

# Jakość hodowli decyduje o jakości wyciągów alergenowych roztoczy kurzu domowego

Dr n. biochem.  
**O. Cromwell**

Dr n. biochem.  
**B. Weber**

Dr n. przyr.  
**F. Kniest**

Dział Naukowo-Badawczy  
Allergopharma Joachim Ganzer  
KG Reinbek, Niemcy

ARTYKUŁ SPONSOROWANY – ALERGENY

## House dust mite cultures determine the quality of mite extracts

### S U M M A R Y

Allergic sensitisation to house dust mites is the most common cause of perennial symptoms of allergic rhinitis, asthma and dermatitis. Mites comprise a large group of Arthropoda belonging to the sub-class Acari and the class Arachnida. The house dust mites in turn belong to the family Pyroglyphidae, and the examples most frequently associated with allergic sensitisation in European countries include *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *D. microceras* and *Euroglyphus maynei*. These small spider-like creatures are barely visible to the naked eye

**Alergia na roztocza kurzu domowego jest najczęstszą przyczyną całorocznych objawów alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa, astmy oskrzelowej i atopowego zapalenia skóry. Roztocze stanowią dużą grupę stawonogów, należącą do gromady Arachnida (pajęczaki) i rzędu Acarina (roztocze). Z kolei roztocze kurzu domowego należą do rodziny Pyroglyphidae. W krajach europejskich objawy alergiczne wywołują najczęściej gatunki: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *D. microceras* oraz *Euroglyphus maynei*. Roztocze są mikroskopijnymi, niewidocznymi gołym okiem pajęczakami.**

Cromwell O.: Jakość hodowli decyduje o jakości wyciągów alergenowych roztoczy kurzu domowego. *Alergia*, 2007, 1: 26-28

Właściwe rozpoznanie uczulenia na roztocze kurzu domowego oraz wykorzystanie immunoterapii swoistej w leczeniu towarzyszących schorzeń alergicznych wymaga dobrej jakości preparatów roztoczy, stanowiących materiał wyjściowy do ekstrakcji. Zrozumienie funkcjonowania ekosystemu roztoczy kurzu domowego jest bardzo ważne dla ustalenia optymalnych warunków ich hodowli.

Równowaga w ekosystemie kurzu domowego, a co za tym idzie wzrost populacji roztoczy zależy od wilgotności i temperatury otoczenia. Człowiek i zwierzęta domowe odgrywają znaczącą rolę w odżywianiu roztoczy. Szczególnie istotny jest złuszczone naskórek i włosy, ponadto resztki pożywienia, pył z mebli i elementów konstrukcji mieszkania oraz materiał organiczny wnoszony do domu ze środowiska zewnętrznego. W kurzu domowym bytują też liczne gatunki grzybów, w tym różne gatunki *Aspergillus* oraz *Wallemia sebi*, które odgrywają istotną rolę zarówno jako źródło pożywienia, jak i degradując naskórek,

który staje się lepiej przyswajalny dla roztoczy. Duża wilgotność i wysokie temperatury powietrza w miesiącach letnich, aż do późnej jesieni sprzyjają odżywianiu i rozmnażaniu się roztoczy. Nadejście zimy powoduje zamykanie drzwi i okien oraz włączenie ogrzewania, co pociąga za sobą spadek wilgotności w mieszkaniach i prowadzi do spadku liczebności roztoczy. Ten okres roku jest szczególnie trudny dla osób uczulonych, ponieważ są narażone na wysokie stężenia alergenów uwolnionych w wyniku rozpadu roztoczy.

