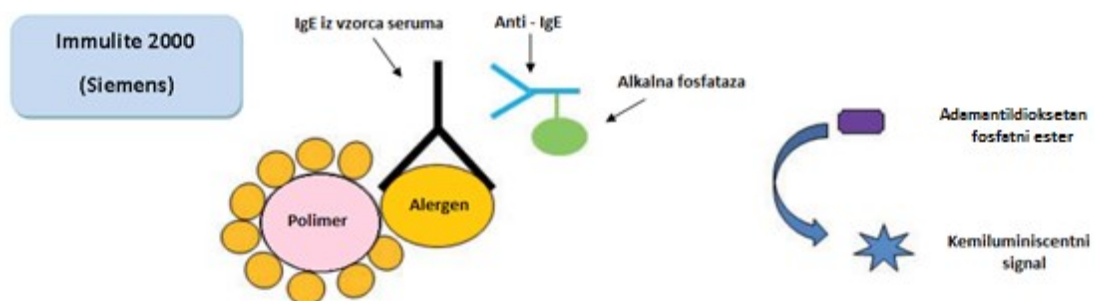
Analitski sistem ImmunoCAP uporabljamo za avtomatizirano kvantitativno določanje koncentracije sIgE proti različnim nativnim in rekombinantnim alergenom. Za analizo protiteles proti posameznemu alergenu, ki traja 2,5 ure, potrebujemo 40 μ L seruma. Pri tej metodi *in vitro* je tarčni alergen kovalentno vezan na trden nosilec, narejen iz aktiviranega hidrofilnega polimera. Nanj se nato vežejo sIgE, prisotna v analiziranem srumskem vzorcu. Po spiranju dodamo sekundarna protitelesa anti-IgE, ki so označena z encimom β -galaktozidaza. Ta se vežejo na primarna IgE protitelesa iz vzorca, ki so se specifično pritrčila na alergen. Nato po spiranju dodamo substrat, 4-metilumbeliferil- β -D-glukuronid, ki ga encim pretvori v fluorescentni produkt, 4-metilumbeliferon. Sledi inkubacija in dodatek razvijalne tekočine, nato pa reakcijo ustavimo s posebno raztopino. Intenziteta fluorescence nastalega produkta je odvisna od njegove koncentracije, ki je proporcionalna koncentraciji protiteles sIgE, vezanih na alergen (Slika 1). Izmerjeno intenziteto fluorescence s pomočjo predhodno izdelane šest-točkovne umeritvene krivulje, pretvorimo v koncentracijo sIgE v vzorcu. Rezultat podamo v obliki kU_A/L (kU - kilo enot, A - specifična protitelesa za posamezen alergen, L - liter). Poročevalsko območje metode je v območju med 0,35 in 100 kU_A/L (22, 23).



Slika 1: Shematski prikaz principa metode, na kateri temelji analitski sistem ImmunoCAP; prirejeno po (24).

3.3.2. Analitski sistem Immulite 2000

Tako kot analitski sistem ImmunoCAP, tudi analitski sistem Immulite 2000 uporabljamo za kvantitativno, določanje koncentracij sIgE proti različnim nativnim in rekombinantnim alergenom *in vitro*. Za analizo protiteles IgE proti posameznemu alergenemu, ki traja 65 minut, potrebujemo 50 μ L seruma. Pri tej metodi so alergeni v tekoči fazi kovalentno vezani na, z biotinom obdane, topne poli-lizinske polimere. Tako biotiniran alergen se, preko kompleksa biotin-streptavidin, veže na s streptavidinom obdane polistirenske kroglice. Primarna protitelesa sIgE iz preiskovanega serumskega vzorca se najprej vežejo na alergen, nato pa se nanje pripnejo dodana sekundarna protitelesa anti-IgE, ki so konjugirana z encimom alkalna fosfataza. Po spiranju sledi dodatek substrata - adamantildioksetan fosfatni ester, ki ga encim pretvori v kemiluminiscentni produkt. Intenziteta kemiluminiscence je sorazmerna koncentraciji protiteles sIgE v preiskovanem serumskem vzorcu (Slika 2). Koncentracijo sIgE tudi v tem primeru določimo s pomočjo umeritvene krivulje, pridobljene iz sedmih koncentracijskih točk standarda. Rezultat podamo v obliki kU_A/L , poročevalsko območje metode pa je med 0,1 in 100 kU_A/L (22).



Slika 2: Shematski prikaz principa metode, na kateri temelji analitski sistem Immulite; prirejeno po(24).

3.4. OBDELAVA PODATKOV

Podatke o meritvah vzorcev smo zbirali in urejali v programu Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, ZDA). Pridobljene podatke smo nato statistično obdelali s programom MedCalc, verzija 15.8. Zaradi boljše predstavnosti smo dva stolpčna diagrama (Sliki 3 in 4) izrisali s programom GraphPadPrism 5.03 (GraphPad Software, ZDA).

3.4.1. Statistična obdelava podatkov

Za preverjanje normalne porazdelitve podatkov znotraj skupin rezultatov, dobljenih z uporabo posameznih rekombinantnih alergenov, smo uporabljali Shapiro – Wilkov test. Za ugotavljanje statistično značilne soodvisnosti med dvema skupinama vzorcev smo uporabili test χ^2 , oziroma Fisherjev natančni test, kadar so bile pričakovane frekvence <5. Moč povezav med rezultati, izmerjenimi z obema analitskima sistemoma, ob uporabi posameznih rekombinantnih alergenov, smo izračunali s pomočjo linearne regresije in Spearmanovega korelacijskega koeficienta. Ker so imele izmerjene koncentracije sIgE proti rApi m 1 in rVes v 5 razmeroma nizke vrednosti, smo jih zaradi boljše preglednosti razsevnih diagramov logaritemsko transformirali. Izračunali smo tudi enačbi obeh regresijskih premic in določili koeficienta determinacije (25).

