



Korzyści wynikające z zastosowania metod molekularnych in vitro w diagnostyce IgE-zależnych chorób alergicznych

Benefits of application of in vitro molecular methods in the diagnosis of IgE-dependent allergic diseases

S U M M A R Y

In vitro allergy diagnostics has been developing rapidly for several years. This mainly due to great progress that has been made in the field of allergen synthesis, isolation and characterization. Application of in vitro allergy diagnosis based on assessment of IgE reactivity to individual allergen components allows for better identification of the main allergenic source and demonstration of mechanisms involved in cross-reactivity. The method can help in better selection of candidates for allergen immunotherapy.

Ostatnie lata przyniosły szybki rozwój metody diagnostyki alergologicznej in vitro. Spowodowane jest to w dużej mierze postępowaniem w dziedzinie syntezy, izolacji i charakteryzacji alergenów. Zastosowanie diagnostyki in vitro w oparciu o ocenę stężenia IgE wobec pojedynczych komponentów alergenowych pozwala na lepszą identyfikację głównych źródeł alergenowych i wykazanie mechanizmów reakcji krzyżowych. Metoda ta może być również pomocna w kwalifikacji chorych do immunoterapii alergenowej.

Kowal K.: Korzyści wynikające z zastosowania metod molekularnych in vitro w diagnostyce IgE-zależnych chorób alergicznych. *Alergia*, 2018, 1; 11-14

Choroby alergiczne zależne od immunoglobuliny E (IgE) takie jak alergiczny nieżyt nosa, zapalenia spojówek, astma alergiczna, alergie pokarmowe, alergie na jady owadów czy anafilaksja występują w krajach uprzemysłowionych u przeszło 20% osób z ogólnej populacji. Diagnostyka chorób, u podłoża których leży natychmiastowa reakcja nadwrażliwości, opiera się na wykazaniu powiązania pomiędzy występującymi objawami klinicznymi a obecnością alergenowo-swoistych IgE (sIgE). W celu wykazania obecności sIgE stosuje się metody in vivo i in vitro. W praktyce klinicznej najczęściej stosowaną metodą in vivo są testy skórne punktowe oraz rzadziej testy śródskórne. W wyniku indukowanej alergenem IgE-zależnej degranulacji komórek tucznych dochodzi do reakcji skórnej o typie bąbel i rumień.

Pomimo szeregu zalet metody in vivo charakteryzuje również szereg wad, a do głównych należą uzależnienie wyników od reaktywności skóry oraz od jakości ekstraktu stosowanego do testów.

Rozwijające się sposoby izolacji natywnych alergenów jak i możliwości syntetyzowania białek będących alergenami przy użyciu metod genetycznych stanowią nowe źródła sub-

stancji stosowanych w testach diagnostycznych. Jednakże, zastosowanie takich nowo uzyskanych materiałów do diagnostyki in vivo musi być poprzedzone wykonaniem szeregu badań pokazujących bezpieczeństwo ich stosowania u ludzi. Takie postępowanie znacznie wydłużyłoby możliwość wdrożenia do diagnostyki alergologicznej poszczególnych alergenów, których poznano już dzisiaj przeszło 3000, nie licząc ich poszczególnych odmian. Natomiast zastosowanie powyższych substancji w badaniach in vitro, które pozwalają na wykrycie obecności sIgE w surowicy badanych osób może odbywać się w zasadzie bez ograniczeń.

Obecnie do wykrywania obecności sIgE w surowicy stosowane są przede wszystkim testy oparte na metodach immunoenzymatycznych, w których ekstrakt alergenowy/ alergen związany jest z fazą stałą. Obecne w surowicy przeciwciała rozpoznające dane białka wiążą się z nimi, a po usunięciu niezwiązanych elementów surowicy IgE rozpoznawane jest przy użyciu znakowanych przeciwciał. Po dokładnym wypłukaniu niezwiązanych przeciwciał i dodaniu odpowiedniego substratu intensywność reakcji barwnej jest oceniana kolorymetrycznie, a stężenie sIgE w badanej surowicy jest proporcjonalne do intensywności zabarwienia.



