

Diagnostyka molekularna

– czy jest potrzebna

Component-resolved diagnostics - is it needed

SUMMARY

Component-resolved diagnostics /CRD/ is used to map the allergen sensitization of a patient at a molecular level using purified natural or recombinant allergenic molecules instead of allergen extracts. One of the most important implications of CRD is the ability to distinguish genuine sensitization from sensitization due to cross-reactivity. CRD help the clinician evaluate the risk of systemic versus local reaction, may decrease the need for provocation testing and improve recommendation for allergen avoidance, it's also useful in allergen immunotherapy

Diagnostyka molekularna /component-resolved diagnostics, CRD/ umożliwia ocenę uczulenia na alergen na poziomie komponent alergenowych przy użyciu naturalnych lub rekombinowanych alergenów w miejsce ekstraktów alergenowych. Jednym z najważniejszych wskazań do badań metodą CRD jest odróżnienie pierwotnego uczulenia od reakcji krzyżowych. Metoda ta umożliwia przewidywanie ryzyka wystąpienia reakcji systemowych, zmniejsza częstość wykonywania prób prowokacyjnych i poprawia zalecenia dotyczące eliminacji alergenu z diety. Ze względu na możliwość oceny pierwotnego uczulenia CRD powinno być wskazane w kwalifikacji do swoistej immunoterapii alergenowej

Zawadzka – Krajewska A: Diagnostyka molekularna – czy jest potrzebna. *Alergia*, 2018, 2; 15-17

Przypadek 1.

6-cio letnia dziewczynka była konsultowana przez alergologa z powodu przewlekającego się nieżyty nosa i spojówek. Objawy wystąpiły po raz kolejny w tym samym czasie. Obserwowano je od lutego do maja z największym nasileniem w połowie kwietnia, w okresie pylenia brzozy. Rodzice zgłaszali również objawy świądu ze strony jamy ustnej po spożyciu przez dziecko surowej marchewki, jabłka, brzoskwini i orzechów laskowych. W celu potwierdzenia wstępnego rozpoznania alergicznego nieżyty nosa i spojówek wykonano wówczas punktowe testy skórne, które były dodatnie z alergenami:

orzecha arachidowego	6 mm
orzecha laskowego	5 mm
soi	6 mm
brzoskwini	5 mm
jabłka	6 mm
brzozy	5 mm
olchy	6 mm
leszczyny	5 mm
kontrola ujemna	0 mm
kontrola dodatnia	4 mm.

Poszerzono również diagnostykę o ocenę swoistych przeciwciał klasy IgE metodą UniCAP RAST:

orzech arachidowy	18 kU/L	4 klasa
orzech laskowy	17,6 kU/L	4 klasa
soja	10,2 kU/L	3 klasa
brzoskwinia	3,4 kU/L	2 klasa

jabłko	8,7 kU/L	3 klasa
brzoza	23,2 kU/L	4 klasa.

Na tej podstawie rozpoznano wówczas alergiczny nieżyt nosa i spojówek oraz alergię pokarmową na orzechy, soję, brzoskwinię i jabłko. Zlecono leczenie alergicznego nieżyty nosa i spojówek lekami przeciwhistaminowymi i steroidem podawanym na błonę śluzową nosa. Zlecono również całkowite wyeliminowanie z diety produktów sojowych, orzechów, jablek i brzoskwini.

Z powodu niepokoju rodziców o możliwość wystąpienia reakcji uogólnionej po spożyciu powyższych pokarmów uzupełniono diagnostykę o ocenę obecności przeciwciał przeciw komponentom alergenowym metodą ImmunoCAP ISAC. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

W badaniu metodą ImmunoCAP ISAC na obecność przeciwciał przeciwko komponentom alergenowym wykazano obecność alergenowoswoistych immunoglobulin E /asIgE/ dla komponentów alergenowych należących do rodziny białek zależnych od patogenezы PR-10 /pathogenesis-related/, które są homologiczne z głównym alergenem brzozy Bet v 1. Badanie to umożliwiło ustalenie ostatecznego rozpoznania pierwotnego uczulenia na brzożę pod postacią alergicznego nieżyty nosa i spojówek, uczulenia krzyżowego na orzech laskowy, orzech arachidowy, jabłko, soję i brzoskwinię pod postacią zespołu alergii jamy ustnej. Kontynuowano leczenie alergicznego nieżyty nosa i spojówek. Zmniejszono niepokój rodziców dotyczący



Dr n. med.