3.4.2. Izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti

Vseh 205 preiskovancev je bilo monosenzibiliziranih na strup čebele ali ose in so ob piku žuželke doživeli alergijsko reakcijo. Zato smo občutljivost diagnostičnega testa za posamezni rekombinantni alergen izračunali s pomočjo naslednjih formul;

Vzorci bolnikov senzibiliziranih na strup čebele:

$$\frac{\text{število vzorcev, pozitivnih za posamezni rekombinantni alergen}}{\text{število vseh vzorcev bolnikov senzibiliziranih na strup čebele (n = 95)}}$$

Vzorci bolnikov senzibiliziranih na strup ose:

$$\frac{\text{število vzorcev, pozitivnih za posamezni rekombinantni alergen}}{\text{število vseh vzorcev bolnikov senzibiliziranih na strup ose (n = 110)}}$$

Za ovrednotenje diagnostične specifičnosti testov za rApi m 1 in rVes v 5 smo na obeh analitskih sistemih izmerili koncentracije omenjenih rekombinantnih alergenov tudi v skupini serumskih vzorcev zdravih kontrolnih oseb (n = 49). Za ovrednotenje specifičnosti za rApi m 2 pa smo izmerili koncentracije le s sistemom LITE, za kar smo prav tako

uporabili serumske vzorce zdravih kontrolnih oseb (n = 50). Specifičnost diagnostičnega testa smo izračunali s pomočjo naslednje formule;

$$\frac{\text{število vzorcev, pozitivnih za posamezni rekombinantni alergen}}{\text{število vseh vzorcev zdravih kontrolnih oseb (n = 49; pri rApi m 2, n = 50)}}$$

Število pozitivnih oz. negativnih rezultatov za posamezni rekombinantni alergen smo, s pomočjo statističnega testa χ^2 , primerjali z rezultati enakih rekombinantnih alergenov ali njihovih kombinacij, določenih z obema analitskima sistemoma. Za statistično značilno razliko med rezultati, določenimi s primerjanima testoma, smo upoštevali vrednost $P < 0,05$.

4. REZULTATI

V vseh 205 vzorcih serumov smo določili koncentracije sIgE proti rekombinantnim alergenom (Api m 1 LITE, Api m 2 LITE, Api m 1 CAP, Ves v 5 LITE, Ves v 5 CAP, Ves v 1 CAP), glede na vnaprej določen algoritem. Izmerjene vrednosti smo opredelili kot pozitivne ali negativne, glede na referenčno mejo proizvajalcev obeh primerjanih analitskih sistemov, ki je za pozitiven rezultat $>0,35$ kU/L. Rezultati meritev so predstavljeni v preglednici IV.

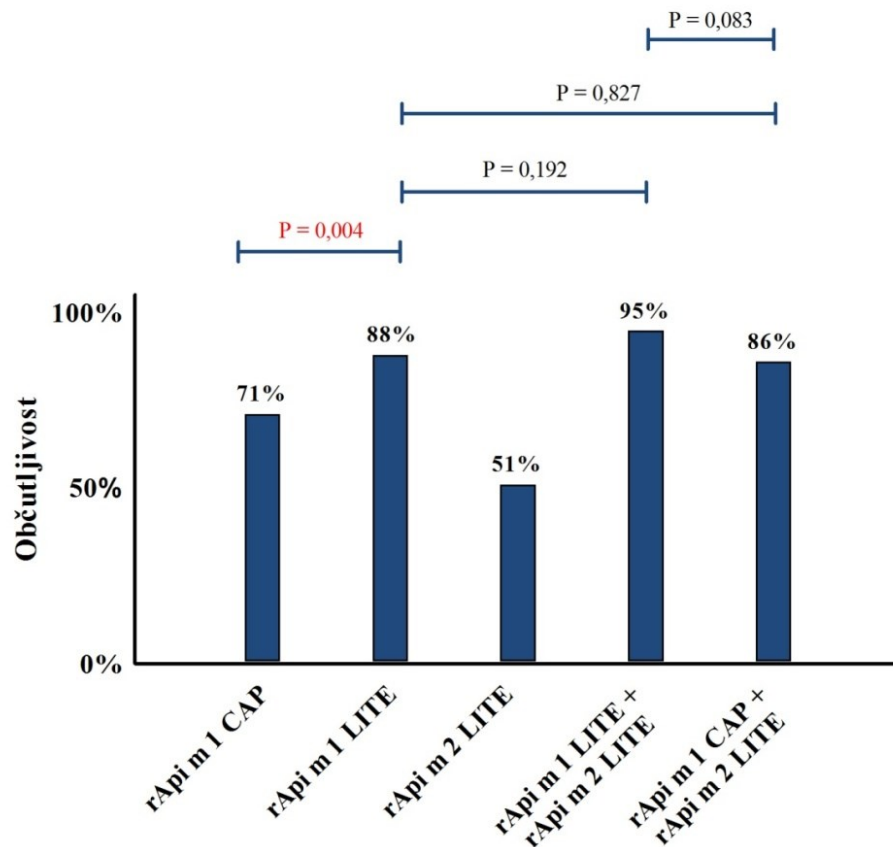
Preglednica IV: Rezultati meritev nativnih in rekombinantnih alergenov na sistemih Immulite in ImmunoCAP.

	Immulite		ImmunoCAP	
	Pozitiven rezultat	Negativen rezultat	Pozitiven rezultat	Negativen rezultat
Vzorci bolnikov monosenzibiliziranih na strup čebele (n = 95)				
Strup čebele (i1)	/	/	95	0
Strup ose (i3)	/	/	0	95
rApi m 1	84	11	67	28
rApi m 2	48	47	/	/
Vzorci bolnikov monosenzibiliziranih na strup ose (n = 110)				
Strup čebele (i1)	/	/	0	110
Strup ose (i3)	/	/	110	0
rVes v 5	102	8	90	20
rVes v 1*	/	/	9	11

*rVes v 1 le v primeru negativnega rezultata meritve rVes v 5 (n = 20)

4.1.1. Diagnostična občutljivost primerjanih analitskih sistemov za rekombinantne alergene čebele

Izračunane občutljivosti primerjanih testov za posamezni rekombinantni alergen čebele in njihove kombinacije so predstavljeni na Sliki 3.

