



Diagnostyka molekularna w alergii na pokarmy

Molecular diagnostics in Food Allergy

SUMMARY

Molecular diagnostic techniques have been practically used in allergology for over 10 years. The paper discusses the importance of molecular diagnostics in the food allergy diagnosis. The capabilities of the method and its limitations in the application are presented. Based on the latest literature, the benefits of molecular diagnostics in the diagnosis of food allergy and limitations in the use of this method have been demonstrated.

One of the main advantages of this method is to obtain information on the potential for cross-reactivity of inhalant and food allergens with epitope structural similarity. The method is a modern supplement to the current allergy diagnostics deserving its dissemination. Provides detailed information on allergenic components at the molecular level, allowing for a better understanding of the symptoms and individualization of treatment for the patient.

Techniki diagnostyki molekularnej mają praktyczne zastosowanie w alergologii od ponad 10 lat. W pracy omówiono znaczenie diagnostyki komponentowej w rozpoznawaniu alergii pokarmowej. W oparciu o najnowszą literaturę przedstawiono korzyści wynikające z zastosowania diagnostyki molekularnej w rozpoznawaniu alergii pokarmowej oraz ograniczenia w stosowaniu tej metody.

Jedną z głównych zalet tej metody jest uzyskanie informacji na temat możliwości wystąpienia reakcji krzyżowych, dotyczących alergenów wziewnych i pokarmowych, wykazujących podobieństwo strukturalne w obrębie epitopów. Metoda ta jest nowoczesnym uzupełnieniem dotychczasowej diagnostyki alergologicznej zasługującą na jej rozpowszechnienie. Dostarcza szczegółowych informacji na temat alergizujących komponentów na poziomie molekularnym, pozwalając na lepsze zrozumienie występujących objawów i indywidualizację postępowania w leczeniu pacjenta.

Bartuzi Z.: Diagnostyka molekularna w alergii na pokarmy. *Alergia*, 2017, 3; 13-17

Diagnostyka alergii na pokarmy jest jednym z największych wyzwań jakie stoją przed współczesną alergologią. Nie ma bowiem w chwili obecnej jednego, uniwersalnego narzędzia badawczego, którego zastosowanie w każdym przypadku pozwala odpowiedzieć na pytanie jakie są powody występujących dolegliwości. Te trudności i problemy związane z diagnostyką wynikają z szeregu przyczyn. Należy do nich niewątpliwie różny mechanizm patogenetyczny leżący u podstaw występujących dolegliwości. Czasami współwystępowanie mechanizmów immunologicznych i nieimmunologicznych, który wymagają często stosowania różnych narzędzi badawczych. Do innych czynników zalicza się różnorodność spożywanych pokarmów, współwystępowanie nadwrażliwości na wiele składników pokarmowych, różne drogi przenikania alergenów pokarmowych, zmienność siły uczulającej pokarmów (potrawy przetworzone). Należy również pamiętać, że

sposób przechowywania pokarmów może decydować o wystąpieniu reakcji (np. żywność foliowana). Istotne z punktu widzenia prowadzonej diagnostyki alergologicznej jest także obecność kofaktorów decydujących o wystąpieniu bądź nie w określonych okolicznościach reakcji alergicznej. Ich istotną rolę potwierdzają ostatnio publikowane badania, gdzie stwierdzono ich udział w reakcji alergicznej aż w połowie zdarzeń u osób dorosłych i 23% u dzieci. Wreszcie coraz powszechniej występujące zjawisko reakcji krzyżowych, które jak sugerowano na ostatnim Kongresie EAACI zmienia oblicze nadwrażliwości na pokarm zwłaszcza u osób dorosłych. Wymaga to nie tylko wiedzy dotyczącej interakcji poszczególnych molekuł alergenowych, ich swoistości i specyfiki ale także zastosowania niezwykle precyzyjnych, nowoczesnych narzędzi badawczych.