Prof. dr hab. n. med.
Krzysztof Kowal

Poradnia Alergologiczna
Uniwersytecki Szpital
Kliniczny i
Zakład Alergologii
i Immunologii
Doświadczalnej
UM w Białymstoku

Słowa kluczowe:

IgE, diagnostyka molekularna, alergen

Key words:

IgE, molecular diagnostics, allergen



DIAGNOSTYKA

Ocena stężenia sIgE za pomocą testów immunoenzymatycznych w diagnostyce chorób alergicznych charakteryzują liczne korzyści:

1. Nie stwarza ryzyka anafilaksji, szczególnie jeśli chodzi o diagnostykę reakcji anafilaktycznych na leki czy pokarmy.
2. Może być wykonywana u chorych przyjmujących leki blokujące reakcję skórą takich jak leki przeciwhistaminowe czy przeciwpsychotyczne jak również w sytuacjach, gdy stosowane leki mogą zwiększyć ryzyko ciężkiej anafilaksji lub utrudnić postępowanie w przypadku wystąpienia anafilaksji (β-blokery i inhibitory enzymu konwertującego).
3. Może być wykonywana u chorych z rozległymi zmianami skórnymi oraz wkrótce po przebytej reakcji anafilaktycznej, czy też po intensywnej ekspozycji skóry na promieniowanie UV czyli w sytuacjach gdy wykonanie testów skórnych nie umożliwi uzyskania wiarygodnych wyników.
4. Pozwala na zastosowanie nowych ekstraktów alergenowych oraz pojedynczych białek, w tym białek rekombinowanych czy modyfikowanych.

izolowane z ekstraktów źródeł alergenowych, czyli białka natywne np. alergen główny roztocza Dermatophagoides pteronyssinus nDer p 1 jak również białka uzyskane na drodze inżynierii genetycznej czyli alergeny rekombinowane (ang. recombinant allergens) np. alergen główny brzozy rBet v 1.

Korzyścią z zastosowania białek rekombinowanych jest ich całkowita homogenność, podczas gdy białka izolowane z ekstraktów poszczególnych źródeł alergenowych zazwyczaj stanowią mieszaniny izoalergenów.

Warto podkreślić, iż większość badań dotyczących poznania szczegółów sposobu wiązania IgE z poszczególnymi alergenami prowadzona przy pomocy techniki krystalografii odbywa się w oparciu o alergeny rekombinowane. Dzieje się tak min. dlatego, iż techniki inżynierii genetycznej pozwalają na uzyskanie dużych ilości homogennych białek.

Bardzo istotną kwestią w diagnostyce molekularnej jest

również jakość testu z którego korzystamy. Na rynku testów wieloparametrowych są obecne testy: półilościowe i ilościowe. W wyborze testu należy brać pod uwagę jego parametry w tym czułość i swoistość.

Nowoczesne metody, w których poszczególne alergeny rozmieszczone są na fazie stałej np. w kształ-

cie paska umożliwiają jednoczesną ocenę stężenia sIgE wobec poszczególnych białek głównych źródeł alergenowych np. wobec poszczególnych alergenów pyłków brzozy Bet v 1, Bet v 2 (profilina), i Bet v 4 (polkalcyna).

Metody te nazywane są powszechnie diagnostyką w oparciu o komponenty alergenowe (ang. component resolved diagnosis – CRD), gdzie poszczególne białka nazwane są komponentami w odróżnieniu od ekstraktów z poszczególnych źródeł alergenowych np. pyłku brzozy, które tradycyjnie nazywane były „alergenami”. Należy jednak podkreślić, iż z punktu widzenia naukowego alergenem jest każde pojedyncze białko, które indukuje syntezę IgE, a następnie wyzwała odpowiedź kliniczną u uprzednio uczulonych osób.

Zwykle organizm chorych na choroby alergiczne wytwarza co najmniej kilka różnych klonów IgE, wiążących dane białko w różnych miejscach. Miejsce na powierzchni alergenu z którym wiąże się pojedynczy klon IgE nazywa się epitopem.