## Warunki hodowli roztoczy

Hodowla roztoczy w sztucznych warunkach wymaga stworzenia optymalnego środowiska, szczególnie temperatury i wilgotności oraz zapewnienia odpowiedniego pożywienia. Maksymalny wzrost *D. pteronyssinus* i *D. farinae* następuje w temperaturze od 20 do 30°C przy względnej wilgotności 70 do 80%. Temperatura 24-26°C oraz względna wilgotność 75-80% wybrane do rutynowej hodowli przez Eraso i wsp. (1997) można uznać za optymalne. Udana hodowla wymaga też zapewnienia dużej powierzchni, co zwykle osiąga się przez włączenie obojętnych lub półobojętnych substratów. Dieta powinna obejmować istotne ilości białka. Wczesne doniesienia wskazywały więc na możliwość efektywnej hodowli na ludzkim, złuszczonej naskórku, uzupełnionym proszkiem z drożdży. Standard Międzynarodowy dla *Dermatophagoides pteronyssinus* (NIBSC,82/528) oparto na wyciągu uzyskanym z roztoczy hodowanych na takim właśnie podłożu, a Bousquet i wsp. (1985) potwierdzili skuteczność podobnie standaryzowanych wyciągów w immunoterapii swoistej. W chwili obecnej w hodowli roztoczy do produkcji preparatów diagnostycznych i terapeutycznych dla człowieka należy unikać wszelkiego materiału pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego, by wykluczyć ryzyko przeniesienia czynników infekcyjnych. Szczególne obawy dotyczą schorzeń wirusowych oraz encefalopatii gąbczastej.

“Wytyczne dla Produktów Alergenowych” (1996) oraz Monografia Produktów Alergenowych Farmakopei Europejskiej (1997) odnotowują powyższe problemy i stwierdzają, że „jeśli w podłożu hodowli wykorzystuje się substraty pochodzenia ludzkiego, należy wykluczyć ryzyko przeniesienia chorób infekcyjnych”. Ponadto w Wytycznych czytamy, że „należy zadbać o zminimalizowanie zawartości wszelkich składowych alergenowych w podłożu używanym do hodowli roztoczy”.

## Podłoża do hodowli roztoczy

Do hodowli roztoczy stosuje się szereg różnych podłoży, unikając użycia złuszczonego naskórka lub innych tkanek kręgowców. Opracowano wiele alternatywnych źródeł substancji odżywczych.

Drożdże stanowią idealne źródło istotnych aminokwasów, zawierają ponad 50% białka oraz witaminy, głównie z grupy B i kwas foliowy. Mąka pszenna z pełnego ziarna dostarcza węglowodanów, białek, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i witamin. Peptony otrzymane z soi stanowią doskonałe źródło aminokwasów, możliwe jest też stosowanie mieszanek aminokwasowych, zbliżonych do tych wykorzystywanych w podłożach dla owadów Schneider lub Grace.

Do podłoży jest również dodawana lecytyna fosfolipidów, która wchodzi w skład błon komórkowych.

Dafnie stanowią bogate źródło białek i węglowodanów, które pochodzą prawie wyłącznie z przyswajania alg. Skrobia jest optymalnym źródłem węglowodanów.

Rozważano włączenie antybiotyków celem zminimalizowania ryzyka wzrostu bakterii, ale jest to wykluczone ze względu na możliwość kontaminacji produktów alergenowych.

Tak więc optymalne podłoże do hodowli roztoczy powinno zawierać zdefiniowane ilości białka, węglowodanów, witamin oraz kilka pierwiastków śladowych, poddanych obróbce minimalizującej zawartość składowych alergenowych (np. przez skrajnie wysoką lub niską

temperaturę) oraz zachowywać stabilność w warunkach prowadzenia hodowli. Podłoże musi gwarantować brak ryzyka przeniesienia chorób infekcyjnych, chociaż nie da się osiągnąć sterylności z racji prowadzenia hodowli żywych roztoczy. Kilka typowych składów przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1** Składowe podłoża a zawartość białka i alergenów głównych w wyciągach roztoczy

Składowe podłoża					Białko µg/ml	Der p 1 µg/ml	Der p 2 µg/ml
1	Dafnie	Drożdże	Skrobia	Lecytyna	340	46	22 b
2	Mąka sojowa / zbożowa	Drożdże	Peptony		352	14	13 b
3	Mieszanka białkowa	Drożdże	Skrobia	Lecytyna	67	31	2
4	Mieszanka aminokwasów a	Drożdże	Pszenica	Witaminy	290	96	17 c

Czas trwania hodowli jest czynnikiem rozstrzygającym o składzie i jakości wyciągów alergenowych. Hodowla przechodzi przez trzy fazy. We wstępnej fazie utajenia roztocza zasiedlają podłoże i przystępują do reprodukcji. W fazie wzrostu ich liczba gwałtownie rośnie, ostatecznie po wyczerpaniu pożywki dochodzi do wymierania hodowli. Istotne jest zbieranie roztoczy z poszczególnych hodowli w tym samym czasie, by zapewnić porównywalną zawartość alergenów, nie tylko pod względem ilościowym, ale również ze względu na spektrum alergenowe i proporcje poszczególnych alergenów. Optymalnie jest zebrać roztocza pod koniec fazy wzrostu, gdy ich liczba osiąga maksimum. Wyciągi otrzymane z hodowli w fazie wzrostu mają większą zdolność wiązania przeciwciał klasy IgE niż te pochodzące z hodowli w fazie utajenia bądź schyłkowej (Eraso et al 1998).