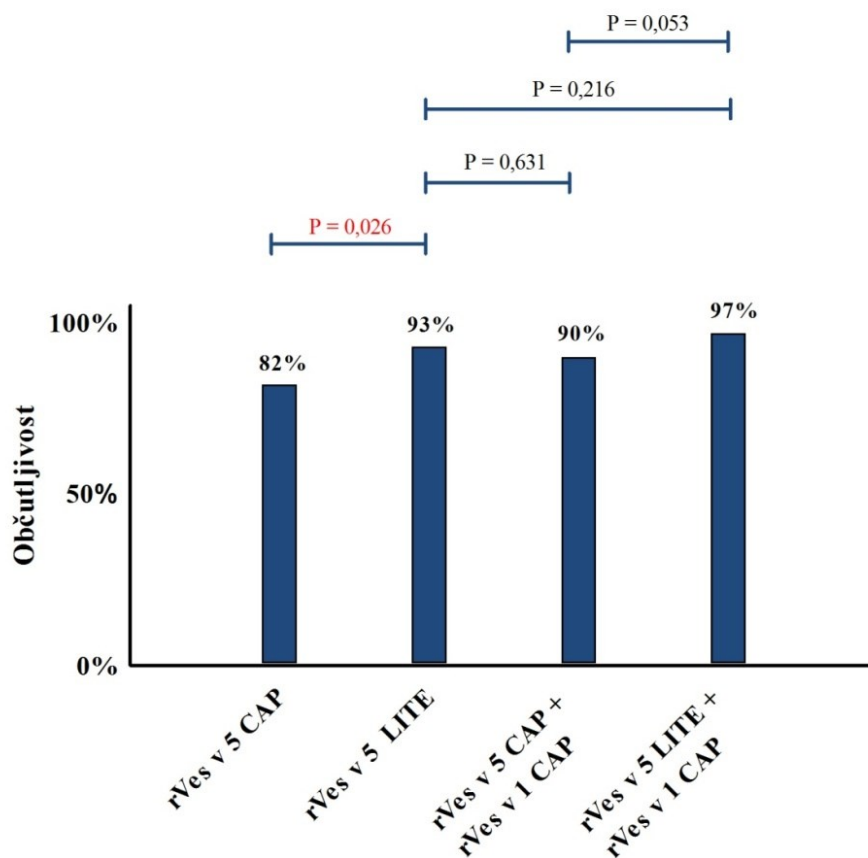


Slika 3: Izračunane diagnostične občutljivosti primerjanih diagnostičnih testov za posamezne rekombinantne alergene čebele in njihove kombinacije. Nad stolpčnimi diagrami so prikazani izračuni χ^2 testa za ustrezen par.

Izračunana občutljivost testa za poglavitni alergen v strupu čebele (rApi m 1) je bila na analitskem sistemu LITE (88% [84/95]) statistično značilno večja ($P = 0,004$), kot na sistemu CAP (71% [67/95]). Občutljivost za novi komercialno dostopni alergen rApi m 2 pa je bila v primerjavi z rApi m 1 nizka (51% [48/95]). Kombinacija obeh alergenov, rApi m 1 in rApi m 2, je sicer diagnostično občutljivost analitskega sistema LITE še povečala (95% [90/95]), vendar pa ta sprememba ni bila statistično značilna ($P = 0,192$). Kombinacija novega alergena rApi m 2 LITE z rApi m 1 CAP je izkazala nižjo diagnostično občutljivost (86% [82/95]), kot rApi m 1 LITE sam (88%), kar ni bilo statistično značilno ($P = 0,827$). Kombinacijo rekombinantnih alergenov za dva različna analitska sistema smo izračunali zato, ker rApi m 2 ni komercialno dostopen za sistem CAP.

4.1.2. Diagnostična občutljivost primerjanih analitskih sistemov za rekombinantne alergene ose

Rezultati izračunanih diagnostičnih občutljivosti primerjanih analitskih sistemov za posamezne rekombinantne alergene ose in njihove kombinacije so predstavljeni na Sliki 4.



Slika 4: Izračunane diagnostične občutljivosti primerjanih diagnostičnih testov za posamezne rekombinantne alergene ose in njihove kombinacije. Nad stolpčnimi diagrami so prikazani izračuni χ^2 testa za ustrezen par.

Izračunana diagnostična občutljivost na poglavitni alergen v strupu ose, rVes v 5, je bila na analitskem sistemu LITE (93% [102/110]) statistično signifikantno večja ($P = 0,026$), kot na sistemu CAP (82% [90/110]). Tudi kombinacija alergenov rVes v 1 in rVes v 5, je na sistemu CAP izkazala manjšo občutljivost kot sam alergen rVes v 5 na sistemu LITE (90% [90/110]). Občutljivost na kombinacijo alergenov rVes v 5 LITE in rVes v 1 CAP pa se je povečala (97% [107/110]). Kombinacija slednjih dveh rekombinantnih alergenov se je z visoko diagnostično občutljivostjo približala celo tisti, ki jo je izkazal nativni strup ose.

Razlike v občutljivostih primerjanih testov na kombinacije rekombinantnih alergenov in samega rVes v 5 LITE, pa niso bile statistično značilne.

4.1.3. Diagnostične občutljivosti primerjanih analitskih sistemov za alergene ose in čebele, glede na posamezne stopnje sistemskih reakcij po Muellerju

Preglednica V: Diagnostične občutljivosti primerjanih testov za alergena rApi m 1 in rVes v 5, po posameznih skupinah, določenih glede na stopnjo sistemske reakcije po Muellerju.

Teža reakcije	Občutljivost ImmunoCAP (%)	Občutljivost Immulate (%)	Razlika v občutljivosti (%)	P – vrednost
Vzorci bolnikov senzibiliziranih na strup čebele (n = 95; [rApi m 1])				
VLR	69 (9/13)	77 (10/13)	8	1,00
I	64 (7/11)	82 (9/11)	18	0,64
II	48 (11/23)	74 (17/23)	26	0,13
III	90 (27/30)	100 (30/30)	10	0,24
IV	72 (13/18)	100 (18/18)	28	0,045
I+II	53 (18/34)	76 (26/34)	23	0,08
III+IV	83 (40/48)	100(48/48)	17	0,01
Vzorci bolnikov senzibiliziranih na strup ose (n = 110; [rVes v 5])				
VLR	83 (10/12)	92 (11/12)	8	1,00
I	100 (14/14)	100 (14/14)	0	1,00
II	77 (17/22)	95 (21/22)	18	0,19
III	83 (24/29)	83 (24/29)	0	1,00
IV	76 (25/33)	97 (32/33)	21	0,03
I+II	86 (31/36)	97 (35/36)	11	0,20
III+IV	79 (49/62)	90 (56/62)	11	0,13

Preglednica V prikazuje vrednosti diagnostičnih občutljivosti za alergena rApi m 1 in rVes v 5, izračunane za oba primerjana analitska sistema, ki so razdeljene po posameznih stopnjah sistemskih reakcij po Muellerju. Občutljivosti za rekombinantne alergene sistema LITE, so bile v vseh primerih, razen v dveh, kjer so bile enake, večje od tistih, ki smo jih izračunali za sistem CAP. Največje razlike v primerjanih občutljivostih na rekombinantne

alergene smo opazili v skupini vzorcev s IV. stopnjo systemske reakcije. Občutljivost na rApi m 1 je bila tako v tej skupini serumskih vzorcev na analitskem sistemu LITE 100%, na primerjanem sistemu CAP pa 72%. Razlika je bila mejno statistično značilna ($P = 0,045$). Diagnostični občutljivosti testov na rVes v 5 pa sta bili, na sistemu LITE 97%, na sistemu CAP pa 76%. V tem primeru je bila razlika med občutljivostima statistično značilno značilna ($P = 0,03$).