Reakcja IgE-zależna na galaktozo-alfa-1,3-galaktozę

Powszechnie stosowane testy w diagnostyce komponentowej umożliwiają również ocenę obecności sIgE wobec reagujących krzyżowo determinant węglowodanowych (ang. cross-reacting carbohydrate determinants - CCD). Obecność sIgE wobec CCD ma zwykle bardzo niewielkie znaczenie kliniczne, natomiast może w istotny sposób wpływać na wyniki



1
Ryc.

Ocena komponentów alergenowych u pacjenta z dodatnimi testami skórnymi na brzozy i tymotkę łąkową

Alergeny	klasa	IgE [kU/l]	0	1	2	3	4 + 5
			0.15	0.35	0.7	3.5	17.5
g06 Tymotka łąkowa	6	>100					
g205 rPhl p1	6	>100					
g215 rPhl p5	6	>100					
t03 Pylek brzozy	6	>100					
t215 rBet v1	0	0.25	<input type="checkbox"/>				
t216 rBet v2	6	>100					

5. Umożliwia szybką ocenę uczulenia na duży zakres alergenów.

Dostępne testy pozwalają na ocenę sIgE wobec alergenów:

- wziewnych • pokarmowych • lateksu • niektórych leków • jądów owadów błonkoskrzydłych

Stosowane są obecnie dwa rodzaje testów: skierowane na wykrycie jednego rodzaju sIgE (singleplex) oraz na wykrywanie różnych sIgE (multiplex) umożliwiające oznaczanie sIgE skierowanych wobec przeszło 2 komponentom alergenowym. Jako alergeny stosuje się ekstrakty z poszczególnych źródeł alergenowych np. ekstrakt pyłku tymotki (G6) lub poszczególne białka np. główny alergen pyłku brzozy należący do grupy PR-10 (Bet v 1). W testach stosowane są zarówno pojedyncze alergeny

2
Ryc.

Opis alergenu alpha-Gal z systemu CDRS PRO FABER

Nazwa zwyczajowa alergenu: **alpha-Gal Marker**

Nazwa testu: **Bos d CA**; Wartość IgE: **1.00**

Komentarz: Wskaźnikiem reaktywności wobec węglowodanów glikoprotein ssaków występujących w wielu różnych tkankach. Gdy jest dodatni może być powiązany z dodatnimi wynikami innych uczulających glikoprotein ssaków; Może powodować silne reakcje po spożyciu czerwonego mięsa. Powoduje reakcje po podaniu niektórych leków biologicznych.



testów wobec alergenów, które są glikoproteinami. Do znanych klinicznie istotnych zespołów zależnych od CCD należy reakcja IgE-zależna na galaktozo-alfa-1,3-galaktozę. Objawia się jako reakcja anafilaktyczna po zjedzeniu czerwonego mięsa. Pierwotne uczulenie zależne jest od wprowadzonych do organizmu ludzkiego substancji zawierającej galaktozo-alfa-1,3-galaktozę przez niektóre gatunki kleszczy.

Taka ocena jest pomocna w podejmowaniu decyzji co do dalszego procesu diagnostycznego u chorych z objawami nietolerancji pokarmowych.

Ad 2. Analiza uczulenia na poszczególne komponenty alergenowe pozwala wskazać potencjalne źródło uczulenia.



3 Ryc. Ocena komponentów alergenowych u osób z dodatnimi testami na orzeszki ziemne. Osoba u której wykazano rzeczywiste uczulenie na swoiste alergeny orzeszków Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, które wykazują się wysoką stabilnością i są odpowiedzialne za ciężkie reakcje anafilaktyczne.

Alergeny	klasa	IgE [kU/l]					
		0.15	0.35	0.7	3.5	17.5	100
f13 Orzech ziemny	6	>100					
f422 Ara h 1	6	>100					
f423 Ara h2	6	>100					
f424 Ara h3	6	>100					
f352 Ara h8	0	<0.15					
f427 Ara h9	0	<0.15					