## Oznakowanie alergenów roztoczy

Nazwy alergenu tworzy się z trzech pierwszych liter nazwy rodzajowej, pierwszej litery nazwy gatunkowej oraz liczby wskazującej grupę o strukturalnym podobieństwie pomiędzy gatunkami. Dlatego alergen grupy 1 *Dermatophagoides pteronyssinus* otrzymuje symbol Der p 1. Zidentyfikowano i scharakteryzowano co najmniej 18 różnych alergenów wśród gatunków roztoczy z rodzaju *Dermatophagoides*. Wszystkie te alergeny wywołują uczulenie u pewnego odsetka pacjentów, ale niektóre z nich są wiodącymi przyczynami uczulenia i objawów. Badania nad rozpowszechnieniem uczulenia na poszczególne alergeny roztoczy kurzu domowego ujawniły, że częstość uczulenia na Der p 2 jest wyższa niż na Der p 1. W jednym z badań wykazano też, że u 60% pacjentów uczulonych na roztocza kurzu domowego, od 50% do 100% ogólnej ilości swoistych dla roztoczy przeciwciał klasy IgE jest skierowanych przeciwko alergenom Der p 1 i Der p 2 (van der Zee i wsp. 1988). Dotyczy to szczególnie osób, u których uczulenie rozwinęło się w młodym wieku (O'Brien & Thomas, 1994). Jest więc szczególnie ważne, by obydwa wymienione alergeny znajdowały się w składzie produktów diagnostycznych i terapeutycznych w adekwatnych ilościach.

Alergeny grupy 1, do których należą Der p 1, Der f 1 i Eur m 1, są proteazami cysteinowymi pochodzącymi z przewodu pokarmowego roztoczy i obecnymi w dużych ilościach w ich odchodach. Funkcja i pochodzenie alergenów grupy 2 nie jest jasna, ale wykazują one homologię z białkami najądrza, co nasuwa przypuszczenie, że mogą być one wydzielane przez narządy płciowe męskich form roztoczy. Dużą zdolność wiązania IgE wykazują również alergeny grupy 3 (trypsyna) i 9 (proteaza serynowa

o właściwościach kolagenolitycznych), a także prawdopodobnie grupa 11 (paramiozyna), 14 (witelogenina) i 15 (chitynaza). Alergeny grupy 4 ( $\alpha$ -amylaza), 5, 7 i 8 (transferaza glutationu) wykazują pośrednią zdolność wiązania, natomiast alergen grupy 10 zidentyfikowano jako tropomiozynę, która reaguje krzyżowo z białkami wielu innych gatunków, nie jest więc alergenem przydatnym w diagnostyce. Rutynowo oznacza się zawartość alergenów grupy 1 i 2. Całkowitą aktywność alergenową wyciągów rozumianą jako zdolność wiązania IgE ocenia się w testach zahamowania (np. RAST). Do oceny spektrum alergenowego służą techniki immunoblottingu, w których wykorzystuje się surowice pacjentów uczulonych na roztocza kurzu domowego celem identyfikacji alergenów rozdzielonych metodą elektroforezy.