Stopnje reakcij po Muellerju smo razdelili v dve nadskupini, in sicer glede na težo reakcije ob piku žuželke. Tako smo osebe, ki so ob piku doživele systemsko reakcijo, uvrstili v I. in II., tiste, ki so izkusili hudo systemsko ali anafilaktično reakcijo, pa v III. in IV. skupino po Muellerju. Od diagnostičnih občutljivosti, izračunanih za omenjeni nadskupini, je bila najbolj izrazita tista na rekombinantni alergen rApi m 1, in sicer v vzorcih oseb s hudo systemsko ali anafilaktično reakcijo (II. in IV. skupina). V sistemu LITE je bila 100%, v sistemu CAP pa 72 %, kar se je izkazalo za statistično značilno ($P = 0,01$).

4.1.4. Izračuni diagnostične specifičnosti primerjanih testov za rekombinantne alergene rApi m 1, rApi m 2 in rVes v 5

Preglednica VI: Diagnostični specifičnosti testiranih rekombinantnih alergenov.

	Specifičnost Immulate (%)	Specifičnost ImmunoCAP (%)	Razlika v specifičnostih (%)	P - vrednost
rApi m 1	94 (3/49)	98 (1/49)	4	0,62
rApi m 2	96 (2/50)	/	/	/
rVes v 5	96 (2/49)	98 (1/49)	2	1,00

Specifičnost za rApi m 1, določena na sistemu LITE, je bila 94%, tista, določena na sistemu CAP pa 98%. Podobne rezultate smo dobili tudi za rekombinantni alergen rVes v 5, kjer sta bili specifičnosti 96% (sistem LITE) in 98% (sistem CAP). Specifičnost za rApi m 2 na sistemu LITE je bila 96%.

4.1.5. Razlike v številu pozitivnih in negativnih rezultatov za alergena rApi m 1 in rVes v 5, izmerjenih s primerjanima analitskima sistemoma

Preglednica VII: Število pozitivnih in negativnih rezultatov za rekombinantna alergena rApi m 1 in rVes v 5, ki smo jih določili s primerjanima analitskima sistemoma.

	Immulate (pozitivni vzorci)	Immulate (negativni vzorci)
Vzorci pacientov senzibiliziranih na strup čebele (n = 95; [rApi m 1])		
ImmunoCAP (pozitivni vzorci)	67	0
ImmunoCAP (negativni vzorci)	17	11
Vzorci pacientov senzibiliziranih na strup ose (n = 110; [rVes v 5])		
ImmunoCAP (pozitivni vzorci)	90	0
ImmunoCAP (negativni vzorci)	12	8

V Preglednici VII so prikazana števila pozitivnih in negativnih serumskih vzorcev za rApi m 1 in rVes v 5, glede na uporabljeni analitski sistem. Med vzorci bolnikov, ki smo jim določili protitelesa proti rekombinantnemu alergenu rApi m 1, jih je bilo 61% negativnih na sistemu CAP, a pozitivnih na sistemu LITE. Noben vzorec, ki je bil pozitiven na sistemu CAP, pa ni bil negativen na sistemu LITE.

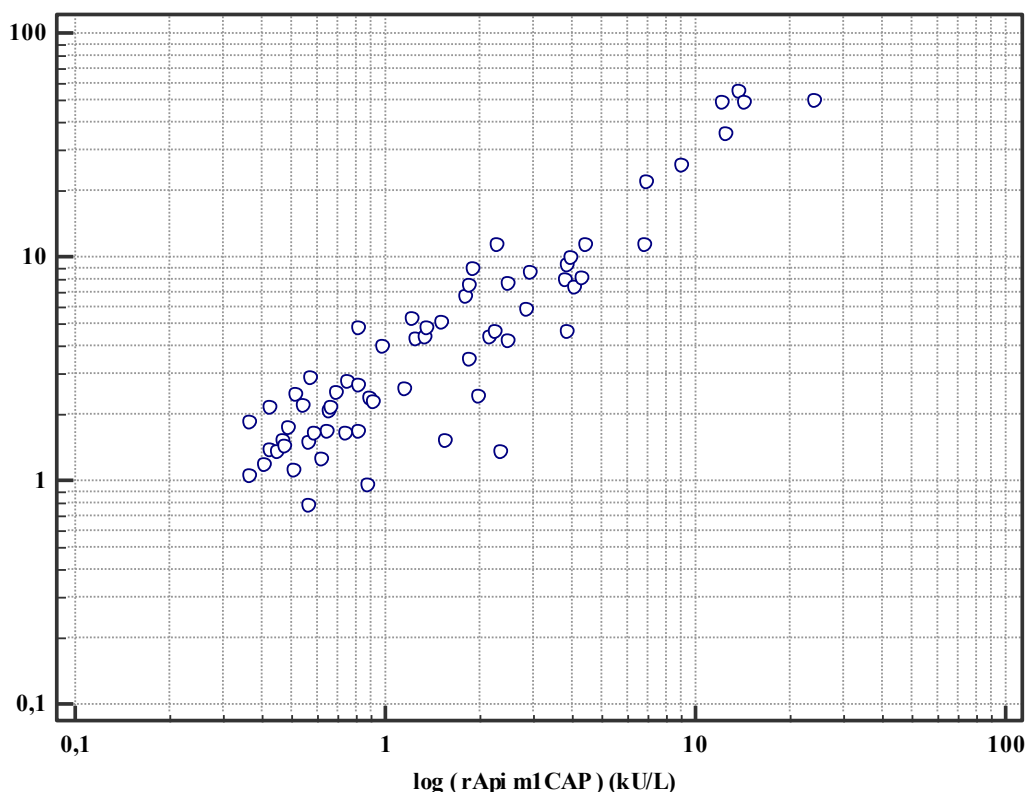
Podoben trend smo opazili tudi pri določanju protiteles proti rVes v 5, kjer je bilo 60% vzorcev, ki so bili negativni na sistemu CAP, pozitivnih na sistemu LITE. Tudi v tem primeru ni bil noben vzorec, ki je bil pozitiven na sistemu CAP, negativen na sistemu LITE.

4.1.6. Korelaciji med količinami protiteles proti rApi m 1 in rVes v 5, določenimi s primerjanima analitskima sistemoma

Za oceno korelacije med količinami protiteles zoper posamezen rekombinantni alergen, določenimi s primerjanima analitskima sistemoma CAP in LITE, smo izračunali ustrezne korelacijske koeficiente. Za oceno povezanosti smo uporabili linearno regresijo, pri čemer smo za odvisno spremenljivko vzeli vrednosti, izmerjene na sistemu LITE, za neodvisno pa tiste, ki smo jih določili na sistemu CAP.

Ker izmerjene vrednosti niso bile normalno porazdeljene, kar smo preverili s Shapiro-Wilkovim testom, smo za ugotavljanje moči povezanosti izračunali Spearmanove korelacijske koeficiente.