**Anna
Zawadzka-Krajewska**

Klinika Pneumonologii
i Alergologii Wiek
Dziecięcego
WUM
w Warszawie

Kierownik kliniki:
Prof. dr hab. n. med.
Marek Kulus

Słowa kluczowe:

diagnostyka molekularna, reakcje krzyżowe, uczulenie pierwotne

Key words:

component-resolved diagnostics, cross-reactivity, genuine sensitization

możliwości wystąpienia zagrażającej życiu dziecka reakcji po spożyciu produktów z ukrytą zawartością badanych pokarmów.

Przypadek 2.

6-cio letni chłopiec z potwierdzonym uczuleniem na pyłki brzozy pod postacią alergicznego nieżytu nosa i spojówek został przyjęty do kliniki z powodu reakcji anafilaktycznej po spożyciu orzechów laskowych. W dniu przyjęcia do oddziału badaniem przedmiotowym stwierdzoną duszność, uogólnioną pokrzywkę, obfity wyciek z nosa i łzawienie. Chłopiec skarżył się na bóle brzucha, wymiotował. Po 4 tygodniach od wystąpienia objawów został ponownie przyjęty do oddziału w celu pogłębienia badań diagnostycznych. Wykonano wówczas ocenę asIgE metodą UniCAP RAST:

1
Tab. Ocena przeciwciał przeciwko komponentom alergenowym metodą ImmunoCAP ISAC

Alergen	ISU-E	Rodzina białek
Soja		
-Gly m 4	18	Białko PR-10
-Gly m 5	< 0,1	7s globuliny białka zapasowe
-Gly m 6	< 0,1	11s globuliny białka zapasowe
Brzoza		
-Bet v1	56	białko PR-10
Orzech arachidowy		
Ara h8	3,4	białko PR-10
Ara h1	< 0,1	7s globuliny białka zapasowe
Ara h2	< 0,1	2s globuliny białka zapasowe
Ara h3	< 0,1	11s globuliny białka zapasowe
Ara h9	< 0,1	nsLTP
Orzech laskowy		
Cor a 1	6,4	białko PR-10
Cor a 9	< 0,1	11s globuliny białka zapasowe
Cor a 8	< 0,1	nsLTP
Jabłko		
Mal d 1	6,3	białko PR-10
Brzoskwinia		
Pru p 1	2,3	białko PR-10
Pru p 3	< 0,1	nsLTP

• brzoza 12,6 kU/L
• orzech laskowy 6,4 kU/L.

Ze względu na obserwowaną reakcję anafilaktyczną po spożyciu orzechów laskowych w celu ustalenia ryzyka wystąpienia ciężkich reakcji alergicznych oceniono stężenie asIgE przeciwko komponentom alergenowym metodą ImmunoCAP ISAC. Stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko Cor a 9 5,8 ISU-E /11s globuliny białka zapasowe/ świadczących o pierwotnym uczuleniu, co wyjaśnia ciężką reakcją po spożyciu orzechów laskowych. Zlecono kontynuowanie leczenia alergicznego nieżytu nosa i spojówek. Zakazano spożywania orzechów laskowych. Chłopiec wymaga zaopatrzenia w adrenalinę na wypadek reakcji anafilaktycznej.

Dyskusja.

Diagnostyka oparta na komponentach /component resolved diagnostics, CRD/ umożliwiła przede wszystkim odróżnienie pierwotnego uczulenia od reakcji krzyżowych. Służy również do przewidywania ryzyka wystąpienia ciężkich uogólnionych reakcji po ekspozycji na alergen i kwalifikacji do swoistej immunoterapii alergenowej. W alergii pokarmowej pozwala na zmniejszenie wykonywania prób prowokacyjnych i ustalenie prawdopodobieństwa nabycia tolerancji /1, 2/.

