

Ocena testu cytotoksyczności i testu ALCAT w rozpoznawaniu alergii i ustalaniu wskazań do leczenia za pomocą diet eliminacyjnych

Opracowano na podstawie raportu Komisji d/s Weryfikacji Niekonwencjonalnych Metod Diagnostycznych i Leczniczych ZG Polskiego Towarzystwa Alergologicznego

Opracował: dr hab. med. MICHAŁ KUREK

Wprowadzenie

Pojęcie „alergia” pojawiło się po raz pierwszy w artykule, opublikowanym w czerwcu 1906 roku, przez wiedeńskiego pediatrę Clemensa von Pirqueta. Warto przy tej okazji przypomnieć, że do 1906 roku wszystkie przejawy nadwrażliwości, która wynikała ze zmienionego sposobu reagowania organizmu i prowadziła do zaburzeń chorobowych, określano jako przejaw zjawiska idiosynkrazji. W rozumieniu von Pirqueta alergia, podobnie jak idiosynkrazja, oznaczały zmieniony sposób reagowania organizmu („allos ergein”) i prowadzącą do objawów chorobowych nadwrażliwość. Cechą szczególną alergii, okazał się jej nabyty charakter i bezpośredni związek zmienionego sposobu reagowania z mechanizmami odporności swoistej [1]. Pojęcie alergii pozwalało opisać niedostrzegany dotychczas związek między zaburzeniami chorobowymi, uwarunkowanymi przez mechanizmy odporności swoistej. Było to szczególnie istotne w czasach, w których zjawisko odporności rozumiano powszechnie jako mechanizm służący wyłącznie zdrowiu. Następne lata przyniosły pojęcie atopii i opisaną przez Praustnitza i Kuestnera możliwość biernego przenoszenia alergii przy pomocy surowicy. W 1963 roku, Gell i Coombs dokonali klasyfikacji reakcji immunopatologicznych na 4 typy reakcji i opisali towarzyszące im typowe zespoły objawów klinicznych. Odkrycie w 1967 roku IgE, będącej nośnikiem alergii typu natychmiastowego, zaowocowało pojawieniem się technik oznaczania w surowicy przeciwciał tej klasy. Metody te rozwijane są do dzisiaj i stanowią podstawę diagnostyki laboratoryjnej, najczęściej rozpoznawanych alergicznych reakcji natychmiastowych i schorzeń z kręgu atopii. Mimo, że definicja i zasady rozpoznawania zostały jednoznacznie określone, problem alergii pozostaje do

dzisiaj źródłem kontrowersji i nieporozumień. Wynikają one, między innymi, z obiektywnych trudności związanych z różnicowaniem alergii z reakcjami z kręgu idiosynkrazji i innymi przejawami szeroko rozumianej nietolerancji. Spektakularnym przykładem idiosynkrazji, której objawy „naśladują” symptomatologię alergii typu I, jest zespół astmy poaspirynowej opisany przez Hirschberga już w 1902 roku. W 1918 roku, von Behring zwrócił uwagę na „reakcje anafilaktoidalne”, które nie różniąc się zasadniczo od objawów anafilaksji, pojawiały się już po pierwszym podaniu obcego białka. W latach 80. zwrócono uwagę na nierozwiązany problem nazewnictwa niepożądanych odczynów polekowych i pokarmowych, których objawy nie różnią się zasadniczo od symptomatologii wszystkich typów reakcji immunoalergicznyc Gella i Coombsa. Reakcje tego typu określane są mianem pseudoalergicznyc (pseudoallergic reactions - PAR) [2]. Przyczyną nieporozumień jest stosowanie metod laboratoryjnych, które są bezwartościowe lub których przydatność diagnostyczna nie została określona. W okresie minionych dziesięcioleci pojawiało się wiele metod rozpoznawania alergii. Niektóre spośród nich, jak np. metoda biernej skórnej anafilaksji, znalazły zastosowanie w medycynie doświadczalnej. Inne, mimo pokładanych w nich nadziei, traciły znaczenie nie wykazując czułości i swoistości odpowiadających obowiązującym standardom. Do metod uznanych za nieprzydatne w latach 70., należy test cytotoksyczności („cytotoxic test”), propagowany w Stanach Zjednoczonych od końca lat 50. W latach 90. pojawiła się w Polsce jego techniczna modyfikacja - test ALCAT („Antigen Leukocyte Cellular Antibody Test”). Mimo, że ALCAT nie uzyskał aprobaty Amerykańskiej i Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej oraz Zarządu Głównego Polskiego