Izračunana vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta ρ , za količine protiteles proti rApi m 1, izmerjene s sistemoma LITE in CAP, je bila 0,93 ($P < 0,001$; 95% CI: 0,892 - 0,951), kar kaže na zelo dobro povezanost med obema analitskima metodama.



Slika 5: Razsevni diagram logaritmiranih vrednosti koncentracij protiteles proti rApi m 1, določenih z analitskima sistemoma Immulite in ImmunoCAP, s pripadajočo regresijsko premico.

Dobra povezanost med omenjenimi rezultati, pridobljenimi s primerjanima analitskima metodama, je prikazana na Sliki 5. Predstavljene so izmerjene vrednosti vzorcev, v katerih so bile koncentracije protiteles $>0,35$ kU/L in <100 kU/L. Ker je bila večina vrednosti v območju nižjih koncentracij, smo zaradi večje preglednosti izvedli njihovo logaritemsko transformacijo in dobili ustrezno premico linearne regresije. Za vse ostale izračune smo uporabljali nelogaritmirane vrednosti.

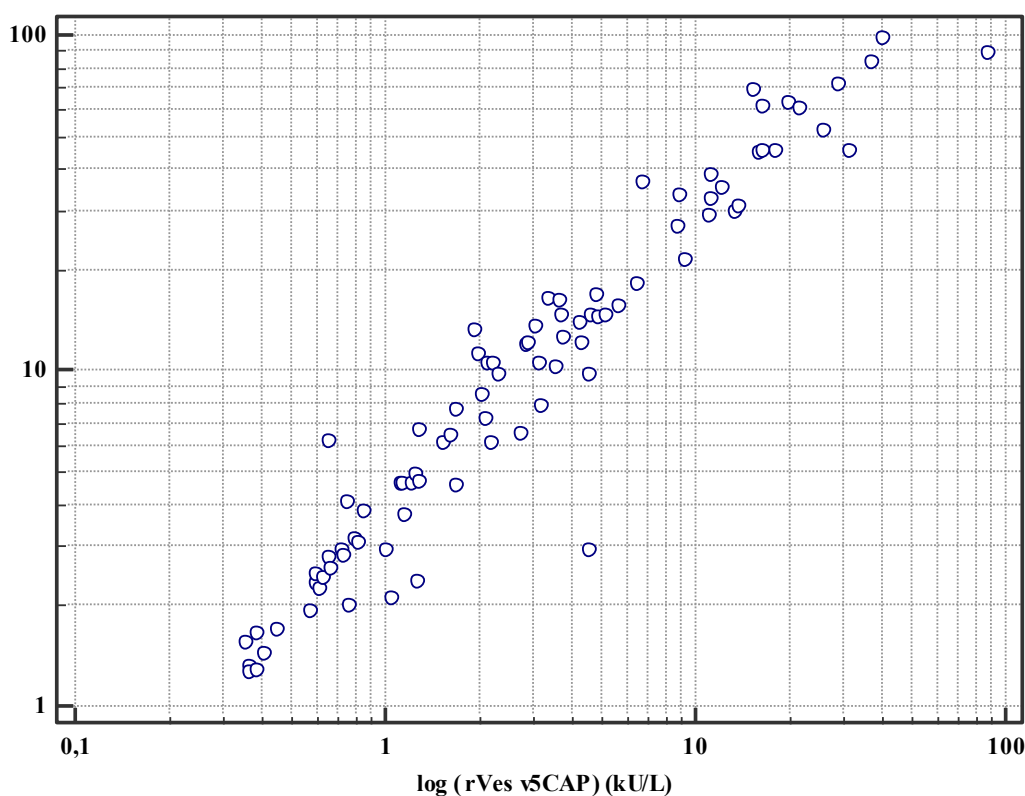
Izračunali smo enačbo regresijske premice:

$$Y = 0,02 + 2,73x$$

in koeficient determinacije R^2 , katerega vrednost za omenjeno regresijo je bila 0,885, kar kaže na veliko stopnjo odvisnosti med obema spremenljivkama.

Vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta ρ za količine protiteles proti rVes v 5, izmerjene s primerjanima analitskima sistemoma LITE in CAP, je bila 0,98 ($P < 0,001$; 95 % CI: 0,965 – 0,983), kar pomeni zelo dobro povezanost med obema metodama.

Korelacija med analitskima metodama je grafično prikazana na Sliki 6. Tako kot v prejšnjem primeru (rApi m 1), so predstavljene le izmerjene vrednosti tistih vzorcev, v katerih so bile koncentracije protiteles $>0,35$ kU/L in <100 kU/L. Na podlagi njihovih logaritmiranih vrednosti smo izrisali tudi prilegajočo se premico linearne regresije.



Slika 6: Razsevni diagram logaritmiranih vrednosti koncentracij protiteles proti rVes v 5, določenih z analitskima sistemoma Immulite in ImmunoCAP, s pripadajočo regresijsko premico.

Izračunali smo enačbo regresijske premice:

$$Y = 3,26 + 2,30x$$

in koeficient determinacije $R^2 = 0,879$. Njegova vrednost tudi v tem primeru nakazuje veliko stopnjo odvisnosti med obema spremenljivkama.

5. RAZPRAVA

Alergija na strupe žuželk iz reda kožekrilcev (*Hymenoptera*) je eden najpogostejših vzrokov za težjo in potencialno usodno sistemsko anafilaktično reakcijo (3). Iz podatkov v literaturi je razvidno, da je 56% – 94% populacije vsaj enkrat doživelo pik ene izmed tovrstnih žuželk (26). Prevalenca senzibilizacije na strupe kožekrilcev pa variira med 9,3% in 38,7%. Pri tem doživi veliko lokalno reakcijo 2,4% – 26,4% oseb, sistemsko reakcijo pa 0,3% – 7,5% (27).

Prav zaradi zapletov, do katerih lahko privede pik kožekrilca, sta diagnostika in ustrezno zdravljenje še kako pomembna. Poleg natančne anamneze bolnika in kožnih testov je eden izmed poglavitnih diagnostičnih postopkov določanje koncentracije protiteles IgE proti nativnim strupom kožekrilcev. V nadaljnji poglobljeni diagnostiki pa lahko, zaradi napredka rekombinantne tehnologije, določamo tudi koncentracije sIgE proti posameznim alergenim sestavinam strupov kožekrilcev.

