Usporedba metoda ImmunoCAP i IMMULITE za mjerenje imunoglobulina E te korelacija s rezultatima kožnog ubodnog testa

Knezović, Anela

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:931094

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Anela Knezović

Usporedba metoda ImmunoCAP i IMMULITE za mjerenje imunoglobulina E te korelacija s rezultatima kožnog ubodnog testa

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen u Dječjoj bolnici Srebrnjak, pod vodstvom doc. dr. sc. Mirjane Turkalj, dr. med. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem se dr. sc. Mirjani Turkalj i djelatnicima DB Srebrnjak na stručnim savjetima i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala dr. sc. Nadi Oršolić na susretljivosti, ljubaznosti i zalaganju tijekom pisanja samog diplomskog rada.

Najveće hvala mojim roditeljima, bratu i sestri koji su mi omogućili školovanje i bili bezuvjetna podrška tijekom studiranja.

Zahvaljujem i svome dečku na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom svih godina školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

USPOREDBA METODA ImmunoCAP I IMMULITE ZA MJERENJE IMUNOGLOBULINA E TE KORELACIJA S REZULTATIMA KOŽNOG UBODNOG TESTA

Anela Knezović

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Učestalost alergijskih bolesti u posljednjih 20-30 godina u dramatičnom je porastu, posebno kod djece. Razlog trenda porasta još uvijek nije poznat. Poznato je da alergijska bolest ima nekoliko faza: senzibilizaciju, manifestaciju simptoma, perzistenciju i remisiju. Moderna medicina teži prevenciji, sprječavanju progresije bolesti i dijagnosticiranju bolesti u najranijim fazama. Ključni dio dijagnostike alergijskih bolesti je otkrivanje alergena koji izazivaju reakciju. Danas se dijagnostika alergijskih bolesti provodi *in vivo* i *in vitro* testovima. Osnovni *in vivo* test je kožni ubodni test koji mjeri kožnu reakciju na specifični alergen apliciran u kožu. Osnovni *in vitro* testovi mjere razinu specifičnog imunoglobulina E u uzorku seruma. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti rezultate mjerenja specifičnih IgE protutijela mjerenih metodama ImmunoCAP i IMMULITE, te rezultate usporediti s rezultatima kožnog ubodnog testa na iste alergene. Obradom uzoraka iz selektirane i neselektirane skupine ispitanika uspoređene su navedene metode. Rezultati su pokazali da su ImmunoCAP i IMMULITE metode usporedive i približno jednako osjetljive. Metoda IMMULITE pokazala je viši stupanj slaganja s rezultatima kožnog testa. Obje metode su valjane u rutinskoj dijagnostici alergijskih bolesti, a niti jedna metoda nije dostatna niti idealna u dijagnostici alergijskih bolesti.

(39 stranica, 6 slika, 6 tablica, 35 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: alergijske bolesti, specifični IgE, *in vivo*, *in vitro*, ImmunoCAP, IMMULITE

Voditelj: Dr. sc. Mirjana Turkalj, doc.

Suvoditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Dr. sc. Sandra Radić, doc.

Dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija, izv. prof.

Rad prihvaćen: 18. veljače 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology Graduation Thesis

INTERMETHOD COMPARISON OF DETECTION PERFORMANCE FOR ALLERGEN-SPECIFIC IgE ANTIBODIES BETWEEN ImmunoCAP AND IMMULITE AND THEIR AGREEMENT WITH SKIN PRICK TESTING

Anela Knezović

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Prevalence of allergic diseases has been in dramatic increase over last 20-30 years, especially in children. The reason of this increasing trend is still unknown. It's known that allergic disease has several phases: sensibilisation, symptoms manifestation, persistence and remision. Modern medicine tends to prevent, to preclude progression of the disease and to diagnose disease in the earliest phases. A key part of diagnosing allergic diseases is detection of allergen that causes reaction. Today, diagnostics of allergic diseases is carried out by *in vivo* and *in vitro* tests. General *in vivo* test is a skin prick test that measures skin reactions at specific allergen injected into the skin. General *in vitro* tests measures the level of specific IgE in a sera sample. The goal of this research was to compare the results of measurements of specific IgE antibodies measured by ImmunoCAP and IMMULITE methods, and to compare that results with the results of skin prick test on the same allergens. We compared mentioned methods processing selected and nonselected group of samples. The results showed that IMMULITE and ImmunoCAP are comparable and approximately equally sensitive methods. The IMMULITE showed better correlation with the skin prick test results. Both methods are valid in the routine diagnostics of allergic diseases, but no method is sufficient nor ideal in diagnostics of allergic diseases.

(39 pages, 6 figures, 6 tables,35 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Key words: allergic diseases, specific IgE, *in vivo*, *in vitro*, ImmunoCAP, IMMULITE

Supervisor: dr. sc. Mirjana Turkalj, Asst. Prof.

Cosupervisor: dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

dr. sc. Sandra Radić, Asst. Prof.

dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 18th, 2016

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

1.1. Alergijske bolesti 1

1.1.1. Podjela alergijskih bolesti 3

1.2. Dijagnosticiranje alergijskih bolesti 5

1.2.1. *In vivo* dijagnosticiranje alergijskih bolesti (SPT) 6

1.2.2. *In vitro* dijagnosticiranje alergijskih bolesti 8

1.3. IMMULITE 2000 metodologija 10

1.4. ImmunoCAP metodologija 10

1.5. Cilj istraživanja 12

2. MATERIJALI I METODE 13

2.1. Serološka analiza uzoraka 13

2.2. IMMULITE 2000 i UniCAP 100 15

2.3. Kožni ubodni test (SPT) i klinička dijagnoza 17

2.4. Statističke analize podataka 17

2.4.1. Test predznaka (Sign test) 18

2.4.2. Linov koeficijent konkordancije 18

2.4.3. Spearmanov koeficijent rang korelacije 18

3. REZULTATI 20

3.1. Analiza rezultata prve skupine pacijenata 20

3.2. Analiza rezultata druge skupine pacijenata 26

4. RASPRAVA 30

5. ZAKLJUČAK 33

6. LITERATURA 34

7. ŽIVOTOPIS 37

POPIS KRATICA

ADCC- stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (engl. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)

CAP- ImmunoCAP metoda (engl. *ImmunoCAP*)

FEIA- fluoroenzimski imunotest (engl. *Fluoro Enzyme Immuno Assay*)

FIA- fluoroimunotest (engl. *Fluoro Immuno Assay*)

Ig- imunoglobulin (engl. *Immunoglobuline*)

IgE- imunoglobulin razreda E

IgG- imunoglobulin razreda G

IgM- imunoglobulin razreda M

IML- IMMULITE metoda (engl. *IMMULITE*)

kU/L- kilojedinica po litri (engl. *kiloUnit/Liter*)

N/P- nema podataka

RAST- radioalergosorbenti test (engl. *Radio Allergo Sorbent Test*)

RIST- radioimunosorbentni test (engl. *RadioImmuno Sorbent Test*)

RPM- okretaji u minuti (engl. *Repeats per minute*)

sIgE- specifični imunoglobulin razreda E (engl. *specific Immunoglobuline E)*

SPT- kožni ubodni test (engl. *Skin Prick Test*)

T_H- pomoćnički limfociti T (engl. T_{HELPER})

uIgE- ukupni imunoglobulini razreda E

WAO- Svjetska Alergološka organizacija (engl. *World Allergy Organisation*)

WHO- Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

1. UVOD

1.1. Alergijske bolesti

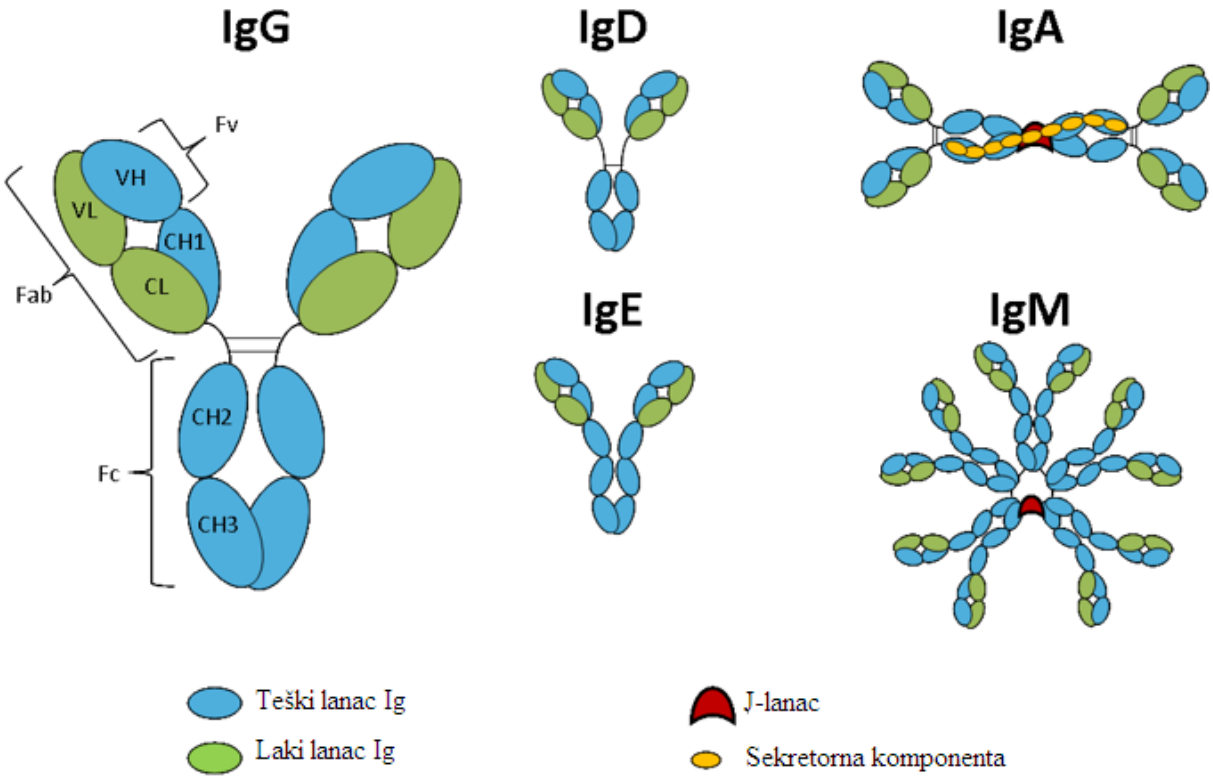
Alergijske bolesti su globalni problem u visokorazvijenim zemljama, kao i u zemljama u razvoju. Prema statistikama Svjetske zdravstvene organizacije, WHO (engl. *World Health Organisation*), 30-40% ukupnog svjetskog stanovništva boluje od barem jedne alergijske bolesti. Trend porasta alergija posebno je zabilježen u djece, a u porastu su prvenstveno kompleksne alergije koje dovode do povećane potrebe za liječničkom skrbi (Bulat-Kardum, 2013).

Pojam alergije uveo je Clemens vor Pirquet 1906. godine, definirajući ga kao sposobnost nekih organizama da reagiraju hipersenzitivno uslijed ulaska nepoznate tvari u organizam (Galli i sur., 2008). Kako tvrdi Andreis (2004): „Taj je pojam tada obuhvaćao oba značenja imunoreakcije: pojačanu otpornost na mikroorganizme i njihove toksine, nazvanu imunost, te različite štetne pojave, što se nazivalo preosjetljivošću. No s vremenom je pojam alergije izgubio svoje prvotno značenje pa se danas poistovjećuje s preosjetljivošću.“

Zajedničko obilježje svih alergijskih bolesti je da se razvijaju i mijenjaju tijekom života. Simptomi su raznoliki, javljaju se u bilo kojem organskom sustavu u bilo kojem razdoblju života, a intezitet im slabi starenjem (Kanceljak-Macan, 2004).

