

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

*ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΛΟΓΙΑΣ –
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΛΟΓΙΑΣ*

ΑΝΔΡΕΑΣ ΦΡΕΤΖΑΓΙΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΠΥΡΙΔΗΣ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΤΖΟΥΜΑΚΑ – ΜΠΑΚΟΥΛΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΡΟΥΣΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΑΝΔΡΕΑΣ ΦΡΕΤΖΑΓΙΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΠΥΡΙΔΗΣ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ

*ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΛΟΓΙΑΣ –
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΛΟΓΙΑΣ*

ΜΑΡΙΑ ΤΣΟΛΙΑ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ - ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΠΑΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ -ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑΣ

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλοί αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως».

(Νόμος 5343/32, άρθρ. 202 παρ. 2 και νόμος 1268/ 82, άρθρ. 50 παρ. 8)

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΕΔΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΟΥ ΜΕΛΕΤΙΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΝΤΙΠΡΟΕΔΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΟΥ ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΥ ΠΑΤΣΟΥΡΗ

Στους γονείς μου,

Χρήστο και Γεωργία
Που μας ώθησαν από ένστικτο στα "γράμματα"
σε εποχές που άλλα προμηγύανε και άλλα δικαίωσαν.

Και στον αδελφό μου,

Γιώργο
άνθρωπο των "γραμμμάτων"
που με προσωπικό κόστος στάθηκε ακέραια στη θέση τους,
όταν έφυγαν από κοντά μας,
αφήνοντας σε εμένα ελεύθερο τον δρόμο των "γραμμμάτων"

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

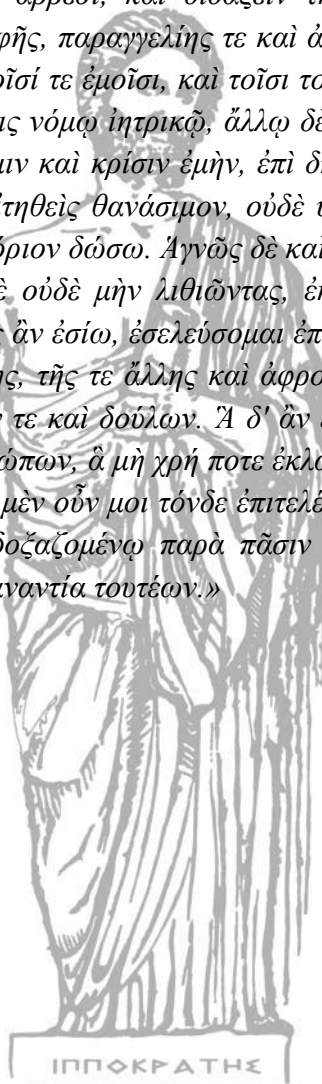
| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ..... | 4 |
| ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ..... | 5 |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... | 7 |
| ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ..... | 9 |
| <i>Μέλος σε Ελληνικές Εταιρείες και Ευρωπαϊκούς Οργανισμούς.....</i> | 9 |
| <i>Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά.....</i> | 9 |
| <i>Δημοσιευμένα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας:.....</i> | 12 |
| <i>Προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια.....</i> | 12 |
| <i>Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά.....</i> | 13 |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 14 |
| 1. ΑΛΛΕΡΓΙΑ..... | 15 |
| 1.1 Ιστορική Αναδρομή..... | 15 |
| 1.2 Η ορολογία της αλλεργίας στη Νέα Χιλιετία..... | 17 |
| 1.3 Οριοθετώντας την αλληλεπίδραση Υποκειμένου-Περιβάλλοντος..... | 17 |
| 1.4 Γενικοί Όροι..... | 18 |
| 1.5 Ειδικοί ορισμοί ανά νόσο..... | 20 |
| 1.6 Επιδημιολογικά δεδομένα..... | 25 |
| 2. ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΟ..... | 28 |
| 2.1 Τι κάνει ένα αλλεργιογόνο να είναι αλλεργιογόνο;..... | 28 |
| 2.2 Μείζονα – κύρια και ελάσσονα – δευτερεύοντα αλλεργιογόνα..... | 33 |
| 2.3 Ονοματολογία των αλλεργιογόνων..... | 34 |
| 2.4 Οικογένειες πρωτεϊνών – αλλεργιογόνων..... | 34 |
| 2.5 Μείζονες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης..... | 38 |
| 2.6 Μείζονες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης..... | 45 |
| 3. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ (recombinant) ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ..... | 50 |
| 3.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων..... | 55 |
| 3.2 Εφαρμογές και χρήση των ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων..... | 58 |
| 4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ..... | 61 |
| 4.1 In vivo διαγνωστικές μέθοδοι – ποιοτικοί – προσδιορισμού της ειδικής IgE..... | 63 |
| 4.2 In vitro διαγνωστικές μέθοδοι – ποσοτικοί προσδιορισμού ειδικής IgE..... | 65 |
| 4.3 Άλλες in vitro μέθοδοι προσδιορισμού ειδικής IgE..... | 67 |
| 4.4 In vivo ειδικές προκλήσεις..... | 67 |
| 5. ΕΙΔΙΚΗ ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ..... | 70 |
| 5.1 Τι είναι η ειδική στοιχειακή διάγνωση της αλλεργίας..... | 70 |
| 5.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ειδικής στοιχειακής διάγνωσης της Αλλεργίας..... | 73 |
| 5.3 Αιτιολογική προσέγγιση με την ειδική στοιχειακή διάγνωση της Αλλεργίας..... | 74 |
| ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 76 |
| 6. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 77 |
| 7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 78 |
| 8. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 79 |
| 8.1 Συγκέντρωση ασθενών..... | 79 |
| 8.2 Κριτήρια εισαγωγής των ασθενών στη μελέτη..... | 84 |
| 8.3 Κριτήρια αποκλεισμού των ασθενών από τη μελέτη..... | 84 |
| 8.4 Επιλογή των προς μελέτη ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων..... | 85 |
| 8.5 Χαρακτηριστικά των επιλεγέντων προς μελέτη ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων <i>μορίων.....</i> | 85 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| 9. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 96 |
| 10. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ..... | 102 |
| 11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 103 |
| 12. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 140 |
| 13. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 148 |
| 14. ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 150 |
| 15. ABSTRACT..... | 151 |
| 16. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 152 |

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

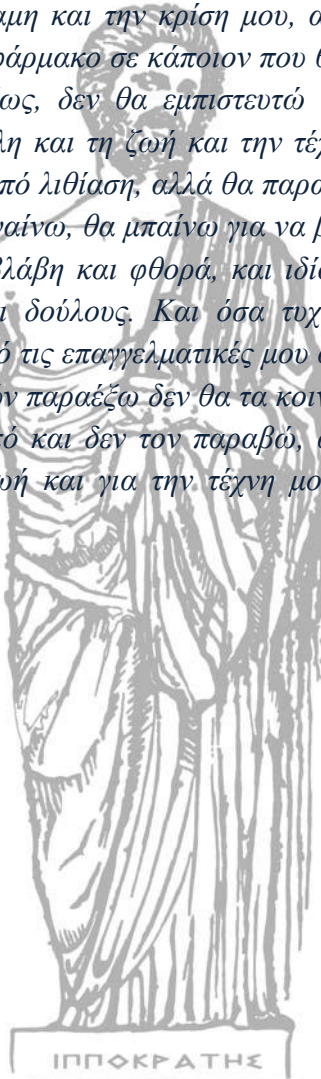
Αρχαίο κείμενο

«Ὁμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, Ἱστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ζυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μαθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ζυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ζυμβουλίην τοιήνδε. Ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνώως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρὴ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὁρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ζυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τούτέων.»



Απόδοση στα νέα ελληνικά

«Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνία του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.»



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Αλλεργία ή αλλεργική νόσος έχει καταστεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας στο ανεπτυγμένο «δυτικό» κόσμο, όπου η επίπτωση της έχει αυξηθεί δραματικά κατά τις τελευταίες δεκαετίες στο επίπεδο σήμερα του 20% ή και περισσότερο στο γενικό πληθυσμό. Από μία σπάνια εκδήλωση 40 ή 50 χρόνια πριν, η αλλεργία είναι σήμερα μια κοινή νόσος και επηρεάζει αρκετές πτυχές της οργάνωσης της κοινωνίας αλλά και τις ίδιες τις ζωές πολλών ανθρώπων.

Η ακριβής διάγνωση είναι σημαντική σε κάθε νόσημα. Συγχρόνως με τη λήψη του ιστορικού και την κλινική εκτίμηση, μια αντικειμενική μέθοδος για την ανίχνευση και μέτρηση των ειδικών IgE αντισωμάτων, τα οποία αποτελούν βασικό μεσολαβητή μεγάλου μέρους των αλλεργικών νοσημάτων, μπορεί να οδηγήσει στη βέλτιστη αντιμετώπισή τους. Γνωρίζοντας ποια επακριβώς αλλεργιογόνα μόρια – στοιχεία προκαλούν μια αλλεργική αντίδραση βοηθά τον ασθενή να αποφύγει την υπεύθυνη αλλεργιογόνο πηγή αλλά και άλλες πηγές που μπορεί να περιέχουν αλλεργιογόνα στοιχεία διασταυρούμενης αντίδρασης. Η γνώση αυτή οδηγεί σε καλύτερη ποιότητα ζωής για τον ασθενή.

Οι in vitro διαγνωστικές μέθοδοι στην IgE μεσολαβούμενη αλλεργία βασίζονται κλασσικά στη χρήση φυσικών εκχυλισμάτων από αλλεργιογόνες πηγές. Η σύνθεση του εκχυλίσματος και συνεπώς η παρουσία ή απουσία των υπεύθυνων αλλεργιογόνων μορίων μπορεί να ποικίλει εξαρτώμενη για παράδειγμα από τη διαδικασία εκχύλισης ή και τη γεωγραφική περιοχή προέλευσης της αλλεργιογόνου πηγής. Ειδικά γενετικά ανασυνδυασμένα (recombinant) αλλεργιογόνα μόρια, παραχθέντα σύμφωνα με καλώς προσδιορισμένες αναπαραγωγίμες μεθόδους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμπλουτισμό των κλασσικών εκχυλισμάτων, ως αυτόνομα αλλεργιογόνα μόρια αντιδραστήρια ή ως υβρίδια – μείγματα μορίων αντικαθιστώντας τα εκχυλίσματα και να καθορίσουν το ειδικό στοιχειακό αλλεργιογονικό προφίλ ενός ασθενούς με σκοπό την ακριβή διάγνωση και θεραπεία.

Η μόνη επιτυχής αντιμετώπιση της αλλεργικής νόσου έως και σήμερα παραμένει η ειδική ανοσοθεραπεία. Με την ειδική στοιχειακή διάγνωση δηλαδή τον καθορισμό του ειδικού στοιχειακού αλλεργιογονικού προφίλ ενός αλλεργικού ασθενούς, τα υπεύθυνα αλλεργιογόνα ταυτοποιούνται αλλά και η ειδική IgE αντιδραστικότητα παρακολουθείται με ακρίβεια κατά τη διάρκεια της ειδικής ανοσοθεραπείας. Στο μέλλον εκτιμάται ότι μπορεί να καταστεί δυνατή η εξατομίκευση της ειδικής ανοσοθεραπείας ώστε να περιλαμβάνει μόνον εκείνα τα αλλεργιογόνα μόρια – στοιχεία των αλλεργιογόνων πηγών στα οποία ο ασθενής είναι ευαισθητοποιημένος προκειμένου να επιχειρείται και να επιτυγχάνεται η μέγιστη αποτελεσματικότητα της.

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της εφαρμογής ειδικής στοιχειακής διάγνωσης, με χρήση βασικών αλλεργιογόνων μορίων, αγρωστωδών, ακάρεων και ιχθύος, σε έλληνες αλλεργικούς ασθενείς.

Σε αυτό το σημείο κρίνω και αισθάνομαι επιτακτική την ανάγκη, να εκφράσω τις ευχαριστίες αλλά και την ευγνωμοσύνη μου σε εκείνους που συνετέλεσαν στην υλοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Πρώτα από όλους τη σεβαστή μου Καθηγήτρια κα Φωτεινή Σαζώνη – Παπαγεωργίου, Αν. Καθηγήτρια Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την επιμονή της στην επιστημονική αναγκαιότητα εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής και την εμπιστοσύνη για αυτό στο

πρόσωπο μου. Κυρίως την ευχαριστώ θερμά για την εμπνευσμένη διδασκαλία της, στη σπουδή, τη γνώση, την κλινική άσκηση και την ερευνητική προσέγγιση της Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, ιδιαίτερα δε του τόσο ενδιαφέροντος πεδίου της Παιδιατρικής Αλλεργιολογίας. Το φίλο και Καθηγητή μας, κ. Νίκο Παπαδόπουλο, Αν. Καθηγητή Αλλεργιολογίας – Παιδιατρικής Αλλεργιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου, με την ανάθεση προς διερεύνηση ενός δύσκολου και πρωτοποριακού θέματος Μοριακής Αλλεργιολογίας. Επίσης για την ουσιαστική του βοήθεια στην εκπόνηση της παρούσης διατριβής. Καθ' όλη τη διάρκεια της επέτυχε με υπομονή, επιμονή, συνεχή καθοδήγηση και έμπνευση αλλά και σταθερή απαίτηση αποτελέσματος την επίτευξη της ολοκλήρωσής της. Τον ευχαριστώ θερμά για όσα με δίδαξε σ' όλη αυτή την προσπάθεια, κρατώντας ως ακαδημαϊκή προσωπικότητα τη θαυμαστή για μένα ισορροπία, του φίλου και του Καθηγητή του αντικειμένου.

Τους αγαπητούς συναδέλφους και φίλους Αλλεργιολόγους, κα Κωνσταντίνα Πίσκου, κα Σταυρούλα Γιαβή, κα Ειρήνη Ρουμπεδάκη, κο Γιώργο Κωνσταντίνου, κο Γιώργο Σταυρουλάκη, κο Δημήτρη Μήτσια, κο Σάββα Σαββατιανό και κο Μάνο Σιφναίο για την πολύτιμη συμβολή και την ομαδική δουλειά τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Τέλος τον αγαπητό Καθηγητή Rudolf Valenta και τους συνεργάτες του, Susan Vrtala (υπεύθυνη για το μόριο του ακάρεος), Birgit Linhart (υπεύθυνη για το μόριο του γρασιδιού, είδους Timothy), Ines Swoboda (υπεύθυνη για το μόριο του ψαριού), από το Αλλεργιολογικό Ερευνητικό Εργαστήριο Christian Doppler του Τμήματος Παθολογικής Ανοσολογίας, του Κέντρου Φυσιολογίας και Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Βιέννης, για την αμέριμη επιστημονικά και δεοντολογικά συνεργασία μας.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στα Τρίκαλα Θεσσαλίας στις 18/08/1964. Αποφοίτησα από το Λύκειο Σοφάδων Καρδίτσας το 1982 με βαθμό απολυτηρίου 18,8 (άριστα).

Εισήλθα κατόπιν επιτυχών εξετάσεων στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τον Ιούλιο του 1995 έλαβα το πτυχίο της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ με βαθμό Λίαν Καλώς.

Υπηρέτησα τη στρατιωτική μου θητεία ως οπλίτης ιατρός Μονάδας από 21/11/95 έως 03/06/97 στην 135^η Μοίρα Πεδινού Πυροβολικού στο Άργος Ορεστικό Καστοριάς.

Υπηρέτησα ως αγροτικός ιατρός στο Κ.Υ. Παλαμά Καρδίτσας από 06/10/97 έως 05/10/98.

Διορίσθηκα ως έμμισθος ειδικευόμενος ιατρός στη 2^η Παιδιατρική Κλινική του Γ.Π. Νοσοκομείου Παίδων Αθηνών "Π & Α Κυριακού" από 04/02/2000 έως 05/02/2002 για απόκτηση ειδικότητας Παιδιατρικής, που προαπαιτείται για την απόκτηση τίτλου ειδικότητας της Αλλεργιολογίας και Κλινικής Αλλεργιολογίας.

Διορίσθηκα ως έμμισθος ειδικευόμενος ιατρός στο Αλλεργιολογικό Τμήμα του Γ.Π. Νοσοκομείου Παίδων Αθηνών "Π & Α Κυριακού" από 16/05/2002 έως 05/06/2005 για την απόκτηση τίτλου ειδικότητας Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας.