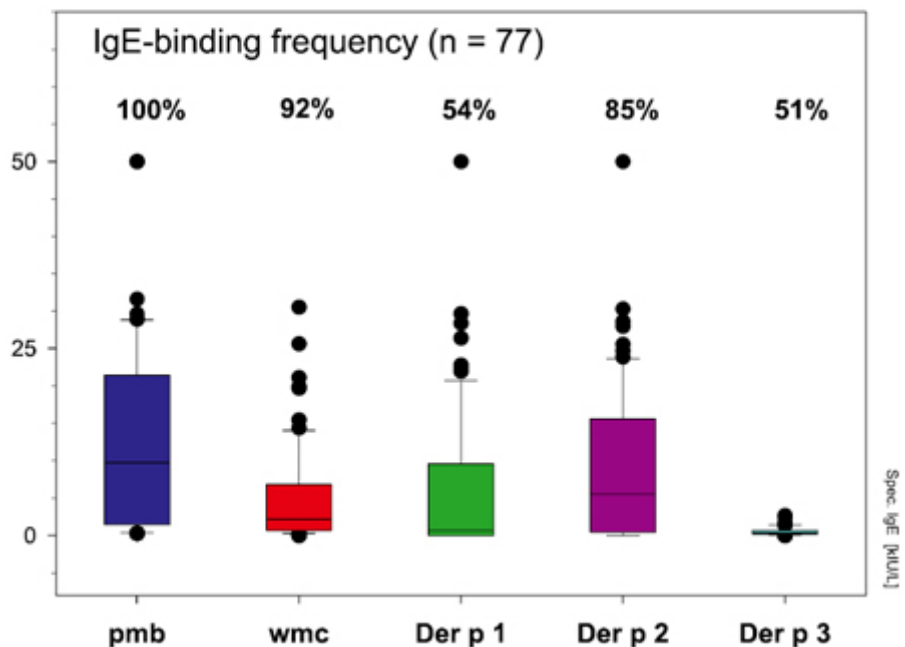
Wiele alergenów roztoczy to enzymy, spośród których te o aktywności proteolitycznej mogą wywołać istotną degradację białka. W jej efekcie niektóre alergeny są obecne w ekstraktach w minimalnych ilościach. Szczególnie wrażliwe na degradację są alergeny grupy 3 i 14, których zawartość w ciałach roztoczy jest względnie duża, a zawartość w wyciągach niewielka. Właściwe przechowywanie zebranych roztoczy przed ekstrakcją odgrywa istotną rolę w minimalizowaniu tego problemu.

Większość wytwórców wykorzystuje do produkcji wyciągów roztoczowych całe hodowle roztoczy (whole mite culture = wmc), zawierające roztocza, ich odchody oraz składowe podłoża. Porównanie wyciągów roztoczy kurzu domowego pochodzących od różnych wytwórców wykazało 10-krotne różnice w stężeniu alergenu Der p 2, podczas gdy stężenia Der p 1 różniły się nawet 25-krotnie (van Ree, 2007). Stosunek stężeń obu alergenów był zbliżony do jedności w niektórych preparatach, podczas gdy w innych dominował alergen Der p 1. Z dużą dozą prawdopodobieństwa różnicę tę tłumaczy ekstrakcja z całych hodowli roztoczy, zawierających bogate w Der p 1 cząstki odchodów, a nie z oczyszczonych ciał roztoczy.

Objęcie ekstrakcją cząstek odchodów jest w dużym stopniu odpowiedzialne za wysoką zawartość alergenu Der p 1, który przeważa w wyciągu kosztem innych alergenów, co zubaża jego profil alergenowy. W wielu wyciągach całych kultur roztoczowych proporcja alergenów głównych Der p 1 i Der p 2 wynosi 20:1, natomiast w wyciągach oczyszczonych ciał roztoczy (purified mite bodies = pmb) udział cząstek odchodów jest minimalny, toteż proporcja Der p 1 do Der p 2 jest bliższa 1:1 (patrz Tabela 1, podłoża 1 i 2), a stężenia innych alergenów są proporcjonalnie wyższe, dzięki czemu spektrum alergenowe wyciągu jest lepiej zdefiniowane

**1**  
TABELA

**Stężenia swoistych alergenowo przeciwciał klasy IgE w surowicy pacjentów uczulonych na roztocze kurzu domowego, mierzone przy pomocy wyciągów roztoczy i oczyszczonych alergenów. Wyciągi przygotowano z oczyszczonych ciał roztoczy (pmb) i całych hodowli roztoczowych (wmc), natomiast pojedyncze alergeny zostały oczyszczone chromatograficznie.**