Znaczenie kliniczne sIgE białek alergogennych

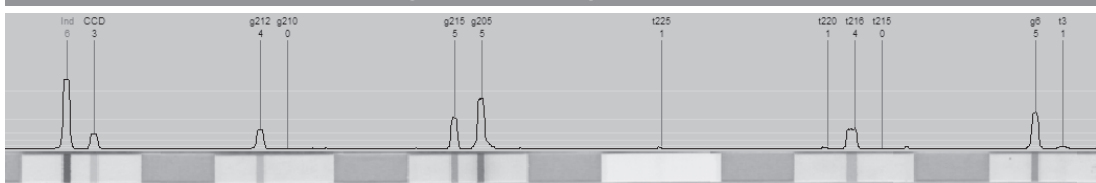
Ocena stężenia sIgE wobec poszczególnych białek alergenowych (komponentów) może być przydatna w ocenie:

1. ryzyka ciężkich reakcji anafilaktycznych
2. pierwotnego źródła uczulenia
3. krzyżowych reakcji pomiędzy poszczególnymi źródłami alergenowymi

Ad 1. Dodatkowo odczyn testów skórnych z obecnie stosowanymi ekstraktami alergenowymi pozwalają ustalić obecność sIgE wobec mieszaniny białek obecnych w danym źródle alergenowym. Nie można natomiast stwierdzić wobec którego konkretnie białka organizm wytwarza sIgE. Jest to o tyle istotne, iż poszczególne białka alergenowe różnią się stabilnością, a co za tym idzie mają różne znaczenie kliniczne. Jako przykład może posłużyć uczulenie na orzeszki ziemne. Wynik dodatniego testu, czy ocena stężenia sIgE wobec mieszaniny białek orzeszków ziemnych nie pozwala na jasną interpretację co do ryzyka reakcji anafilaktycznej. Spektrum reakcji alergicznych na orzeszki ziemne

U chorych z dodatnimi testami na mieszanki alergenów traw i brzozy analiza reakcji na poszczególne komponenty może wskazać na źródło uczulenia pokazując obecność sIgE wobec alergenów swoistych dla jednego ze źródeł alergenowych i obecność krzyżowo reagujących alergenów, które odpowiadają za dodatnie testy z ekstraktami drugiego źródła alergenowego np. obecność sIgE wobec profilin. Jako przykład można wskazać osobę, u której dodatnie testy na ekstrakt pyłków brzozy warunkowany jest krzyżowym

4 Ryc. Wyniki oceny komponentów alergenowych u osoby z dodatnimi testami skórnymi na ekstrakty pyłków traw i brzozy. t3-ekstrakt brzozy, t6-ekstrakt tymotki, t215- rBet v 1, t216 – rBet v 2, t220 – r Bet v 4, t225 – rBet v 6, g205 – rPhl p 1, g215 – rPhl p 5, g210 – rPhl p 7, g212 – rPhl p 12



może zależeć od obecności sIgE skierowanych przeciwko Ara h 5 czyli profilinie, czy też Ara h 8 czyli alergenowi z grupy homologów alergenu głównego brzozy (Bet v 1). Obecność sIgE wobec powyższych białek jest odpowiedzialne za stosunkowo częste dodatnie wyniki testów oceniających reaktywność wobec całych ekstraktów białek orzeszków ziemnych. Jednakże oba białka wykazują się dużą niestabilnością i dlatego ulegają bardzo szybko destrukcji. Wyklucza to w zasadzie możliwość uogólnionej reakcji anafilaktycznej. Natomiast wykazanie uczulenia na białka spichrzeniowe czyli Ara h 1, Ara h 2 czy Ara h 3, które cechuje wysoka stabilność struktury trzecio- i czwarto-rzędowej wiąże się z dużym ryzykiem anafilaksji.

uczuleniu na profilinę (Rycina 4). Głównym źródłem alergenowym jest pyłek traw gdyż wykazano wysokie stężenia sIgE wobec swoistych alergenów traw Phl p 1 i Phl p 5, natomiast nie stwierdzono uczulenia na główny alergen brzozy Bet v 1. Natomiast dodatnią reakcją uzyskano zarówno z profiliną tymotki jak i brzozy. Występowanie sIgE wobec jednej profiliny np. pyłku tymotki warunkuje w zasadzie reaktywność wobec wszystkich innych profilin pochodzących nawet ze stosunkowo luźno spokrewnionych roślin. Nasilenie reakcji wobec poszczególnych profilin wydaje się odzwierciedlać podobieństwo strukturalne poszczególnych białek, a nie ekspozycję na te białka.