Unatoč brojnim istraživanjima, pitanje zašto dolazi do povećanog razvoja alergijskih bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno. Znanstvenici su postavili nekoliko hipoteza koje uključuju nasljednu sklonost razvoju alergija, razne čimbenike okoliša i životni stil pojedinca koji, najčešće složenim međudjelovanjima, dovode do razvoja alergijskih bolesti (Sense About Science, 2015). Ono što je sigurno jest da se alergijska reakcija ne razvija pri prvom, već pri ponovljenom dodiru sa antigenom (alergenom). Antigen je svaka tvar koja izaziva specifičnu imunoreakciju, odnosno potiče organizam na stvaranje antitijela (Andreis i sur., 2004). Postoji pet različitih tipova molekula antitijela, zajedničkog naziva imunoglobulini (Slika 1.) . Sve molekule imunoglobulina imaju istu osnovnu građu: sastoje se od dva teška i dva laka polipeptidna lanca koji su međusobno povezani disulfidnim vezama. Razlikujemo dvije vrste lakih lanaca (κ i λ) te pet vrsta teških lanaca (γ, μ, α, ε i δ). Teški lanci unutar

molekule imunoglobulina određuju njegovu pripadnost pojedinom razredu. Svaki laki lanac sastoji se od dva dijela-od jedne varijabilne i jedne konstantne domene. Za razliku od lakih, teški lanci se sastoje od jedne varijabilne i tri ili četiri konstantne domene (Sabioncello i Gagro, n.d.). Antigeni koji izazivaju alergijske reakcije nazivaju se alergenima.



Slika 1. Struktura imunoglobulina (preuzeto i prilagođeno s absoluteantibody.com).

Nasljedna sklonost razvoju alergijskih bolesti naziva se atopija. Iako relativno star, pojam atopije i danas je predmet polemika. Ring (2006) atopiju definira na dva načina, referirajući se na laboratorijske rezultate s jedne strane i na kliničku simptomatologiju s druge strane. Najvažniji događaj glede laboratorijske dijagnostike alergijskih bolesti nedvojbeno je detekcija IgE antitijela. Ovakav princip prihvaćen je od strane Svjetske alergološke organizacije, WAO (engl. *World Allergy Organisation*), koja je definirala atopiju kao osobnu ili obiteljsku sklonost razvoju senzibilizacije i stvaranja IgE antitijela kao odgovora na izlaganje antigenima. S druge strane, klinička simptomatologija pozornost usmjerava na samog pacijenta i na simptome bolesti, a potom na sintezu IgE antitijela. Iz toga proizlazi definicija atopije kao obiteljske tendencije razvoja bolesti temeljene na preosjetljivosti, a

povezane s povećanom proizvodnjom IgE antitijela (Ring, 2006). Genetska sklonost razvoju alergijskih bolesti ne znači nužno i njihov razvoj, ali povećava vjerojatnost razvoja u odnosu na osobe koje nisu atopične (Sense About Science, 2015).

Prema Mehuliću (2008), najveći broj alergijskih bolesti posredovan je IgE antitijelima. Alergijske bolesti koje nisu posredovane IgE antitijelima potaknute su najčešće imunoglobulinima G, imunim kompleksima i stanicama.

Različiti čimbenici iz okoliša također djeluju na razvoj alergijskih bolesti: klimatske promjene i sve veća industrijalizacija doprinose povećanju alergija. Uočena je veza između učestalosti pojave alergijskih bolesti i promjene prehrambenih navika, života u zatvorenim i neventiliranim prostorima te starijom životnom dobi majki (Wright i Scott, 2001; Kanceljak-Macan, 2004).

„Higijenska teorija“ jedna je od hipoteza kojom se pokušava pojasniti povećanje učestalosti i razvoj alergijskih bolesti. Ona porast alergija povezuje s poboljšanjem socioekonomskog statusa, uočenog posebno u razvijenim zemljama Zapada. Naime, izloženost djece bakterijskim i parazitskim infekcijama tijekom ranog djetinjstva inducira razvoj imunološkog sustava, odnosno smanjuje rizik pojave alergija (Kanceljak-Macan, 2004; Bulat-Kardum, 2013). Razvoj medicine, pojava antibiotika te higijenska osviještenost uzroci su sve manje izloženosti djece mikrobima što za posljedicu ima češću pojavu alergijskih bolesti. „Higijenska teorija“ ne objašnjava u potpunosti razvoj alergijskih bolesti, već se nadopunjuje s drugim čimbenicima u kompleksnu međureakciju (Bulat-Kardum, 2013).

1.1.1. Podjela alergijskih bolesti

Danas se najčešće upotrebljava klasifikacija alergija prema mehanizmima njihova nastanka. Takvu klasifikaciju su 1963. predložili Coombs i Gell, a alergijske bolesti dijele se na 4 osnovna oblika.

Prvi oblik preosjetljivosti temelji se na stvaranju IgE antitijela, koja se Fc područjem molekule imunoglobulina vežu na receptore na bazofilima i mastocitima. Za nastanak antitijela uslijed dodira s alergenom i za njegovo vezanje za ciljne stanice potrebno je oko 14 dana. Pri ponovljenom unosu alergena u organizam, alergen će reagirati s kompleksom

antitijelo-ciljna stanica., tj. senzibiliziranim mastocitom ili bazofilom. Reakcijom jedne molekule antigena s dvije molekule antitijela dolazi do otpuštanja medijatora (degranulacija) iz ciljnih stanica. Najvažniji od medijatora koji se oslobađaju je histamin. Generalno, posljedica otpuštanja histamina je više ili manje izražena anafilaktička reakcija. Zbog toga se prvi oblik preosjetljivosti naziva i anafilaktička preosjetljivost. Prvi znakovi anafilaktičke preosjetljvosti javljaju se samo nekoliko minuta nakon dodira senzibilizirane jedinke s antigenom, što rezultira općom ili lokalnom anafilaksijom. Neki od znakova anafilaksije su povećanje propusnosti kapilara, pojačano lučenje žlijezda, kontrakcija glatkih mišića i nakupljanje upalnih stanica u tkivima (Andreis i sur., 2004).

Drugi tip preosjetljivosti naziva se i citotoksična preosjetljivost ovisna o antitijelima. Riječ je o antitijelima klase IgM ili IgG koja reagiraju s antigenima na površini ciljne stanice i uzrokuju njenu smrt. Ciljne stanice mogu biti stanice različitih tkiva, a do smrti stanice dolazi aktivacijom mehanizama opsonizacije, lize ili stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima. Kada govorimo o opsonizaciji, govorimo o vezanju antitijela na ciljnu stanicu, prezentiranju Fc-ulomka antitijela kojeg prepoznaje fagocit i posljedično lakšem fagocitiranju ciljne stanice. Antitijela su sposobna i za aktivaciju sustava komplementa. Stvaranje C3b komponente koja ima opsonizacijsko djelovanje te C5b-C9 koja razara ciljnu stanicu lizom također je oblik citotoksične preosjetljivosti. Na kraju, antitijela koja se nalaze na površinama stanica reagiraju s antigenima koji su dio stanične membrane ili se adsorbiraju na nju i dovode do stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Jedan od najpoznatijih primjera citotoksične preosjetljivosti je liza eritrocita uslijed transfuzije krvi nepodudarne krvne grupe.

Treći oblik preosjetljivosti je preosjetljivost uzrokovana imunokompleksima. Imunokompleksi nastaju reakcijama topljivih antigena i antitijela u krvnom optjecaju te se redovito uklanjaju fagocitima. Ponekad dolazi do povećanog stvaranja imunokompleksa i/ili njihovog duljeg zadržavanja u krvi, što omogućava taloženje imunokompleksa u stijenkama krvnih žila. To posljedično dovodi do oštećenja okolnog tkiva. Preosjetljivost trećeg tipa može biti lokalna i opća. U lokaliziranom obliku imunokompleksi nastaju na području unosa antigena-ubrizgavanjem antigena lokalno u tkivo, za razliku od opće gdje imunokompleksi nastaju ulaskom velike količine antigena u krv, koji u senzibiliziranoj osobi cirkuliraju krvlju. Taloženje imunokompleksa događa se u mnogim patološkim stanjima zajedničkog imena bolesti imunokompleksa. Često se u takvim stanjima javlja glomerulonefritis. Taloženjem

imunokompleksa u glomerularnim kapilarama dolazi do oštećenja bubrega uz proteinuriju te zatajivanje bubrega zbog zatvaranja kapilara rastom endotelnih stanica. Osim bubrega, najčešće područje taloženja imunokompleksa su zglobovi. Tada govorimo o reumatoidnom artritisu (Andreis i sur., 2004).

Četvrti oblik preosjetljivosti ili preosjetljivost posredovana stanicama karakteristična je samo za jedinke koje su prethodno bile u dodiru sa određenim antigenom, odnosno za senzibilizirane jedinke. Ponovnim ubrizgavanjem istog antigena u senzibilizirani organizam dolazi do pojave crvenila i otekline na mjestu ubrizgavanja. Antigen potiče pomoćničke limfocite T (T_H) na lučenje citokina i kemokina, koji će u konačnici uzrokovati ekstravazaciju plazme i upalnih stanica koje će infiltrirati okolno tkivo. Preosjetljivost može biti potaknuta širokom paletom antigena, a najčešće je riječ o bjelančevinama. Reakcija preosjetljivosti je toliko snažna da uzrokuje oštećenje vlastitoga tkiva. Dodirna ili kontaktna preosjetljivost važan je oblik preosjeljivosti posredovane stanicama, a razvija se uslijed dodira kože s tvarima male molekulske mase koje se ponašaju kao hapteni. Karakteristike kontaktne preosjetljivosti su pojava crvenila i oteklina kože, uz mogućnost širenja po cijelom tijelu.
Uz kontaktnu preosjetljivost, reakcije četvrtog oblika preosjetljivosti javljaju se i u autoimunim bolestima, u reakcijama odbacivanja transplantata te u tumorskim oboljenjima (Andreis i sur., 2004).

1.2. Dijagnosticiranje alergijskih bolesti

Dijagnosticiranje alergijskih bolesti kompleksan je i dugotrajan proces kojem prethodi anamneza (Kanceljak-Macan, 2004). Stoga kažemo da se alergijske bolesti dijagnosticiraju temeljem povijesti bolesti i kliničkih simptoma (Plebani i sur., 1998). Preciznost dijagnostičkih postupaka koji vode ispravnoj dijagnozi iznimno je važna zbog odabira odgovarajuće terapije (Stipić-Marković i sur., 2015). Danas se klinička simptomatologija ispituje dvjema osnovnim metodama: *in vivo* kožnim ubodnim testom, SPT (engl. *Skin Prick Test*) te *in vitro* određivanjem ukupnih i specifičnih IgE antitijela (Plavec i sur., 2011).

1.2.1. *In vivo* dijagnosticiranje alergijskih bolesti (SPT)

Prema Mehuliću (2008), kožni ubodni test je: „semikvantitativna metoda za otkrivanje *in vivo* specifičnih IgE antitijela, odnosno senzibiliziranih osoba.“ O važnosti testa govori nam činjenica da je preporučen kao primarna dijagnostička metoda alergijskih bolesti posredovanih IgE-om (Plavec i sur., 2011), a ispravno proveden test može biti osjetljiviji od *in vitro* izmjerenih specifičnog IgE-a u serumu (Van der Zee i sur. 1988; Wood i sur., 1999; Plavec i sur., 2011). Neki od pokazatelja za SPT u alergijskim bolestima su: rinitis, astma, atopijski dermatitis, anafilaktičke reakcije na hranu, akutna urtikarija te odabrani slučajevi kronične urtikarije. S druge strane, kontraindikacije uključuju difuzna dermatološka stanja, jaki dermografizam, odbijanje suradnje od strane pacijenta, trajnu i tešku astmu, trudnoću, novorođenačku i dojenačku dob, bolesnike na terapiji beta-blokatorima te bolesnike koje ne mogu prekinuti terapiju, a koja bi direktno utjecala na rezultate testiranja (Plavec i sur., 2011). Kao osnovne prednosti metode ističu se istodobno testiranje senzibilizacije na više alergena, osjetljivost, specifičnost, brzina, kao i činjenica da je test prilično bezbolan i ne zahtjeva skupu tehnologiju (Mehulić, 2008; Plavec i sur., 2011). Potencijalni nedostatak testa je subjektivnost osobe koja očitava rezultate (Plavec i sur., 2011). Postoji nekoliko varijacija kožnog ubodnog testa, a svima je zajedničko korištenje standardiziranih alergenskih pripravaka poznatih koncentracija i izbor alergena karakterističnih za područje boravka pacijenta (World Health Organisation, 1989; Plavec i sur., 2011). Uz odabrane alergene nužna je primjena pozitivne i negativne kontrole.