Postępy jakie dokonały się w ostatnich dwóch dekadach, dotyczące biochemii, genetyki, immunologii, inżyn-



**Prof. dr hab. n. med.
Zbigniew Bartuzi**

Katedra i Klinika
Alergologii, Immunologii
Klinicznej i Chorób
Wewnętrznych
Collegium Medicum
w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja
Kopernika w Toruniu

Słowa kluczowe:

diagnostyka molekularna, reakcje krzyżowe, alergia pokarmowa

Key words:

molecular diagnostics, cross-reactivity, food allergy

nierii genetycznej przełożyły się również na opracowanie nowych metod w zakresie diagnostyki alergologicznej. Minęło 50 lat od odkrycia immunoglobulin IgE, która od czasu genialnego odkrycia Praunitz'a i Kustner'a przez prawie 40 lat była określana „tajemniczą reaginą”. Późniejsze badania pozwoliły określić swoistość produkowanych przeciwciał i były niewątpliwie postępem

miczne. Pierwszą rodziną opisaną w 1976 roku przez Carlssona były profiliny, białka termolabilne o masie cząsteczkowej od 12-15 kDa, charakteryzujące się obecnością w końcowej części łańcucha 7 aminokwasów o tej samej sekwencji. Te białka są szeroko rozpowszechnione w komórkach pyłków roślin i pokarmach pochodzenia roślinnego co wyjaśnia szeroko

1

Tab.

Komponenty wysokiego i niskiego ryzyka – WAO 2013

Źródło	Wysokie ryzyko	Niskie ryzyko
Orzeszek ziemny	Ara h 1, 2, 3, 9	Ara h8, profilina, CCD
Orzeszek laskowy	Cor a 8, 9, 14	Profilina, CCD
Orzech włoski	Jug r 1, 2, 3	Profilina, CCD
Soja	Gly m 5, 6	Profilina, CCD
Owoce Rosacea	Pru p 3, Mal d3	Pru p 1, Mal d1, profilina, CCD
Pszemica	Tri a 14, Tri a 19	Profilina, CCD

w diagnostyce nadwrażliwości na pokarm. Prawdziwym jednak krokiem milowym było wprowadzenie nowych metod molekularnych, opartych na postępach w zakresie inżynierii genetycznej, które stanowią już dziś jedno z podstawowych narzędzi badawczych. Pierwsze prace w tym zakresie zostały opublikowane pod koniec ubiegłego wieku przez R. Valenta [1]. Dla prawidłowego zrozumienia molekularnej diagnostyki alergii jest konieczność poznania właściwości alergenów.

Alergenem może być każda struktura zawierająca białko. Niezwykle istotne jest aby wiedzieć, że potencjalne źródło alergenu składa się z tysięcy molekuł, z których tylko niektóre mają istotne znaczenie kliniczne [2, 3, 4]. Te z nich, które zdolne są do wywołania reakcji alergicznej mają swoją charakterystyczną specyfikę i swoistość. Są odporne bądź nie na działanie temperatury, soków trawiennych, są zdolne lub nie do wywołania ciężkich reakcji anafilaktycznych czy też reakcji krzyżowych.

Molekuły alergenowe

Podkomitet ds. Nazewnictwa alergenów, działający przy WHO scharakteryzował aktualnie 151 rodzin i 1018 molekuł alergenowych. O specyfice danej molekuły alergenowej decyduje jej swoisty układ aminokwasów w łańcuchu, jej budowa przestrzenna, która może mieć charakter konformacyjny lub liniowy. Komponenty klasyfikowane są do różnych grup białek, w zależności od funkcji, struktury czy wrażliwości na czynniki fizykoche-

występujące zjawisko reakcji krzyżowych. Stąd profiliny zostały nazwane przez Carlssona „pomostem łączącym alergię pokarmową z alergią pyłkową”. Wśród kolejno odkrywanych rodzin i panalergenów czyli grup białek o podobnej budowie, występujących w różnych źródłach należy wymienić te, które z punktu widzenia klinicznego odgrywają niezwykle istotną rolę. Należą do nich białka zapasowe – stabilne i odporne na działanie temperatury, odgrywające kluczową rolę w ciężkich reakcjach anafilaktycznych. Białka przenoszące lipidy LTP, również odporne na działanie soków trawiennych i termostabilne mogą odgrywać istotną rolę w miejscowych i uogólnionych reakcjach alergicznych. Białka stresu roślinnego, zwłaszcza PR-10, albuminy surowicy, lipocaliny, parvalbumina, determinanty węglowodanowe i wiele innych mają swoją specyfikę i swoistość, determinującą objawy związane z nadwrażliwością typu alergicznego [5, 6, 7]. Wiedza na temat właściwości poszczególnych rodzin jest istotna dla każdego alergologa a zwłaszcza dla osób zajmujących się trudną diagnostyką alergii na pokarmy.