Εργάσθηκα ως επιστημονικός συνεργάτης του Αλλεργιολογικού Τμήματος του Γ.Π. Νοσοκομείου Παίδων Αθηνών "Π & Α Κυριακού" από τη λήψη της ειδικότητάς της Αλλεργιολογίας 14/07/2005 έως 29/04/2007 ασκώντας ερευνητικό και κλινικό έργο.

Υπηρέτησα ως Επιμελητής Β' Αλλεργιολογίας επι θητεία στο Αλλεργιολογικό Τμήμα του Γ.Π. Νοσοκομείου Παίδων Αθηνών "Π & Α Κυριακού" από 29/04/2007 έως 29/03 2012.

Υπηρετώ ως μόνιμος Επιμελητής Β' Αλλεργιολογίας στην Μονάδα Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γ.Π. Νοσοκομείου Παίδων Αθηνών "Π & Α Κυριακού" από 29/03/2012 έως σήμερα.

Μέλος σε Ελληνικές Εταιρείες και Ευρωπαϊκούς Οργανισμούς

1. Ελληνική Εταιρία Αλλεργιολογίας και Κλινικής νοσολογίας (ΕΑΑΚΑ)
<http://www.allergy.org.gr>
2. European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)
<http://www.eaaci.org>

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

1. *Longitudinal assessment of immunological status and rate of immune recovery following treatment in children with ALL.*

Kosmidis S, Baka M, Bouhoutsou D, Doganis D, Kallergi C, Douladiris N, Pourtsidis A, Varvoutsis M, Saxoni-Papageorgiou F, Vasilatou-Kosmidis H.

Pediatr Blood Cancer. 2008 Mar;50(3):528-32

2. *Reintroduction of cow's milk in milk-allergic children: safety and risk factors.*
Vassilopoulou E, Konstantinou G, Kassimos D, **Douladiris N**, Xepapadaki P, Manoussakis E, Saxoni-Papageorgiou P, Papadopoulos NG.
Int Arch Allergy Immunol. 2008;146(2):156-61.
3. *Consumption of heat-treated egg by children allergic or sensitized to egg can affect the natural course of egg allergy: hypothesis-generating observations.*
Konstantinou GN, Giavi S, Kalobatsou A, Vassilopoulou E, **Douladiris N**, Saxoni-Papageorgiou P, Papadopoulos NG.
J Allergy Clin Immunol. 2008 Aug;122(2):414-5.
4. *Association of passive exposure of pregnant women to environmental tobacco smoke with asthma symptoms in children.*
Xepapadaki P, Manios Y, Liarigkovinos T, Grammatikaki E, **Douladiris N**, Kortsalioudaki C, Papadopoulos NG.
Pediatr Allergy Immunol. 2009 Aug;20(5):423-9.
5. *Evaluation and standardisation of different matrices used for double-blind placebo-controlled food challenges to fish.*
Vassilopoulou E, **Douladiris N**, Sakellariou A, Cortes SV, Sinaniotis A, Rivas MF, Papadopoulos NG.
J Hum Nutr Diet. 2010 Oct;23(5):544-9.
6. *Risk of allergic reactions to wine, in milk, egg and fish-allergic patients.*
Vassilopoulou E, Karathanos A, Siragakis G, Giavi S, Sinaniotis A, **Douladiris N**, Fernandez-Rivas M, Clausen M, Papadopoulos NG.
Clin Transl Allergy. 2011 Oct 17;1(1):10.
7. *A 5-year venom immunotherapy protocol with 50 µg maintenance dose: safety and efficacy in school children.*
Konstantinou GN, Manoussakis E, **Douladiris N**, Hatzioannou A, Giavi S, Saxoni-Papageorgiou P, Papadopoulos NG.
Pediatr Allergy Immunol. 2011 Jun;22(4):393-7.
8. *Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA.*
Papadopoulos NG, Agache I, Bavbek S, Bilo BM, Braido F, Cardona V, Custovic A, Demonchy J, Demoly P, Eigenmann P, Gayraud J, Grattan C, Heffler E, Hellings PW, Jutel M, Knol E, Lötvald J, Muraro A, Poulsen LK, Roberts G, Schmid-Grendelmeier P, Skevaki C, Triggiani M, Vanree R, Werfel T, Flood B, Palkonen S, Savli R, Allegri P, Annesi-Maesano I, Annunziato F, Antolin-Amerigo D, Apfelbacher C, Blanca M, Bogacka E, Bonadonna P, Bonini M, Boyman O, Brockow K, Burney P, Buters J, Butiene I, Calderon M, Cardell LO, Caubet JC, Celenk S, Cichocka-Jarosz E, Cingi C, Couto M, Dejong N, Del Giacco S, **Douladiris N**, Fassio F, Fauquert JL, Fernandez J,

Rivas MF, Ferrer M, Flohr C, Gardner J, Genuneit J, Gevaert P, Groblewska A, Hamelmann E, Hoffmann HJ, Hoffmann-Sommergruber K, Hovhannisyan L, Hox V, Jahnsen FL, Kalayci O, Kalpaklioglu AF, Kleine-Tebbe J, Konstantinou G, Kurowski M, Lau S, Lauener R, Lauerma A, Logan K, Magnan A, Makowska J, Makrinioti H, Mangina P, Manole F, Mari A, Mazon A, Mills C, Mingomataj E, Niggemann B, Nilsson G, Ollert M, O'Mahony L, O'Neil S, Pala G, Papi A, Passalacqua G, Perkin M, Pfaar O, Pitsios C, Quirce S, Raap U, Raulf-Heimsoth M, Rhyner C, Robson-Ansley P, Alves RR, Roje Z, Rondon C, Rudzeviciene O, Ruëff F, Rukhadze M, Rumi G, Sackesen C, Santos AF, Santucci A, Scharf C, Schmidt-Weber C, Schnyder B, Schwarze J, Senna G, Sergejeva S, Seys S, Siracusa A, Skypala I, Sokolowska M, Spertini F, Spiewak R, Sprickelman A, Sturm G, Swoboda I, Terreehorst I, Toskala E, Traidl-Hoffmann C, Venter C, Vlieg-Boerstra B, Whitacker P, Worm M, Xepapadaki P, Akdis CA. Clin Transl Allergy. 2012 Nov 2;2(1):21.

Δημοσιευμένα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας:

Προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

1. “Comparison of recombinant major fish allergen Cyp c 1.01 from carp and a hypoallergenic Cyp c 1.01 derivative by skin prick testing in fish allergic Greek children”
Douladiris N, Swoboda I, Spitzauer S, Vassilopoulou e, Saxoni – Papageorgiou F, Valenta R, Papadopoulos NG. In Proceedings of EAACI 2006 Congress.
2. “In vitro and in vivo characterisation of recombinant hypoallergenic derivatives of the major mite allergen Der p 2.
Chen KW, Fuchs G, Sonneck K, Gieras A, Swoboda I, **Douladiris N**, Linhart B, Jankovic M, Pavkov T, Keller W, Papadopoulos NG, Valent P, Valenta R, Vrtala S. In Proceedings of Clemens von Priquet – Symposium 2006, Vienna Austria.
3. “Comparison of in vivo allergenic activity of recombinant grass pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6) and a hybrid molecule consisting of their epitopes in grass pollen allergic children”
Douladiris N, Giavi S, Linhart B, Vrtala S, Konstantinou G, Paleologou N, Valenta R, Papadopoulos NG. In Proceedings of EAACI 2007 Congress.
4. “Pattern of in vivo allergenic activity of the major grass pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6) in grass pollen allergic greek children”
Douladiris N, Giavi S, Vrtala S, Linhart B, Konstantinou G, Swoboda I, Valenta R, Papadopoulos NG. In Proceedings of International Congress of Pediatrics 2007.
5. “A universal concept for the generation of hypoallergenic fish”
Swoboda I, Balic N, Spitzauer S, Neubauer A, Quirce S, **Douladiris N**, Papadopoulos NG, Valenta R. In Proceedings of Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum 2010.
6. “Fish hypersensitivity – are there safe alternatives”
Stavroulakis G, Giavi S, **Douladiris N**, Manousakis M, Papadopoulos NG. In Proceedings of EAACI 2011 Congress.
7. Comparison of in vivo allergenic activity of recombinant grass pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6) and a hybrid molecule consisting of their epitopes.
Douladiris N, Piskou K, Savvatianos S, Linhart B, Vrtala S, Sifneos M, Valenta R, Papadopoulos NG. In Proceedings of EAACI 2011 Congress.

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

1. *A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE – mediated fish allergy.*
Swoboda I, Bugajska – Schretter A, Linhart B, Verdino P, Keller W, Schulmeister U, Sperr WR, Valent P, Peltre G, Quirce S, **Douladiris N**, Papadopoulos NG, Valenta R, Spitzauer S. *J Immunol.* 2007 May 15;178(10):6290-6.
2. *Reduction of the in vivo allergenicity of Der p 2, the major house dust mite allergen, by genetic engineering.*
Chen KW, Fuchs G, Sonneck K, Gieras A, Swoboda I, **Douladiris N**, Linhart B, Jankovic M, Pavkov T, Keller W, Papadopoulos NG, Valent P, Valenta R, Vrtala S. *Mol Immunol.* 2008 May;45(9):2486-98.
3. *A general strategy for the generation of hypoallergenic molecules for immunotherapy of fish allergy.*
Swoboda I, Balic N, Spitzauer S, Neubauer A, Quirce S, **Douladiris N**, Papadopoulos NG, Valenta R.
J Allergy. Clin. Immunol – D-12-002273R In press
4. *A molecular diagnostic algorithm to guide pollen immunotherapy in Southern Europe: Towards Component-Resolved Management of allergic diseases*
Douladiris N, Savvatiianos S, Roumpedaki I, Skevaki C., Mitsias D, Papadopoulos N.
International Archives of Allergy and Immunology - No.: 201302017 Accepted for publication
5. *Comparison for clinical reactivity of recombinant major fish allergen Cyp c 1.01 from carp and a hypoallergenic Cyp c 1.01 derivative by skin prick and serology testing in fish allergic Greek children.*
Douladiris N, Linhart B, Stavroulakis G, Vasillopoulou A, Swoboda I, Valenta R, Papadopoulos NG. *Under preparation*
6. *Comparison of in vivo allergenic activity of recombinant grass pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6) and a hybrid molecule consisting of their epitopes by skin prick testing in grass pollen allergic children.*
Douladiris N, Piskou K, Savvatiianos S, Linhart B, Vrtala S, Sifnaios E, Valenta R, Papadopoulos NG. *Under preparation*

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΛΛΕΡΓΙΑ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Εκδηλώσεις «αλλεργίας» είναι γνωστές εδώ και αιώνες. Νόσοι, όπως το άσθμα, το έκζεμα και η κνίδωση έχουν περιγραφεί στην αρχαία λογοτεχνία της Κίνας, της Αιγύπτου και της Ελλάδας (Πίνακας 1). Σε ιερογλυφικά που χρονολογούνται 2.500 π.Χ περίπου, περιγράφεται ο θάνατος ενός Φαραώ μετά από τσίμπημα μέλισσας. Ο Όμηρος χρησιμοποιεί τη λέξη άσθμα στην Ιλιάδα, για να περιγράψει τη βαριά αναπνοή του Έκτορα μετά την εξαντλητική μάχη του με τον Αίαντα(1). Η πρώτη ιστορική αναφορά οικογένειας με «ατοπική συνδρομή» άσθματος, εκζέματος και ρινοεπιπεφυκίτιδας αφορούσε στο Ρωμαίο αυτοκράτορα Οκταβιανό Αύγουστο και στους απόγονους του Κλαύδιο και Μπριτάννικο(2). Το 2^ο και τον 6^ο περίπου αιώνα μ.Χ κάνουν την εμφάνισή τους στην ιατρική βιβλιογραφία οι όροι «άσθμα» και «έκζεμα» αντίστοιχα, ενώ στο μεσαίωνα η εποχική ρινοεπιπεφυκίτιδα ήταν ήδη γνωστή με το όνομα «πυρετός εκ ρόδου» (rose fever), που στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από τον όρο «πυρετός εκ χόρτου» (hay fever)(3). Σύμφωνα με τον Shakespeare, ο Ριχάρδος ο 3^{ος} εμφάνιζε κνιδωτικό εξάνθημα μετά από λήψη φράουλας(4). Το 1873 ο Blackley ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε δερματικές δοκιμασίες και προκλήσεις, για να αποδείξει την αιτιολογική συσχέτιση γύρεων και πυρετού εκ χόρτου(5).



Εικόνα 1

Το 1902, δύο Γάλλοι ιατροί, οι Portier και Richet ανακοίνωσαν την πρόκληση αναφυλακτικού shock μετά από ευαισθητοποίηση σε πειραματόζωα και εισήγαγαν τον όρο αναφυλαξία. Όπως γλαφυρά αναλύει ο Richet στην ομιλία του κατά την απονομή του βραβείου Nobel, χρησιμοποίησαν τον όρο «ανα + φύλαξις» για να εκφράσουν την κατάσταση εκείνη όπου ο οργανισμός αντί να προφυλάσσεται (μετά από διαδοχικές δόσεις ανοσοποίησης), αναπτύσσει έντονη αντίδραση υπερευαισθησίας(6). Ο όρος «αλλεργία» γεννήθηκε στις 24 Ιουλίου 1906 στη σελίδα 1.453 της εβδομαδιαίας ιατρικής επιθεώρησης του Μονάχου (Munhener Meizininische Wochenschrift) από το Βιεννέζο παιδίατρο Clemens Von Pirquet (Εικόνα 1). Προσπαθώντας να διαχωρίσει τις προστατευτικές από τις βλαπτικές αντιδράσεις του ανοσιακού συστήματος, ένωσε δύο ελληνικές λέξεις: τη λέξη «άλλος» και τη λέξη «έργο» δημιουργώντας το νεολογισμό «αλλεργία». Για τον «νονό» της, η αλλεργία ήταν ένα «άλλο» «έργο», δηλαδή μια ποιοτικά διαφορετική -από τη συνηθισμένη- αντίδραση του οργανισμού. Με την πάροδο του χρόνου, ο όρος απέκτησε ευρεία αποδοχή και έγινε ομπρέλα που καλύπτει πλήθος ετερογενών ιατρικών νοσημάτων.

Η ανάγκη διάκρισης του άσθματος, του εκζέματος και της ρινοεπιπεφυκίτιδας από τα υπόλοιπα αλλεργικά νοσήματα, όπως η αναφυλαξία και η ορονοσία, οδήγησε τον Αμερικανό ανοσολόγο Arthur Coca στην εισαγωγή του όρου «ατοπία»(7). Εμπνευσμένος, και αυτός, από την Αρχαία Ελληνική Γραμματεία χρησιμοποίησε την Ελληνική λέξη «τόπος» και το στερητικό «α», για να περιγράψει την «περίεργη/διαφορετική» αντίδραση σε μη βλαπτικούς παράγοντες, όπως οι τροφές και τα «αθώα» εισπνεόμενα αλλεργιογόνα. Θεωρούσε ως ατοπία, την κληρονομική προδιάθεση μιας (μικρής) ομάδας ασθενών, να αναπτύσσουν «ποιοτικά

ανώμαλη απάντηση» που εκδηλώνεται με την κλινική εικόνα του άσθματος και της ρινοεπιπεφυκίτιδας και συνοδεύεται από θετικές δερματικές δοκιμασίες.

Το πεδίο της αλλεργιολογίας, βαδίζοντας χέρι-χέρι με αυτό της ανοσολογίας, αναπτύχθηκε ταχύτατα τα τελευταία χρόνια. Η γνώση των ανοσολογικών μηχανισμών έριξε αρκετό φως στην αιτιοπαθογένεια των αλλεργικών νοσημάτων. Η κλασική κατάταξη των αντιδράσεων υπερευαισθησίας σε τέσσερις τύπους από τους Gell και Coombs το 1963 αποδείχτηκε ιδιαίτερα χρήσιμη και ανθεκτική στο πέρασμα του χρόνου(8). Παρ'όλες τις τροποποιήσεις και προσθήκες που έγιναν στην πορεία του χρόνου και παρά την έντονη κριτική που δέχεται σήμερα, εξακολουθεί να διατηρεί έναν εξαιρετικά εκπαιδευτικό χαρακτήρα.