Towarzystwa Alergologicznego, jest on rozpowszechniany w Polsce jako uniwersalna metoda rozpoznawania alergii na pokarmy i inne czynniki środowiska. Analiza przyczyn popularności ALCAT-testu wśród pacjentów i sposobów jego propagowania przez niektórych lekarzy w okresie po ukazaniu się Raportu ZG PTA, wykracza poza ramy tego opracowania. Nie sposób przy tej okazji nie zauważyć, że lekarze będący zwolennikami tej metody, głoszą niejednokrotnie koncepcje patogenetyczne, bliskie doktrynie „Ekologii Klinicznej”. Ten modny w Stanach Zjednoczonych kierunek, oparty jest na pojmowaniu zjawiska alergii, w sposób odbiegający od ogólnie przyjętej definicji. Wynikające z tego koncepcje patogenetyczne są sprzeczne z wiedzą medyczną. Ich przenikanie do środowiska lekarskiego i świadomości pacjentów, należy uznać za zjawiska niepokojące, podobnie jak obciążanie pacjentów kosztami rozpoznawania alergii przy pomocy testu ALCAT [3].

Test cytotoxyczności i testALCAT. Historia metody i jej autorzy

Zasada testów cytotoxyczności i ALCAT oparta jest na założeniu, że dodanie „alergenu” do zawiesiny leukocytów osób wrażliwych, prowadzi do zaburzeń czynnościowych, zmiany kształtu i dezintegracji tych komórek. Opisywane przy tym zmiany jak: utrata zdolności tworzenia pseudopodiów, pojawianie się form owalnych i leukocytoliza, traktowane są jako dowód „uczulenia” na badaną substancję i rozpoznanie jej przyczynowej roli w wyzwalaniu objawów chorobowych. Autorem testu jest A.P. Black, który w latach 50. opisał zjawisko hamowania ruchliwości neutrofilów, zmiany strukturalne w cytoplazmie i ograniczenie ich żywotności, pod wpływem uczulających pyłków roślin, u osób z pyłkownicą [4]. W latach 60., małżeństwo W.T.K. Bryan & M.P. Bryan zmodyfikowało część metody i test zaczął być rozpowszechniany w USA, a następnie w Finlandii i na terenie Niemiec [5]. ALCAT zaprezentowany został po raz pierwszy pod koniec lat 80. w Stanach Zjednoczonych. System ALCAT jest udoskonalonym technicznie testem cytotoxyczności. Rozpoznawanie „alergii” polega na ocenie zmiany liczby i wielkości komórek, stymulowanych badaną substancją. Wyniki są oceniane w oparciu o wskazania sprzężonych z komputerem licznika i analizatora wielkości komórek. Test propagowany jest jako metoda rozpoznawania czynników wyzwalających objawy „alergii”, „pseudoalergii” i zespoły chorobowe wynikające z koncepcji patogenetycznych zwolenników doktryny „Ekologii Klinicznej”. Od początku lat 90-tych, system ALCAT oferowany jest w Polsce przez ISO-Lab Medical Technology ALCAT Technology Systems, a jego

rozpowszechnianiu służy monografia „Test ALCAT. Odpowiedź komórkowa na obce substancje: żywność, pleśnie, uszlachetniacze żywności, środowisko chemiczne, barwniki, farmakoaktywne składniki żywności, antybiotyki, NSAID”. Autorem jest M.J.Pasula. Integralną część monografii stanowi suplement „Propozycja zastosowania ALCAT Testu w codziennej praktyce alergologa” autorstwa dr med. D.Mylek [6].