I tak np. trzeba wiedzieć, że determinanty węglowodanowe to O i N-glikany wchodzące w skład glikoprotein. Zawarta w nich ksyloza i fukoza wiążą się z rdzeniem determinanty poprzez N-acetyloglukozamine. Wiązanie to jest wysoce immunogenne dla organizmu ludzkiego co powoduje, że wytwarzane przeciwciała anty-CCD reagują z alergenami zawierającymi glikany, będąc czę-



stym powodem fałszywie dodatnich wyników określających obecność swoistych IgE.

Dotychczasowa diagnostyka alergologiczna, w tym oznaczanie swoistych IgE opierała się na oznaczeniu ich w naturalnych ekstraktach alergenowych, które są mieszaniną różnych alergenów. Ekstrakty różnią się stabilnością i zawartością molekuł alergenowych co związane jest ze zmiennością źródła z którego jest pozyskiwany. Wykazano m.in. w przypadku niektórych pokarmów a także roztoczy kurzy domowego kilkudziesięcio-krotne różnice w zakresie stężeń poszczególnych alergenów. Ekstrakty wymagają precyzyjnej standaryzacji lecz dokładny skład i zawartość alergenów są niemożliwe do przewidzenia [8, 9, 10]. Przy posługiwaniu się ekstraktami jako źródle diagnostycznym, poza wyżej podnoszo-

cjonalnych metod oczyszczania białek np. metodą filtracji na żelu. W przypadku molekuł rekombinowanych najczęściej do syntezy wykorzystywane są E. Coli i drożdże. Uzyskuje się w ten sposób doskonale oczyszczone alergeny o zdefiniowanej strukturze.

Nowoczesne techniki diagnostyczne alergii

Ten niewątpliwy postęp, jak podkreślono wyżej, w zakresie inżynierii genetycznej doprowadził do opracowania nowoczesnej techniki diagnostycznej alergii (CRD – component resolved diagnostics) czyli molekularnej diagnostyki alergii.

Testy mikrooznaczeń (microarray), pozwalają na analizę surowicznych swoistych przeciwciał przeciwko ściśle określonym cząsteczkom wchodzącym w skład alergenu. Stosowane w teście mikroplatyki mają

2

Tab.

Molekuły alergenowe odpowiedzialne za uczulenie pierwotne i reakcje krzyżowe

Alergen	Pierwotne uczulenie na alergeny pokarmowe	Reakcje krzyżowe
Orzech arachidowy	Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 9	Ara h8
Orzech laskowy	Cor a 8, Cor a 9	Cor a 1, Cor a 2, Cor a 11
Orzech włoski	Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Jug r 4	brak
soja	Gly m 5, Gly m 6, Gly m 25	Gly m 4
Pszenica	Tri a 19, omega-5 gliadyna, HMW-glutenina, Tri a 14, Tri a 26	
Brzoskwinia	Pru p 3	Pru p 1, Pru p 4
Jabłko	Brak	Mal d 1
Kiwi	Act d1, Act d 2, Act d 5	Act d 8
Seler	Api g 1	Api g 1
Białko jaja kurzego	Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 4	Gal d 5
Żółtko jaja kurzego	Gal d 5	Brak
Mleko	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8	Bos d 6
Dorsz i Karp	Gad c 1, Cyp c 1	Gad c 1, Cyp c 1
Marchew	Dau c 1	Dau c 4

nymi problemami, brak jest możliwości rozróżnienia uczulenia pierwotnego od reakcji krzyżowych. Ma to ogromne znaczenie dla populacji chorych z nadwrażliwością alergiczną na pokarm gdyż decyduje o sposobie postępowania. Trudności diagnostyczne wynikające z niedoskonałości naturalnych ekstraktów alergenowych stały się inspiracją do wykorzystania technik inżynierii genetycznej do produkcji alergenów rekombinowanych lub natywnych uzyskiwanych z wysoko oczyszczonych składników alergenowych. Molekuły natywne są wytwarzane za pomocą konwen-

zaadsorbowane na swojej powierzchni molekuły naturalnych komponentów alergenowych lub rekombinowanych, z którymi reagują obecne w badanej surowicy swoiste dla nich przeciwciała IgE wykrywane poprzez dodanie znakowanych przeciwciał anty IgE. Wykonanie testu trwa ponad 3 godziny i polega na przygotowaniu i wstępnym przemyciu chipa, następnie na inkubacji próbki, wykryciu przeciwciałem znakowanym, skanowaniu biochipa, analizie i generowaniu wyniku. Testy te pozwalają wykryć przeciwciała IgE, ustalić indywidualny profil swoistych przeciwciał, całościowy obraz uczu-