Η ανακάλυψη της IgE από τους Ishizaka και Johanson το 1967 και η συσχέτισή της με τις αντιδράσεις υπερευαισθησίας τύπου I άλλαξε σε μεγάλο βαθμό την οπτική και την εξέλιξη της αλλεργιολογίας(9). Η ανεύρεση ή όχι ειδικών IgE αντισωμάτων, διχοτομεί τη σύγχρονη ορολογία σε IgE-μεσολαβούμενα και μη IgE-μεσολαβούμενα νοσήματα. Παρά τις αμφισβητήσεις, τις περιρρέουσες δικαιολογίες και τις διχογνωμίες, η IgE συνεχίζει να απολαμβάνει την απόλυτη πρωτοκαθεδρία της. Δεν είναι λίγες οι στιγμές που δίνεται η εντύπωση ότι η αλλεργιολογία θα ήθελε να αλλάξει το όνομά της σε «IgE-ολογία». Παρόλα αυτά δεν πρέπει να λησμονούμε ότι τα αλλεργικά νοσήματα περιλαμβάνουν πληθώρα από κλινικές οντότητες που δεν είναι IgE- μεσολαβούμενες.

Πίνακας 1: Ιστορικοί σταθμοί ονοματολογίας στην Αλλεργιολογία

| Έτος | Συγγραφέας | Νόσος |
|-------------|--|---|
| 2698 πΧ | Huang Ti | “Θορυβώδης αναπνοή» |
| 2641 πΧ | Άγνωστος (Ιερογλυφικά) | Θάνατος από νυγμό σφήκας |
| 800 πΧ | Όμηρος | Εμφάνιση της λέξης άσθμα |
| 120 | Αρεταίος ο Καπαδόκης | Ιατρικός ορισμός άσθματος |
| 600 | Αέτιος Αμιδινός | Όρος έκζεμα |
| 1565 | L. Bottalus | Rose fever |
| 1783 | P. Phoebus | Hay fever |
| 1872 | H.I Quinke | Αγγειοοίδημα |
| 1902 | Portier & Richet | Αναφυλαξία |
| 1906 | Von Pirquet | Αλλεργία |
| 1923 | Coca & Cooke | Ατοπία |
| 1968 | Gell & Coombs | Ταξινόμηση αντιδράσεων υπερευαισθησίας |
| 1968 | WHO International Reference centre for Immunoglobulins | Επίσημη ανακοίνωση της ανακάλυψης της IgE |

1.2 Η ορολογία της αλλεργίας στη Νέα Χιλιετία

Η Ευρωπαϊκή Ακαδημία Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (EAACI) και στη συνέχεια η Παγκόσμια Οργάνωση Αλλεργιολογίας (WAO) ξεκίνησαν στην απαρχή της νέας χιλιετιρίδας μια προσπάθεια να ορίσουν και να ταξινομήσουν τα αλλεργικά νοσήματα. Με την ελπίδα ότι θα σταματήσει η εννοιολογική σύγχυση κατά τη χρησιμοποίηση όρων, όπως αλλεργία, ατοπία, υπερευαισθησία κ.α. εξέδωσαν κατευθυντήριες οδηγίες(10, 11). Η σύνδεση των αλλεργικών νοσημάτων με παθοφυσιολογικούς αιτιολογικούς μηχανισμούς και παράλληλα η διατήρηση όρων που εισήχθησαν στην ιατρική ορολογία, αιώνες πριν την ανακάλυψη των μηχανισμών αυτών, καθιστούν το εγχείρημα ιδιαίτερα δύσκολο.

Το άσθμα και το έκζεμα είναι όροι που δεν προσδιορίζουν την αιτιολογία και την παθοφυσιολογία τους, αλλά περιγράφουν ένα σύνολο συμπτωμάτων που γίνονται κατανοητά σε άλλοτε άλλο βαθμό. Στην πορεία των χρόνων υπήρξαν περισσότερο εύστοχοι και «επιστημονικοί» ορισμοί, αλλά οι όροι αυτοί αποτελούν πλέον αναπόσπαστο κομμάτι της ιατρικής επιστήμης. Είναι προφανές, ότι οι όροι άσθμα και έκζεμα δεν πρόκειται να εξαφανιστούν από το ιατρικό λεξιλόγιο, επειδή εκτός των άλλων, δεν προκαλούν κανενός είδους λανθασμένη αντίληψη.

Αντίθετα, ιδιαίτερη δυσκολία παρουσιάζουν όροι όπως αλλεργία, ατοπία και ατοπική δερματίτιδα. Η εκτεταμένη χρησιμοποίησή τους, τις περισσότερες φορές με διαφορετικό ή λανθασμένο τρόπο καθιστά ιδιαίτερα δύσκολο τον επαναπροσδιορισμό της σημασίας τους ή την αντικατάστασή τους. Είναι εμφανές ότι το επίθετο «ατοπικός» πρέπει να έχει την ίδια σημασία με την έννοια της λέξης «ατοπία». Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει με σαφήνεια σήμερα.

Πρέπει να σημειωθεί επίσης, ότι η αλλεργιολογία είναι μια ειδικότητα που ασχολείται με πολλά διαφορετικά όργανα. Είναι φυσιολογικό λοιπόν να συναντιέται με ειδικότητες που επικεντρώνονται σε συγκεκριμένα όργανα (πχ. ΩΡΛ, οφθαλμολογία, πνευμονολογία). Αυτό αποτελεί μια επιπλέον δυσκολία-δικαιολογία στην καθολική αποδοχή της προτεινόμενης ορολογίας και στην εφαρμογή της, τόσο σε ερευνητικό όσο και κλινικό επίπεδο.

1.3 Οριοθετώντας την αλληλεπίδραση Υποκειμένου-Περιβάλλοντος

Στην κλινική πράξη οι αλλεργικές παθήσεις εκδηλώνονται με ποικιλία και ετερογένεια, αλλά κατά βάση αποτελούν μια αντίδραση του οργανισμού απέναντι στο περιβάλλον του. Ο τρόπος αντίδρασης εξαρτάται αφ' ενός από τον παράγοντα με τον οποίο έρχεται σε επαφή ο οργανισμός και αφ' ετέρου από τον τρόπο που ο ίδιος χειρίζεται την έκθεση αυτή. Στον παρακάτω Πίνακα 2 αποσαφηνίζονται οι όροι που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την αλληλεπίδραση οργανισμού- εξωγενών παραγόντων.

Πίνακας 2: Ορολογία

| Ορολογία | Ορισμοί |
|---------------------------|---|
| Ενυαισθητοποίηση | Ανάπτυξη IgE αντισωμάτων μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση |
| Τοξικότητα | Αναμενόμενη ζημιογόνος δράση, κυρίως δόσοεξαρτώμενη, μιας ουσίας |
| Δηλητηρίαση | Αντίδραση στη φαρμακολογική τοξικότητα |
| Υπερευαισθησία | Αναπαραγόμενη συμπτωματολογία μετά την έκθεση σε δεδομένο ερέθισμα (σε δόση ανεκτή από φυσιολογικά άτομα) |
| Δυσανεξία | Υπερευαισθησία στα πλαίσια φαρμακολογικής/μεταβολικής αντίδρασης-τοξικότητας |
| Ιδιοσυγκρασιακή αντίδραση | Υπερευαισθησία χωρίς ανοσολογικό μηχανισμό και χωρίς συσχέτιση με φαρμακολογική τοξικότητα |
| Αλλεργία | Αντίδραση υπερευαισθησίας που προκαλείται μέσω ειδικών ανοσολογικών μηχανισμών |

Κατά μία έννοια, η αλλεργία αποτελεί έναν από τους τρόπους που χειρίζεται ο οργανισμός ερεθίσματα του περιβάλλοντος και αποτελεί ένα κομμάτι των σχετιζόμενων με το περιβάλλον ιατρικών νοσημάτων.

1.4 Γενικοί Όροι

Ο μηχανισμός εκκίνησης της αντίδρασης που προκαλεί τα σημεία και τα συμπτώματα μιας αλλεργικής νόσου είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Επειδή παρόμοιες κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να προκαλούνται από διαφορετικούς μηχανισμούς, η κατανόησή τους, έχει εξαιρετική σημασία για τον ερευνητή, τον ιατρό και κατ' επέκταση τον ίδιο τον ασθενή. Λανθασμένη ταυτοποίηση των μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα, αδυναμία πρόληψης και αναποτελεσματική θεραπεία. Συνεπώς, η σύνδεση της χρησιμοποιούμενης ορολογίας με τον κινητήριο μηχανισμό της αντίδρασης θεωρείται επιτακτική.

Ο όρος Υπερευαισθησία πρέπει να χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αντικειμενικά αναπαραγόμενη συμπτωματολογία μετά την έκθεση σε δεδομένο ερέθισμα και σε δόση που είναι ανεκτή από φυσιολογικά άτομα.

Ο ορισμός είναι ευρύς - στα όριά του μπορεί να τοποθετήσει κανείς λοιμώξεις και αυτοάνοσες αντιδράσεις, των οποίων η διάκριση δεν είναι πάντα σαφής. Επίσης, οντότητες όπως «πολλαπλή χημική ενυαισθητοποίηση» και «καθολική φαρμακευτική αλλεργία» δεν πληρούν το

κριτήριο της ειδικότητας και ως εκ τούτου δεν ανήκουν στις αντιδράσεις υπερευαισθησίας(12).

Αλλεργία είναι μια αντίδραση υπερευαισθησίας που προκαλείται από ανοσολογικούς μηχανισμούς. Στην περίπτωση που έχουν αποδειχθεί άλλου τύπου μηχανισμοί (εκτός των ανοσολογικών), όπως για παράδειγμα στην υπερευαισθησία από ασπιρίνη(13), μπορεί να χρησιμοποιείται ο όρος μη αλλεργική υπερευαισθησία.

Τα αντιγόνα που διεγείρουν αντιδράσεις υπερευαισθησίας μέσω ανοσολογικών μηχανισμών (δηλαδή προκαλούν αλλεργία) ονομάζονται αλλεργιογόνα.

Με δεδομένο ότι πολλές αλλεργικές αντιδράσεις προκαλούνται από μηχανισμούς που εμπλέκουν την IgE, προτείνεται η διάκριση τους σε IgE μεσολαβούμενη και σε μη IgE μεσολαβούμενη αλλεργία. Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται παθήσεις που προκαλούνται από άλλους ισotύπους αντισωμάτων, όπως η ορονοσία, η αναφυλαξία από ανοσοσυμπλέγματα(14), οι πνευμονίτιδες εξ υπερευαισθησίας(15) αλλά και παθήσεις από αντιγονοειδικά T- λεμφοκύτταρα, όπως η δερματίτιδα εξ επαφής και πιθανώς μορφές του άσθματος, της ρινίτιδας και της δερματίτιδας.

Η απλουστευμένη αυτή διχοτόμηση των αλλεργικών παθήσεων είναι για πολλούς απλοϊκή! Όπως όλοι οι αρνητικοί ορισμοί, έτσι και ο όρος μη IgE μεσολαβούμενη αλλεργία συσσωρεύει απλά νόσους, χωρίς να δίνει καμία πληροφορία για την παθοφυσιολογία τους. Οι αντιρρήσεις γίνονται περισσότερο βάσιμες, αν αναλογιστούμε ότι πολλές από τις παθήσεις που ανήκουν στην κατηγορία αυτή διαθέτουν έναν καλά τεκμηριωμένο ανοσολογικό μηχανισμό. Ορισμένοι προτείνουν να γίνεται διαχωρισμός των αλλεργικών παθήσεων χρησιμοποιώντας την κατάταξη Gell & Coombs ή κάποιος αναλυτικότερος ανοσολογικός διαχωρισμός. Είναι γεγονός, για παράδειγμα, ότι η έκφραση μη IgE μεσολαβούμενη φαρμακευτική αλλεργία σημαίνει πολύ λιγότερα από την T-μεσολαβούμενη φαρμακευτική αλλεργία ή ακόμα χειρότερα, η έκφραση IgG-μεσολαβούμενη αιμολυτική αναιμία είναι πολύ καλύτερη από τη μη-IgE μεσολαβούμενη αιμολυτική αναιμία.

Ο όρος που έχει προκαλέσει ακόμη περισσότερες αμφισβητήσεις και καλύπτεται συχνά από πέπλο σύγχυσης, είναι η «ατοπία». Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ακαδημία Αλλεργιολογίας (EAACI) και τη Παγκόσμια Οργάνωση Αλλεργιολογίας (WAO), ως Ατοπία ορίζεται η ατομική ή οικογενής τάση, συνήθως κατά την παιδική ηλικία, για ευαισθητοποίηση και παραγωγή IgE αντισωμάτων, ως απάντηση στη συνήθη έκθεση σε αλλεργιογόνα, συνήθως πρωτεΐνες. Ως συνέπεια, τα άτομα αυτά μπορούν να αναπτύξουν τυπικά συμπτώματα άσθματος, ρινοεπιπεφυκίτιδας ή εκζέματος(11). Ο όρος ατοπία θα πρέπει να χρησιμοποιείται, για να περιγράψει τη γενετική προδιάθεση για παραγωγή IgE αντισωμάτων, εναντίον κοινών αλλεργιογόνων. Πρόκειται για περιβαλλοντικούς παράγοντες στους οποίους εκτίθενται όλοι, αλλά η πλειονότητα δεν παράγει IgE αντισώματα εναντίον τους. Με λίγα λόγια η ατοπία είναι ένας κλινικός ορισμός για τα άτομα που απαντούν με υπερπαραγωγή IgE. Από τον ορισμό είναι προφανές ότι, για να χρησιμοποιηθεί ο όρος ατοπία, πρέπει να έχει αποδειχθεί η ύπαρξη IgE αντισωμάτων είτε στον ορό, είτε με θετικές δερματικές δοκιμασίες. Αλλεργικά συμπτώματα σε ένα άτομο με ατοπία μπορούν να ονομάζονται ατοπικά πχ ατοπικό άσθμα, ατοπική ρινίτιδα, αν και θα πρέπει να σημειωθεί ότι, ιδιαίτερα στα παιδιά, η ύπαρξη ατοπίας αποτελεί περισσότερο παράγοντα κινδύνου επιμονής, παρά ικανή συνθήκη για πρόκληση συμπτωμάτων.

Η παρουσία IgE αντισωμάτων ή θετικών δερματικών δοκιμασιών σε λιγότερο συχνά αλλεργιογόνα, ειδικά αν υπάρχει έκθεση σε υψηλές δόσεις, δεν αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο ατοπίας. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η αλλεργία στο νυγμό υμενοπτέρων και στα φάρμακα που δεν αποτελούν ατοπικές νόσους.

Η απουσία ενός ισχυρού γενετικού δείκτη που θα μπορούσε να ορίσει με σαφήνεια την έννοια της ατοπίας, η δυναμική αλληλεπίδραση γονιδίων-περιβάλλοντος στη διάρκεια της ζωής, η μεταβολή της ικανότητας παραγωγής IgE από λοιμώξεις και ενδογενείς παράγοντες είναι μερικά μόνο από τα σημεία αμφισβήτησης του σημερινού ορισμού της ατοπίας. Δυστυχώς δεν υπάρχει ποσοτικό κατώφλι για να ορίσουμε κάποιο άτομο ως ατοπικό. Μία ασθενώς θετική δερματική δοκιμασία δια νυγμου (skin prick test), ή μια οριακά αυξημένη ειδική IgE είναι δείκτης ήπιας ατοπίας ή ένα ενοχλητικό artifact? Πόσο ευδιάκριτα μπορούμε να τραβήξουμε μια γραμμή και να χαρακτηρίσουμε κάποιον ως μη ατοπικό; Θα παίζει ρόλο η ηλικία του ατόμου στην απόφασή μας; Αρκετά παιδιά αναπτύσσουν θετικές δερματικές δοκιμασίες με την πάροδο του χρόνου, ενώ έχουν συμπτώματα αλλεργίας από τη βρεφική ηλικία. Αυτά τα παιδιά δε χαρακτηρίζονται από πριν ως ατοπικά, αλλά γίνονται ατοπικά στην ηλικία που θετικοποιούνται τα tests? Αντίθετα παιδιά που χάνουν τα συμπτώματα και την ευαισθητοποίησή τους σε κοινά (πχ. τροφικά) αλλεργιογόνα παύουν να είναι ατοπικά; Ανεξάρτητα από τις ανησυχίες και τα ερωτήματα, η τήρηση ορισμών και ταξινόμησης είναι αναγκαία από την επιστημονική κοινότητα.