Preduvjet izvođenju SPT-a je priprema bolesnika na testiranje, što podrazumijeva isključivanje lijekova koji direktno utječu na rezultate: antihistaminici se isključuju na 1-4 dana, antidepresivi na 1-2 tjedna, fenotijazini, antiemetici i neuroleptici na 2 tjedna (Plavec i sur., 2011). Nalaze je potrebno iskazati ovisno o anamnezi, izloženosti alergenima i kliničkim znakovima (Plavec i sur., 2011).

Testovi se izvode na koži bez osipa, te na koži na kojoj nisu lokalno primjenjeni kortikosteroidni lijekovi. Testiranje se obično izvodi na području gornjeg dijela leđa ili na unutrašnjosti podlaktice. Prema Kanceljak-Macan (2004), tri su vrste testova: *prick* kožni test (kožni ubodni test), *prick-prick* kožni test i *patch* test (krpicom).

Kožni ubodni test izvodi se jednokratnom ubodnom lancetom, a započinje obilježavanjem područja na koje će se nanositi kapljice alergena, razmaka najmanje 3-5 cm (Slika 2.). Pravilno izvođenje testa podrazumijeva ubod kroz kapljicu alergena na području podlaktice pod pravim kutom, bez popratnog krvarenja (Milavec-Puretić i Lipozenčić, 2007; Mehulić,

2008). Kao pozitivna kontrola koristi se histamin koncentracije 1 mg/mL, a kao negativna kontrola puferska otopina (50%-tni glicerol u fosfatnome puferu). Svrha pozitivne kontrole je provjera reaktivnosti kože: nekoliko minuta nakon nanošenja dolazi do pojave crvenila, svrbeža i otekline (induracije) na mjestu uboda kroz histaminsku kap. Pozitivnom reakcijom na alergen smatra se urtika promjera ≥ 3 mm, crvenila ≥ 7 mm, ako je pozitivna reakcija na histamin, a negativna na pufersku otopinu (The European Academy of Allergology and Clinical Immunology, 1993; Durham i Church, 2001; Høst i sur., 2003; Kanceljak-Macan, 2004; Mehulić, 2008). Rezultati testa očitavaju se 15-20 minuta nakon testiranja (Kanceljak-Macan, 2004).

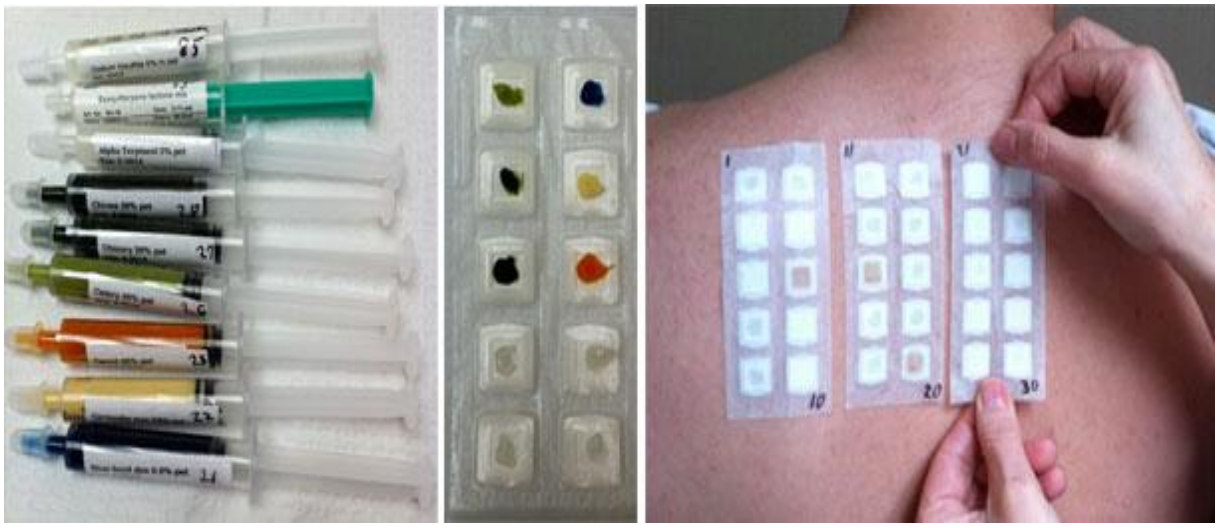


Slika 2. Kožni ubodni test (SPT), metodologija izvođenja opisana u tekstu (preuzeto s www.mnn.com).

Prick-prick kožni test izvodi se na isti način kao i *prick* kožni test. Jedina razlika je u primjeni alergena svježih namirnica. Sterilna alergološka lanceta ubode se u hranu, zatim u kožu ispitanika (Kanceljak-Macan, 2004).

Patch test izvodi se metodom krpice, postavljanjem na zdravu, prethodno očišćenu kožu (Slika 3.). Na filtar-papir (1x1cm) stavlja se 0,02-0,03 g alergena u vazelinu. Krpica se prekriva celofanskom oblogom (2x2 cm), a sve zajedno se prekriva leukoplastom (5x5 cm).

Reakcija se očitava nakon 48 i 72 h. Moguće je koristiti komercijalne vrpce, kao i izrađivati vrpce s alergenima specifičnim za podneblje (Milavec-Puretić i Lipozenčić, 2007).



Slika 3. Priprema i postavljanje krpica (preuzeto s www.ibsfoodallergy.com).

1.2.2. *In vitro* dijagnosticiranje alergijskih bolesti

Iako se kožno testiranje koristi kao primarni način dijagnosticiranja alergijskih bolesti, često dolazi do potrebe za *in vitro* laboratorijskim testovima. Ovi testovi omogućuju kvantifikaciju medijatora anafilaktičkih reakcija i identifikaciju alergena kada kožno testiranje nije moguće (Plavec i sur., 2011). *In vitro* testovi se razvijaju i unaprjeđuju posljednjih 40-ak godina i postali su jedna od najvažnijih dijagnostičkih metoda kada se koristi u otkrivanju alergijskih reakcija posredovanih IgE antitijelima (Li i sur., 2004.; Ollert i sur., 2005; Wang i sur., 2008; Lee i sur., 2009).

Određivanje ukupnog i specifičnog IgE iznimno je važno u laboratorijskoj dijagnostici alergijskih reakcija ranog tipa. Osnovni princip ovih testova je specifična reakcija vezivanja antigena i antitijela (Mehulić, 2008). Karakteristike dobrog testa za otkrivanje IgE antitijela su točnost, visoka osjetljivost, specifičnost i reproducibilnost (Hamilton, 2010; Hamilton i Williams, 2010; Goikoetxea i sur., 2013).

Određivanje ukupnog IgE podrazumijeva mjerenje koncentracije IgE neovisno o specifičnosti. Nalaz unutar raspona referentnih vrijednosti ne isključuje alergijsku bolest, kao što povišena koncentracija ukupnog IgE nužno ne znači alergijsku bolest (Mehulić, 2008; Plavec i sur., 2011). Testovi koji se najčešće koriste pri određivanju ukupnog IgE su:

a) radioimunosorbentni test, RIST (engl. *Radio Immuno Sorbent Test*),

b) fluoroimunotest, FIA (engl. *Fluoro Immuno Assay*)

c) fluoroenzimimunotest, FEIA-CAP System (engl. *Fluoro Enzyme Immuno Assay*) (Mehulić, 2008).

Određivanje specifičnih IgE otkriva potencijalnu senzibilizaciju na više alergena iz jednog uzorka krvi. Najveći nedostatak je ekonomska neisplativost te manja osjetljivost u odnosu na pravilno izveden kožni ubodni test (Mehulić, 2008; Plavec i sur., 2011). Velika prednost određivanja specifičnih IgE nad kožnim ubodnim testom očituje se u situacijama kada pacijenti nisu u mogućnosti prekidati terapiju zbog testiranja (a koja dovodi do lažno negativnog kožnog ubodnog testa), kod pacijenata koji ne žele surađivati te kod pacijenata kod kojih bi dodir sa alergenom uzrokovao anafilaktičku reakciju (Stipić-Marković i sur., 2015). Za određivanje specifičnog IgE u upotrebi su: radioalergosorbentni test, RAST (engl. *Radio Allergo Sorbent Test*) i radioalergosorbentni test na hidrofilnom polimernom nosaču, ImmunoCAP sistem (Mehulić, 2008).

Prije 40-ak godina, 1970-ih, švedska tvrtka Phadia/Pharmacia (danas ThermoFisher) razvila je prve *in vitro* alergološke testove na čijem se usavršavanju nije prestalo raditi. Povijest razvoja testova dijeli se u 4 generacije:

I. Phadebas RAST (1974): razvijen je prvi laboratorijski test za specifična IgE antitijela
II. Pharmacia CAP System, tj. ImmunoCAP (1989): donosi nove standarde kvalitete i uvodi poluautomatizaciju u laboratorije
III. UniCAP 100 (1996): uvođenje potpune automatizacije, dolazi do poboljšanja u preciznosti i reproducibilnosti
IV. ImmunoCAP 1000 i 250 testovi (2001/2004): testovi koji se odlikuju većom brzinom, povećanim kapacitetom i kontinuiranim nasumičnim pristupom

Iako trenutno ne postoji zlatni standard što se tiče *in vitro* određivanja specifičnog IgE, „kvazi-zlatnim“ standardom smatra se FEIA-CAP sistem zbog široke primjene, analitičke pouzdanosti i podudaranja s rezultatima kožnog ubodnog testa (Ollert i sur., 2005; Lee i sur., 2009).

U novije vrijeme pojavila se metoda IMMULITE 2000 koja koristi alergene u tekućim fazama, kemiluminiscentna je, a za obradu podataka potrebno je oko sat vremena (Ollert i sur., 2005; Cobbaert i Jonker, 2005; Lee i sur., 2009).

1.3. IMMULITE 2000 metodologija

IMMULITE 2000 je kvantitativni test za *in vitro* određivanje alergen-specifičnog IgE u uzorcima ljudskog seruma, a koristi se u svrhu kliničke dijagnostike IgE posredovanih alergijskih bolesti. Za potrebe testa uzima se 50 μL seruma po alergenu, a prvi rezultati su vidljivi nakon samo 65 minuta. Test je u potpunosti automatiziran i izvodi se kroz dvije faze, odnosno dva ciklusa po 30 min inkubacije. IMMULITE 2000 test može se pohvaliti postavljenim nultim kalibratorom, odnosno najniže postavljenim kalibratorom-na 0,0 kU/L. Detekcijski limit iznosi 0,1 kU/L (Li i sur., 2004).

Alergeni korišteni u testu kovelentno su vezani na topljive biotinirane polilizinske polimere u tekućoj fazi koji se vežu na streptavidin-biotin kompleks. Sekundarna anti-IgE antitijela konjugirana su sa alkalnom fosfatazom i kompleks djeluje na supstrat adamantil-dioksetan fosfat ester te posljedično dolazi do pojave kemiluminiscencijskog signala.

Odnos intenziteta kemiluminiscencijskog signala i razine prisutnog alergena određuje se pomoću standardne krivulje sa 7 koncentracijskih točaka (Goikoetxea i sur., 2013).