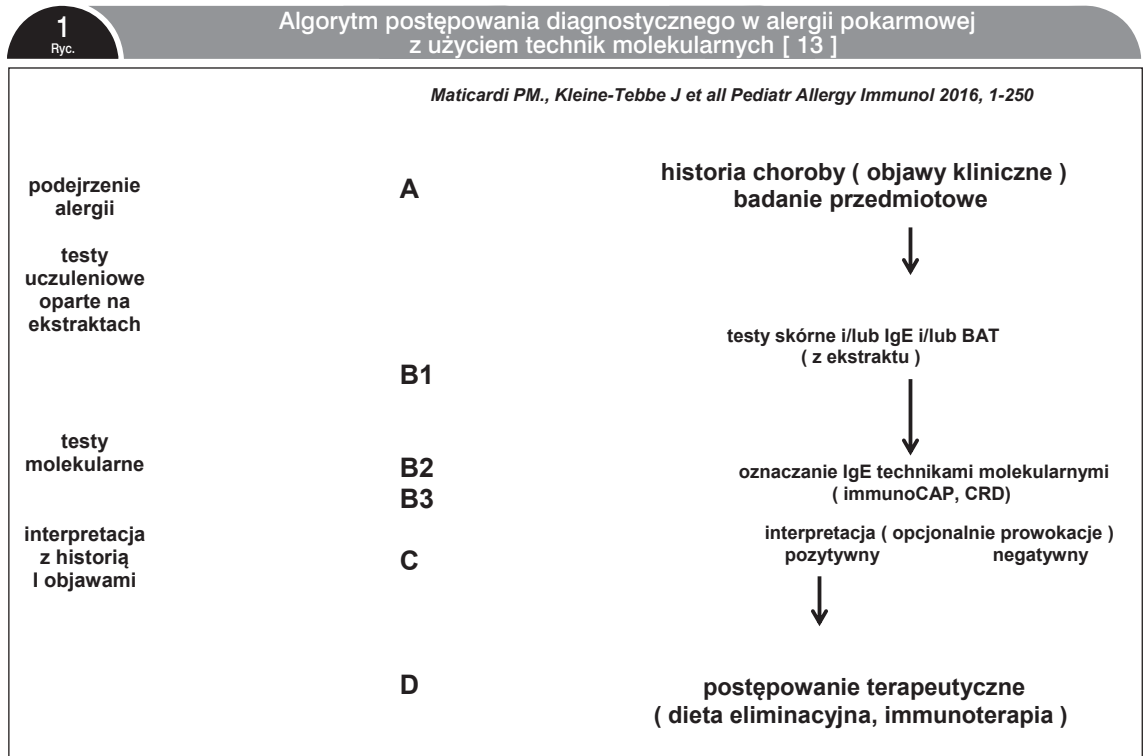
DIAGNOSTYKA

lenia oraz wykryć reakcje krzyżowe między badanymi alergenami [11, 12, 13].

Diagnostyka Molekularna Alergii jest metodą mającą na celu ustalenie profilu uczuleniowego pacjenta na poziomie molekularnym, wykorzystującą oczyszczone naturalnie bądź rekombinowane molekuly (komponenty alergenowe), zamiast ekstraktów alergenowych.

ISAC

Wprowadzony w 2006 roku w USA i dostępny również w Polsce w dwóch ośrodkach The Immuno-Solid phase Allergen Chip (ISAC), wykorzystuje technologię biochipu do pomiaru specyficznych przeciwciał IgE przeciwko 112 komponentom alergenowym w pojedynczym teście. Nie ma powodów do zastosowania testu w przypadku obiektywnych cech braku uczulenia lub w przypadku obecności uczulenia na jeden, znany aler-



Techniki diagnostyki molekularnej w alergii pozwalają na:

- określenie profilu molekularny alergii chorego
- rozróżnienie faktycznego uczulenia od symptomów wywołanych reakcją krzyżową u pacjentów multi-uczuleniowych
- przewidzenie ryzyka wystąpienia ciężkich, ogólnoustrojowych reakcji bądź łagodnych reakcji miejscowych w alergii pokarmowej, zmniejszając niepokój pacjenta
- określenie prawdopodobieństwa nabycia tolerancji
- zmniejszenie potrzeby wykonywania prób prowokacyjnych oraz poprawia zalecenia odnośnie eliminacji alergenu z diety pacjentów oraz identyfikuje faktycznie uczulające alergeny w celu wprowadzenia ewentualnej odpowiedniej immunoterapii w przyszłości

Obecnie dostępne są 2 platformy do diagnostyki molekularnej alergii:

1. bazuje na oznaczeniach pojedynczych komponentów,
2. na jednoczesnym oznaczeniu wielu komponentów alergenowych

gen. Natomiast należy go stosować:

- U chorych z OAS oraz uczulonymi na szereg pyłków i pokarmów pochodzenia roślinnego
- Z astmą uczulonych na wiele czynników
- Atopowym zapaleniem skóry
- Idiopatyczną anafilaksją
- Przy braku lub niewystarczającej odpowiedzi na prowadzone leczenie
- W sytuacji niemożności zastosowania testów skórnych np. u małych dzieci bądź z innych powodów

Próba ustalenia faktycznej przyczyny reakcji alergicznych może czasem przypominać szukanie „igły w stogu siana”. Szczególnie ma to miejsce gdy objawy i historia choroby są sprzeczne, pacjent jest uczulony na wiele molekuł alergenowych jednocześnie lub wykazuje niezadowalającą odpowiedź na leczenie.

Najbardziej znany i stosowany od kilkunastu lat na całym świecie jest test ISAC.

FABER

Od roku dostępna jest nowsza generacja testów molekularnych – FABER. Jest to system diagnostyczny na który składa się multiparametrowy immunoenzymatyczny test diagnostyczny alergii IgE-zależnej w nanotechnologii, pozwalający oznaczyć swoiste IgE w suro-



technologii, pozwalający oznaczyć swoiste IgE w surowicy krwi wobec molekuł i ekstraktów alergenowych oraz innowacyjny moduł CDRS, angażujący technologię informatyczną oraz platformę komunikacyjną, w celu ułatwienia sposobu przedstawiania oraz analizowania wyników pacjentów. Test powstał przy zaangażowaniu wielu instytucji pod nadzorem Centrum Alergologii Molekularnej w Rzymie (Włochy). Test FABER pozwala ocenić 122 molekuly oraz 122 alergeny pochodzące ze 123 różnych źródeł alergenowych, tj. pokarmy, rośliny, zwierzęta i inne.

ALEX

Na ostatnim Kongresie EAACI w Helsinkach została zaprezentowana kolejna generacja testów molekularnych – ALEX – Allergy Explorer, która to jest efektem pracy badaczy z ośrodka wiedeńskiego. Zawiera on ocenę 150 molekuł alergenowych pochodzących z ekstraktów i ponad 100 molekuł alergenowych. Aktualnie jeszcze test nie został wprowadzony do praktyki klinicznej.

W 2012 roku 4 największe organizacje międzynarodowe (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI), European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), World Allergy Organisation (WAO), American College of Allergy, Asthma & Immunology (ACAAI) opracowały dokument (ICON), który stanowi konsensus zmierzający do usystematyzowania wiedzy dotyczącej m.in. diagnostyki i leczenia alergii pokarmowej. Również w Position Paper EAACI z 2014 roku zostało potwierdzone stanowisko europejskie dotyczące miejsca diagnostyki molekularnej w postępowaniu z chorym z nadwrażliwością alergologiczną na pokarmy [14, 15]. Międzynarodowe zalecenia rekomendują dokładną analizę historii choroby pacjenta jako pierwszy etap postępowania diagnostycznego oraz wykonanie testów IgE w oparciu o ekstrakty alergenowe (testy sIgE „in vitro” lub testy skórne) jako drugi etap badania diagnostycznego. Diagnostyka molekularna alergii jest traktowana jako trzeci etap postępowania diagnostycznego z pacjentem, u którego

wyniki uzyskane w ramach pierwszego i drugiego etapu były niewystarczające. Dla doświadczonego lekarza alergologa diagnostyka molekularna może być włączona do drugiego etapu postępowania diagnostycznego.