U opisanej w pierwszym przypadku dziewczynki wykazano obecność alergenowoswoistych przeciwciał klasy IgE przeciwko komponentom alergenowym należących do rodziny białek PR-10, będących homologami głównego alergenu brzozy Bet v 1. Należały do nich komponenty: orzecha laskowego/Cor a 1/, orzecha arachidowego/Ara h 8/, soi /Gly m 4/, brzoskwini /Pru p 1/, jabłka/Mal d 1/. Obecność asIgE przeciwko komponentom alergenowym orzechów, owoców i warzyw wynikała z uczulenia krzyżowego w stosunku do pierwotnego uczulenia na pyłek brzozy. Duży stopień homologii w obrębie rodziny białek PR-10 jest przyczyną występowania reakcji krzyżowej, zwykle o charakterze miejscowym, po spożyciu w formie surowej między innymi: jabłka, brzoskwini, marchwi przez osoby pierwotnie uczulone na brzozę/3,4/. Uczulenie pierwotne rozwija się w następstwie bezpośredniej ekspozycji na alergen, a nie w wyniku reakcji krzyżowych/3,4/. Alergia krzyżowa polega na połączeniu się przeciwciała klasy IgE wytworzonego pierwotnie w kierunku jednego antygeny z antygenem o dostatecznie dużym podobieństwie determinant antygenowych. W skład alergenu źródłowego wchodziły komponenty alergenowe, białka zbudowane z przestrzennie ułożonych łańcuchów polipeptydowych. Każda komponenta alergenowa może zawierać wiele epitopów /determinant antygenowych/. Część epitopów może mieć strukturę zbliżoną do budowy epitopów z innych źródeł alergenowych. Komponenty alergenowe zawierające epitopy o dużym stopniu podobieństwa sekwencji liniowej lub struktury przestrzennej określane są jako alergeny homologiczne.

Stopień homologii sekwencji aminokwasów epitopów liniowych lub duży stopień podobieństwa struktury przestrzennej epitopów konformacyjnych warunkuje możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych/3,4,5/. Przy zgodności sekwencji aminokwasów epitopów sięgającej 70% prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji krzyżowej jest duża, przy zgodności poniżej 50% występuje rzadko /2,5/.

Komponenty alergenowe zawierające epitopy o dużym stopniu homologii tworzą rodziny białek reagujących krzyżowo /2/.

Należą do nich /2,6/:

- **białko PR-10** białka zależne od patogenez, homologiczne z głównym alergenem brzozy Bet v 1. Większość białek PR-10 jest wrażliwa na podgrzewanie i trawienie
- **białka zapasowe** /spichrzeniowe/: 2s albuminy, 11s globuliny, 7s globuliny, prolaminy zbożowe. Białka te są odporne na podgrzewanie i trawienie. Uczulenie na nie jest częstą przyczyną silnych reakcji ogólnoustrojowych
- **białka przenoszące lipidy** /non-specific lipid transfer proteins, nsLTP/ są odporne na podgrzewanie i trawienie, często związane z silnymi reakcjami ogólnoustrojowymi



2

Tab.

Komponenty alergeny odpowiedzialne za reakcje krzyżowe

Orzech arachidowy	Ara h 8
Orzech laskowy	Cor a 1, Cor a 2, Cor a 11
Soja	Gly m 4
Brzoskwinia	Pru p 1, Pru p 4
Jabłko	Mal d 1
Seler	Api g 1
Marchew	Dau c 4
Mleko	Bos d 6
Trawy	Phl p 7, Phl p 12
Brzoza	Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4
Roztocze kurzu domowego	Der p 10
Pies	Can f 6
Kot	Fel d 2, Fel d 4

- **profiliny:** białka o wysokiej reaktywności krzyżowej, nazwane mostem łączącym alergię pokarmową i wziewną; białka wrażliwe na podgrzewanie i trawienie. Uczulenie na profilinę występuje u 20-40% pacjentów z alergią pokarmową i pyłkową
- **tropomiozyny** odporne na podgrzewanie i trawienie, często związane z silnymi reakcjami ogólnoustrojowymi. Istnieje wysoka homologia sięgająca 80% między tropomiozyną bezkręgowców
- **polkalcyny:** rodzina białek występująca wyłącznie wśród roślin dająca fałszywie dodatnie wyniki aslgE w stosunku do alergenów roślinnych
- **parvalbuminy** odporne na podgrzewanie i trawienie, związane często z silnymi reakcjami ogólnoustrojowymi
- **defenzyny**
- **oleozyny:** silnie anafilaktyczne, odporne na podgrzewanie i trawienie
- **białka thaumatino-podobne** są względnie odporne na temperaturę i trawienie, mogą wywołać reakcje systemowe
- **lipokaliny**

CCD-krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe, są glikanami wchodzącymi w skład glikoprotein. Powodują wytwarzanie przeciwciał anti-CCD reagujących krzyżowo z alergenami zawierającymi glikany np. pyłkami roślin, pokarmami pochodzenia roślinnego, co jest powodem fałszywie dodatnich wyników badań /2/. Komponenty alergeny odpowiedzialne za reakcje krzyżowe przedstawiono w tabeli 2/1/.