1.5 Ειδικοί ορισμοί ανά νόσο

1.5.1 Άσθμα

Η λέξη άσθμα χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες στην ιατρική βιβλιογραφία και παράλληλα έχει γίνει κομμάτι του λεξιλογίου των περισσότερων λαών του πλανήτη. Πρόκειται για μια παγκόσμια αναγνωρίσιμο όνομα που αντιπροσωπεύει ένα σύνδρομο. Παρόλα αυτά, η μεταβλητότητα με την οποία χρησιμοποιείται η λέξη αυτή και οι ελιγμοί που επιστρατεύονται για τον ορισμό του άσθματος, παρομοιάζονται από μερικούς συγγραφείς, με τον ορισμό και τη χρήση αφηρημένων εννοιών όπως η αγάπη(16).

Τρία θεμελιώδη ερωτήματα εξακολουθούν με επιδεξιότητα να κρύβονται από το φως της σύγχρονης ιατρικής έρευνας. Τι είναι άσθμα; Ποιός αναπτύσσει άσθμα και γιατί; Ποιοι παράγοντες προβλέπουν τις εξάρσεις και την απαντητικότητα της θεραπείας; Είναι εμφανές πως η απάντηση των τελευταίων δύο ερωτημάτων προϋποθέτει την απάντηση του πρώτου. Η έννοια του άσθματος ως ενιαίας νόσου, υποχωρεί συνεχώς. Καθώς νέα δεδομένα προστίθενται, τόσο περισσότερο αφαιρούν τη λάμψη της παραδοσιακά ιστορικής υπεραπλούστευσης της μίας και αδιαίρετης νόσου. Η συνεχής αποκάλυψη διαφορετικών κλινικών και παθογενετικών φαινοτύπων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το άσθμα αποτελεί μια έννοια που περικλείει διαφορετικές νόσους.

Ο σύγχρονος ορισμός του άσθματος σύμφωνα με τη GINA(17), είναι περιγραφικός και προσπαθεί να αθροίσει τα κλινικά, τα παθοφυσιολογικά και τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της νόσου:

Το άσθμα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή των αεραγωγών στην οποία συμμετέχουν πολλά είδη κυττάρων και μεσολαβητών. Η χρόνια φλεγμονή συνοδεύεται με βρογχική υπεραπαντητικότητα, που προκαλεί υποτροπιάζοντα επεισόδια συρρίτουσας αναπνοής, δύσπνοιας, αίσθημα βάρους ή περίσφιξης στο στήθος και βήχα, ιδιαίτερα την νύχτα ή νωρίς το πρωί. Αυτά τα συμπτώματα συνήθως συνδέονται με εκτεταμένη αλλά μεταβαλλόμενη στένωση των αεραγωγών η οποία αναστρέφεται, τουλάχιστον μερικώς, είτε αυτόματα είτε με θεραπεία. Η προσθήκη της έννοιας της φλεγμονής και η εξερεύνηση των μοριακών μηχανισμών της, αποτέλεσε σημαντικότατο επίτευγμα, με άμεση αντανάκλαση στη θεραπευτική στόχευση του άσθματος. Από την άλλη όμως, όχι μόνο είναι ιδιαίτερα δύσκολο να καταδειχθεί η φλεγμονώδης διαδικασία στην καθημερινή κλινική πράξη, αλλά μπορεί και να απουσιάζει από ορισμένους κλινικούς φαινοτύπους. Η Ευρωπαϊκή Ακαδημία Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (EAACI) σε συνεργασία με την Αμερικάνικη Ακαδημία (AAAAI) δεν συμπεριέλαβαν τη φλεγμονή στον ορισμό του παιδικού άσθματος. Σύμφωνα με την ομοφωνία PRACTALL, το άσθμα στα παιδιά ορίζεται ως: Επαναλαμβανόμενα επεισόδια απόφραξης αεραγωγών και διαλείποντα συμπτώματα αυξημένης βρογχικής υπεραπαντητικότητας σε εκλυτικούς παράγοντες όπως η άσκηση, η έκθεση σε αλλεργιογόνα και οι ιογενείς λοιμώξεις(18).

Οι ορισμοί πάντως των σύγχρονων ομοφωνιών έχουν επικριθεί έντονα για την πολυπλοκότητα και τη δυσχρηστία τους. Δεν είναι λίγοι αυτοί που αναπολούν τον ορισμό που έδωσε η πρώτη παιδιατρική ομοφωνία για το άσθμα(19): Βήχας ή/και συριγμός στις περιπτώσεις που το άσθμα μοιάζει πιθανό και άλλες σπανιότερες διαγνώσεις έχουν αποκλειστεί. Αν και πεπαλαιωμένος ορισμός, χωρίς τη «σοφία» των σύγχρονων εξελίξεων, αντικατοπτρίζει την ουσία της καθημερινής κλινικής πραγματικότητας. Ωστόσο η συνεχής αναγκαιότητα επιτυχούς χειρισμού του παιδικού άσθματος, οδήγησε στη δημιουργία της πρόσφατης διεθνούς συμφωνίας για το παιδικό άσθμα (International Consensus on (ICON) Pediatric Asthma) με σκοπό τη διασαφήνιση μεταξύ όλων των διεθνών οδηγιών των κρίσιμων εκείνων σημείων στην αποτελεσματική διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση του(20).

Υπό το πρίσμα της αλλεργιολογικής νομενκλατούρας, το άσθμα που προκαλείται από ανοσολογικούς μηχανισμούς ονομάζεται αλλεργικό άσθμα. Όταν καταδεικνύεται IgE-μηχανισμός συνιστάται η χρήση του όρου IgE-μεσολαβούμενο άσθμα. Ανάλογα με τη διάρκεια των συμπτωμάτων το άσθμα μπορεί να αναφέρεται ως διαλείπον ή επίμονο, ενώ η κατάταξή του σε ελεγχόμενο, μερικώς ελεγχόμενο και μη ελεγχόμενο είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην κλινική πράξη.

Στη PRACTALL εισήχθη ο όρος «άσθμα επαγόμενο απο αλλεργιόγονο» (allergen-induced asthma), για να διαφοροποιήσει τις περιπτώσεις όπου παρότι υπάρχει IgE ευαισθητοποίηση τα συμπτώματα προκαλούνται απο άλλα αίτια.

Μη-Αλλεργικό άσθμα: Αυτός είναι ο προτιμώμενος όρος για τον τύπο του άσθματος, στον οποίο δεν καταδεικνύεται ανοσολογικός μηχανισμός. Συνιστάται να μη χρησιμοποιούνται πλέον οι παλαιοί όροι «εξωγενές» και «ενδογενές» για τη διάκριση μεταξύ της αλλεργικής και μη αλλεργικής υπο-ομάδας άσθματος.

Ας σημειωθεί ότι με βάση βιοψίες που έγιναν σε ατοπικούς και μη ατοπικούς ασθματικούς, η τοπική φλεγμονή έχει περισσότερες ομοιότητες παρά διαφορές.

1.5.2 Ρινίτιδα

Ρινικά συμπτώματα που προκαλούνται από αντίδραση υπερευαισθησίας (πχ. φτέρνισμα, καταρροή, ρινική συμφόρηση) ονομάζονται ρινίτιδα και όταν οφείλονται σε ανοσολογικό μηχανισμό ονομάζονται αλλεργική ρινίτιδα. Επειδή μεγάλο μέρος των περιπτώσεων της αλλεργικής ρινίτιδας οφείλονται σε IgE μηχανισμό, έχει επικρατήσει ο όρος να είναι σχεδόν ταυτόσημος με την IgE μεσολαβούμενη αλλεργική ρινίτιδα. Όταν τα συμπτώματα είναι εποχικά η ρινίτιδα ονομάζεται εποχική, ενώ όταν υπάρχει συμπτωματολογία όλο το χρόνο, ονομάζεται ολοετής. Σύμφωνα με την ARIA (Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma) προτείνεται η ταξινόμηση της αλλεργικής ρινίτιδας, ανάλογα με τη διάρκεια της, σε διαλείπουσα και επίμονη και, ανάλογα με τη βαρύτητά της, σε ήπια και μέτρια/σοβαρή(21).

Στις περιπτώσεις εκείνες που δεν καταδεικνύεται ανοσολογικός μηχανισμός, ή, για την ακρίβεια, μη συστηματικός IgE μηχανισμός, η ρινίτιδα ονομάζεται μη αλλεργική. Οι περιπτώσεις τοπικής παραγωγής IgE, ειδικά όταν συνδέονται με θετικές ρινικές προκλήσεις, δημιουργούν σύγχυση στην ορολογία, αλλά εφ' όσον δε συνοδεύονται από θετικές δερματικές δοκιμασίες ή ειδική IgE στον ορό, εξακολουθούν να κατατάσσονται στις μη αλλεργικές ρινίτιδες(22). Στο μέλλον η ονοματολογία της ρινίτιδας θα πρέπει να επανεξεταστεί.

Η αλλεργική ρινίτιδα πολύ συχνά συνοδεύεται από επιπεφυκίτιδα και ο όρος αλλεργική ρινοεπιπεφυκίτιδα θεωρείται δόκιμος και έχει γίνει αποδεκτός. Η «ατοπική» κερατοεπιπεφυκίτιδα και η «vernal» («εαρινή») κερατοεπιπεφυκίτιδα μπορούν εν μέρει να εξηγηθούν μέσω IgE μηχανισμών, αλλά η ακριβής κατάταξή τους απαιτεί περαιτέρω μελέτες(23).

1.5.2 Δερματίτιδα

Σε αντίθεση με τους «κρυμμένους» βλενογόννους του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού, στο δέρμα η φλεγμονή είναι άμεση, ορατή και προσβάσιμη. Η δερματολογία χρησιμοποιεί περιγραφικούς ορισμούς για την ονοματολογία των νοσημάτων της (πχ. εκζεματοειδές, κοκκιοματώδες, νομισματοειδές, πορφυρικό κα). Η εντόπιση επίσης των δερματικών αλλοιώσεων χρησιμοποιείται για τον ορισμό τους (πχ. καμπτικό ή εκτατικό). Η προσπάθεια σύνδεσης των αλλεργικών δερματικών παθήσεων με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που τις διέπουν και η χρήση ενιαίας ορολογίας οδήγησε την Παγκόσμια Οργάνωση Αλλεργιολογίας στην πρόταση νέας ονοματολογίας και ταξινόμησης(11).

Ο γενικός όρος που χρησιμοποιείται για τις φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος είναι δερματίτιδα. Σε αυτήν ανήκουν το έκζεμα, η εξ επαφής δερματίτιδα, καθώς και άλλες μορφές (πχ. φωτοδερματίτιδα, σμηγματορροϊκή δερματίτιδα).

Οι χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος με κοινά κλινικά/μορφολογικά χαρακτηριστικά και γενετικά διαταραγμένο φραγμό εντάσσονται κάτω από τη σκέπη του γενικότερου όρου έκζεμα. Η γενετικά καθοριζόμενη ευαισθησία του δέρματος, ως οργάνου στόχου, αποτελεί τη βάση του εκζέματος(24).

Τα ατοπικά παιδιά αναπτύσσουν φλεγμονή που κυριαρχείται από IgE σχετιζόμενη ανοσολογική αντίδραση. Στις περιπτώσεις αυτές το έκζεμα ονομάζεται ατοπικό. Όταν οι ανοσολογικοί μηχανισμοί είναι ασαφείς, θα πρέπει απλά να χρησιμοποιείται η λέξη έκζεμα. Όπως αναφέρθηκε εκτεταμένα, στην ανάλυση της έννοιας ατοπία, ο όρος ατοπικό έκζεμα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο στις περιπτώσεις αποδεδειγμένης IgE ευαισθητοποίησης.

Όταν η φλεγμονή δε συσχετίζεται με IgE αντισώματα, πρέπει να χρησιμοποιείται ο όρος μη ατοπικό έκζεμα. Η έννοια ατοπική δερματίτιδα που έχουμε όλοι στο μυαλό μας, παρουσιάζει αρκετά ετυμολογικά προβλήματα και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται. Αν για παράδειγμα χρησιμοποιήσουμε τα 4 μείζονα κλασικά κριτήρια των Hanifin και Rajka(25) (απαιτούνται 3 μείζονα κριτήρια για τη διάγνωση) θα δούμε ότι ένα από αυτά είναι η ατοπία. Συνεπώς, μπορούμε να διαγνώσουμε ατοπική δερματίτιδα σε κάποιον χωρίς να είναι απαραίτητα ατοπικός (χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα 3 κριτήρια)! Τη σύγχυση αυτή προσπαθεί να επιλύσει η νέα ονοματολογία και ταξινόμηση. Επιπρόσθετα, η διάκριση του εκζέματος σε ατοπικό και μη ατοπικό έχει θεμελιώδη κλινική σημασία, αφ' ενός σε ότι αφορά στην αποφυγή υπεύθυνων αλλεργιογόνων, και από τη άλλη, επειδή τα παιδιά με μη ατοπικό έκζεμα έχουν λιγότερες πιθανότητες να αναπτύξουν άσθμα στη συνέχεια της ζωής τους(26).

Η φλεγμονή του δέρματος που προκαλείται από επαφή με χημικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους ονομάζεται δερματίτιδα εξ' επαφής. Όταν η αντίδραση μεσολαβείται από ανοσολογικούς μηχανισμούς (που στη περίπτωση αυτή κυριαρχούν τα Th1 λεμφοκύτταρα), ονομάζεται αλλεργική δερματίτιδα(27). Συστηματική έκθεση στις ουσίες αυτές μπορεί να προκαλέσει συστηματική αλλεργική εξ' επαφής δερματίτιδα(28). Στις περιπτώσεις που δεν εμπλέκεται ανοσολογικός μηχανισμός χρησιμοποιείται ο όρος μη αλλεργική εξ' επαφής δερματίτιδα, αλλά και όροι όπως τοξική ή ερεθιστική δερματίτιδα εξ' επαφής θεωρούνται έγκυροι.

1.5.3 Αντιδράσεις σε τροφές – φάρμακα – υμενόπτερα

Υπάρχουν καταστάσεις στις οποίες η ονοματολογία με βάση το όργανο-στόχο είναι ανεπαρκής, για να τις περιγράψει. Πολλά αλλεργιογόνα οδηγούν σε ποικιλία πολυσυστηματικών αντιδράσεων που δύσκολα ταξινομούνται με τα υπάρχοντα συστήματα.

Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις μετά τη λήψη τροφών ονομάζονται τροφική υπερευαισθησία. Όταν εμπλέκεται ανοσολογικός μηχανισμός ονομάζονται τροφική αλλεργία και όταν ο μηχανισμός είναι IgE μεσολαβούμενος ονομάζονται IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία. Σημειώνεται, ότι η ύπαρξη ειδικών IgG αντισωμάτων δεν έχει κλινική σημασία και συνήθως απλά υποδηλώνει προηγούμενη έκθεση στη συγκεκριμένη τροφή(29).

Οι φαρμακευτικές ανεπιθύμητες αντιδράσεις (αντιδράσεις υπερευαισθησίας) για τις οποίες υπάρχει απόδειξη ή ισχυρή υποψία ανοσολογικού μηχανισμού ονομάζονται φαρμακευτική αλλεργία. Η προσθήκη του όρου άμεση ή επιβραδυνόμενη περιγράφει την έναρξη των συμπτωμάτων και πιθανολογεί με σημαντική ακρίβεια τον υποκείμενο μηχανισμό (πχ IgE ή T-λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα). Οι IgE μεσολαβούμενες φαρμακευτικές αλλεργίες αποτελούν ένα πολύ μικρό κομμάτι των φαρμακευτικών υπερευαισθησιών. Σε κάθε περίπτωση η κατάδειξη του ανοσολογικού μηχανισμού είναι πολύ δύσκολη, ενώ ακόμα και οι δερματικές δοκιμασίες ή τα tests διέγερσης βασεοφίλων δεν είναι ικανές να απαντήσουν με σαφήνεια(30).