1.4. ImmunoCAP metodologija

ImmunoCAP je kvantitativni test za *in vitro* mjerenje cirkulirajućeg alergen-specifičnog IgE antitijela u serumu ili plazmi. Za testiranje se uzimaju uzorci venske ili kapilarne krvi, a za obradu ovom metodom potrebno je 40 μL seruma ili plazme po alergenu. Do pojave prvih rezultata potrebno je oko 3 h. ImmunoCAP tehnologija koristi kalibrator postavljen na 0,35 kU/L, što je ujedno i njen detekcijski limit (Li i sur., 2004).

Alergen od interesa kovalentno je vezan na hidrofilni polimerni nosač-ImmunoCAP za određivanje specifičnih IgE-a u serumu. Ovako postavljeni alergeni reagirat će s antitijelima u uzorku, odnosno doći će do nastanka kompleksa alergen-antitijelo. Nakon ispiranja nevezanih IgE, dodaje se mišje monoklonalno,enzimski označeno antitijelo na IgE. Kao enzim koristi se beta-galaktozidaza, koja uzrokuje transformaciju dodanog supstrata-metilumbeliferil-β-D-galaktozida u 4-metilumbeliferon, odnosno fluorescirajući produkt. Slijedi razdoblje inkubacije propisano uputama za upotrebu te ponovno ispiranje, ovaj puta nevezanih enzimski

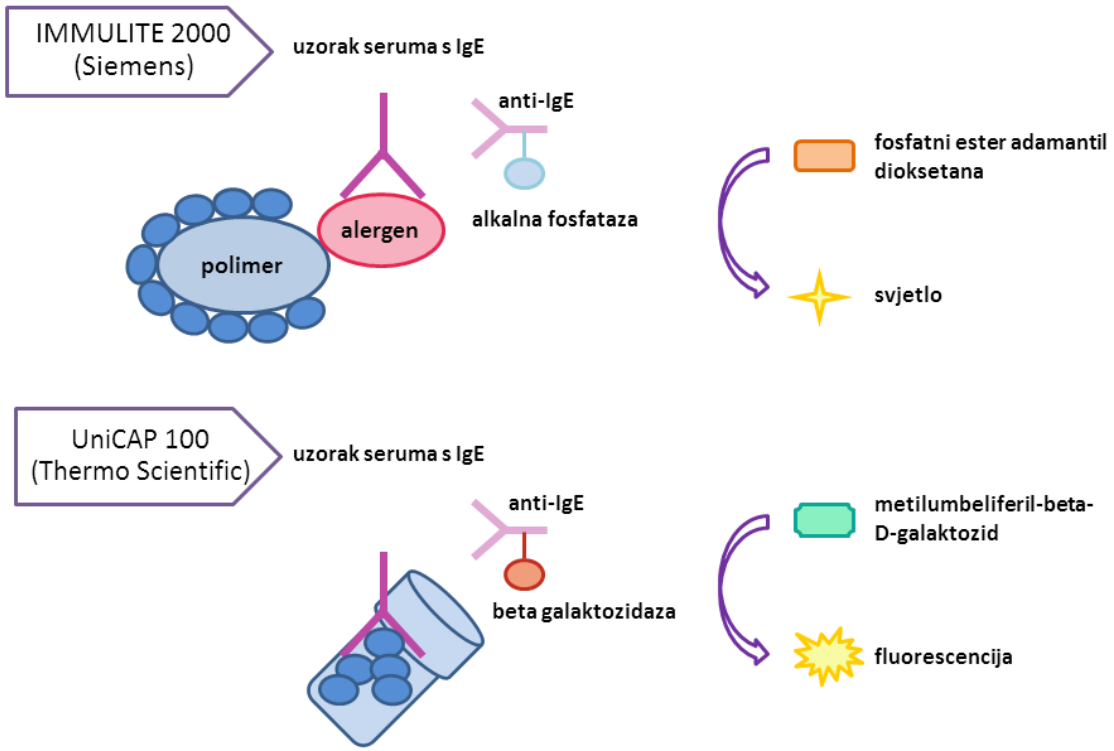
označenih antitijela na IgE. Na kraju se reakcija zaustavlja i mjeri se fluorescencija. Intenzitet izmjerene fluorescencije proporcionalan je broju IgE antitijela prisutnih u ispitivanom uzorku. Za daljnje analize rezultata ovaj intenzitet se prevodi u koncentracije IgE koristeći kalibracijsku krivulju predloženu od strane WHO. Same koncentracije mogu biti izražene podjelom na razrede (I-IV) ili pak brojčano sa odgovarajućom mjernom jedinicom (kIU/L) (Gunnar i Johansson, 2004; Stipić-Marković i sur., 2015).

Test je poluautomatiziran; UniCAP platforma omogućila je obradu uzoraka uključujući sve prethodno navedene faze zajedno sa ispisom rezultata. Podaci se pohranjuju u sustavu te se neposredno nakon mjerenja na dnevnoj bazi dobiva krivulja uspoređena sa dotad prikupljenim podacima. Za različite potrebe tržišta Pharmacia je osigurala i različite modele UniCAP-a: instrument s najvećim kapacitetom obrađuje 240 testova u satu, odnosno oko 1200 testova dnevno (Liappis i sur., 1999; Williams i sur., 2000; Szeinbach i sur., 2001; Gunnar i Johansson, 2004).

Pouzdanost rezultata testa leži u samom dizajnu čvrste faze. Faza se sastoji od trodimenzionalnog celuloznog polimera velike površine i visokog kapaciteta vezanja na koji je kovalentnim vezama vezan velik broj alergena. Danas je poznato preko 500 alergena koji se koriste za ovaj test, a ovakva struktura osigurava otkrivanje jako niskih koncentracija IgE.

Kada govorimo o troškovima ImmunoCAP testova u usporedbi sa alternativnim testovima koji se još uvijek rabe i koji se većinom baziraju na povijesti bolesti, oni su zasigurno veći. Međutim, troškovi ovakvog testiranja iznimno su niski u usporedbi s potrebama bolesnika uslijed dijagnostike nespecifičnim testovima koja zna potrajati jako dugo. Dobrobit za bolesnika i zdravstvo je brza i točna dijagnoza u kratkom periodu (Gunnar i Johansson, 2004). Budući da unos lijekova i/ili otrov kukaca direktno utječu na rezultate testa, preporučljivo je uzorak krvi uzeti 2-3 tjedna do 6 mjeseci nakon kontaminacije (Phadia, 2012).

Usporedba metoda IMMULITE 2000 i ImmunoCAP prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Usporedba metoda IMMULITE 2000 i ImmunoCAP (preuzeto i prilagođeno iz Goikoetxea i sur., 2013).

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je procijeniti metodu IMMULITE 2000 za otkrivanje alergen-specifičnog imunoglobulina E i usporediti rezultate dobivene ImmunoCAP metodom za određivanje alergen-specifičnih IgE antitijela. Rezultati dobiveni navedenim metodama će se usporediti s rezultatima kožnog ubodnog testa.

2. MATERIJALI I METODE

Uzorci korišteni u ovome radu krvni su serumi djece dobi 3 mjeseca do 18 godina. Djeca su bila liječena i obrađivana u Dječjoj bolnici Srebrnjak, a serumi su uzeti prema preporukama liječnika. Svi uzorci su prikupljeni u razdoblju od travnja 2013. godine do ožujka 2015. godine.

Dvije su skupine pacijenata uključene u istraživanje. Prva skupina uključuje 569 pacijenata čija je povijest bolesti ukazivala na IgE-posredovane reakcije na aeroalergene, otrove kukaca ili alergijske reakcije na hranu, a koji su prethodno imali pozitivan SPT na iste alergene. Ovi pacijenti nisu koristili nikakve lijekove koji bi mogli utjecati na rezultate SPT, nisu bolovali od autoimunih bolesti niti su utvrđena bilo koja druga stanja koja bi mogla utjecati na rezultate SPT. Analiza seruma učinjena je u sklopu laboratorijske obrade pacijenata, a dio seruma upotrijebljen je za mjerenja sIgE i uIgE, za što su pacijenti i/ili njihovi roditelji dali pisani pristanak.

Druga grupa sastoji se od 100 pacijenata, odnosno seruma odabranih nasumično iz bolničke „biobanke“, a za potrebe dodatnog mjerenja sIgE pacijenti i/ili njihovi roditelji također su dali pisani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane bolničkog etičkog povjerenstva.

2.1. Serološka analiza uzoraka

Unutar skupine odabranih pacijenata obrađeno je 569 uzoraka seruma koji su uzeti od djece u dobi od 0,3 do 17,9 godina (muška djeca-371, ženska djeca-198; prosječna dob 8,8 godina). Mjerena su specifična IgE antitijela na sljedeće inhalacijske i nutritivne alergene te otrove insekata:

a. *Alternaria tenius,* m6
b. breza, t3
c. epitel mačke, e1
d. ambrozija, w1
e. *Dermatophagoides pteronyssinus,* d1
f. rđobrada, g3
g. bjelanjak jajeta, f1
h. mlijeko, f2

i. kikiriki, f13
j. otrov pčele, i1
k. otrov ose, i3

te kod dva rekombinantna alergena: rApi m1-*Apis mellifera* i rVes v5-*Vespula vulgaris* (Tablica 1.).

Tablica 1. Veličina uzorka i dob za prvu skupinu pacijenata (N=569).

Testirani parametar	**N**	**Dob**
Ukupni IgE (uIgE)	121	8,8±5,3 [0,3-17,9]
AEROALERGENI		
Alternaria tenuis, m6	76	10,8±3,9 [3,5-17,7]
Breza, t3	75	10,3±4,2 [0,25-19,1]
Epitel mačke, e1	71	10,7±4,6 [1,8-19,1]
Ambrozija, w1	74	8,8±4,1 [0,25-17,1]
D. pteronyssinus, d1	66	9,0±4,6 [0,25-18,5]
Rđobrada, g3	74	9,9±4,1 [0,25-17,1]
NUTRITIVNI ALERGENI		
Bjelanjak jajeta, f1	77	4,4±3,4 [0,5-16,7]
Mlijeko, f2	68	4,1±3,5 [0,4-15,6]
Kikiriki, f13	79	6,9±4,4 [0,6-17,7]
OTROV KUKACA		
Otrov pčele, i1	40	12,7±6,4 [2,7-17,6]
Otrov ose, i3	36	12,5±6,9 [2,7-17,6]
rApi m 1 - *Apis mellifera*	33	13,4±6,5 [5,4-17,6]
rVes v 5 - *Vespula vulgaris*	28	12,6±7,2 [4,5-17,4]

Unutar druge skupine pacijenata obrađeno je 100 uzoraka seruma koji su uzeti od djece srednje dobi 8,5 godina (muška djeca-54, ženska djeca-46). Svi uzorci su testirani na najčešće nutritivne i inhalacijske alergene:

a. *Dermatophagoides pteronyssinus* (grinje iz kućne prašine), d1
b. epitel mačke, e1
c. ambroziju, w1
d. brezu, t3
e. rđobradu, g3
f. bjelanjak jajeta, f1
g. mlijeko, f2
h. kikiriki, f13

Svim pacijentima uzorak krvi je obrađivan dvjema ranije opisanim metodama (ImmunoCAP i IMMULITE). Centrifugiranjem 10 minuta na 3000 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) završen je prvi ciklus obrade. Takvi uzorci, kojima će biti mjereni sIgE, pohranjuju se na temperaturi -20 °C u slučaju nastavljanja obrade unutar 24 h ili na -80 °C za dužu pohranu. Specifična IgE antitijela za spomenute alergene mjerena su dva puta: jedan put sustavom IMMULITE 2000, drugi put UNICAP 100 FEIA, prema uputama proizvođača. Za mjerenja IMMULITE 2000 potrebno je oko 50 μL seruma po alergenu, a za UNICAP 100 FEIA oko 40 μL po alergenu.