Podstawy teoretyczne i opis procedury według twórców metody

Idea testu nawiązuje do opisanego w 1947 roku, przez T.L.Squier i H.J.Lee, zjawiska niszczenia przez alergeny pyłkowe leukocytów osób z pyłkownicą [7]. Istnienie takiego zjawiska nie budzi wątpliwości i zostało ono potwierdzone przez innych autorów. Opisano także cytotoxyczny wpływ uczulających alergenów na inne komórki krwi [5]. Z badań E. Holopainen i wsp. wynika, że u 72% spośród 75 badanych, efekt cytotoxyczny można było przenieść w sposób bierny, zawieszając leukocyty pacjenta „nie reagującego” w surowicy osoby „reagującej” na badany czynnik. Ogrzanie surowicy do temperatury 56°C ograniczało odsetek dodatnich wyników do 40%. Reakcję można było zablokować dodając do surowicy EDTA, preparat antyhistaminowy, kromoglikan dwusodowy i glukokortykosteroid odpowiednio u: 100%, 93% 45% i 19 - 52%. Potwierdza to istnienie efektu uszkodzenia leukocytów przez badane substancje i wskazuje na udział wielu czynników, w tym cytokin, ale nie wyjaśnia istoty mechanizmu ich uszkodzenia [8]. Zdaniem innych badaczy, niektóre spośród obserwowanych reakcji cytotoxycznych, mogą wynikać z oczywistych właściwości farmakologicznych lub toksycznych badanych substancji, przy czym ocenę zależności między bodźcem a reakcją utrudniają nierozwiązane problemy metodyczne testu. Należą do nich: niekontrolowane zmiany pH, stosowanie wody destylowanej w celu osiągnięcia lizy erytrocytów oraz wspomniane powyżej, stosowanie substancji o nieokreślonych jednoznacznie właściwościach farmakologicznych, toksycznych i mikrobiologicznych. Oznacza to, że właściwości środowiska, w którym zawieszono są badane leukocyty i jego zmiany, związane z wprowadzaniem obcych substancji, są nieporównywalne nawet u tego samego pacjenta [9]. Powyższe zastrzeżenia dotyczą testu cytotoxyczności i mimo wprowadzenia usprawnień technicznych, także testu ALCAT. Autorzy testu cytotoxyczności zalecają jego wykonywanie z użyciem silikonowanych szkiełek podstawowych i nakrywkowych, na których umieszczana jest zawiesina badanych komórek, w pierścieniach wazelinowych. Zawiesinę leukocytów uzyskuje się z 10 ml krwi żyłnej, pobieranej od pacjenta