Η ίδια λογική της διάκρισης των όρων υπερευαισθησία, αλλεργία και IgE μεσολαβούμενη αλλεργία χρησιμοποιείται για την κατάταξη των αντιδράσεων των υμενοπτέρων.

1.5.4 Αναφυλαξία

Έναν αιώνα μετά την εισαγωγή του στην ιατρική, ο όρος αναφυλαξία χρησιμοποιείται πολύ συχνά με διαφορετικές έννοιες και χωρίς αυστηρά κριτήρια διάγνωσης. Σύμφωνα με την τελευταία ομοφωνία(31):

- Η αναφυλαξία είναι μια σοβαρή συστηματική αλλεργική αντίδραση με ταχύτερη έναρξη που μπορεί έως και να προκαλέσει το θάνατο.
- Παρουσιάζει ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων.
- Είναι το αποτέλεσμα της απελευθέρωσης μεσολαβητών από τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα.

Τα κλινικά κριτήρια που απαιτούνται για τη διάγνωση της αναφυλαξίας δίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3

Πίνακας 3: Κλινικά κριτήρια για τη διάγνωση της αναφυλαξίας

| |
|--|
| Αναφυλαξία είναι πολύ πιθανή, όταν ισχύει τουλάχιστον ένα από τα τρία κριτήρια |
| 1.Οξεία έναρξη (λεπτά έως λίγες ώρες) με συμμετοχή δέρματος, βλεννογόνων ή και των δύο (πχ πομποί, flushing, αγγειοοίδημα χειλέων, γλώσσας) ΚΑΙ ΤΟΥΛΑΧΙΣΤΟΝ ΕΝΑ ΑΠΟ ΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΩ Α.Αναπνευστική δυσχέρεια (πχ. δύσπνοια, συριγμός) Β.Πτώση αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) ή συμπτώματα υποτονίας, συγκοπής, ακράτειας |
| 2.Δύο ή περισσότερα από τα παρακάτω όταν συμβαίνουν ταχέως μετά από έκθεση σε πιθανό αλλεργιογόνο για τον συγκεκριμένο ασθενή Α. Εμπλοκή δέρματος – βλεννογόνων Β. Αναπνευστική δυσπραγία Γ. Πτώση ΑΠ ή σχετιζόμενα συμπτώματα Δ. Επίμονα συμπτώματα από το γαστρεντερικό (κωλικοειδές κοιλιακό άλγος, έμετος) |
| 3.Πτώση ΑΠ μετά από έκθεση σε γνωστό αλλεργιογόνο για το συγκεκριμένο ασθενή Α. Βρέφη και παιδιά: Χαμηλή συστολική ΑΠ (ανάλογα με την ηλικία) ή πτώση >30% Β. Ενήλικες: Συστολική ΑΠ <90 mmHg ή πτώση >30% της συστολικής ΑΠ |

Οι αναφυλακτικές αντιδράσεις που δεν οφείλονται σε ανοσολογικό μηχανισμό δεν ονομάζονται πλέον αναφυλακτοειδείς, αλλά μη αλλεργικές συστηματικές αντιδράσεις.

Η ανακάλυψη και η προσπάθεια οριοθέτησης των «παράξενων» αντιδράσεων του οργανισμού, οδήγησε τους πρωτοπόρους της ανοσολογίας και της αλλεργιολογίας στη δημιουργία νεολογισμών. Οι λέξεις αυτές που είναι εμπνευσμένες από την Αρχαία Ελληνική Γραμματεία, διατηρούνται στη βιβλιογραφία και επαναπροσδιορίζουν το νόημά τους κάτω από το φως των νέων εξελίξεων. Οι σύγχρονες ομοφωνίες προσπαθούν να επανακαθορίσουν τους ορισμούς της αλλεργίας και να δημιουργήσουν μια αυστηρή ορολογία που θα χρησιμοποιείται με τον ίδιο τρόπο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι αμφισβητήσεις και οι περιρρέουσες δικαιολογίες, οδηγούν συχνά σε γόνιμες συζητήσεις, αλλά και σε στείρες αντιπαραθέσεις. Οι οπτικές γωνίες που αντιμετωπίζονται οι αλλεργικές παθήσεις είναι πολύ διαφορετικές και κατ' επέκταση δημιουργούν τελείως διαφορετικές εκτιμήσεις για τους ορισμούς τους. Δεν πρέπει όμως να λησμονούμε, ότι κάθε τέτοια προσπάθεια πρέπει να έχει

ως επίκεντρο τη βελτίωση της ιατρικής επιστήμης και κατ' επέκταση τη βελτίωση των παρεχόμενων υπηρεσιών στους ασθενείς μας.

Οποιαδήποτε προσπάθεια νέων ορισμών και ορολογιών θα πρέπει να είναι εναρμονισμένη με τα λόγια του Αριστοτέλη:

Έχουμε καθήκον να δημιουργούμε καινούργια ονόματα, εάν αυτό υποδηλώνει ένα καινούργιο είδος ή έννοια με διακριτές ειδικές ιδιότητες. Διαφορετικά, η προσπάθειά μας είναι άκαρπη. (Αριστοτέλης, Ρητορική, τόμος Γ')

1.6 Επιδημιολογικά δεδομένα

Τα περιστατικά εκδήλωσης αλλεργιών αυξάνονται δραματικά σε όλον τον κόσμο. Περίπου 10%-30% του ενήλικου πληθυσμού παγκοσμίως και έως και 40% των παιδιών πάσχουν από κάποια μορφή αλλεργίας. Οι αναπνευστικές αλλεργίες είναι οι συνηθέστερες αλλεργίες στην Ευρώπη και παγκόσμια. Η αλλεργική ρινίτιδα (με ή χωρίς επιπεφυκίτιδα) προσβάλλει το 5%-50% του παγκόσμιου πληθυσμού, 15% έως 20% εκ του οποίου πάσχει από μία οξεία μορφή της πάθησης, και ο επιπολασμός της αυξάνεται(32, 33). Εκτιμάται ότι το αλλεργικό άσθμα προσβάλλει 5%-12% του ευρωπαϊκού πληθυσμού. Ένα σημαντικό μέρος των δεδομένων υποδεικνύει μια σχέση μεταξύ ρινίτιδας και άσθματος. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει με συνέπεια ότι αυτά τα νοσήματα συχνά συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή, ώστε τουλάχιστον 60% των ασθενων με άσθμα πασχουν από ρινοεπιπεφυκίτιδα, ενώ μεταξύ 20% και 30% των ασθενών με ρινοεπιπεφυκίτιδα έχουν και άσθμα(34). Η αλλεργική ρινίτιδα είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για εκδήλωση άσθματος, συχνά προηγείται της εκδήλωσής του και συμβάλλει στο μη ικανοποιητικό έλεγχο του. Η παρουσία και ο τύπος του άσθματος επηρεάζεται από την αλλεργική ευαισθητοποίηση και από τη διάρκεια και τη σοβαρότητα της αλλεργικής ρινίτιδας(35). Αυτά τα ευρήματα σε συνδυασμό με ευρήματα μελετών μετά πρόκληση με αλλεργιογόνο σε ανώτερο και κατώτερο αεραγωγό που αποκαλύπτουν ίδιες παθοφυσιολογικές βλάβες επιβεβαίωσαν την παραδοχή «ένας ενιαίος αεραγωγός μία νόσος»(36, 37). Η παραδοχή αυτή σηματοδότησε την έναρξη μείζονος αλλαγής στη θεραπευτική αντιμετώπιση της αναπνευστικής αλλεργίας.

Το άσθμα είναι επίσης η πιο κοινή χρόνιας νόσος της παιδικής ηλικίας και η κύρια αιτία παιδικής νοσηρότητας από χρόνια ασθένεια. Η ευαισθητοποίηση σε συγκεκριμένα αλλεργιογόνα είναι ένα από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου εκδήλωσης άσθματος στα παιδιά, ενώ στην Ευρώπη 20% με 30% των εφήβων ηλικίας 13 έως 14 ετών πάσχουν από αλλεργική ρινίτιδα(38).

Επιπρόσθετα, τα παιδιά εκδηλώνουν μια δυναμική πορεία της αλλεργίας, δηλαδή έχοντας μία αλλεργική νόσο αυξάνουν τις πιθανότητες να εκδηλώσουν και άλλες. Συγκεκριμένα από την πρώτη εκδήλωση του ατοπικού εκζέματος να εμφανίσουν στη συνέχεια τροφική αλλεργία και με την υποχώρηση τους να εκδηλωθεί η αναπνευστική αλλεργία(39, 40). Η δυναμική αυτή πορεία, γνωστή ως αλλεργική πορεία, μας είναι γνωστή σε πολλά σημεία των μηχανισμών της ώστε με έγκαιρη διάγνωση, επαρκή φαρμακευτικό έλεγχο και ειδική θεραπευτική αντιμετώπιση με την χορήγηση ανοσοθεραπείας να μπορούμε να αναστείλουμε σημαντικά την εξέλιξη της(41).

Σύμφωνα με τη μελέτη ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood – Διεθνής Μελέτη του Άσθματος και των Αλλεργιών στην Παιδική Ηλικία*) στην οποία μετέχουν 306 κέντρα από 105 χώρες (21 στην Ευρώπη), ξεκίνησε το 1991 και έδωσε πρόσφατα τα αποτελέσματα της τρίτης φάσης (III) (1999 – 2004), υπάρχει συνολικά μια αυξανόμενη τάση επιπολασμού των αλλεργικών νοσημάτων διεθνώς(42). Συγκεκριμένα διεθνώς ο επιπολασμός του άσθματος, της ρινοεπιπεφυκίτιδας και του εκζέματος βρέθηκε 11.7%, 8.5% και 7.9% αντίστοιχα για την ηλικιακή ομάδα 6 έως 7 ετών. Επίσης ο επιπολασμός βρέθηκε 14.1%, 14.6% και 7.3% αντίστοιχα για την ηλικιακή ομάδα 13 έως 14 ετών(43). Η φάση τρία (III) που ολοκληρώθηκε κατά μέσο όρο 7 έτη μετά τη φάση ένα (I) ανέδειξε μεταβολή του επιπολασμού κατά τουλάχιστον μία σταθερή απόκλιση για κάθε ένα τουλάχιστον μελετώμενο νόσημα. Οι σταθερές αποκλίσεις αύξησης των νοσημάτων βρέθηκαν διπλάσια συχνότερες από τις αποκλίσεις μείωσης και περισσότερο συχνές στην ηλικιακή ομάδα 6 έως 7 ετών. Τα περισσότερα κέντρα ανέδειξαν αύξηση του επιπολασμού και για τα τρία νοσήματα και στις δύο ηλικιακές ομάδες. Οι αυξήσεις ήταν σημαντικότερες για το έκζεμα στη νεώτερη ομάδα και για την αλλεργική ρινοεπιπεφυκίτιδα και στις δύο ομάδες. Μόνο στα μεγαλύτερα παιδιά σημειώθηκε μείωση του επιπολασμού του άσθματος για τα κέντρα με το μεγαλύτερο ήδη επιπολασμό, ένα σχετικά ενθαρρυντικό γεγονός(42).

Αντίστοιχα επιδημιολογικά δεδομένα από την Ελλάδα έχουμε για τη φάση δύο (II) της ISAAC από την Αθήνα και τη Θεσσαλονίκη. Για την ηλικιακή ομάδα 9 έως 10 ετών ο επιπολασμός του άσθματος και της ρινοεπιπεφυκίτιδας βρέθηκε 7.7% και 12.5% αντίστοιχα για την Αθήνα και 11.5% και 21.7% αντίστοιχα υψηλότερος για τη Θεσσαλονίκη(44).

Συνολικά τα τρία μελετώμενα ατοπικά νοσήματα εμφάνισαν μεταβολές του επιπολασμού τους στο χρόνο σε σταθερή συσχέτιση μεταξύ τους. Τούτο φαίνεται να υποδηλώνει είτε ότι τα νοσήματα αυτορυθμίζονται ως προς τον επιπολασμό τους και τυχαία βρέθηκαν σταθερά συσχετιζόμενα μεταξύ τους, είτε ότι όποιοι παράγοντες επιδρούν στην μεταβολή του επιπολασμού λειτουργούν όμοια διεθνώς και ανεξάρτητα από οικονομικές, πολιτισμικές και οικολογικές διαφορές των κρατών. Αυτά τα ευρήματα κρίνονται σημαντικά καθώς αναδυσκνείουν τους περιβαλλοντικούς πιθανόν σημαντικότερους από τους γενετικούς παράγοντες(45). Ιδιαίτερα για την Ευρώπη η μελέτη ISAAC αποκάλυψε επίσης μια αυξητική τάση στα ποσοστά επιπολασμού του άσθματος και των αλλεργιών ειδικά στις αστικές περιοχές όπου τα παιδιά εμφανίζουν περισσότερες αλλεργικές αντιδράσεις σε ενδοοικιακά και εξωοικιακά αλλεργιογόνα. Επιπλέον η τάση εκδήλωσης αλλεργιών αυξάνει με τη μείωση της ποιότητας του αέρα στο περιβάλλον(46).

Ο αυξανόμενος επιπολασμός της τροφικής αλλεργίας στον ανεπτυγμένο κόσμο έχει συγκεντρώσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, ιδιαίτερα τις τελευταίες δύο δεκαετίες, με συνέπεια την αυξανόμενη γνώση και συγκέντρωση δεδομένων σχετικά με τον επιπολασμό, τους παράγοντες κινδύνου αλλά και την επίπτωση στην υγεία, ιδιαίτερα των παιδιών, το κόστος και τις κοινωνικές πτυχές διαχείρισης του προβλήματος. Δεδομένα από το πρόγραμμα μελέτης της τροφικής αλλεργίας στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (*Food Allergy Research and Resource Program – FARRP*) εκτιμούν τον επιπολασμό της τροφικής αλλεργίας μεταξύ 3.5 και 4.0% περίπου(47). Αντίστοιχα για την Ευρώπη δεδομένα από το πρόγραμμα EuroPrevall (*The prevalence cost and basis of food allergy in Europe*), χρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Ένωση και επικεντρωμένο στον επιπολασμό και το κόστος της τροφικής αλλεργίας εκτιμά ποσοστά, μετά τη διενέργεια τροφικών προκλήσεων, έως 3% για το γάλα

αγελάδας, έως 1.7% για το αυγό και 1% - 10.8% για οποιαδήποτε τροφή(48). Ανάλογες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ανάλογα περίπου ποσοστά για τον Καναδά, την Αυστραλία και την Ιαπωνία(49, 50).

2. ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΟ

2.1 Τι κάνει ένα αλλεργιογόνο να είναι αλλεργιογόνο;

Το ερώτημα, τι κάνει ένα αλλεργιογόνο να είναι αλλεργιογόνο, έχει απασχολήσει γενιές ερευνητών, ωστόσο δεν έχουμε ακόμη μια καταληκτική απάντηση. Ανεξάρτητα από την αυξανόμενη γνώση για τα μοριακά, χημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, των γνωστών αλλεργιογόνων, ακόμη δεν κατανοούμε πλήρως γιατί κάποιες πρωτεΐνες να είναι, ενώ οι περισσότερες δεν είναι, κλινικά λειτουργικά αλλεργιογόνα. Διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν επιχειρηθεί για τον προσδιορισμό των δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των αλλεργιογόνων, με σκοπό την ανάπτυξη μεθόδων πρόβλεψης της αλλεργιογονικότητας και επομένως την ταυτοποίηση των αλλεργιογόνων. Καμιά από τις μεθόδους αυτές δεν έχει επιτύχει έναν αξιόπιστο διαχωρισμό μεταξύ αλλεργιογόνων και μη αλλεργιογόνων βιολογικών μορίων – υλικών(51).