2.2. IMMULITE 2000 i UniCAP 100

Koncentracije cirkulirajućeg IgE mjerili smo dvjema metodama: IMMULITE 2000 kemiluminiscentnim imunotestom (Siemens) i UniCAP 100 fluorecentnim imunotestom (Termo Fisher). Svi upotrebljavani alergeni dobiveni su od proizvođača i korišteni su prema uputama za upotrebu.

IMMULITE 2000 je potpuno automatizirana, kemiluminiscentna metoda kojom smo uzorak obradili u dva koraka. Streptavidinom obloženi polimeri, tekući alergeni i uzorak seruma pacijenta inkubirali su se 30 min. Svaka alergenska tuba sastojala se od specifičnih alergena u proteinskom puferu s tvari odgovornom za čuvanje koja sadrži natrijev azid, u koncentraciji manjoj od 0,1g/dL. Zbog potencijalne opasnosti od stvaranja eksplozivnih metalnih azida s

olovnim i bakrenim odvodima, uzorci su isprani velikim količinama vode. Time je završila prva faza. Nakon ispiranja, dodano je alkalnom fosfatazom (30 mL) označeno monoklonalno mišje antitijelo u puferu (L2UNA6), specifično za ljudske IgE i uslijedila je ponovna inkubacija 30 min. Nakon inkubacije ponovljeno je ispiranje te se mjerio intenzitet kemiluminiscencijskog signala odnosno razina alergena. Kako bismo odgovorili na zahtjeve za unutarnjim kontrolama, koristili smo specifične kontrole alergena dobivene od proizvođača-DC1LCM, DC2LCM, MC6LCM i L2SNCCM.

UniCAP 100 je poluautomatizirani imunotest baziran na ImmunoCAP tehnologiji. Za testiranje uzorka bilo nam je potrebno 40 μL seruma, 50 μL konjugata, 50 μL supstrata i 600 μL stop-otopine koja zaustavlja reakciju. Alergen na koji smo ispitivali preosjetljivost kovalentno je vezan na polimerni hidrofilni nosač. Dodavanjem uzorka seruma došlo je do vezanja alergena na antitijela IgE iz seruma. Nakon faze vezanja, isprali smo nevezani IgE pomoću ImmunoCAP Washing Solutiona (Art No 10-9422-01/10-9202-01) te smo dodali mišje monoklonalno, enzimski označeno antitijelo na IgE (ImmunoCAP Specific IgE Anti IgE, Art No 14-4417-01, Kathon CG 0,15%). Kao enzim koristili smo beta-galaktozidazu (ImmunoCAP Specific IgE Conjugate, Art No 10-9419-xx), koja je u konačnici rezultirala transformacijom dodanog supstrata metilumeliferil-β-D-galaktozida u 4-metilumbeliferol. Nakon inkubacije pri 37 °C uzorci su ponovno isprani ImmunoCAP Washing Solutionom te smo zaustavili reakciju Stop Solutionom (Sodium carbonate 4%, 65 mL). Na kraju smo mjerili fluorescenciju dobivenog produkta, a fluorescencija je varirala u ovisnosti o količini vezanih antitijela IgE na alergene. Kalibratori (ImmunoCAP Specific Calibrators,ljudski IgE u bufferu, Art No 10-9254-01-konc. 0,35; 0,7; 3,5; 17,5; 50 i 100 kU/L, Kathon CG 0,15%, žuto bojilo 0,2 mL) su vezani sa anti-IgE kalibracijskom krivuljom od 6 točaka. Metoda je mjerila razine 0,35-100 kU_a/L (U_a-mjerna jedinica kojom se iskazuju količine alergena). Rezultati su se mogli prikazati i razredima 0-6, detaljnije prikazanima u Tablici 2. Budući da laboratorijska praksa zahtijeva kontrole kvalitete u svakom ciklusu mjerenja, koristili smo kontrole dostavljene iz Phadie: ImmunoCAP Specific IgE Negative Control (10-9445-01), ImmunoCAP Specific IgE Control (10-9449-01) i ImmunoCAP Specific IgE f1 Control (10-9450-01).

Tablica 2. Podjela sIgE na 6 razreda sa pripadajućim koncentracijama.

Razred	Mogućnost otkrivanja	kU_a/L
0	nije moguće	<0,35
1	niska	0,35-0,70
2	srednja	0,71-3,50
3	visoka	3,51-17,50
4	jako visoka	17,60-50
5	jako visoka	51-100
6	jako visoka	>100

2.3. Kožni ubodni test (SPT) i klinička dijagnoza

Svim ispitanicima u prvoj skupini prije *in vitro* obrade učinjen je SPT komercijalno dostupnim standardiziranim ekstraktima alergena (Stallergens, Francuska). Svi alergeni korišteni u ispitivanjima karakteristični su za naše podneblje. Kapljice alergena (0,02 mL), zajedno sa pozitivnom i negativnom kontrolom stavljane su na volarnu stranu podlaktice, a potom standardiziranom lancetom injektirane su u kožu. Kao pozitivna kontrola korišten je histamin, a slana otopina je korištena kao negativna kontrola. Nakon 15 min očitavane su reakcije i mjereni su dijametri za sve alergene svim pacijentima. Samo reakcije dijametra ≥ 3 mm od negativne kontrole obilježene su kao pozitivne.

Podaci o SPT za drugu skupinu pacijenata preuzeti su iz osobnih kartona bolničke elektroničke baze podataka.

2.4. Statističke analize podataka

Rezultati mjerenja sIgE metodama UniCAP 100 i IMMULITE 2000 analizirani su s ciljem međusobne usporedbe metoda.

Kako bismo ukazali na razlike, korišten je Test predznaka i Linov koeficijent konkordancije. Spearmanovim koeficijentom rang korelacije procijenili smo povezanost rezultata sIgE i SPT

za prvu skupinu uzoraka. Za analizu druge skupine uzoraka, odnosno za usporedbu razine sIgE i pozitivnih kliničkih simptoma povezanih sa izlaganjem specifičnim alergenima, korištena je bimodalna logistička regresija.
Razina značajnosti testova je postavljena na $P<0,05$. Svi dobiveni podaci statistički su obrađeni računalnim programom STATISTICA ver. 12 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

2.4.1. Test predznaka (Sign test)

Test predznaka je neparametrijska metoda alternativna *t*-testu za zavisne uzorke, a izračunava se kada je vrijednost mjerenja 1 veća od vrijednosti mjerenja 2. Na osnovi binomne raspodjele računaju se z-vrijednost i p-vrijednost (Eterović i Kardum, 2010).

2.4.2. Linov koeficijent konkordancije

Linov koeficijent konkordancije je test kojim se općenito mjeri sličnost između neke nove metode i „zlatnog standarda“. Mi smo ga koristili za usporedbu metode IMMULITE 2000 i UniCAP 100. Rezultat testa može biti bilo koja vrijednost od -1 do 1, sa idealnim podudaranjem na 1.

2.4.3. Spearmanov koeficijent rang korelacije

Spearmanov koeficijent rang korelacije neparametrijski je ekvivalent Paersonovog koeficijenta linearne korelacije. Za razliku od Paersonovog, Spearmanov koeficijent ne izvodi računske operacije preko numeričkih vrijednosti zavisne i nezavisne varijable, već iz relativnih odnosa varijabli. Računamo ga u slijedećim slučajevima:

a. mali uzorak
b. varijable nemaju normalnu raspodjelu
c. želimo izračunati povezanost dvije varijable koje nisu linearne
d. nesimetričan raspored metričkih varijabli koje odskaču od svih

Sam postupak računanja odvija se u dvije faze. U prvoj fazi dijelimo u rangove stvarne numeričke vrijednosti zavisne i nezavisne varijable na način da idemo od najmanje prema najvećoj ili obrnuto, po principu: prvi rang-prvo mjesto, n-ti rang- n-to mjesto. U drugoj fazi pristupamo računanju korelacije rangova prema formuli za Spearmanov koeficijent rang korelacije.

Koeficijent se izračunava po formuli:

$$\rho = 1 - \frac{6 \times \Sigma d^2}{n \times (n^2 - 1)}$$

gdje je:

ρ- (ro) Spearmanov koeficijent

d- razlika između rangova x i y

n- broj parova rangova promjenjivih x i y

Spearmanov koeficijent rang korelacije može imati vrijednosti od -1 do 1. Manja razlika između rangova podrazumijeva približavanje krajnjim vrijednostima, tj. veći stupanj korelacije između promatranih pojava (Eterović i Kardum, 2010).

3. REZULTATI

Za izradu ovog diplomskog rada obrađivala sam dvije odvojene skupine uzoraka: izabranu skupinu uzoraka pacijenata čija je povijest bolesti ukazivala na IgE-posredovane reakcije na aeroalergene, otrove kukaca ili alergijske reakcije na hranu te skupinu nasumično odabranih uzoraka. Svi uzorci obrađeni su metodama IMMULITE 2000 i UniCAP 100, te su pacijenti prve skupine podvrgnuti i SPT-u. Podaci o SPT testiranjima za drugu skupinu preuzeti su iz povijesti bolesti pacijenata.

3.1. Analiza rezultata prve skupine pacijenata

Unutar prve skupine pacijenata (N=569) vrijednost svakog testiranog parametra pokazala je varijabilnost.

Vrijednosti izmjerene podudarnosti metoda IMMULITE 2000 i UniCAP 100 te Linov koeficijent konkordancije prilikom mjerenja sIgE za prvu skupinu pacijenata prikazani su u Tablici 3. Vrijednosti Linovog koeficijenta konkordancije podijeljene su u kategorije: 0-0,20 kao jako niska podudarnost, 0,21-0,40 kao niska podudarnost, 0,41-0,60 kao umjerena podudarost, 0,61-0,80 kao znatna podudarnost te 0,81-1 kao gotovo idealna podudarnost.

Tablica 3. Podudarnost rezultata mjerenja IMMULITE 2000 i UniCAP 100 za selektiranu skupinu pacijenata.

Testirani parametar	N	Stupanj podudarnosti	Linov koeficijent konkordancije (95% CI)
Ukupni IgE (uIgE)	121	gotovo idealno	0,976 (0,970-0,980)
AEROALERGENI			
Alternaria tenuis, m6	76	znatno	0,651 (0,548-0,735)
Breza, t3	75	znatno	0,610 (0,498-0,702)
Epitel mačke, e1	71	znatno	0,761 (0,668-0,831)
Ambrozija, w1	74	gotovo idealno	0,931 (0,893-0,956)
D. pteronyssinus d1	66	gotovo idealno	0,918 (0,872-0,948)
Rđobrada, g3	74	znatno	0,720 (0,638-0,786)
NUTRITIVNI ALERGENI			
Bjelanjak jajeta, f1	77	znatno	0,654 (0,559-0,731)
Mlijeko, f2	68	gotovo idealno	0,927 (0,889-0,952)
Kikiriki, f13	79	gotovo idealno	0,895 (0,845-0,930)
OTROV KUKACA			
Otrov pčele, i1	40	gotovo idealno	0,951 (0,910-0,974)
Otrov ose, i3	36	gotovo idealno	0,828 (0,711-0,900)
rApi m 1 - *Apis mellifera*	33	gotovo idealno	0,859 (0,747-0,923)
rVes v 5 - *Vespula vulgaris*	28	umjereno	0,431 (0,331-0,521)

Usporedba rezultata mjerenja IgE metodama IMMULITE 2000 i UniCAP 100 pokazala je gotovo idealnu podudarnost rezultata ukupnog IgE i sljedećih alergena: *D. pteronyssinus*, mlijeko, kikiriki, otrov pčele, otrov ose, *Apis mellifera* i ambrozije. Znatna podudarnost

metoda dokazana je za epitel mačke, bjelanjak jajeta, rđobradu i brezu, dok su mjerenja pokazala umjerenu podudarnost u slučaju *Vespula vulgaris*.