Warto podkreślić, iż za pomocą analizy obecności sIgE skierowanych przeciwko poszczególnym alergenom pokarmowym można z dużym prawdopodobieństwem potwierdzić lub wykluczyć alergiczne tło w przypadku występowania objawów nietolerancji konkretnych pokarmów.

Ad 3 Dzięki analizie profilu sIgE wobec poszczególnych komponentów alergenowych można wyjaśnić krzyżowe reakcje między alergenami wziewnymi i pokarmowymi. Klasycznym przykładem jest wykazanie uczulenia na tropomiozynę (Der p 10) u osoby uczulonej na roztocza kurzu domowego. Występuje ono u kilkunastu procent chorych uczulonych na roztocza kurzu domowego i warunkuje występowanie reakcji anafilaktycznej

**Prace nadesłano 12.04.2018
Zaakceptowano do druku 24.04.2018**
Konflikt interesów nie występuje. Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.



DIAGNOSTYKA

po zjedzeniu owoców morza np. krewetek. Związane jest to z dużym podobieństwem Der p 10 z Pen a 1 czyli głównym alergenem krewetek.

2 Ryc.

Opis alergenu Der p 10 z systemu CDRS PRO – FABER wraz z informacją o reakcjach krzyżowych z innymi molekułami

Nazwa zwyczajowa alergenu: **Mites, Group 10**

Nazwa testu: **Der p 10**; Wartość IgE: **1.00**

Komentarz: Grupy alergenów należących do rodziny tropomiozyn. Wdychanie może spowodować objawy, takie jak nieżyt nosa.

Brak dostępnych innych molekuł z tej samej grupy na teście.

czy chcesz zobaczyć listę znanych alergizujących molekuł należących do tej grupy?
Kliknij tutaj

Nazwa zwyczajowa alergenu: **Tropomyosin**

Nazwa testu: **Der p 10**; Wartość IgE: **1.00**

Komentarz: Grupa białek mięśniowych stawonogów; Są one obecne w skorupiakach, morskich i lądowych mięczakach, owadach i roztoczech; w zależności od drogi narażenia, dodatni wynik dla jednego z tych alergenów rzadko związany jest z łagodnymi objawami po spożyciu (świąd w jamie ustnej), objawami jelitowymi lub skórными; często powoduje silne reakcje anafilaktyczne; wdychanie tego alergenu może powodować objawy ze strony dróg oddechowych, takie jak astma i nieżyt nosa. Ten alergen jest odporny na gotowanie.

Inne molekuły z tej samej grupy są dostępne na teście:

Ani s 3	Wartość IgE: 1.00
Hel as 1	Wartość IgE: 1.00
Per a 7	Wartość IgE: 1.00
Lit v 1	Wartość IgE: 1.00
Ven ga 1	Wartość IgE: 1.00
Uro du 1	Wartość IgE: 1.00

Poznanie dokładnego profilu uczulenia na poszczególne komponenty alergenu może pomóc w selekcji chorych, którzy powinni wykazywać dobry efekt immunoterapii alergicznej. Osoby, u których stwierdzano obecność sIgE wobec alergenów głównych i brak sIgE wobec alergenów pozostałych danego źródła alergenu np. jedynie wobec Bet v 1 i brak wobec Bet v 2 czy Bet v 4, wskazuje na duże prawdopodobieństwo dobrej skuteczności immunoterapii alergicznej.

Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, iż ekstrakty alergiczne stosowane w immunoterapii są standaryzowane w odniesieniu do zawartości alergenów głównych, ale nie pozostałych białek.

- Dlatego też obecność sIgE skierowanych wobec szerokiego spektrum alergenów danego źródła alergenu, w tym wobec alergenów reagujących krzyżowo przemawia za mniejszymi szansami powodzenia immunoterapii alergicznej.
- Natomiast wykazanie obecności sIgE wobec rzadszych alergenów i braku sIgE wobec alergenów głównych stanowi czynnik predykcyjny braku skuteczności immunoterapii alergicznej.
- Podobnie wykazanie wysokiego stężenia sIgE wobec CCD może być odpowiedzialne za krzyżową reakcję z alergenami, które są glikoproteinami. Taka sytuacja może powodować błędną ocenę przy kwalifikacji do immunoterapii alergicznej.