Αλλεργική αντίδραση ή/και νόσος δύναται να προκληθεί από μια πληθώρα διαφορετικών βιολογικών υλικών όπως γύρεις φυτών, ακάρεα οικιακής σκόνης, μύκητες και συστατικά τροφών(52, 53). Κάθε τέτοιο βιολογικό υλικό αποτελεί μια αλλεργιογόνο πηγή που περιέχει διακριτά αλλεργιογόνα μόρια, στοιχεία, δηλαδή επιμέρους συστατικά σε κάποιο ή κάποια από τα οποία το αλλεργικό άτομο έχει ευαισθητοποιηθεί μετά αρχική επαφή και αντιδρά σε κάθε επομένη επαφή μαζί του με άλλοτε άλλη βαρύτητα αντίδρασης(54). Αλλεργία είναι αντιδράσεις υπερευαισθησίας, μεσολαβούμενες με ανοσολογικό μηχανισμό, που εκδηλώνονται κυρίως από το δέρμα, το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό δηλαδή τα μέσα – επιφάνειες αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον. Προκειμένου να συμβεί κάτι τέτοιο το επίπεδο – βαθμός έκθεσης στην αλλεργιογόνο πηγή είναι κρίσιμο ή στην περίπτωση της τροφικής αλλεργίας η περιεκτικότητα του αλλεργιογόνου συστατικού – στοιχείου στην ενεχόμενη τροφή. Επιπλέον, για κάθε αλλεργιογόνο η δυνατότητα να προκαλέσει μια αλλεργική αντίδραση ταυτίζεται με την είσοδο του στον οργανισμό σε θέση και σημείο που να μπορεί να παρουσιαστεί στα ειδικά για αυτό IgE αντισώματα πάνω στα σιτευτικά κύτταρα και τα βασεόφιλα κύτταρα. Τούτο μπορεί να συμβεί μέσω του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, της επιφάνειας του δέρματος, του γαστρεντερικού συστήματος ή μέσω νυγμού στην περίπτωση του δηλητηρίου των υμενοπτέρων.

Αερομεταφερόμενα αλλεργιογόνα μόρια, κυρίως γύρεις, μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό μέσω των βλεννογόνων της ρινός και των πνευμόνων. Τροφικά αλλεργιογόνα μόρια έπονται συνήθως της πέψης της υπεύθυνης τροφής, ώστε να απορροφηθούν στη συστηματική κυκλοφορία και έτσι να προκαλέσουν αντίδραση. Επομένως είναι κυρίως πρωτεΐνες ανθεκτικές στο όξινο περιβάλλον του στομάχου όπως διάφορες πρωτεΐνες αποθήκευσης των ξηρών καρπών(55) και το μείζον αλλεργιογόνο του ψαριού, παρβαλβουμίνη(56). Ορισμένα τροφικά αλλεργιογόνα προκαλούν το καλούμενο σύνδρομο αλλεργίας δια της στοματικής κοιλότητας μια κατάσταση στην οποία συμπτώματα αλλεργικής αντίδρασης εκδηλώνονται μόνο από την στοματική κοιλότητα. Τούτο συμβαίνει διότι τα αλλεργιογόνα αυτά είναι πρωτεΐνες ευαίσθητες στη θερμοκρασία, τα ένζυμα του στομάχου ή την με όποιο τρόπο μετουσίωση τους, με αποτέλεσμα όταν έρχονται σε επαφή με το γαστρικό περιβάλλον ή εάν έχουν μετουσιωθεί προηγουμένως, επεξεργασία μαγειρέματος, να μην

προκαλούν πλέον συμπτώματα κατά τη βρώση τους. Τέτοια είναι συχνά η περίπτωση για τις πρωτεΐνες προφιλίνες (profilins) όπου τα αναπνευστικά αλλεργιογόνα που τις περιέχουν για τα αγρωστώδη, την ελιά, το περδικάκι προκαλούν συμπτώματα επιπεφυκίτιδας, ρινίτιδας, άσθματος στην εποχή ανθοφορίας, γυρεοφορίας ενώ τα αντίστοιχα τροφικά αλλεργιογόνα φράουλα, ροδάκινο, σταφύλι, ξηροί καρποί συνήθως προκαλούν ήπια μέτρια συμπτώματα αλλεργίας δια της στοματικής κοιλότητας αν και σοβαρότερα συμπτώματα από το γαστρεντερικό ή και συστηματική αντίδραση σπάνια μπορεί να εκδηλωθούν(57).

Σύμφωνα με τα σύγχρονα δεδομένα, Th2 ανοσολογικές απαντήσεις, συνιστούν προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη μιας τύπου I αντίδρασης υπερευαισθησίας, η οποία οδηγεί στην παραγωγή IgE και τον εφοδιασμό των σιτευτικών και βασεόφιλων κυττάρων με τις ειδικές IgE για το αλλεργιογόνο. Αν και η βιολογία των Th2 κυττάρων και η επίδρασή τους στα B κύτταρα και τη μετατροπή των τάξεων ανοσοσφαιρινών μας είναι καλά κατανοητή, γνωρίζουμε λιγότερο για τους μηχανισμούς που ελέγχουν την αρχική Th2 επιλογή απάντησης στο αλλεργιογόνο. Ορισμένες θεωρίες προθέτουν ένα εξαρτώμενο από αλλεργιογόνο μηχανισμό που καθορίζεται στο επίπεδο των αντιγονοπαρουσιαστικών δενδριτικών κυττάρων(58). Άλλες προτείνουν έναν T κύτταρο-εξαρτώμενο(59), ή παραγόντων του ζενιστή(60), μηχανισμό επικράτησης της Th2 απάντησης. Επί της αρχής, όλοι οι ανωτέρω παράγοντες αθροιστικά επάγουν ή προσθέτουν στην αλλεργιογονικότητα μιας συγκεκριμένης ουσίας. Η πολυπλοκότητα των συνθηκών έκθεσης σε ένα αλλεργιογόνο καθιστά δύσκολη την προσπάθεια να κατανοηθεί γιατί μια δεδομένη πρωτεΐνη, σε ένα δεδομένο άτομο, μια δεδομένη χρονική συγκυρία προκαλεί μια αλλεργική ανοσιακή απάντηση και όχι μια υγιή ή ανοχής ανοσιακή απάντηση. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και τη Διεθνή Ένωση των Ανοσολογικών Εταιρειών (International Union of Immunological Societies – I.U.I.S) και συγκεκριμένα την Υπο-επιτροπή Ονοματολογίας των Αλλεργιογόνων, μια πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται και κατατάσσεται ως αλλεργιογόνο όταν προκαλεί μια ειδική IgE μεσολαβούμενη αντίδραση σε τουλάχιστον πέντε (5) άτομα(61).

Οι σημαντικές, κατά πλειοψηφία, αλλεργιογόνες πηγές είναι οι αερομεταφερόμενες γύρεις δένδρων, αγρωστωδών, θάμνων, εκκρίσεις ακάρεων, κατσαρίδας, σπόροι μυκήτων, επιθήλια ζώων, αλλεργιογόνα τροφών και δηλητήρια υμενοπτέρων. Η οδός της έκθεσης, η δόση έκθεσης και η βιολογική λειτουργία του αλλεργιογόνου είναι κρίσιμες στη δόμηση της αλλεργικής ευαισθητοποίησης. Ο αποφασιστικός παράγοντας παραμένει φυσικά η δυνατότητα να προκαλεί ανοσιακή απάντηση, που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μόριο θα πρέπει να εκτεθεί στην επαφή με το ανοσολογικό σύστημα σε κάποια από τα σημεία ανάπτυξής του. Η ευαισθητοποίηση αναπτύσσεται στις επιφάνειες της έκθεσης στο αλλεργιογόνο όπως το αναπνευστικό, το δέρμα και το γαστρεντερικό. Το ειδικό IgE αντίσωμα δεσμεύεται στους αντίστοιχους ειδικούς επιτόπους του αλλεργιογόνου. Χρειάζεται ένας ελάχιστος αριθμός δύο επιτόπων στο αλλεργιογόνο που θα δεσμευτούν διασταυρούμενα από το IgE αντίσωμα για την ενεργοποίηση της αντίδρασης. Όσοι περισσότεροι των δύο επιτόπων είναι παρόντες και διαθέσιμοι προς δέσμευση τόσο περισσότερο δραστική είναι η δέσμευση και η ενεργοποίηση της αντίδρασης(62). Οι επίτοποι μπορούν να είναι γραμμικοί ή διαμορφωτικοί με βάση τη μόνο ή δίσ ή τρισδιάστατη δομή τους. Εάν ένα αλλεργιογόνο μόριο το οποίο είναι ευαίσθητο στην μετουσίωση όπως το όξινο περιβάλλον του στομάχου, φέρει και τους δύο τύπους των επιτόπων, οι διαμορφωτικοί επίτοποι θα χαθούν στο όξινο περιβάλλον του στομάχου ενώ οι γραμμικοί αντίθετα θα διατηρηθούν ακέραιοι και δυνάμενοι να συνδέσουν ειδική IgE και να

προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση(63). Συνέπεια τούτου, αλλεργία οφειλόμενη σε ευαισθητοποίηση έναντι γραμμικών επιτόπων έχει την τάση να εκδηλώνεται με βαρύτερες αντιδράσεις, μετά επαφής ακόμη και με ίχνη του υπεύθυνου αλλεργιογόνου μορίου και να επιμένει, δύσκολα αποδράμουςα, έως και την ενήλικη ζωή του αλλεργικού ατόμου. Αντιθέτως, αλλεργία οφειλόμενη σε διαμορφωτικούς επιτόπους χαρακτηρίζεται από μάλλον ηπιότερες αντιδράσεις συγκριτικά, εμφανίζει συχνά ανοχή σε ίχνη του υπεύθυνου αλλεργιογόνου και κατά κανόνα αποδράμει νωρίς(64).

Γενικά θεωρώντας, έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση αλλεργιογόνου προκαλεί IgE ευαισθητοποίηση και αλλεργία. Αντίθετα, έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις – δόσεις αλλεργιογόνου προκαλεί ανοχή μέσω Treg κυττάρων, ή μίας μετασχηματισμένης Th2 κυτταρικής απάντησης με παραγωγή υψηλών επιπέδων ειδικών IgG4 αντισωμάτων για το αλλεργιογόνο, ή και τα δύο και έτσι μπλοκάρει τη σύνδεση των συμπλεγμάτων IgE αντισώματος – αλλεργιογόνου στα δραστικά κύτταρα της αλλεργικής ανοσιακής απόκρισης(65, 66).

Τι είναι όμως υψηλή και τι χαμηλή δόση ή συγκέντρωση, η οποία προκαλεί ευαισθητοποίηση, όταν η έκθεση ενός ατόμου σε δεδομένο αλλεργιογόνο είναι δύσκολο να μετρηθεί και προσδιορίζεται μόνο κατ' εκτίμηση;

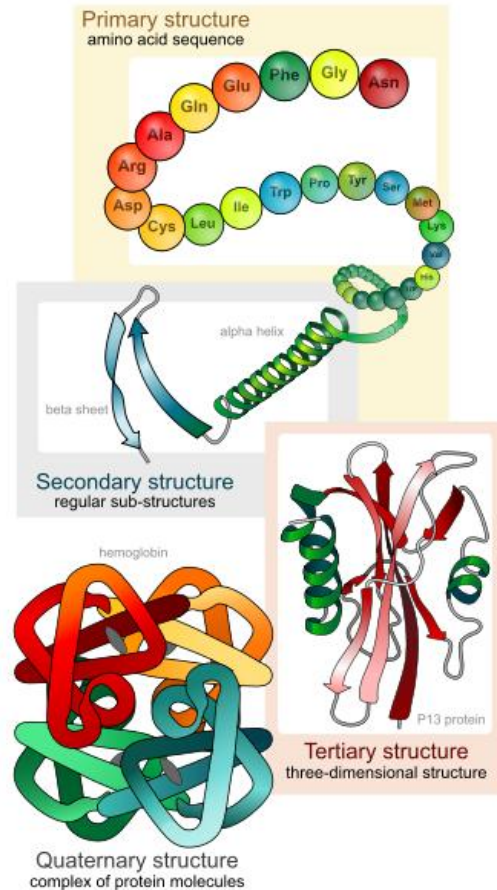
Η εισπνεόμενη ποσότητα αλλεργιογόνου γάτας εκτιμάται σε εύρος 1 – 300 ng την ημέρα ανάλογα με την παρουσία του ζώου στο χώρο(67). Οι συγκεντρώσεις των αλλεργιογόνων των ακάρεων στον ενδοοικιακό αέρα είναι πολύ χαμηλές για να μετρηθούν ενώ συγκεντρώσεις δειγμάτων σκόνης έδειξαν τιμές έως 400 φορές χαμηλότερες των αντίστοιχων της γάτας(68). Τέλος έκθεση σε εξωοικιακά αλλεργιογόνα γύρης κατά τη διάρκεια της εποχής ανθοφορίας βασιζόμενη κατ' εκτίμηση στην ταχύτητα της γύρης και την απελευθέρωση από αυτή του αλλεργιογόνου αντιστοιχεί σε τιμές 0.03 ng/d(69). Επομένως ποσότητες νάνο-γραμμαρίων ή και λιγότερο αλλεργιογόνου αποδεικνύονται ικανές για πρόκληση αλλεργικής ευαισθητοποίησης και νόσου. Ωστόσο δεν εκδηλώνει ο καθένας που εκτίθεται σε αλλεργιογόνα ενός συγκεκριμένου χώρου ευαισθητοποίηση και αλλεργία. Εκτός από τις συνθήκες έκθεσης υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στην ανοσιακή απάντηση του ατόμου σε συγκεκριμένη δόση αλλεργιογόνου. Η ανάπτυξη μιας αλλεργικής (Th2 κυτταρικής και IgE μεσολαβούμενης) ανοσιακής απάντησης εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση και το βαθμό έκθεσης του αλλεργιογόνου, αλλά και την ισχύ του ενεργοποιού τα T κύτταρα σήματος. Η μεταβλητότητα του απλοτύπου του Μέγιστου Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MΣΙ) μεταξύ ατόμων καθορίζει τη συγγένεια σύνδεσης των αντιγονικών πεπτιδίων στα MΣΙ Τάξης II μόρια και την παρουσίαση τους στους υποδοχείς T-κυττάρων(65, 70). Επομένως ότι θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ψηλή δόση αλλεργιογόνου για ένα άτομο μπορεί να είναι χαμηλή για άλλο εάν το αλλεργιογόνο μόριο εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για τα μόρια σύνδεσης του MΣΙ στο συγκεκριμένο άτομο.

Τα αλλεργιογόνα που δύνανται να εκλύουν τύπου I ή ειδικού IgE αντισώματος μεσολαβούμενη αλλεργία είναι κυρίως πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες και αποτελούν ως ομάδα λιγότερο από 2% των γνωστών οικογενειών των πρωτεϊνών όπως καταγράφονται. (AllFam database:

www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/)(71, 72). Τούτο τείνει να υποδεικνύει ότι δομικές και βιοχημικές ομοιότητες μεταξύ αλλεργιογόνων πρωτεϊνών και η σύγκριση αλλεργιογόνων και μη αλλεργιογόνων μελών της αυτής οικογένειας πρωτεϊνών θα μπορούσε να καθορίσει την αλλεργιογονικότητα ως ιδιότητα μιας πρωτεΐνης. Η πρωτοταγής δομή – αλληλουχία αμινοξέων – μιας πρωτεΐνης επιτρέπει τις φυσικοχημικές της ιδιότητες όπως το μοριακό βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο, την υδροφοβικότητα και τη σταθερότητα του μορίου να προβλεφθούν. Υπολογιστική ανάλυση των μειζόνων ή κύριων αλλεργιογόνων έχει δείξει ότι τα περισσότερα μόρια είναι σχετικά μικρού μεγέθους συνήθως μεταξύ 10 και 60 kDa, αν και υπάρχουν

αλλεργιογόνα μικρότερου αλλά και μεγαλύτερου μεγέθους, αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες με χαμηλή υδροφοβικότητα και υψηλή σταθερότητα(73). Επιπρόσθετα μετά- μεταγραφικοί μετασχηματισμοί όπως η γλυκοσυλίωση ή η παρουσία και ο αριθμός δισουλφιδικών δεσμών μπορούν να αυξάνουν τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των αλλεργιογόνων μορίων(74, 75). Αν και αυτή η προσέγγιση μας επιτρέπει να καθορίσουμε κοινά μοριακά χαρακτηριστικά των αλλεργιογόνων μορίων, δεν υπάρχει μία από τις ανωτέρω παραμέτρους ή συνδυασμός τους που να επιτρέπει αξιόπιστη διάκριση μεταξύ αλλεργιογόνων και μη αλλεργιογόνων. Έχει επιπλέον προταθεί ότι ένας κοινός παρονομαστής των αλλεργιογόνων θα μπορούσε να είναι η έλλειψη πρωτεϊνικής αλληλουχίας που να ανευρίσκεται και σε πρωτεΐνες βακτηρίων(76). Έρευνες ομολογίας έχουν δείξει ότι τα περισσότερα κοινά αλλεργιογόνα μόρια δεν έχουν αντίστοιχα βακτηριακά ομόλογα, ενώ μη αλλεργιογόνα μόρια του ίδιου είδους έχουν αντίστοιχα ομόλογα στα βακτήρια. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές σημαντικές εξαιρέσεις στον κανόνα. Επιπρόσθετα, πρωτεΐνες βακτηρίων έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να δράσουν ως τύπου I αλλεργιογόνα μεσολαβώντας IgE ανοσιακή απάντηση(77, 78).