Bitno je spomenuti da su rezultati mjerenja metodom IMMULITE 2000 bili značajno viši od rezultata mjerenja metodom UniCAP 100 i to za uIgE (P<0,0001), *D. pteronyssinus* (P =0,0042), epitel mačke (P<0,0001), bjelanjak jajeta (P<0,0001), mlijeko (P<0,0001), rđobradu (P<0,0001), brezu (P<0,0001), ambroziju (P=0,0251) te za rekombinantne alergene *Apis mellifera* (P<0,0001) i *Vespula vulgaris* (P=0,0013).

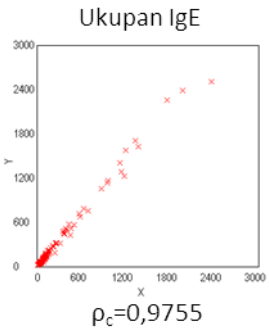
Usporedba rezultata mjerenja IgE metodama IMMULITE 2000 i UniCAP100 sa rezultatima SPT pokazala je statistički značajne korelacije za sljedeće alergene: *D. pteronyssinus*, epitel mačke, bjelanjak jajeta, mlijeko, kikiriki, rđobradu, *Alternaria tenius* i ambroziju (P<0,05, za sve). Generalno gledajući, korelacijski koeficijenti su nešto viši za metodu IMMULITE 2000, osim za mjerenja *Alternaria tenius*. Detaljan prikaz odnosa svih metoda (nije moguć za sve podatke) za prvu grupu pacijenata prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Usporedba rezultata dobivenih IMMULITE 2000 i UniCAP 100 metodama te korelacija sa SPT u selektirane skupine pacijenata.

		A) Usporedba metoda			B) Korelacija sa SPT	
Testirani parametar	**Metoda**	**Medijan (IQR)**	**Z**	***P* - vrijednost**	**Spearman R**	***P*- vrijednost**
Ukupni IgE	CAP	94,9 (37,7-231,0)	8	<0,0001	N/P	N/P
	IML	113,0 (42,7-277,0)			N/P	N/P
AEROALERGENI						
A. tenuis, m6	CAP	9,90 (2,68-18,80)	4,301	<0,0001	0,432	0,0014
	IML	6,82 (2,73-11,90)			0,322	0,0199
Breza, t3	CAP	7,96 (2,28-18,10)	5,929	<0,0001	0,203	0,1027
	IML	19,70 (3,90-54,80)			0,335	0,006
Epitel mačke, e1	CAP	4,53 (1,58-12,00)	7,464	<0,0001	0,249	0,0456
	IML	15,10 (5,12-32,50)			0,373	0,0022
Ambrozija, w1	CAP	10,16 (2,65-30,40)	2,239	0,0251	0,337	0,0038
	IML	12,60 (2,30-31,70)			0,39	0,0007
D. pteronyssinus, d1	CAP	12,20 (2,25-52,60)	2,864	0,0042	0,347	0,0047
	IML	17,2 (3,17-68,50)			0,357	0,0035
Rđobrada, g3	CAP	6,66 (1,89-19,10)	6,554	<0,0001	0,343	0,004
	IML	13,40 (3,55-46,90)			0,404	0,0006
NUTRITIVNI ALERGENI						
Bjelanjak jajeta, f1	CAP	1,94 (0,92-5,76)	7,685	<0,0001	0,496	<0,0001
	IML	5,36 (2,60-19,50)			0,508	<0,0001
Mlijeko, f2	CAP	1,44 (0,59-6,08)	4,308	<0,0001	0,626	<0,0001
	IML	0,55 (0,25-3,30)			0,759	<0,0001
Kikiriki, f13	CAP	3,98 (1,29-17,50)	0,574	0,5663	0,521	<0,0001
	IML	3,79 (0,54-21,20)			0,671	<0,0001
OTROV KUKACA						
Otrov pčele, i1	CAP	5,74 (1,63-21,25)	0,961	0,3367	N/P	N/P
	IML	5,01 (1,41-27,15)			N/P	N/P
Otrov ose, i3	CAP	1,24 (0,45-3,22)	1,014	0,3105	N/P	N/P
	IML	1,12 (0,16-5,85)			N/P	N/P
rApi m 1 - *Apis mellifera*	CAP	1,11 (0,23-6,47)	5,127	<0,0001	N/P	N/P
	IML	4,30 (0,62-18,00)			N/P	N/P

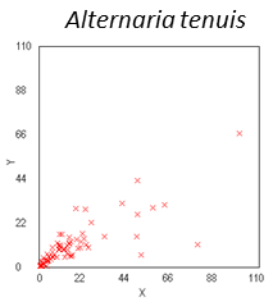
rVes v 5 - *Vespula vulgaris*	CAP	0,66 (0,09-2,87)	3,213	0,0013		N/P	N/P
	IML	1,61 (0,08-8,30)				N/P	N/P

*N/P- nema podataka

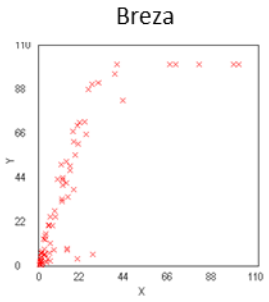


ρ_c=0,9755

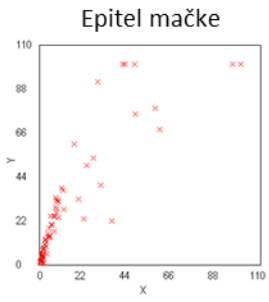
AEROALERGENI



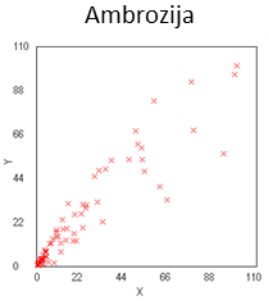
ρ_c=0,6510



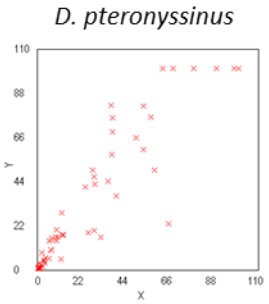
ρ_c=0,6098



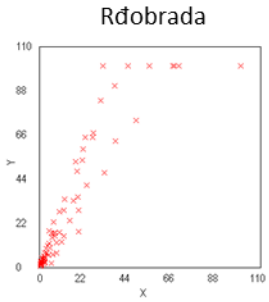
ρ_c=0,7610



ρ_c=0,9312

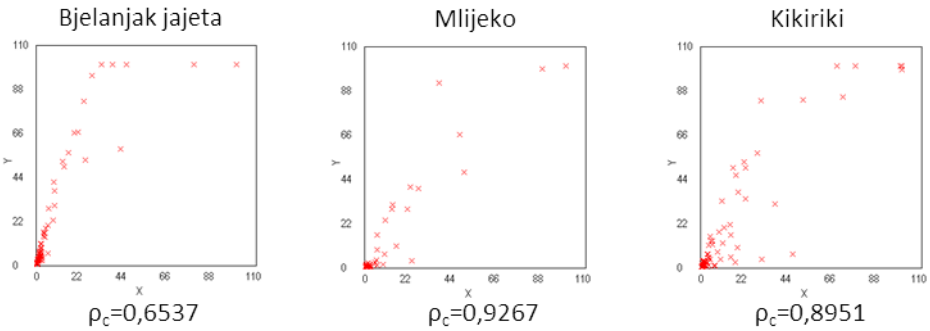


ρ_c=0,9177

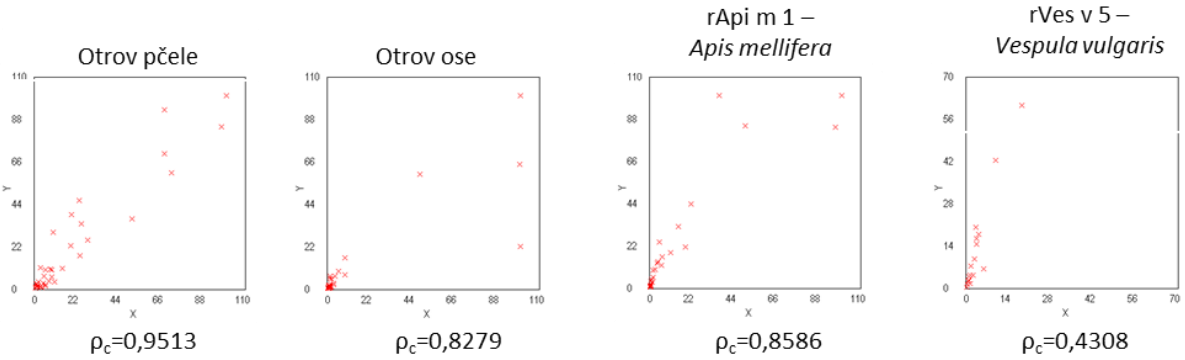


ρ_c=0,7200

NUTRITIVNI ALERGENI



OTROV KUKACA



Slika 5. Dijagrami usporedbe metoda IMMULITE 2000 i UniCAP 100 za prvu skupinu pacijenata (x-os:UniCAP 100;y-os:IMMULITE 2000).

3.2. Analiza rezultata druge skupine pacijenata

Druga skupina pacijenata sastojala se od 100 nasumično odabranih uzoraka seruma koje smo analizirali. Podatke o STP testiranjima preuzeli smo iz povijesti bolesti pacijenata.

Od 100 uzoraka seruma, 99 ih je imalo podatke o SPT-u, od čega ih je 45 bilo pozitivno na barem jedan od testiranih alergena (45,4%). Ukupno 36 pacijenata imalo je u obitelji slučaj atopije, a 49 pacijenata su i sami bili atopičari.

Usporedbom rezultata dobivenih mjerenjem IgE u serumu metodama IMMULITE 2000 i UniCAP 100 zamijećena je gotovo idealna podudarnost za sljedeće alergene: *D. pteronyssinus*, rđobradu , brezu i ambroziju. Znatnu podudarnost u rezultatima pokazali su epitel mačke, bjelanjak jajeta i kikiriki, dok je mlijeko jedino pokazalo nisku podudarnost.

Detaljan prikaz podudarnosti metoda i Linova konkordancijskog koeficijenta prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Usporedba podudarnosti metoda i Linov koeficijent konkordancije za drugu skupinu pacijenata (N=100).

Testirani alergen	N	Stupanj podudarnosti	Linov koeficijent konkordancije (95% CI)
AEROALERGENI			
Breza, t3	100	gotovo idealno	0,952 (0,931-0,966)
Epitel mačke, e1	100	umjereno	0,570 (0,539-0,599)
Ambrozija, w1	100	gotovo idealno	0,972 (0,962-0,980)
D. pteronyssinus, d1	100	gotovo idealno	0,964 (0,947-0,976)
Rđobrada, g3	100	gotovo idealno	0,894 (0,860-0,920)
NUTRITIVNI ALERGENI			
Bjelanjak jajeta, f1	100	umjereno	0,457 (0,399-0,512)
Mlijeko, f2	100	nisko	0,390 (0,325-0,450)
Kikiriki, f13	100	umjereno	0,475 (0,319-0,606)

Vrijednosti Linovog koeficijenta konkordancije podijeljene su u kategorije: 0-0,20 kao jako niska podudarnost, 0,21-0,40 kao niska podudarnost, 0,41-0,60 kao umjerena podudarnost, 0,61-0,80 kao znatna podudarnost i 0,81-1 kao gotovo idealna podudarnost.

Unutar skupine uočene su značajno više vrijednosti rezultata dobivenih metodom IMMULITE 2000 i to za epitel mačke (P<0,0001), bjelanjak jajeta (P<0,0001), kikiriki (P<0,0001), rđobradu (P<0,0001) i brezu (P<0,0001), dok su mlijeko i ambrozija podudarni i usporedivi.

Usporedba metoda te povezanost rezultata s kliničkim znakovima prikazana je u Tablici 6.

Tablica 6. Usporedba metoda i povezanost s kliničkim znakovima za drugu skupinu pacijenata (N=100).