Težava, ki se pojavlja pri določanju protiteles IgE proti celokupnemu strupu čebele in/ali ose, je predvsem nezadostna specifičnost razpoložljivih diagnostičnih testov. Posledica tega je, da pogosto določimo dvojno pozitivne preiskovance, alergične na strup čebele in ose. V večini primerov dvojne senzibilizacije pa je klinično pomembna le ena od njiju (na določen alergen) (28, 15). Glavna razloga za ugotovljeno dvojno senzibilizacijo na strupa čebele in ose sta prisotnost navzkrižno reaktivnih ogljikohidratnih (sladkornih) determinant, oziroma navzkrižno reaktivnih homolognih epitopov, ki so v obeh vrstah strupov (29). Prav zaradi pomanjkanja specifičnosti testov proti nativnim strupom potrebujemo nadaljnjo poglobljeno diagnostiko, ki jo lahko izvedemo tudi z uporabo posameznih ali kombiniranih rekombinantnih alergenov, značilnih za strupe kožekrilcev.

Prvi komercialno dostopni rekombinantni alergeni za diagnostiko alergij na strupe kožekrilcev so bili Api m 1, Ves v 5 in Ves v 1, za uporabo na analitskem sistemu ImmunoCAP. O njihovi diagnostični občutljivosti in specifičnosti lahko najdemo v literaturi precej podatkov. Leta 2013 pa so za rutinsko uporabo na analitskem sistemu Immulite, postali dostopni rekombinantni alergeni Api m 1, Api m 2 in Ves v 5.

Razvoj rekombinantne tehnologije, ki je omogočil uporabo rApi m 1 in rVes v 5, je pomenil velik korak naprej v smislu napredka v diagnostiki alergij na pike kožekrilcev.

Prednost uporabe rekombinantnih alergenov je namreč odsotnost navzkrižno reaktivnih ogljikohidratnih determinant, zaradi česar se v veliki meri izognemo dvojno pozitivnim rezultatom pri določanju alergij na strupa čebele in ose.

Vendar pa, glede na objavljene podatke v literaturi, tudi poglobljena rekombinantna alergena iz strupa čebele in ose (rApi m 1 in rVes v 5) nista dosegla pričakovane diagnostične občutljivosti (17). Zato so izdelali dodatna, rApi m 2 in rVes v 1 in ju dodali v standardni nabor seta alergenov za rutinsko diagnostiko alergij na kožekrilce. Zato je bil namen našega dela primerjalno ovrednotiti uporabnost komercialno dostopnih rekombinantnih alergenov, na analitskih sistemih ImmunoCAP in Immulite.

Najprej smo z uporabo obeh analitskih sistemov ovrednotili diagnostični občutljivosti obeh poglobljenih rekombinantnih alergenov strupov čebele in ose (Api m 1 in Ves v 5). Izračunana občutljivost določanja sIgE proti rApi m 1 na analitskem sistemu CAP je bila 71%. Dobljeni rezultat je sovpadal s predhodno objavljenimi študijami, v okviru katerih so ugotovili, da je uporaba rApi m 1 v rutinski diagnostiki sicer koristna, vendar pa občutljivost tega rekombinantnega alergena ni zadovoljiva (17). Isto skupino vzorcev smo nato uporabili še za ovrednotenje občutljivosti določanja sIgE proti rApi m 1 na analitskem sistemu LITE. Ta je bila statistično značilno večja (88%, $P = 0,004$) kot v primeru uporabe analiskega sistema CAP. Primerljivo občutljivost (83%), kot mi, so določili tudi v kasneje objavljeni študiji (30). Občutljivost testov z novim rekombinantnim alergenom Api m 2, je bila v primerjavi z rApi m 1, na analitskem sistemu LITE mnogo nižja, in sicer 51%. Naš rezultat se sklada z občutljivostjo, ki je bila ugotovljena v okviru kasneje objavljene študije, in je znašala 56% (30). Kombinirana uporaba dveh rekombinantnih alergenov (rApi m 1 in rApi m 2) strupa čebele na sistemu LITE je povečala diagnostično občutljivost testa na 95%, kar pomeni da smo na ta način lahko prepoznali skoraj vse preiskovance z alergijo na strup čebele (90/95). Tudi v tem primeru je naš rezultat primerljiv z občutljivostjo (94%), ki so jo določili v študiji, v okviru katere so v serumskih vzorcih določali prisotnost sIgE proti 6 različnim nekomercialno dostopnim rekombinantnim alergenom strupa čebele (31).

Tudi pri uporabi poglobljenega rekombinantnega alergena (Ves v 5) strupa ose je bila občutljivost statistično značilno večja na sistemu LITE (93%, $P = 0,026$) v primerjavi s tisto, ki smo jo določili na sistemu CAP (82%). Občutljivost, izračunana za analitski sistem CAP, je bila primerljiva s tistimi, ki so jih opredelili v drugih študijah (17). Občutljivost

analitskega sistema LITE pa je bila skoraj enaka tisti (92%), ki so jo opredelili v kasneje objavljeni študiji (30). Tudi kombinacija alergenov rVes v 5 in rVes v 1, ki smo jo uporabili na sistemu CAP, ni pripomogla k povečanju diagnostične občutljivosti (90%, $P = 0,631$), v primerjavi z občutljivostjo, določeno ob uporabi samega rekombinantnega alergena rVes v 5 na sistemu LITE. Vendar pa opažena razlika ni bila statistično značilna. Ker rekombinantni alergen rVes v 1 ni komercialno dostopen za analitski sistem LITE, smo izračunali še občutljivost kombinacije rVes v 5 LITE in rVes v 1 CAP na sistemu LITE. Ta je bila 97%, kar je bilo za 7% več kot v primeru uporabe te kombinacije na sistemu CAP, pri čemer pa razlika ni bila statistično značilna ($P = 0,053$).

V nadaljevanju magistrskega dela smo preiskovano populacijo bolnikov, skladno s klasifikacijo po Muellerju, razdelili v skupine od I do IV, glede na težo sistemskih reakcij, ki so jih doživeli po piku žuželk. V vseh skupinah bolnikov smo izračunali občutljivosti obeh analitskih sistemov in jih medsebojno primerjali. Največjo razliko v izračunanih diagnostičnih občutljivostih smo opazili v skupini bolnikov, ki so po piku kožekrilca doživeli anafilkatično reakcijo (IV. stopnja klasifikacije po Muellerju). Občutljivost testa z uporabo rApi m 1 na sistemu LITE je bila 100%, z uporabo rVes v 5 pa 97%, medtem ko sta bili primerjani občutljivosti, določeni na sistemu CAP, 72% (rApi m 1) in 76% (rVes v 5). V obeh primerih sta bili razliki v občutljivostih med analitskima sistemoma statistično značilni (rApi m 1: $P = 0,045$; rVes v 5: $P = 0,03$). Še več, izračunana skupna občutljivost testa, izvedenega na sistemu LITE, z vzorci skupin III in IV, v katere smo vključili preiskovance, ki so doživeli najtežje reakcije po piku kožekrilca, je bila 100%. To pomeni, da smo lahko na ta način zanesljivo identificirani vse (48/48), ki so doživeli najtežje oblike sistemskih reakcij na strup kožekrilca. Z analitskim sistemom ImunnoCAP pa smo z analizo teh dveh skupin vzorcev dosegli občutljivost 83%. Razlika med občutljivostima je bila statistično značilna ($P = 0,01$).