Warto jednakże podkreślić, iż za pomocą testów można wykazać jedynie uczulenie (ang. sensitization) na poszczególne ekstrakty czy białka. Natomiast, o znaczeniu klinicznym poszczególnych wyników musi decydować lekarz w oparciu o typowy obraz kliniczny, badanie fizykalne oraz powiązania danych klinicznych z wynikami testów.

Piśmiennictwo: 1. Becker S, Schleder T, Kramer MF, Haack M, Vrtala S, Resch Y, Lupinek C, Valenta R, Gröger M. Real-Life Study for the Diagnosis of House Dust Mite Allergy - The Value of Recombinant Allergen-Based IgE Serology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170:132-7. 2. Borres MP, Maruyama N, Sato S, Ebisawa M. Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy. *Allergol Int.* 2016;65:378-387. 3. Casset A, Khayath N, de Blay F. How In Vitro Assays Contribute to Allergy Diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16:82. 4. di Coste A, Occasi F, De Castro G, Zicari AM, Galandrini R, Giuffrida A, Indimmo L, Duse M. Predictivity of clinical efficacy of sublingual immunotherapy (SLIT) based on sensitization pattern to molecular allergens in children with allergic rhinoconjunctivitis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2017 ;45:452-456. 5. Gupta M, Cox A, Nowak-Węgrzyn A, Wang J. Diagnosis of Food Allergy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2018;38:39-52. 6. Homann A, Schramm G, Jappe U. Glycans and glycan-specific IgE in clinical and molecular allergology: Sensitization, diagnostics, and clinical symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:356-368. 7. Kowal K, DuBuske LM. Overview of in vitro allergy tests. *Feldwag AM, ed. UpToDate.* Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on April 02, 2018). 8. Kowal K, DuBuske LM. Overview of skin testing for allergic disease. *Feldwag AM, ed. UpToDate.* Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on April 02, 2018). 9. Martínez-Cañavate Burgos A, Torres-Borrego J, Molina Terán AB, Corzo JL, García BE, Rodríguez Pacheco R, Moreno Aguilar C, Dávila I. Molecular sensitization patterns and influence of molecular diagnosis in immunotherapy prescription in children sensitized to both grass and olive pollen. *Pediatr Allergy Immunol.* 2018 Jan 25. doi: 10.1111/pai.12866. 10. Martín-Serrano A, Barbero N, Agundez JA, Vida Y, Perez-Iñestrosa E, Montañez MI. New Advances in the Study of IgE Drug Recognition. *Curr Pharm Des.* 2016;22:6759-6772. 11. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int.* 2015;64:332-43. 12. Melioli G, Savi E, Crivellaro MA, Passalacqua G. Potential of molecular based diagnostics and its impact on allergen immunotherapy. *Asthma Res Pract.* 2016 Jun 2;2:9. eCollection 2016. 13. Mueller GA. Contributions and Future Directions for Structural Biology in the Study of Allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;174:57-66. 14. Offermann LR, Schlachter CR, Perdue ML, Majorek KA, He JZ, Booth WT, Garrett J, Kowal K, Chruszcz M. Structural, Functional, and Immunological Characterization of Profilin Panallergens Amb a 8, Art v 4, and Bet v 2. *J Biol Chem.* 2016;291:15447-59. 15. Tscheppe A, Breiteneder H. Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;172:187-202. 16. Villalta D, Tonutti E, Bizzaro N, Brusca I, Sargentini V, Asero R, Bilo MB, Manzotti G, Murrilli F, Cecchi L, Musarra A. Recommendations for the use of molecular diagnostics in the diagnosis of allergic diseases. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2018;50:51-58.

ALERGIA

START WYDAWNICTWO ▾ ARTYKUŁY ▾ SZUKAJ



Szukaj nas pod adresem:
www.alergia.org.pl