Η σημειωθείσα πρόοδος στη δομική βιολογία και τη βιοπληροφορική μας έχει προμηθεύσει λεπτομερείς πληροφορίες για τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή περισσότερων από 200 κοινών αλλεργιογόνων μορίων (RCSB protein Data Bank : www.rcsb.org/pdb/)(73). Τα περισσότερα αλλεργιογόνα δύνανται να κατατάσσονται σε τέσσερις (4) δομικές οικογένειες όταν κατατάσσονται σύμφωνα με την πτύχωση της πρωτεΐνης τους: (1) antiparallel β – strands (2) antiparallel β – strands closely associated with one or more α – helices (3) α – and β – structures not closely associated (4) α – helical structure. Ξανά, αν και υπήρξαν



Εικόνα 2

κάποια αρχικά δεδομένα, δεν υπάρχουν κάποια δομικά χαρακτηριστικά δευτεροταγούς ή τριτοταγούς δομής που να επιτρέπουν μια αξιόπιστη διάκριση μεταξύ αλλεργιογόνων και μη αλλεργιογόνων πρωτεϊνών(79). Ωστόσο, ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών επιτρέπει την ερμηνεία και σε σημαντικό βαθμό την πρόβλεψη της διασταυρούμενης αλλεργιογονικότητας μεταξύ ομόλογων αλλεργιογόνων μορίων από διαφορετικές αλλεργιογόνες πηγές. Η διασταυρούμενη αλλεργιογονικότητα αφορά στη δυνατότητα μιας πρωτεΐνης να προκαλεί συμπτώματα μετά έκθεση σε θεωρητικά διαφορετικές αλλεργιογόνες πηγές όπως το αλλεργιογόνο της προφιλίνης (profilin) και το σύνδρομο γύρης τροφής. Επίσης διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ περιβαλλοντικών αλλεργιογόνων και αντιγόνων ανθρώπινου ιστού βασιζόμενη στη μοριακή απομίμηση, θεωρείται ότι παίζει σημαντικό παθογενετικό ρόλο στην ατοπική δερματίτιδα(80).

Μια περισσότερο πρόσφατη προσέγγιση υποδεικνύει ότι ειδικά των αλλεργιογόνων μοτίβα (motifs) μπορούν να αναγνωριστούν με τη μέθοδο της *in silico* χαρτογράφησης χαρακτηριστικών της επιφάνειας των μορίων. Ανάλυση των προτύπων (patterns) διατήρησης, των υπολειμμάτων (residue) επιφάνειας πρωτεΐνης, σε 4 οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών και των μη αλλεργιογόνων ομολόγων τους ανέδειξε την παρουσία ειδικών του αλλεργιογόνου τεμαχίων (patches) με υψηλή αναλογία εκτεθειμένων στην επιφάνεια υδροφοβικών υπολειμμάτων(81). Κατά πόσον τούτο είναι αληθές και για άλλες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών αλλά και η ίδια η φύση της λειτουργικής συσχέτισης των ειδικών του αλλεργιογόνου μοτίβων επιφάνειας του μορίου μένει να προσδιοριστεί με περισσότερα δεδομένα στο μέλλον.

Η τριτοταγής δομή των αλλεργιογόνων μορίων δύναται να επηρεάζει την αλλεργιογονικότητα διευκολύνοντας τη «γεφύρωση» (cross – linking) των ειδικών του αλλεργιογόνου IgE αντισωμάτων, αυξάνοντας τη σταθερότητα του αλλεργιογόνου μορίου, μέσω προστασίας από πρωτεολυτική αποδόμηση και τελικώς σχηματίζοντας πρόσθετους, για σύνδεση IgE αντισώματος, επιτόπους που εδράζονται σε περιοχές επαφής μονομερών του μορίου(82).

Επομένως αν και μπορούμε να περιγράψουμε κοινά στοιχεία των αλλεργιογόνων μορίων, η δομική βιολογία δεν έχει επιτύχει έως σήμερα να μας προμηθεύσει με αξιόπιστα χαρακτηριστικά διάκρισης που να επιτρέπουν τον προσδιορισμό των αλλεργιογόνων μορίων(79, 83, 84). Ωστόσο, το γεγονός ότι ένα αλλεργιογόνο μόριο προκαλεί την μετατροπή και μονοκλωνική, ολιγοκλωνική ή πολυκλωνική, IgE ισοτύπου, ανοσιακή απόκριση στην συγκεκριμένη δομή του (η οποία μπορεί να εκδηλώνει επιπλέον διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με ομόλογες δομές) δεικνύει ισχυρά ότι κάποια στοιχεία της δομής του αλλεργιογόνου μορίου πρέπει να εμπλέκονται στην όλη διαδικασία.

Ωστόσο, οφείλουμε να διατηρούμε ανοιχτή την προοπτική των πιθανοτήτων που προκαλούν την, μέσω μετατροπής σε Th2 κυτταρική και ειδική του IgE αντισώματος, ανοσιακή απάντηση σε ποικιλία παραγόντων, ειδικών του συγκεκριμένου ασθενούς (γενετικό υπόστρωμα), εγγενούς λειτουργίας του αλλεργιογόνου (άλλης αλλά επάγουσας την αλλεργιογονικότητα), όπως και περιβαλλοντικούς παράγοντες που συνεκδηλώνονται κατά την έκθεση στο αλλεργιογόνο μόριο ή την αλλεργιογόνο πηγή.

2.2 Μείζονα – κύρια και ελάσσονα – δευτερεύοντα αλλεργιογόνα

Μία απλή και σημαντική κατάταξη των αλλεργιογόνων είναι σε μείζονα ή κύρια και ελάσσονα ή δευτερεύοντα αλλεργιογόνα. Ένα μόριο καλείται μείζον ή κύριο αλλεργιογόνο όταν προκαλεί αλλεργική αντίδραση στο 50% ή και περισσότερο των αλλεργικών ατόμων ενός συγκεκριμένου πληθυσμού και ελάσσον ή δευτερεύον όταν λιγότερο του 50% των ατόμων του πληθυσμού αυτού αντιδρούν στο δεδομένο αλλεργιογόνο.

Τα αλλεργιογόνα μπορούν να χαρακτηρισθούν με βάση την αλλεργιογόνο πηγή προέλευσης τους και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού στον οποίο αναφέρονται και έχουν μελετηθεί ως αίτια πρόκλησης αλλεργίας. Έχει δειχθεί ότι ορισμένα αλλεργιογόνα καθίστανται μείζονα όταν μελετάται συγκεκριμένος πληθυσμός με υπερβολική ή ασυνήθιστη έκθεση σε αυτά όπως συμβαίνει σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές (περιοχές καλλιέργειας ελιάς, φυσικοί ελαιώνες)(54, 85) ή επαγγελματική έκθεση (μελισσοκόμοι, εργάτες και επαγγελματίες υγείας σε latex)(86-88) ενώ παραμένουν ελάσσονα σε άλλους πληθυσμούς. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αλλεργία σε φρούτα της οικογένειας Rosaceae στην Ευρώπη. Στη Βόρεια και Κεντρική Ευρώπη η πλειονότητα των αλλεργικών στα φρούτα ασθενών είναι ευαισθητοποιημένοι στις PR-10 πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με το μείζον αλλεργιογόνο της Σημύδας Bet v 1. Μια μικρή σχετικά μειονότητα είναι ευαισθητοποιημένη σε άλλα αλλεργιογόνα όπως οι LTPs (lipid transfer proteins) και οι profilins. Στην Νότια Ευρώπη αντίθετα ευαισθητοποίηση στη Σημύδα σπάνια ανευρίσκεται, για προφανείς γεωγραφικούς λόγους, ενώ ευαισθητοποίηση στις LTPs (lipid transfer proteins) είναι κοινή και κυρίαρχη στους πληθυσμούς ιδιαίτερα της Μεσογείου(89).

Συστημικά τα μείζονα αλλεργιογόνα μελετώνται ως τα πλέον σημαντικά αλλά αυτό δεν αναιρεί τη δυνατότητα ορισμένων αλλεργιογόνων να προκαλούν σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις σε ένα αλλεργικό σε αυτά άτομο, αν και ελάσσονα κατά τον συστημικό χαρακτηρισμό τους. Κλασικό παράδειγμα και εδώ το ανώτερο αναφερθέν με τις LTP (lipid transfer proteins) του φουντουκιού να κατατάσσονται ως ελάσσονα αλλεργιογόνα και την PR-10 (pathogen related) πρωτεΐνη να αναγνωρίζεται ως μείζον αλλεργιογόνο για Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη. Οι LTPs (lipid transfer protein) όμως μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές αλλεργικές, αναφυλακτικές, αντιδράσεις και σε αυτούς τους πληθυσμούς σε σχέση με την PR – 10 (pathogen related) πρωτεΐνη που κατά κανόνα προκαλεί ηπιότερες αντιδράσεις(90-92).

2.3 Ονοματολογία των αλλεργιογόνων

Σύμφωνα με την παραδοσιακή κατάταξη, τα αλλεργιογόνα αντιμετωπίστηκαν κατά την ονοματολογία τους σύμφωνα με το είδος ή αλλεργιογόνο πηγή προέλευσης τους (πχ. αλλεργιογόνο αυγού, ψαριού, γύρης ελιάς, μύκητα), δηλαδή με ένα ειδικό για το είδος τρόπο. Όταν έγινε εμφανές ότι πολλές αλλεργιογόνα μόρια πρωτεΐνης ενός είδους έχουν ομόλογα τους σε άλλα στενά ή απομακρυσμένα συγγενικά είδη, άρχισε να χρησιμοποιείται η ταξινόμηση που βασίζεται στην ομοιότητα της ακολουθίας αμινοξέων, της δομής ή και λειτουργίας της πρωτεΐνης.

Το σύστημα ονοματολογίας για τα αλλεργιογόνα συνεχίζει να προέρχεται από την πηγή αλλεργιογόνου αλλά και τους κανόνες που έχουν θεσπιστεί από τη Διεθνή Ένωση των Ανοσολογικών Εταιρειών (*International Union of Immunological Societies – I.U.I.S*) και συγκεκριμένα την Υπο-επιτροπή Ονοματολογίας των Αλλεργιογόνων για να εξασφαλιστεί ότι η αναγνώριση και ταυτοποίηση είναι μοναδική για κάθε αλλεργιογόνο(61). Η υπο-επιτροπή διατηρεί επίσης ένα «επίσημο κατάλογο των αλλεργιογόνων», η οποίος μπορεί να βρεθεί στην ιστοσελίδα τους (<http://www.allergen.org>). Όταν ένα νέο αλλεργιογόνο εντοπιστεί, το οποίο να πληροί ορισμένα κριτήρια που αφορούν την ταυτότητα του και την δυνατότητα δέσμευσης IgE αντισώματος, η επιτροπή απονέμει ένα όνομα στο αλλεργιογόνο. Το νέο αλλεργιογόνο μπορεί να είναι μία νέα ή μία γνωστή ήδη πρωτεΐνη που έχει ανακαλυφθεί ότι έχει ιδιότητες δέσμευσης του IgE αντισώματος.

Το όνομα αποτελείται από τα τρία πρώτα γράμματα του γένους του είδους (φυτικού ή ζωικού) ακολουθούμενο από το πρώτο γράμμα (περισσότερα του ενός γράμματα σε περιπτώσεις προϋπάρχοντος άλλου αλλεργιογόνου) του επιθέτου και ένα αραβικό αριθμό που υποδηλώνει τη σειρά ανακάλυψης του συγκεκριμένου αλλεργιογόνου μορίου. Σύμφωνα με αυτόν τον κανόνα έχουμε για παράδειγμα: γύρις ελιάς (*Olea europea*) – *Ole e* 1, 2, 7, 9, περδικάκι (*Parietaria judaica*) – *Par j* 1, 2, αυγό (*Gallus domesticus*) – *Gal d* 1, 2, 3, 4, 5, μέλισσα (*Apis mellifera*) – *Api m* 1, 4.

2.4 Οικογένειες πρωτεϊνών – αλλεργιογόνων

Σχεδόν κάθε πρότυπο, πηγή πρωτεϊνών, είναι εν δυνάμει αλλεργιογόνος. Δεν υπάρχει ωστόσο μια γνωστή δομή πρωτεΐνης κοινή σε όλα τα αλλεργιογόνα μόρια ή αλλιώς δεν υπάρχει μια γνωστή δομή πρωτεΐνης που να καθιστά μία ουσία αλλεργιογόνα πηγή. Κάθε είδος (φυτικό, ζωικό) περιέχει επιτόπους σε μόρια του, ειδικούς για το είδος και τα σχηματιζόμενα IgE αντισώματα στρέφονται μόνο εναντίον τους. Αντίθετα πρωτεΐνες με όμοια σε κάποιο βαθμό δομή (>40% αλληλουχία αμινοξέων) μπορούν να περιέχονται σε διαφορετικά μεταξύ τους είδη. Έτσι ειδικά IgE εναντίον αυτών των ομοίων πρωτεϊνικών δομών συνδέονται σε αλλεργιογόνα μόρια πρωτεΐνης διαφορετικών μεταξύ τους ειδών προκαλώντας διασταυρούμενη αντίδραση. Τέλος η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης αλλεργιογόνου σε συνθήκες stress (θερμότητα, πέψη) είναι σημαντικό χαρακτηριστικό που πρέπει να γνωρίζουμε καθώς τέτοιας σταθερότητας πρωτεΐνες προκαλούν βαρύτερη αλλεργική αντίδραση (αναφυλαξία), ενώ πρωτεΐνες ευαίσθητες σε συνθήκες stress προκαλούν συνήθως ηπιότερες αντιδράσεις ή και απλή ευαισθητοποίηση.

Ειδικά για το συγκεκριμένο είδος (ζωικό, φυτικό) αλλεργιογόνα συστατικά μόρια αποτελούν μοναδικούς ειδικούς δείκτες για το συγκεκριμένο αλλεργιογόνο πρότυπο (λεύκωμα αυγού, γύρις αγρωστωδών, άκαρι οικιακής σκόνης). Η αξία της ταυτοποίησης τους έγκειται στη δυνατότητα προσδιορισμού του πρωταρχικού αλλεργιογόνου μορίου που προκάλεσε την ευαισθητοποίηση ή νόσο ειδικά για το συγκεκριμένο αλλεργιογόνο πρότυπο (λεύκωμα αβγού, γύρις αγρωστώδους).

Αλλεργιογόνα συστατικά μόρια με βαθμό κοινής δομής (>40%) παρόντα σε διαφορετικά αλλεργιογόνα πρότυπα, μερικά καθόλου φυλογενετικά σχετιζόμενα μεταξύ τους, αποτελούν δείκτες διασταυρούμενης αντίδρασης. Η ταυτοποίηση τους δίνει σημαντικές πληροφορίες για ευαισθητοποίηση σε πολλαπλά διαφορετικά αλλεργιογόνα πρότυπα. Προσδιορίστηκαν λοιπόν νέες οικογένειες πρωτεϊνών με βάση την κοινή δομή (αλληλουχία αμινοξέων), που μας έδωσαν την δυνατότητα ερμηνείας του φαινομένου της διασταυρούμενης αλλεργίας.