Diagnostične specifičnosti primerjanih diagnostičnih testov, z uporabo kontrolnih vzorcev ter posameznih rekombinantnih alergenov, in sicer rApi m 1 in rVes v 5, določene na analitskih sistemih LITE in CAP, so bile visoke in primerljive (94% - 98%). Diagnostična specifičnost pri uporabi rApi m 2 na sistemu LITE, pa je bila 96%. Na osnovi teh izsledkov lahko sklepamo, da boljša občutljivost analitskega sistema LITE ni posledica nespecifične vezave protiteles IgE.

Pri opredelitvi pozitivnih in negativnih rezultatov določanja količine protiteles sIgE proti rApi m 1 in r Ves v 5, smo opazili približno 60% takih, ki so bili negativni na analitskem sistemu CAP in pozitivni na analitskem sistemu LITE. Prav tako ni bil noben rezultat, ki je bil pozitiven na sistemu CAP, negativen na sistemu LITE.

V zadnjem delu raziskave smo želeli s pomočjo korelacije ovrednotiti ujemanje rezultatov, določenih na primerjanih analitskih sistemih, ob uporabi rekombinantnih alergenov rApi m 1 in r Ves v 5. Ker meritve niso bile normalno porazdeljene, smo izračunali Spearmanova korelacijska koeficienta ρ , ki sta v primeru uporabe rApi m 1 znašala 0,93 (95% CI: 0,892 - 0,951), v primeru uporabe rVes v 5 pa 0,98 (95% CI: 0,965 – 0,983). Obe vrednosti sta bili statistično značilni ($P < 0,001$). Vrednosti Spearmanovih korelacijskih koeficientov kažejo na zelo visoko pozitivno moč povezave med testoma, ob uporabi enakega rekombinantnega alergena. Izračunali smo tudi enačbi regresijskih premic, pri čemer smo za neodvisno spremenljivko uporabili meritve ob uporabi rekombinantnega alergena na sistemu CAP, za odvisno pa tiste, ki smo jih ob uporabi enakega alergena izmerili na sistemu LITE. Izračunana koeficienta determinacije (R^2) sta bila v primeru uporabe rApi m 1, 0,89, v primeru uporabe rVes v 5, pa 0,88. Posledično lahko sklepamo, da približno 12% variabilnosti vzorcev na sistemu LITE ne moremo pojasniti z linearno povezavo med obema sistemoma. Koeficient linearne regresije je v primeru uporabe rApi m 1 znašal 2,7, pri uporabi rVes v 5 pa 2,3. To pomeni, da so bili rezultati meritev povprečnega vzorca na sistemu LITE za 2,7 oz. 2,3-krat višji od tistih, ki smo jih izmerili na sistemu CAP.

Razlike med višjimi vrednostmi rezultatov in boljšo občutljivostjo testov, izvedenih na sistemu LITE, lahko pripišemo morebitnim razlikam v proizvodnji rekombinantnih alergenov in s tem posledično njihovim različnim sposobnostim vezave protiteles IgE. Rekombinanti alergeni za analitski sistem CAP so, kot zagotavlja proizvajalec, brez navzkrižno reaktivnih ogljikohidratnih determinant, pri tem pa ne navaja, iz katerega ekspresijskega sistema so bili pridobljeni. Rekombinantni alergeni za uporabo na sistemu LITE pa so, po podatkih proizvajalca, proizvedeni v celicah Sf9 insektov. Znano je, da proizvodnja rekombinantnih glikoproteinov v teh celicah postranslacijsko ne modificira glikanov z α 1,3-vezano fukozo. Zaradi nepoznavanja uporabljenega ekspresijskega sistema za izdelavo rekombinantnih alergenov za uporabo na analitskem sistemu CAP lahko predvidevamo, da bi to lahko bil razlog za prej omenjene razlike, ki naj bi bile posledica njihovih manjših vezavnih kapacitet za sIgE (32). Razlog za omenjene razlike pa bi lahko

bila tudi drugačna ekstrapolacija kalibracijskega algoritma. To bi namreč lahko bilo povezano z dejstvom, da so bile vrednosti, določene z analitskim sistemom LITE, v povprečju, 2,7- (rApi m 1) oz. 2,3- krat (rVes v 5) višje od tistih, ki smo jih izmerili s sistemom CAP.

Iz vsega navedenega lahko sklepamo, da bo izboljšana občutljivost določanja koncentracije sIgE proti rekombinantnima alergenoma rApi m 1 in rVes v 5, ki smo jo dosegli na analitskem sistemu LITE, pripomogla k izboljšanju diagnostike alergij na strupe čebele in ose. Ta pa bo še uspešnejša, če bomo lahko poleg poglavitnih rekombinantnih alergenov strupov čebele in ose, uporabili še dodatne tovrstne komercialno dostopne alergene, kot je npr. rApi m 2.

6. SKLEP

Z rezultati raziskav, ki smo jih opravili v okviru magistrskega dela, smo dokazali:

- izboljšano diagnostično občutljivost (88%) novega komercialno dostopnega rekombinantnega alergena Api m 1, uporabljenega na analitskem sistemu Immulite, v primerjavi s tisto (71%), ki smo jo določili na analitskem sistemu ImmunoCAP;
- povečano diagnostično občutljivost (95 %) pri uporabi kombinacije rekombinantnih alergenov rApi m 1 in rApi m 2 na analitskem sistemu Immulite;
- izboljšano diagnostično občutljivost (93%) novega komercialno dostopnega rekombinantnega alergena rVes v 5, uporabljenega na analitskem sistemu Immulite, v primerjavi s tisto (82%), ki smo jo določili na analitskem sistemu ImmunoCAP;
- najbolj izrazito izboljšano diagnostično občutljivost pri meritvah serumskih vzorcev tistih bolnikov, ki so doživeli najtežje sistemske reakcije ob piku kožekrilca (III. in IV. stopnja po Muellerju);
- primerljivost diagnostičnih specifičnosti uporabljenih rekombinantnih alergenov rApi m 1 in rVes v 5, določenih na analitskih sistemih Immulite (94% ter 96%) in ImunoCAP (98% ter 98%);
- zelo dobro pozitivno linearno povezanost rezultatov, izmerjenih s primerjanima analitskima sistemoma, ob uporabi rekombinantnega alergena rApi m 1 (Spearmanov korelacijski koeficient rho (ρ): 0,93; $P < 0,001$);
- zelo dobro pozitivno linearno povezanost rezultatov, izmerjenih s primerjanima analitskima sistemoma, ob uporabi rekombinantnega alergena rVes v 5 (Spearmanov korelacijski koeficient rho (ρ): 0,98; $P < 0,001$);
- s pomočjo linearne regresije dokazano zelo močno odvisnost med obema spremenljivkama (koncentraciji sIgE proti rApi m 1 merjeni na obeh analitskih sistemih in proti rVes v 5, prav tako merjeni na obeh analitskih sistemih), s koeficientoma determinacije $R^2 = 0,89$ za rApi m 1 in $R^2 = 0,88$ za rVes v 5;
- da so bile vrednosti koncentracij IgE, določene z analitskim sistemom Immulite, v povprečju 2,7- (v primeru uporabe rApi m 1) oz. 2,3-krat (v primeru uporabe rVes v 5) višje od tistih, ki smo jih izmerili s sistemom ImmunoCAP, kar potrjujejo