## Swoistość wyciągów alergenów roztoczy

Porównanie wyciągów oczyszczonych ciał roztoczy i całych kultur roztoczowych metodą immunoblottingu ujawniło 26 składowych wiążących IgE w pmb, a tylko 19 w wmc (Tovey i Baldo, 1987). W skryningu próbek surowicy 77 pacjentów uczulonych na roztocze stwierdzono we wszystkich przypadkach reakcję z wyciągiem oczyszczonych ciał roztoczy, tylko 92% próbek reagowało w ekstraktem wmc, a reaktywność próbek z oczyszczonymi alergenami Der p 1, Der p 2 i Der p 3 wynosiła odpowiednio 54%, 85% i 51% (Wykres 1). Wyciąg pmb wykrywał istotnie więcej swoistych IgE niż preparat wmc ( $P < 0.0005$ ), różnicę tę z całą pewnością należy przypisać względnie niskiej zawartości Der p 2 w wmc. Poziomy przeciwciał skierowanych przeciwko Der p 3 były istotnie niższe niż przeciw Der p 1 i 2. Większe badanie u 78 pacjentów z wykorzystaniem szerszego zakresu alergenów wykazało reakcję z Der p 1 u 91%, a z Der p 2 u 86% badanych, chociaż poziom przeciwciał wiązanych przez Der p 1 był istotnie niższy. Ponad 95% próbek reagowało zarówno z Der p 1, jak i Der p 2. Kolejnym co do częstości rozpoznawanym alergenem był alergen Der p 4, jednakże intensywność wiązania IgE była bardzo niska, następnie Der p 7, 5, 8 i 10 z częstością rozpoznawania odpowiednio 27%, 18%, 10% i 6% (Pittner G et al, 2004). Badanie to potwierdza wiodące znaczenie alergenów grupy 1 i 2, zarówno pod względem częstości uczulania, jak i wielkości odpowiedzi IgE.

Tak więc odpowiednia zawartość alergenów grupy 1 i 2 w preparatach diagnostycznych gwarantuje wysoką czułość i swoistość testów, a w szczepionkach alergenowych skuteczną immunoterapię swoistą. Kilka innych alergenów z pewnością wywołuje uczulenie IgE-zależne, ale wydaje się, że mają one mniejsze znaczenie niż grupa 1 i 2, zarówno co do częstości, jak i nasilenia alergizacji.

**Optymalne warunki hodowli są niezbędne dla zapewnienia maksymalnego stężenia alergenów oraz reprezentatywnego spektrum alergenowego. Wykorzystanie oczyszczonych ciał roztoczy zapewnia w przeciwieństwie do całych hodowli roztoczy adekwatne ilości alergenów zarówno grupy 1 jak i 2 oraz szersze spektrum pozostałych alergenów.**

#### Piśmiennictwo

•Bataard T, Hrabina A, Bi XZ, Chabre H, Lemoine P et al. Production and proteomic characterisation of pharmaceutical-grade Dermatophagoides pteronyssinus and Dermatophagoides farinae extracts for allergy vaccines. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;140:295-305. •Bousquet J, Calvayrac P, Guérin B et al. Immunotherapy with standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. I. In vivo and in vitro parameters after a short course of treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:734-44. •Eraso E, Martínez J, Martínez A et al. Quality parameters for the production of mite extracts. *Allergol et Immunopathol* 1997;25:113-7. •Eraso E, Martínez J, García-Ortega P et al. Influence of mite growth phases on the biological standardization of allergenic extracts. *Invest Allergol Clin Immunol* 1998;8:201-6. •European Pharmacopoeia Monograph, Allergen Products. 1997:1063. •Note for Guidance on Allergen Products. 1996. CPMP/BWP/243/96. Dostępne od adresem: [www.emea.europa.eu/sitemap.htm](http://www.emea.europa.eu/sitemap.htm). •O'Brien RM, Thomas WR. Immune reactivity to Der p I and Der p II in house dust mite-sensitive patients attending paediatric and adult allergy clinics. *Clin Exp Allergy* 1994;24:737-42. •Pittner G, Vrtala S, Thomas WR, et al. Component-resolved diagnosis of house dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. *Clin Exp Allergy* 2004;34:597-603. •Tovey ER, Baldo BA. Comparison by electroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:93-102. •van der Zee JS, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC. Skin tests and histamine release with P1-depleted Dermatophagoides pteronyssinus body extracts and purified P1. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:884-95. •Van Ree R. Indoor allergens: Relevance of major allergen measurements and standardization. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:270-7. •

Zamknij

Drukuj