Do najczęstszych postaci klinicznych reakcji krzyżowych należą:

- **zespół alergii jamy ustnej /oral allergy syndrome - OAS/ :** zespół zmian toczących się w obrębie jamy ustnej i gardła/3/

2

Tab.

Komponenty alergeny odpowiedzialne za uczulenie pierwotne

Orzech arachidowy	Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 9
Orzech laskowy	Cor a 8, Cor a 9, Cor a 14
Orzech włoski	Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Jug r 4
Soja	Gly m 5, Gly m 6, Gly m 25
Przenica	Tri a 14, Tri a 19, Tri a 26, omega 5-gliadyna
Brzoskwinia	Pru p 3
Seler	Api g 1
Marchew	Dau c 1
Mleko	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 7, Bos d 8
Trawy	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 11
Brzoza	Bet v 1
Bylica	Art v 1
Roztocze kurzu domowego	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2
Kot	Fel d 1
Pies	Can f 1, Can f 2, Can f 5

- **zespół alergii pyłkowo-pokarmowej /pollen-food allergy syndrome - PFAS/ :** zespół zmian podobnych jak w OAS, ale o większym, systemowym zasięgu /3/.

- **zespół kot – wieprzowina** wynikający z dużego stopnia homologii alergenu kota Fel d 2 należącego do albumin surowiczych z albuminą świni występującą w wieprzowinie Sus s 1. Reakcja krzyżowa między Fel d 2 a Sus s 1 występuje u jednej do trzech osób uczulonych na kota /7/.

- **zespół lateks – owoce:** za zespół odpowiedzialna jest rodzina białek reagujących krzyżowo – chitynazy i profiliny. Około 80% uczulonych na lateks prezentuje niepożądane objawy po spożyciu nie tylko awokado, bananów, kiwi, melonów i papai ale również pomidorów i ziemniaków /8/.

- **zespół roztocze – skorupiaki – mięczaki:** w zespole tym wspólnym alergenem jest tropomiozyna Der p 10 w alergenie roztoczy i Pen m 1 w alergenie krewetek /9/.

- **zespół drób – jajo kurze;** za reakcją krzyżową odpowiedzialne jest białko alfa – liwetyna /Gal d 5/ obecna w piórach, mięsie drobiowym i żółtku jaja /10/.

W drugim prezentowanym przypadku wystąpienie reakcji anafilaktycznej po spożyciu pokarmu powinno skłaniać do wykonania badań opartych na komponentach alergenowych. Pozwala to na ocenę stopnia ryzyka wystąpienia ciężkiej, zagrażającej życiu reakcji po spożyciu pokarmu i pozwala na odstąpienie od prób prowokacyjnych, bywa że niebezpiecznych dla pacjenta. Komponenty alergeny odpowiedzialne za uczulenie pierwotne przedstawiono w tabeli 3 /1/.

Diagnostyka oparta na komponentach alergenowych pozwala na personalizację zaleceń, stosowanie właściwej diety, prawidłową kwalifikację do swoistej immunoterapii alergicznej. Tego typu diagnostyka powinna stanowić standardowe narzędzie w pracy każdego alergologa.

Prace nadesłano

20.05.2018

Zaakceptowano do

druku 2.06.2018

Konflikt interesów nie występuje. Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo: 1. Bartuzi Z. Diagnostyka molekularna w alergii pokarmowej. *Alergia* 2017;3:13-17. 2. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, et al. A WAO-ARIA-GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *WAOJ* 2013;6:17. 3. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy* 2015;70:1079-1090. 4. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;suppl. 23:1-250. 5. Bartuzi Z. Nowe spojrzenie na alergeny pokarmowe. *Alergia* 2011;2:31-37. 6. Błażowski Ł, Kurzawa R. ABC diagnostyki molekularnej w alergologii część 1. 2018. 7. Hilger C. Serum albumins. In: EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;suppl. 23:321-328. 8. Sicherer SH. Food allergens overview of clinical features and cross-reactivity. Up to date 2017. 9. WHO/IUIS. Allergen Nomenclature sub-committee. www.allergen.org 2017. 10. Balińska-Miśkiewicz W. Diagnostyka molekularna alergii pokarmowej – czy więcej? *Postępy Hig Med Dośw* 2014;68:754-767.