pozostającego na czczo przez okres 12 godzin. Po umieszczeniu krwi w specjalnym naczyniu, dodaniu 0.8 ml mieszaniny cytrynianów sodu i potasu z dodatkiem dekstrozy, a następnie odwirowaniu zawiesiny, z komórek osadu pozyskuje się leukocyty. Kolejnym etapem jest ich umieszczenie wewnątrz pierścieni wazelinowych na szkiełkach podstawowych. Twórcy metody zalecają stosowanie dostępnych na rynku diagnostycznych wyciągów alergenów lub też sporządzanie wyciągów badanych substancji we własnym zakresie. Technika ich przygotowywania polega na uzupełnieniu masy 8 mg suchej substancji 1 ml niepirogennej wody destylowanej, wymieszaniu i po upływie 24 godzin, pozyskaniu cieczy sklarowanej nad osadem. Reakcja oceniana jest przy użyciu mikroskopu i polega na porównaniu komórek, poddanych działaniu badanej substancji z próbą kontrolną. Ocenie efektu cytotoxyczności służy system punktowy, w którym 1 punkt odpowiada ograniczeniu ruchliwości komórek, a 4 - pojawieniu się form owalnych i cech leukocytolizy [5]. W przypadku stosowania testu ALCAT, krew pobierana jest do próbki z dodatkiem 3.8% cytrynianu sodu, rozcieńczana roztworem izotonicznym i umieszczana w odpowiednich naczyniach. Próby kontrolne uzupełniane są neutralnym roztworem buforującym i podobnie jak próby poddane stymulacji (inkubowane z dyskami wysyconymi testowanymi substancjami), poddawane są procesowi mieszania. Po dokonaniu lizy erytrocytów, zawartość próby jest aspirowana przez pompę i przeprowadzana przez czytnik ilości i objętości przepływających komórek. System jest sprzężony z komputerem, który dokonuje automatycznie pomiarów liczby i objętości, analizując równocześnie zależności między objętością (krzywa X) i liczbą (krzywa Y) przepływających komórek. Przedmiotem interpretacji są procentowe przesunięcia uzyskanych histogramów leukocytów poddawanych stymulacji, w odniesieniu do prób kontrolnych. Uzyskanie różnicy przekraczającej wartość 9%, traktowane jest jako dodatni wynik próby. Proponowany przez producenta zestaw substancji testowych dla systemu ALCAT, obejmuje: 120 pokarmów, 10 rodzajów grzybów pleśniowych, 10 niesterydowych leków przeciwzapalnych, 10 antybiotyków, 20 innych substancji farmakologicznie czynnych, 20 syntetycznych dodatków stosowanych przez przemysł spożywczy oraz 10 substancji chemicznych zanieczyszczających środowisko [6].

Ocena wartości diagnostycznej testu cytotoxycznego

Pod koniec lat 50-tych, test cytotoxyczny propagowano w Stanach Zjednoczonych jako metodę służącą rozpoznawaniu alergenów wziewnych i pokarmowych,

które wywołują objawy chorobowe. Publikacje tego okresu zawierają entuzjastyczne informacje o 99% zgodności testu z wynikami prób prowokacji i 95% skuteczności terapeutycznej diet eliminacyjnych opartych o jego wskazania [5,8]. W 1987 roku, D.L.J.Freed opublikował wyniki badań, mających na celu ocenę powtarzalności testu i jego przydatności diagnostycznej. Powtarzalność wyników testu, uzyskiwanych w odstępach kilkudniowych, u tych samych pacjentów, była porównywalna z powtarzalnością większości powszechnie stosowanych testów immunologicznych. Jednak badania porównawcze wykonane w grupach osób z objawami alergii na pyłki i kurz domowy oraz osób uczulonych, lecz nie wykazujących objawów alergii na badane alergeny, wykazały brak wartości diagnostycznej tej metody.

Tabela 1. Wynik testu cytotoxycznego u pacjentów uczulonych na pyłki traw i roztocza kurzu domowego.

Grupa A: uczuleni i reagujący objawami alergii na badany alergen,

Grupa B: uczulenie i niereagujący objawami alergii na badany alergen.

Wynik analizy statystycznej przy użyciu testu Chi² (1.99). Oznacza to, że mimo uzyskania 60% trafnych wyników wskazań testu, uzyskane wyniki mogą być dziełem przypadku [9].

Ekspozycja na alergen a objawy alergii	wynik testu dodatni	wynik testu ujemny	suma
Grupa A - wrażliwi	20	19	39
Grupa B - niewrażliwi	19	36	55
suma	39	55	94

Warto przy tej okazji podkreślić, że już w 1981 roku Amerykańska Akademia Alergii negatywnie oceniła wartość diagnostyczną testu [9]. Mimo to, test cytotoxyczności znalazł się w centrum zainteresowania zwolenników „Ekologii Klinicznej”, którzy stosują go w rozpoznawaniu kontrowersyjnie interpretowanej „alergii i nietolerancji pokarmowej”. Od tego czasu, metoda rozpowszechniana jest jako test cytotoxyczności pokarmów („cytotoxic food test”). Dodatnie wskazania testu traktowane są jako podstawa do wdrażania diet eliminacyjnych.