		A) Usporedba metoda			B) Povezanost s kliničkim znakovima		
Alergen	**Metoda**	**Medijan (IQR)**	**Z**	***P* - vrijednost**	**OR**	**95% CI**	***P* - vrijednost**
AEROALERGENI							
Breza, t3	CAP	0,02 (0,01-0,12)	6,777	<0,0001	5,43	2,34 - 12,57	<0,0001
	IML	0,05 (0,05-0,05)			7,13	2,87 - 17,74	<0,0001
Epitel mačke, e1	CAP	0,01 (0,01-0,06)	8,471	<0,0001	5,3	1,42 - 19,76	0,01199
	IML	0,05 (0,05-0,05)			5,56	1,51 - 20,40	0,0089
Ambrozija, w1	CAP	0,05 (0,04-0,23)	1,333	0,1824	10,83	3,54 - 33,12	<0,0001
	IML	0,05 (0,05-0,05)			11,45	3,68 - 35,60	<0,0001
D. pteronyssinus, d1	CAP	0,06 (0,02-28,35)	4,954	<0,0001	21,37	4,51 - 101,40	0,0001
	IML	0,05 (0,05-41,80)			20,62	4,59 - 92,56	<0,0001
Rđobrada, g3	CAP	0,03 (0,01-0,89)	7,182	<0,0001	5,6	2,80 - 11,17	<0,0001
	IML	0,05 (0,05-1,62)			5,58	2,88 - 10,80	<0,0001
NUTRITIVNI ALERGENI							
Bjelajak jajeta, f1	CAP	0,03 (0,01-0,12)	8,182	<0,0001	417,22	2,36 – 73644	0,0206
	IML	0,05 (0,05-0,25)			1047,93	0,82 – 1333980	0,0536
Mlijeko, f2	CAP	0,05 (0,02-0,18)	0,203	0,8391	nema pozitivnih kliničkih znakova		
	IML	0,05 (0,05-0,05)					
Kikiriki, f13	CAP	0,03 (0,02-0,11)	4,014	<0,0001	4,22	0,90 - 19,82	0,0643
	IML	0,05 (0,05-0,05)			12,79	1,64 - 99,61	0,0137

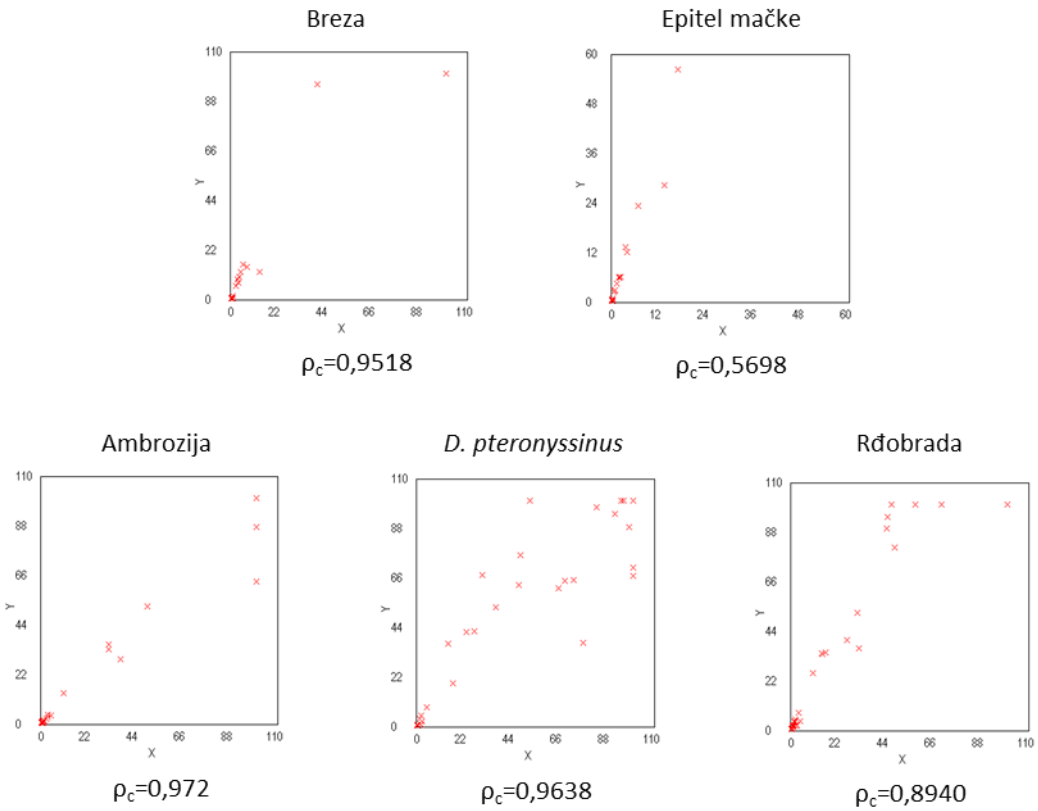
*CAP-ImmunoCAP

*IML-IMMULITE

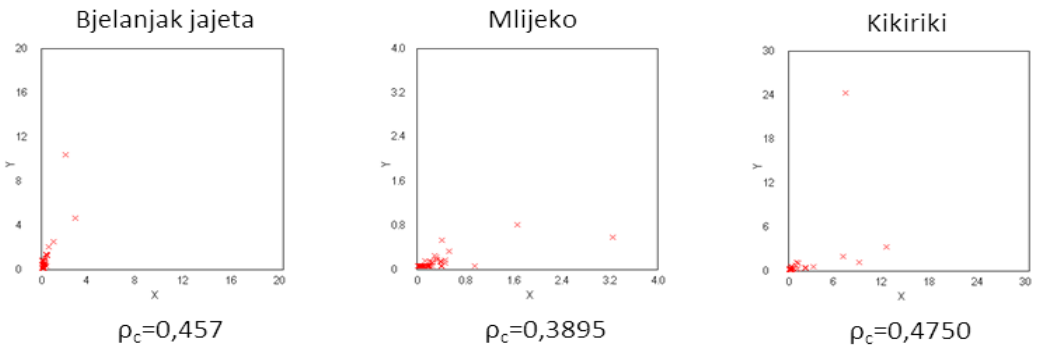
*OR-omjer

*95% CI-95% interval pouzdanosti

AEROALERGENI



NUTRITIVNI ALERGENI



Slika 6. Dijagrami usporedbe rezultata mjerenja metodama IMMULITE 2000 i UniCAP 100 za neselektiranu skupinu (N=100).

4. RASPRAVA

Alergijske bolesti su bolesti dugotrajna tijeka, još uvijek nedovoljno razjašnjene patogeneze. Prirodni tijek njihova razvoja uključuje senzibilizaciju, pojavnost simptoma u određenom razdoblju života te postojanost sa tendencijom remisije sa starenjem. Budući da alergije sigurnim korakom postaju najveći globalni zdravstveni problem, konstantan razvoj dijagnostičkih testova koji su zaslužni za njihovo rano otkrivanje, dijagnosticiranje, a potom i liječenje, logičan je korak svih suvremenih istraživanja (Kanceljak-Macan, 2004).

Ključni dio dijagnosticiranja alergijskih bolesti je okrivanje alergena koji su odgovorni za izazivanje alergijske reakcije. Danas se sve više radi ne samo na otkrivanju alergena s kojima je pacijent već došao u dodir, već i na uklanjanju alergena iz životnog okoliša senzibilizirane osobe. U svrhu identifikacije alergena danas se upotrebljavaju dvije osnovne skupine testova: *in vivo* i *in vitro* testovi. Obje skupine imaju svoje prednosti i nedostatke.

Iako široko prihvaćena i najpouzdanija metoda za okrivanje senzitizacije određenim alergenom *in vivo*, SPT može dati korisne podatke samo za okrivanje i status bolesti. Rezultati testiranja ovise o spretnosti liječnika ili osoblja koji provodi SPT, liječenje antihistaminicima mora biti prekinuto, a očitavanje rezultata nije jednoznačno: pozitivnim rezultatom smatra se reakcija dijametra 3 ili više mm od negativne kontrole. Ipak, u odnosu na *in vitro* testove, SPT je osjetljivija metoda.

In vitro testovi odlikuju se objektivnim kvantitativnim rezultatima neovisno o korištenju lijekova, ukupno su manje invazivni (jedno vađenje krvi za više alergena) i višim stupnjem specifičnosti. Unutar skupine *in vitro* testova razvijen je niz različitih metoda, sve zasnovane na principu laboratorijskog mjerenja razine IgE ispitivanog krvnog seruma u dodiru sa serijom alergena (Liang i sur., 2006). „Zlatnim standardom“ *in vitro* testova smatra se ImmunoCAP, a u posljednje vrijeme ga sustiže nova metoda, IMMULITE.

Upravo mjerenja IgE temelj su nastanka ovog istraživanja: Uspoređivali smo rezultate mjerenja sIgE dvjema različitim *in vitro* metodama: UniCAP 100 i IMMULITE 2000. Obje metode koriste kalibracijski standard 75/502 koji je odobren od strane WHO. Metodologije UniCAP i IMMULITE se prilično razlikuju, a jedna od najvećih razlika je u alergenskim pripravcima koji se koriste pri testiranjima. Metode smo usporedili na temelju mjerenja razina IgE u dvije skupine pacijenata; izabranih uzoraka pacijenata čija je povijest bolesti ukazivala

na IgE-posredovane reakcije na aeroalergene, otrove kukaca ili alergijske reakcije na hranu i/ili nasumično uzetih uzoraka pacijenata koje smo u konačnici povezali s rezultatima SPT-a.

Unatoč već spomenutim metodologijskim razlikama te upotrebi različitih alergenskih pripravaka, dokazali smo znatan do gotovo idealan stupanj korelacije i podudarnosti između metoda IMMULITE i UniCAP. Uočena neslaganja usporedbom rezultata različitih metoda za određene alergene opravdana su upotrebom različitih alergena i alergenskih pripravaka korištenih tijekom istraživanja, a preporučenih od strane proizvođača.

Istraživanje je pokazalo jako dobru podudarnost rezultata dobivenih metodom IMMULITE 2000 i metodom UniCAP 100, koja se trenutno smatra „zlatnim standardom" mjerenja sIgE. Usprkos statistički neznatnim razlikama, zamijetili smo veću podudarnost rezultata dobivenih mjerenjem IMMULITE 2000 i SPT metodama, u usporedbi s UniCAP metodom. U istraživanju Ollerta i sur. (2005) te Goikoetxea i sur. (2013) nalazimo rezultate koji se u konačnim zaključcima u potpunosti podudaraju s našima.

Nadalje, IMMULITE 2000 u usporedbi s UniCAP 100 pokazao je tendenciju prikazivanja viših koncentracija sIgE za nekoliko alergena. Ollert i sur. (2005) zaključili su da je takav rezultat opravdan samom činjenicom da IMMULITE 2000 ima širi raspon mogućnosti otkrivanja alergena u odnosu na UniCAP 100: 0,1-100 kU/L IML u odnosu na 0,35-100 kU/L CAP. Obrnuta situacija, u kojoj je IMMULITE pokazao niže koncentracije od UniCAP metode, opravdava se tehničkim razlikama između metoda i/ili korištenjem različitih alergenskih pripravaka pri testiranjima. Szecsi i Stender (2013) uočili su da ImmunoCAP mjeri uIgE i sIgE jednako, dok IMMULITE pokazuje više vrijednosti sIgE u odnosu na uIgE za kimerna antitijela, što se još treba dodatno istražiti.

O problematici korištenja različitih alergenskih pripravaka pisali su Wang i sur. (2008). Primjer je upotreba različitih peluda breze: IMMULITE upotrebljava pelud *Betula verrucosa,* za razliku od ImmunoCAP-a koji koristi pelud *Betula nigra*. Sve su to gotovo neznatne razlike jer obje vrste imaju gotovo potpuno podudarnu geografsku distribuciju, međutim, u konačnici rezultiraju manjim stupnjem podudarnosti metoda. Goikoetxea i sur. (2013) podržali su teoriju Wanga i sur. (2008), te su zaključili da čak i ista vrsta alergena može pokazati razliku zbog tehničkih nepodudarnosti metoda. Obje skupine slažu se da bi mjerenja različitim metodama trebala biti napravljena upotrebom istih alergena ili alergenskih pripravaka. Takva istraživanja su nužna kako bi se objektivno sagledala kvaliteta svakog uspoređivanog testa.