vrednosti koeficientov ustreznih regresijskih premic (vrednost za $r_{\text{Api m 1}} = 2,7$;
vrednost za $r_{\text{Ves v 5}} = 2,3$).

7. LITERATURA

1. Huber B: 100 Jahre Allergie: Clemens von Pirquet - Sein Allergiebegriff und das ihm zugrunde liegende Krankheitsverständnis. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118(19-20): 573–9.
2. Akdis C, Agache I: *Global Atlas of Allergy*, European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Švica, 2014: 2-12, 32-33.
3. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: *Interna medicina*, 4. izdaja, Littera picta d.o.o., Ljubljana, 2011: 1188-217.
4. Vozelj M: *Imunologija - enciklopedijski priročnik*, DZS, Ljubljana, 1996; 16.
5. Vozelj M: *Temelji imunologije*, DZS, Ljubljana, 2000; 405-434.
6. Lieberman P, Anderson JA: *Allergic diseases*, 2. izdaja, Human press, New Jersey, 2000: 1-16.
7. Košnik M, Marčun R: *Dogovor o obravnavi anafilaksije*, Pro Grafika d.o.o., Golnik, 2015.
URL:<http://www.szum.si/media/uploads/files/ANAFILAKSIJA%20BROSURA.pdf> (Dostopano: 31.07.2017)
8. Biló BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JNG: *Diagnosis of Hymenoptera venom allergy*. *Allergy* 2005; 60: 1339–49.
9. Müller HL: *Diagnosis and treatment of insect sensitivity*. *J of Asthma Research* 1966; 3(4): 331–3.
10. [Www.allergen.org](http://www.allergen.org): *Allergen nomenclature*.
URL:<http://www.allergen.org/search.php?allergenname=&allergensource=&TaxSource=Animalia+Arthropoda&TaxOrder=Hymenoptera&foodallerg=0&bioname=>
(Dostopano: 31.07.2017)
11. Sturm GJ, Kranzelbinder B, Schuster C, Sturm EM, Bokanovic D, Vollmann J, et al.: *Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare*. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(6): 1635-43.

12. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson IB, Altmann F, Gotz M, Jarisch R: Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause of double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging - insect allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(6): 1045–52.
13. Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, Burow G, Hübsch-Müller C, Enk a: In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006; 61(10): 1220–9.
14. Seismann H, Blank S, Braren I, Greunke K, Cifuentes L, Grunwald T, et al.: Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of α -1,3-core fucosylation. *Molecular Immunology*. 2010; 47(4): 799–808.
15. Müller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespa* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy* 2009; 64(4): 543–8.
16. Mittermann I, Zidarn M, Silar M, Markovic-Housley Z, Aberer W, Korosec P, et al.: Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(6): 1300-307.
17. Jakob T, Rafei-Shamsabadi D, Spillner E, Muller S: Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. *Alergo J Int* 2017; 26: 93–105.
18. Müller UR, Dudler T, Schneider T, Cramer R, Fischer H, Skrbic D, et al.: Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A2 from honeybee venom is similar. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96(3): 395–402.
19. Peternelj A, Šilar M, Eržen R, Bajrovič N, Mušič E, Korošec P: Test aktivacije bazofilcev (bat) v in vitro diagnostiki pri preobčutljivosti za strup kožekrilcev. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 183–7.
20. Kopač P, Bajrovič N, Zidarn M: Diagnostika anafilaksije po akutni epizodi.

URL: <http://www.klinika-golnik.si/uploads/si/strokovna-javnost/strokovne-publikacije/anafilaksija-2014-178.pdf>

(Dostopano: 31.07.2017)

21. Šelb J, Kogovšek R, Šilar M, Košnik M, Korošec P. Improved recombinant Api m 1- and Ves v 5-based IgE testing to dissect bee and yellow jacket and their correlation with the severity of the sting reaction. *Clin Exp Allergy* 2016; 46(4): 621–30.
22. Li TM, Chuang T, Tse S, Hovanec-Burns D, El Shami AS. Development and Validation of a Third Generation Allergen-Specific IgE Assay on the Continuous Random Access IMMULITE 2000 Analyzer. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34(1): 67–74.
23. Johansson SGO: ImmunoCAP Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. *Expert review of molecular diagnostics* 2004; 4(3): 273-279.
24. Goikoetxea MJ, Sanz ML, García BE, Mayorga C, Longo N, Gamboa PM, et al.: Recommendations for the use of in vitro methods to detect specific immunoglobulin E: are they comparable?. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013; 23(7): 448–54.
25. MedCalc Statistical Software version 15.8, Manual. URL: <https://www.medcalc.org/manual/>
(Dostopano: 31.07.2017)
26. Antonicelli L, Bilò MB, Bonifazi F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 341–6.
27. Biló BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JNG, Birnbaum J, et al.: Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2005; 60(11): 1339–49.
28. Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, Hemmer W, Sturm EM, Griesbacher A, et al.: Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One* 2011; 6(6): e20842.

29. Seismann H, Blank S, Cifuentes L, Braren I, Bredehorst R, Grunwald T, et al.: Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity. *Clin Mol Allergy* 2010; 8: 7.
30. Schrautzer C, Bokanovic D, Hemmer W, Lang R, Hawranek T, Schwarz I, et al.: Sensitivity and specificity of Hymenoptera allergen components depend on the diagnostic assay employed. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137(5): 1603–5.
31. Köhler J, Blank S, Müller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, et al.: Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(5): 1383–9.
32. Soldatova LN, Cramer R, Gmachl M, Kemeny DM, Schmidt M, Weber M, et al.: Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(5): 691-8.