Należy zauważyć, że w ośrodkach naukowych zajmujących się profesjonalną diagnostyką alergologiczną trwają intensywne prace nad nową, znacznie bardziej zaawansowaną formą diagnostyki molekularnej, mianowicie oznaczaniem swoistych IgE skierowanych przeciwko epitopom alergenowym. Pierwsze prace pojawiły się już w ubiegłym roku i charakteryzują epitopy dla mleka i jajek. Jest to z całą pewnością nowy, bardzo interesujący kierunek badań, który otwiera nowe, obiecujące perspektywy poprawiające efektywność diagnostyczną u chorych z nadwrażliwością alergologiczną na pokarmy [16].

Podsumowanie

Korzyścią użycia diagnostyki komponentowej jest uzyskanie indywidualnego profilu immunologicznego uczulenia na alergeny u chorego, co umożliwi personalizację zaleceń dietetycznych oraz terapeutycznych z uwzględnieniem konkretnego modelu uczulenia. Zastosowanie testów umożliwiających diagnostykę poszczególnych białek, zwiększa czułość i swoistość w porównaniu do konwencjonalnych metod oznaczania IgE wobec ekstraktów alergenowych, który jest mieszaniną wielu białek. Należy jednak zaznaczyć, że wszystkie wyniki badań, zarówno dla molekuł, jak i ekstraktów alergenowych są klinicznie istotne jeśli korespondują z objawami. Diagnostyka molekularna alergii jest obecnie traktowana jako trzeci etap postępowania diagnostycznego wobec pacjenta, u którego wyniki uzyskane w ramach pierwszego (analiza kliniczna historii choroby) oraz drugiego etapu (ocena IgE w oparciu o ekstrakty alergenowe) były niewystarczające. Diagnostyka molekularna jest nową, kompleksową procedurą, która niebawem będzie stanowić standardowe narzędzie diagnostyczne w pracy alergologa. W moim przekonaniu potrzebne są programy edukacyjne dla alergologów na temat diagnostyki molekularnej alergii. ■

Prace nadesłano
28.08.2017
Zaakceptowano do
druku 29.08.2017

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

Piśmiennictwo: 1. Valenta R., Lidholm J., Niederberger V. et al: The recombinant allergen-based concept of component resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1998;29:865-1007 2. Bartuzi Z.: Molekularne cechy alergenów pokarmowych. *Post Dermatol Alergol* 2009; XXVI, 5: 310-312 3. Bartuzi Z.: Nowe spojrzenie na alergeny pokarmowe. *Alergia*, 2011; 2: 31-37 4. Ahrens B., Lopes de Oliveira L.C., Grabenhenrich L.: Individual cow's milk allergens as prognostic markers for tolerance development? *Clin. Exp. Allergy*, 2012; 42: 1630-1637 5. Alessandri C., Zennaro D., Scala E.: Ovomuroid (Gal d 1) IgE detected by microarray system predict tolerability to boiled hen's egg and an increased risk to progress to multiple environmental allergen sensitisation. *Clin. Exp Allergy*, 2012; 42: 441-450 6. Allergen Nomenclature. www.allergen.org (06.04.2014) 7. Ando H., Moverare R., Kondo Y.: Utility of ovomucoid-IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008; 122: 583-588 8. Asero R.: Tomato allergy: clinical features and usefulness of current routinely available diagnostic methods. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2013; 23: 37-42 9. D'Urbano L.E., Pellegrino K., Artesani M.C.: Performance of a component-based allergen-microarray in the diagnosis of cow's milk and hen's egg allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 2010; 40: 1561-1570 10. Bartuzi Z.: Alergia na pokarmy. *Mediton*. 2006 11. Bartuzi Z., Cocco R., Muraro A., Nowak-Węgrzyn A.: Contribution of molecular allergen analysis in diagnosis of milk allergy. *Cur Allergy Asthma Rep*. 2017;17:46 12. Savage J, Sicherer S, Wood R. The natural history of food allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(2):196-203. 13. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI molecular allergology user's guide. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(Suppl 23):1-250. The most comprehensive resource for molecular allergen analysis to date, addressing both food and inhalant allergens. 14. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. 2014;69(8):1008-25. The official guidelines of EAACI addressing the diagnosis of food allergy. 15. Sampson HA, Aceves S, Bock SA, James J, Jones S, Lang D, et al. Food allergy: a practice parameter update—2014. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1016-25 e43. The current AAAAI practice parameter for food allergy addressing the diagnosis of food allergy. 16. Hiroaki Matsuo: Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International* 2015;64:332-343