Ako pogledamo sve karakteristike uspoređivanih metoda, u konačnici možemo reći da je IMMULITE 2000 prevladao nedostatke UniCAP 100 metode korištenjem alergena u tekućoj fazi, upotrebom nultog kalibratora, detekcijskim limitom od samo 0,1 kU/L, višim stupnjem automacije i kraćim vremenom potrebnim za dobivanje prvih rezultata.

Budući da je cilj ovog istraživanja bio procjena i usporedba metode IMMULITE 2000 sa metodom ImmunoCAP te korelacija s rezultatima SPT, a ne otkrivanje konkretnih uzroka različitosti rezultata, na kraju možemo donijeti nepotpune zaključke. Otkrivanje uzroka različitosti rezultata je područje koje je ostalo kao otvoren prostor za napredak i buduća istraživanja.

Trenutno nema nikakvih naznaka da će se potrebe za sIgE testiranjima smanjiti u narednim godinama, zapravo predviđanja su suprotna. Pouzdani, specifični i ponovljivi *in vitro* testovi vjerojatno će postati prvi dijagnostički izbor kada se radi o alergijskim bolestima. S porastom osviještenosti društva i liječnika primarne zdravstvene zaštite te shvaćanjem alergijskih bolesti kao ozbiljnog zdravstvenog problema, čini se da je zlatno doba *in vitro* testiranja ispred nas.

5. ZAKLJUČAK

1. Laboratorijska dijagnostika specifičnih IgE-a u uzorcima seruma može se uspješno i pouzdano obaviti novom metodom IMMULITE 2000.
2. Dobiveni rezultati usporedivi su sa rezultatima široko primjenjivane metode ImmunoCAP.
3. Ipak, ove dvije metode se donekle razlikuju stoga je nemoguća potpuna podudarnost rezultata.
4. Metoda IMMULITE 2000 pokazala je veće slaganje s rezultatima SPT u odnosu na metodu ImmunoCAP.
5. Metode nisu međusobno zamjenjive i treba imati na umu da niti jedna od ovih *in vitro*, a niti *in vivo* metoda za otkrivanje alergijskih bolesti nije idealna te dobivene rezultate treba interpretirati u kontekstu kliničke slike svakog pacijenta.

6. LITERATURA

1. Andreis, I., Batinić, D., Čulo, F., Grčević, D., Marušić, M., Tardi, M., Višnjić, D. 2004. Imunološke preosjetljivosti. U: Andreis I., Imunologija. Medicinska naklada-Zagreb, Zagreb, str. 277-289.
2. Bulat-Kardum LJ. 2013. Alergija-moderna epidemija. Medicus 22, 79-82.
3. Cobbaert C.M., Jonker G.J. 2005. Allergy testing on the IMMULITE 2000 random-access immunoanalyzer-a clinical evaluation study. Clin Chem Lab Med 43, 772-781.
4. Durham S.R., Church M.K. 2001. Principles of allergy diagnosis. U: Holgate S.T., Church M.K., Lichenstein L.M., Allergy. Mosby International Ltd., London, str. 3-16.
5. Eterović D., Kardum G. 2010. Biostatistika za studente medicine (skripta). 5.izd. Split: Medicinski fakultet Split.
6. Galli S., Tsai M., Piliponsky A. 2008. The development of allergic inflammation. Nature 54, 445-454.
7. Goikoetxea MJ., Sanz ML., García BE., Mayorga C., Longo N., Gamboa PM., and the members of the Immunology Commitee of SEIAC. 2013. Recommendations for the use of in vitro methods to detect specific immunoglobulin E: Are they comparable?. J Investig Allergol Clin Immunol 23, 448-454.
8. Gunnar S., Johansson O. 2004. ImmunoCAP specific immunoglobulin E test: tool for research and allergy diagnosis. Expert Rev. Mol. Diagn. 4, 89-95.
9. Hamilton R.G. 2010. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersenzitivity. J Allergy Clin Immunol 125(2 Suppl2), S284-296.
10. Hamilton R., Mudd K., Anderson White M., Wood R. 2011. Extension of food allergen specific IgE ranges from the ImmunoCAP to the IMMULITE systems. Ann Allergy Asthma Immunol 107, 139-144.
11. Hamilton R.G., Williams P.B. 2010. Human IgE antibody serology: a primer for the practicing North American allergist/immunologist. J Allergy Clin Immunol 126 (1), 33-38.
12. Høst A., Andrae S., Charkin S., Diaz-Vasquez C., Dreborg S., Eigenmann P.A., Friedrichs F., Grinstged P., Lack G., Meylan G., Miglioranzi P., Muraro A., Nieto A.,Niggemann B., Pascual C., Pouech M.G., Rance F., Rietschel E., Wickman M. 2003. Allergy testing in children: why, who, when and how? Allergy 58, 1-11.

13. Kanceljak-Macan B. 2004. Suvremeni pogledi na alergijske bolesti. Arh Hig Rada Toksikol 55, 123-134.

14. Lee Y., Sohn J., Lee J., Hong C., Park J. 2009. Allergen-specific IgE measurement with the IMMULITE 2000 system: Intermethod comparison of detection performance for allergen-specific IgE antibodies from Korean allergic patients. Clinica Chimica Acta 401, 25-32.

15. Li T., Chuang T., Tse S., Hovanec-Burns D., El Shami A. 2004. Development and validation of a third generation allergen-specific IgE assay on the continuous random access IMMULITE 2000 analyzer. Annals of Clinical & Laboratory Science 34, 67-74.

16. Liang K., Su M., Jiang R. 2006. Comparison of the skin test and ImmunoCAP system in the evaluation of mold allergy. J Chin Med Assoc 69, 3-6.

17. Liappis N., Starke A., Lanotto O., Ryden B. 1999. Investigation of Pharmacia UniCAP 100 for *in vitro* allergy diagnosis. Clin. Lab. 45, 229-235.

18. Mehulić M. 2008. Učestalost senzibilizacije na pelude u odrasle populacije s atopijom u Zagrebu i okolici. Doktorska disertacija, Zagreb: Medicinski fakultet u Zagrebu.

19. Milavec-Puretić V., Lipozenčić J. 2007. Alergološka dijagnostika u Klinici za kožne i spolne bolesti KBC-a Zagreb. Medix 71, 144-148.

20. Ollert M., Weissenbacher S., Rakoski J., Ring J. 2005. Allergen-specific IgE measured by a continuous random-access iunoanalyzer: interassay comparison and agreement with skin testing. Clinical Chemistry 51, 1241-1249.

21. Phadia 2012. (Internet) Dostupno na: http://www.phadia.com/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Lab-Tests/ (pristupljeno 17. siječnja 2016.).

22. Plavec D., Turkalj M., Erceg D. 2011. Procjena alergijskog statusa u bolesnika s alergijskim bolestima dišnog sustava. Medicus 20, 151-156.

23. Plebani M., Bernardi D., Basso D., Borghesan F., Faggian D. 1998. Measurement of specific immunoglobulin E: intermethod comparison and standardization. Clinical Chemistry 44, 1974-1979.

24. Ring J. 2006. Atopy:Condition, Disease, or Syndrome? (Internet) Dostupno na: http://eknygos.lsmuni.lt/springer/182/3-9.pdf (pristupljeno 12. siječnja 2016.).

25. Sabioncello A., Gagro A. n.d. Mehanizmi nastanka alergijskih reakcija. (Internet) Dostupno na: http://paperzz.com/doc/5162324/mehanizmi-nastanka-alergijskih-reakcija (pristupljeno 22. siječnja 2016.).

26. Sense about science 2015. Making sense about allergies. (Internet) Dostupno na: www.senseaboutscience.org/data/file/resources/189/Making-Sense-Of-Alleries.pdf (pristupljeno 20. siječnja 2016.).

27. Stipić-Marković A., Ivković-Jureković I., Dodig S., Batišta I., Zrinski-Topić R., Barberić M., Topalušić I., Bukovec-Megla Ž., Žižić V. 2015. Hrvatske smjernice za in vitro dijagnostiku preosjetljivosti posredovane IgE protutijelima. Acta Med Croatica 69, 75-96.

28. Szeinbach S.L., Barnes J.H., Sullivan T.J., Williams P.B. 2001. Precision and accuracy of commercial laboratories' ability to classify positive and/or negative allergen-specific IgE results. Ann. Allergy Asthma Immunol. 86, 373-381.

29. Szecsi P.B., Stender S. 2013. 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 162, 131-134.

30. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. 1993. Position paper:Allergen standardization and skin tests. Allergy 48 supl 14, 48-82.

31. Van der Zee J.S., De Groot H., Van Swieten P. i sur. 1988. Discrepancies between the skin test and IgE antibody assays:study of histamine release, complement activation *in vitro*, and occurrence of allergen-specific IgG. J. Allergy Clin. Immunol. 82, 270-281.

32. Wang J., Godbold J.H., Sampson H.A. 2008. Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems. J. Allergy Clin. Immunol. 121, 1219-1224.

33. Williams P.B., Barnes J.H., Szeinbach S.L., Sullivan T.J. 2000. Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE:Establishing a standard. J. Allergy Clin Immunol 105. 1221-1230.

34. Wood R.A., Phipatanakul W., Hamilton R.G., Eggleston P.A. 1999. A comparison of skin prick tests, intradermal skin tests, and RASTs in the diagnosis of cat allergy. J. Allergy Clin Immunol 103, 773-779.

35. Wright R.J., Scott T.W. 2001. Epidemiology of Allergic Disease. U: Holgate S.T., Church M.K., Lichenstein L.M. Allergy. Mosby International Ltd., London, str. 203-212.

7. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije

Ime i prezime: Anela Knezović

Datum rođenja: 19. prosinca 1991.

Adresa: Postranje, Put brane 14, 21 264 Proložac Donji

e-mail: anela1912@gmail.com

Kontakt broj: 095 520 8858

Telefon: 021/ 846 781

Obrazovanje

2013.-2016.	Sveučilište u Zagrebu
	Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek
	Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija
2010.-2013.	Sveučilište u Splitu
	Sveučilišni odjel za studije mora
	Preddiplomski studij Biologije i ekologije mora
2006.-2010.	Gimnazija u Imotskom
	Jezična gimnazija dr. Mate Ujevića

Radno iskustvo

2013.-2015.	Zara Hrvatska

-kao student radila sam u modnoj industriji, bila sam zadužena za dostave i za svakodnevnu kontrolu robe u dućanima

-posao je zahtjevao fleksibilnost, svakodnevno učenje, brzo savladavanje novih problema, točnost i odgovornost

Iskustvo u struci

2015. Dječja bolnica Srebrnjak

-obradila sam nekoliko uzoraka FISH tehnikom i savladala metodu, kao i ELISU-određivanje podrazreda imunoglobulina G na 40 uzoraka

2014. Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“

-radila sam praksu u trajanju od mjesec dana (Odjel za imunološku i molekularnu dijagnostiku)

-obrađivala sam pristigle uzorke krvi: izolacija DNA, obrada uzoraka protočnom citometrijom

2013. -stručna praksa u sklopu fakulteta: Veterinarski institut i Klinički bolnički centar „Sestre milosrdnice“

Osobne vještine

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici: engleski

Komunikacijske vještine

-dobro razvijena intrapersonalna komunikacija kao rezultat preispitivanja vlastitih odluka i svakodnevnih pojavnosti, kao i interpersonalna komunikacija razvijena raznim diskusijama s kolegama i poznanicima

Digitalna kompetencija

-koristim Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi

-služim se Internetom (e-mail, google+, društvene mreže)

Dodatno

-vozačka dozvola B kategorije