Ocena wartości diagnostycznej testu ALCAT

Wprowadzenie udoskonalonej technicznie wersji testu cytotoxyczności, którą jest test ALCAT, nie przyniosło autorom metody spodziewanego sukcesu w Stanach Zjednoczonych i krajach Europy Zachodniej. Wartość diagnostyczna metody została oceniona krytycznie, zarówno przez ekspertów Amerykańskiej jak też Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej [10, 11]. Być może dlatego, producent

systemu ALCAT zainteresowany jest jego rozpowszechnianiem w Polsce i innych krajach byłego bloku komunistycznego. W cytowanej powyżej monografii M.J.Pasula, znaleźć można informacje o wyjątkowej zgodności wyników wskazań testu ALCAT z próbami prowokacji pokarmami, wykonywanymi w systemie podwójnie ślepej próby kontrolowanej placebo (DBPCFC). Sposób przedstawienia części metodycznej tych badań, odbiega od ogólnie przyjętych zasad. Brak też informacji o ich opublikowaniu w renomowanych czasopiśmie fachowych. Umieszczona w monografii lista wskazań do stosowania ALCAT-testu w codziennej praktyce alergologa, jest sprzeczna ze stanem współczesnej wiedzy i odbiega od ogólnie przyjętych zasad sztuki lekarskiej [6].

W 1995 roku, zespół B. Wuetricha przedstawił wyniki oceny skutków zastosowania diet prowokacyjnych, u pacjentów z pokarmową alergią IgE-niezależną, które ustalano w oparciu o dodatnie wskazania ALCAT testu. W okresie poprzedzającym eksperyment, u wszystkich 24 badanych eliminowano z diety pokarmy, wchodzące w skład diagnostycznego zestawu ALCAT. Następnie, kierując się dodatnimi wskazaniami testu, wprowadzano do diety te spośród nich, które powodowały reakcję leukocytów. Mimo, że dietę eliminacyjną celowo zastąpiono dietą mającą sprowokować objawy, u 67%

badanych stwierdzono ustąpienie objawów chorobowych. Poprawa utrzymywała się u 57% badanych, przez okres najbliższych 3 miesięcy. Tylko w dwóch przypadkach, wprowadzenie do diety pokarmów zgodnych z dodatnim wskazaniem testu ALCAT, wiązało się z nawrotem dolegliwości. Na tej podstawie, autorzy ocenili skuteczność diet eliminacyjnych wdrażanych w oparciu o wskazania testu ALCAT jako skuteczne, ale bardzo kosztowne wykorzystanie efektu placebo [12].

Wnioski uchwały Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Alergologicznego, w sprawie oceny przydatności diagnostycznej testów cytotoxyczności i ALCAT.

Na podstawie dostępnych materiałów należy stwierdzić, iż wartość diagnostyczna testów cytotoxyczności i ALCAT nie została obiektywnie potwierdzona. Stosowanie testów w rozpoznawaniu czynników wywołujących objawy alergii, lub objawy będące przejawem szeroko rozumianej osobniczej nietolerancji, jest przedmiotem kontrowersyjnych, w zdecydowanej większości negatywnych ocen. W związku z powyższym, testy cytotoxyczności i ALCAT uważamy za kontrowersyjne i nie polecamy ich do rutynowych czynności diagnostycznych [13].

Piśmiennictwo

1. von Pirquet C: Allergie. Muench. Klin. Wschr. 1906, 29: 1457.
2. P. Kallós, H.D. Schlumberger: Pseudo-Allergic Reactions - PAR. Editorial. Int.Arch.Allergy Immunol. 1987, 82: 1.
3. Randolph T.G.: Human ecology and susceptibility to the chemical environment. Charles C. Thomas, Springfield/Illinois 1962.
4. Black A.P.: A new diagnostic method in allergic diseases. Pediatrics 1956, 17: 716.
5. Bryan W.T. K., Bryan M.P.: Cytotoxic reactions in the diagnosis of food allergy. Otolaryngol.Clin.Nostrh.Am. 1971, 4: 523.
6. Pasula M.J.: Test ACAT. Odpowiedź komórkowa na obce substancje: żywność, pleśń, uszlachetniacze żywności, środowiskowe związki chemiczne, antybiotyki, NSAID's". Wydawnictwo IPS, Warszawa 1993.
7. Squire T.L., Lee H.J.: Lysis in vitro of sensitized leukocytes by ragweed antigen. J.Allergy 1947, 18: 156.
8. Holopainen E., Palva T., Stenberg P., Backman A., Lehti H., Ruokonen J.: Cytotoxic leukocyte reaction. Acta Otolaryngol. 1980, 89: 222-226.
9. Freed D.L.J.: Laboratory diagnosis of food intolerance. w: Food allergy and intolerance (red.) J. Brostoff and S.J. Challacombe. Bailliere Tindall, London 1987: 873.
10. American Academy of Allergy and Clinical Immunology. Training Program Directors' Committee report: Topics related to controversial practices that should be taught in an allergy and immunology training program. J.Allergy Clin.Immunol. 1994, 93: 955.
11. Wuetrich B., Schmid-Grendelmeier: Nahrungsmittelallergien. Internist 1995, 36: 1052.
12. Stoeger P., Schmid P., Wuetrich B.: „ALCAT”: A new diagnostic tool for non-IgE-mediated food allergy? 6 th International Symposium on Immunological and Clinical Problems of Food Allergy. Lugano 24-26 September 1996. Abstract in: Allergologie 1995, 9: 389.
13. Uchwała Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Alergologicznego w sprawie wyników pracy Komisji d/s Weryfikacji Niekonwencjonalnych Metod diagnostycznych i Lecznicych. Jachranka 29. 08. 1995.

Ocena testu cytotoksyczności i testu ALCAT w rozpoznawaniu alergii i ustalaniu wskazań do leczenia za pomocą diet eliminacyjnych

opracował dr hab. med. MICHAŁ KUREK

Rozpoznawanie alergii jest często trudne. Ma to miejsce zwłaszcza wtedy, kiedy konieczne jest różnicowanie pokarmowych reakcji toksycznych i nietolerancji, których objawy nie różnią się zasadniczo od towarzyszących alergii. Sprawia to, że niektórzy sięgają po słabo udokumentowane testy laboratoryjne zalecane przez entuzjastów lub ze względów merkantylnych. Do testów tego rodzaju należą między innymi test cytotoksyczności pokarmów i test ALCAT. Metody te oparte są na obserwacji, że alergeny wywierają wpływ na żywotność i kształt leukocytów krwi obwodowej. Wartość diagnostyczna obydwu testów nie została potwierdzona przez wyniki kontrolowanych badań w oparciu o metodę podwójnie ślepej próby. Badania kliniczne wskazują, że uzyskiwane wyniki są dziełem przypadku i nie są powtarzalne. Z tych powodów Polskie Towarzystwo Alergologiczne stoi na stanowisku, że testy cytotoksyczności pokarmów i ALCAT są przedmiotem kontrowersyjnych ocen a ich wartość nie została potwierdzona. Metody te nie są polecane w rozpoznawaniu alergii i ustalaniu diet terapeutycznych.

The validity of using the cytotoxic food test and ALCAT test in diagnosis of allergy and indications for therapeutical diets

edited by MICHAŁ KUREK

Summary

The diagnosis of food allergy is difficult when it has to be differentiated from toxic reactions and food intolerances with similar clinical symptoms. This unfortunately leads some to try various poorly documented laboratory tests recommended only by enthusiasts or for commercial reasons. These are, among others, the cytotoxic and ALCAT tests based upon the observation that allergens affect the viability and the form of human blood leukocytes. The validity of both tests has not been confirmed by controlled double blind studies. Clinical studies indicate that results are based purely on chance and are not reproducible. For this reason the Polish Society for Allergology has asserted that the cytotoxic food test and ALCAT test are of unproven and controversial value. Both tests are not recommended for diagnosis of allergy and are not indicative for therapeutical diets.