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός ενός αλλεργιογόνου, δηλαδή ενός αλλεργιογόνου μορίου, αποτελεί ένα από τα μείζονα ερευνητικά πεδία της μοριακής αλλεργιολογίας. Αλλεργιογόνα είναι εκείνα τα μόρια, κυρίως πρωτεΐνης, που καθίστανται ικανά να εκλύουν αλλεργική ανοσολογική απάντηση στον άνθρωπο και είναι σημαντικό να γνωρίζουμε όλα τα δυνατά λεπτομερή χαρακτηριστικά τους με σκοπό την προοπτική εκτίμηση της αλλεργιογονικότητας και της διασταυρούμενης αλλεργιογονικότητας τους. Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, εκατοντάδες αλλεργιογόνες πρωτεΐνες από όλες τις δυνατές πηγές ή υλικά (γύρις φυτών, ακάρεα οικιακής σκόνης, μύκητες, επιθήλια ζώων, δηλητήρια υμενοπτέρων, φυσικό λάστιχο – latex, τροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης) έχουν ταυτοποιηθεί και οι ακολουθίες των αμινοξέων τους, οι φυσικοχημικές ιδιότητες και τα κλινικά δεδομένα διατίθενται από πηγές όπως η Official List of Allergens (<http://www.allergen.org>) και η Allergome (<http://www.Allergome.org>)(93). Περισσότερο ειδικές βάσεις δεδομένων για τροφικά αλλεργιογόνα είναι η InformAll (<http://www.foodallergens.ifr.ac.uk>) και η Food Allergy Research and Recourse Programme (FARRP) (<http://www.allergenonline.com>) εκ των οποίων η πρώτη περιορίζεται στις πρωτεΐνες εκείνες που έχουν δείξει σύνδεση ειδικού IgE και πρόκληση κλινικής αλλεργίας στην τροφή από την οποία προέρχονται. Οι βάσεις αυτές ταξινομούν τα αλλεργιογόνα κυρίως σύμφωνα με την πηγή προέλευσης. Ωστόσο ο αυξανόμενος αριθμός των διαθέσιμων δεδομένων των αλληλουχιών αμινοξέων και δομών των αλλεργιογόνων έκανε δυνατή την καθιέρωση μιας πιο φυσικής ταξινόμησης που ταυτοποιεί πλέον οικογένειες πρωτεϊνών των αλλεργιογόνων σύμφωνα με την αλληλουχία των αμινοξέων και την δομική ομοιότητα. Τούτο επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μιας λεπτομερούς βάσης των οικογενειών των πρωτεϊνών. Τέτοια είναι η Pfam database (<http://Pfam.sanger.ac.uk>) με καταχωρημένες στην τελευταία έκδοση της 8957 οικογένειες πρωτεϊνών(94). Η συνδυασμένη με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής χρήση των ανωτέρω βάσεων δεδομένων κυρίως με την εφαρμογή της ταξινόμησης των οικογενειών πρωτεϊνών στα δεδομένα των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών επιτρέπει την ανάδειξη των οικογενειών των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών. Έτσι προκύπτουν οι οικογένειες πρωτεϊνών των αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης και οι οικογένειες πρωτεϊνών των αλλεργιογόνων ζωικής προέλευσης.

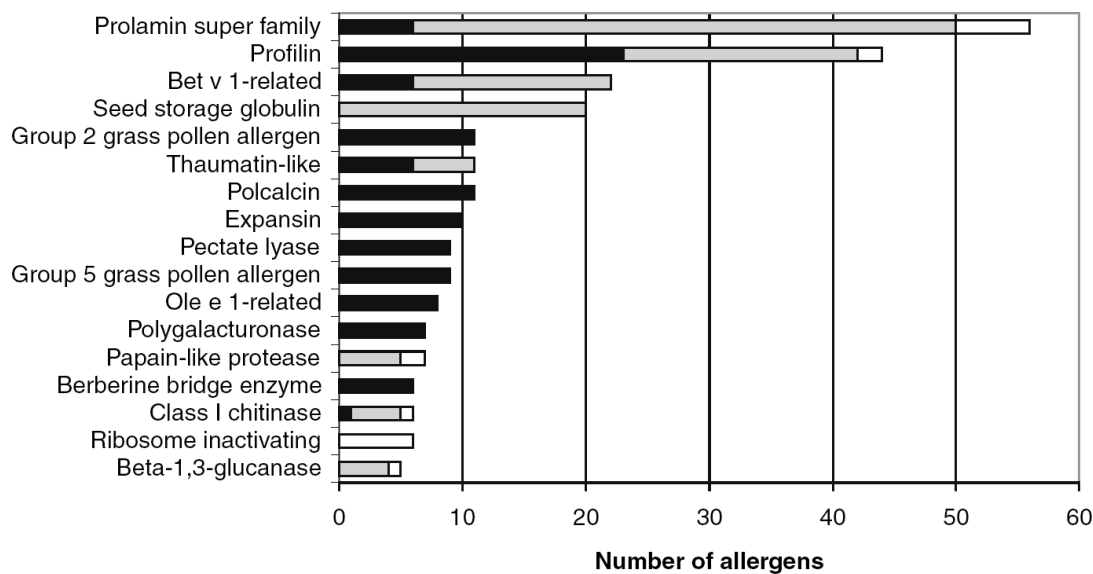
Ο έλεγχος για αλληλουχίες αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης στην βάση δεδομένων Allergome σε συνδυασμό με τη βάση οικογενειών πρωτεϊνών Pfam δημιουργεί μία λίστα Pfam οικογενειών και Pfam πρωτεϊνικών δομών των αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης(71). Η Pfam πρωτεϊνική δομή αναπαριστά το πεδίο ορισμού δομής της πρωτεΐνης και επιλέγεται ως

κριτήριο για την ταξινόμηση των αλλεργιογόνων προκειμένου να αποφευχθούν ασάφειες όσον αφορά πρωτεΐνες πολλαπλών πεδίων ορισμού. Από τις 321 αλληλουχίες αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης, 315 κατανέμονται μεταξύ 62 Pfam πρωτεϊνικών δομών και 66 Pfam οικογενειών πρωτεϊνών, είναι μόνο 0.8% όλων των οικογενειών πρωτεϊνών στην Pfam βάση δεδομένων. Η περιορισμένη κατανομή των αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης στη διάστημα των οικογενειών πρωτεϊνών εμφανίζεται από το γεγονός ότι οι 17 περισσότερο κοινές οικογένειες αλλεργιογόνων περιέχουν 75% όλων των αλληλουχιών αλλεργιογόνων.

| Protein family name | Pfam architecture | Number |
|--|-------------------|--------|
| Prolamin superfamily | PF00234 | 52 |
| Profilin | PF00235 | 42 |
| Bet v 1-related | PF00407 | 21 |
| Seed storage globulin | PF00190-PF00190 | 20 |
| Group 2 grass pollen allergen | PF01357 | 11 |
| Thaumatococcus-like | PF00314 | 11 |
| Polcalcin | PF00036-PF00036 | 11 |
| Expansin | PF03330-PF01357 | 10 |
| Pectate lyase | PF00544 | 9 |
| Group 5 grass pollen allergen | PF01620 | 9 |
| Ole e 1-related | PF01190 | 8 |
| Polygalacturonase | PF00295 | 7 |
| Papain-like protease | PF08246-PF00112 | 6 |
| Berberine bridge enzyme | PF01565-PF08031 | 6 |
| Class I chitinase | PF00187-PF00182 | 6 |
| Ribosome inactivating protein | PF00161 | 6 |
| Beta-1,3-glucanase | PF00332 | 5 |
| Members of 45 allergen families with less than 5 members | | 75 |
| Members of uncharacterized families | | 6 |

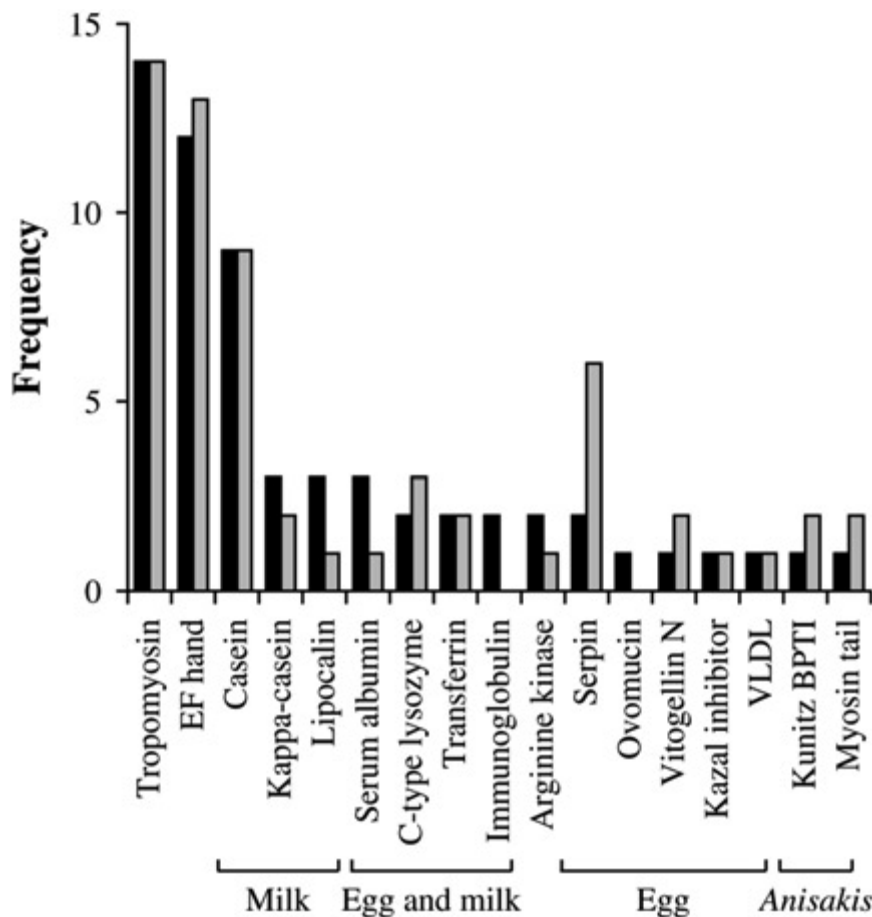
Εικόνα 3: Οι περισσότερο άφθονες οικογένειες πρωτεϊνών των αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης

Οι δύο πιο σημαντικές πηγές των αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης είναι οι γύρεις και οι φυτικές τροφές. Η κατανομή των αλλεργιογόνων μεταξύ των οικογενειών πρωτεϊνών εμφανίζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αλλεργιογόνων πηγών. Χαρακτηριστικά ενώ κάποιες οικογένειες αλλεργιογόνων περιορίζονται σε συγκεκριμένες πηγές όπως οι αποθηκευτικές πρωτεΐνες του καρπού (*seed storage proteins*) στις φυτικές τροφές και οι πολκαλσίνες (*polcalcins*) στις γύρεις, άλλες οικογένειες αλλεργιογόνων ανευρίσκονται σε όλες τις αλλεργιογόνες πηγές. Τούτο αναδεικνύει την αναζητούμενη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ μελών μερικών από αυτές τις οικογένειες παναλλεργιογόνων, υπεύθυνη για την εκδήλωση των συνδρόμων γύρης – τροφής και latex – τροφής αλλεργικής αντίδρασης(95).



Εικόνα 4: Κατανομή ως προς την πηγή των οικογενειών αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης. Μαύρο: γύρεις, Γκριζο: τροφή, Λευκό: άλλο (latex)

Ο έλεγχος, ανάλογα, για αλληλουχίες αλλεργιογόνων ζωικής προέλευσης στις βάσεις τροφικών αλλεργιογόνων, *InformAll* (<http://www.foodallergens.ifr.ac.uk>) και *Food Allergy Research and Recourse Programme (FARRP)* (<http://www.allergenonline.com>) εκ των οποίων η πρώτη περιορίζεται στις πρωτεΐνες εκείνες που έχουν δείξει σύνδεση ειδικού IgE και πρόκληση κλινικής αλλεργίας στην τροφή από την οποία προέρχονται, σε συνδυασμό με τη βάση οικογενειών πρωτεϊνών Pfam δημιουργεί μια λίστα Pfam οικογενειών και Pfam πρωτεϊνικών δομών των αλλεργιογόνων ζωικής προέλευσης(96). Δεδομένου ότι ένας περιορισμένος αριθμός τροφών είναι υπεύθυνος για την πλειοψηφία των αλλεργικών αντιδράσεων, με τα ψάρια, θαλασσινά και ξηρούς καρπούς κυρίως στους ενήλικες, ενώ τα γάλα και το αυγό κυρίως στα παιδιά, και επιπρόσθετα, αντίθετα από τα αλλεργιογόνα φυτικής προέλευσης, τα τροφικά αλλεργιογόνα έχουν ομόλογες αλληλουχίες με πρωτεΐνες του ανθρώπου, γεγονός που επηρεάζει την αναγνώριση τους από το ανοσοποιητικό σύστημα, η κατανομή των αλλεργιογόνων τροφικής προέλευσης ταξινομείται σε τρεις συνολικά οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, με ένα υπόλοιπο 14 οικογενειών που περιέχουν από 1 έως 3 αλλεργιογόνα το καθένα. Ο μικρότερος αριθμός καθορισμένων δεδομένων για τα αλλεργιογόνα τροφικής προέλευσης, με μόνο τρεις οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών κυρίως, αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι οι άνθρωποι εξελικτικά καταναλώνουν πολύ μικρότερο εύρος τροφών ζωικής προέλευσης σε σχέση με τις τροφές φυτικής προέλευσης και ότι επίσης τα αλλεργιογόνα ομόλογα του γάλακτος και του αυγού από διαφορετικά φυλογενετικά είδη δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. Επίσης το δεδομένο της ομολογίας αλληλουχιών πρωτεϊνών και η έμφυτη ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να ξεχωρίζει το "ίδιο" από το "ξένο" μπορεί να ερμηνεύσει γιατί πρωτεΐνες τροφής ζωικής προέλευσης, ιδιαίτερα θηλαστικών, με υψηλό βαθμό ομολογίας είναι ελάχιστα ανοσογόνες στον άνθρωπο και συνεπώς έχουν μικρή πιθανότητα να γίνουν αλλεργιογόνα(96).



Εικόνα 5. Κατανομή ως προς την πηγή των οικογενειών αλλεργιογόνων ζωικής προέλευσης. Μαύρες ράβδοι: InformAll βάση, Γκριζές ράβδοι: FARRP βάση, δεδομένων

Στη συνέχεια περιγράφονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, οι κατανομές ανά είδος και η σημασία στην αλλεργιολογία, ορισμένων σημαντικών οικογενειών αλλεργιογόνων.

2.5 Μείζονες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης

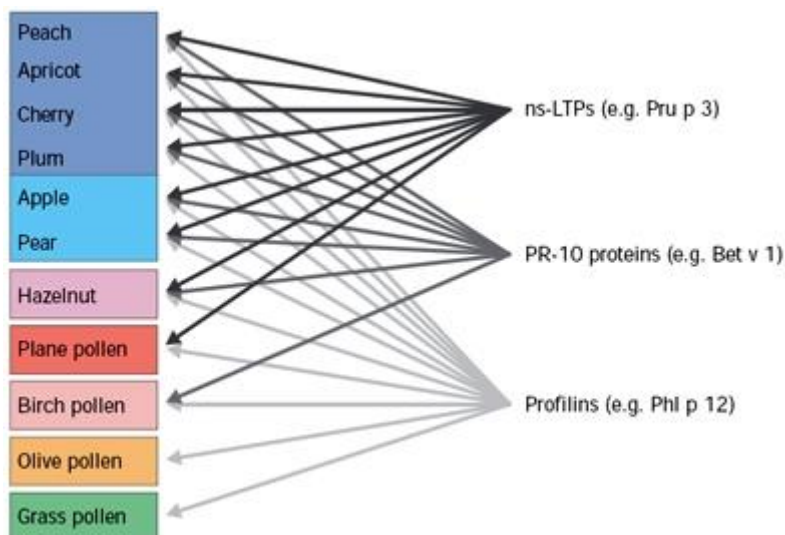
Prolamin Superfamily. Η ύπαρξη της υπεροικογένειας της προλίνης ή προλαμινών προσδιορίστηκε το 1985(97) και το όνομα προήλθε από τις πλούσιες σε προλίνη και γλουταμίνη αποθηκευτικές πρωτεΐνες των δημητριακών όπως τα σιτηρά, κριθάρι, σίκαλη αλλά όχι το ρύζι. Αν και αλλεργικές αντιδράσεις στις προλίνες των σιτηρών περιγράφονται σαφώς, τα μείζονα αλλεργιογόνα που εκτιμάται ότι ευαισθητοποιούν ατοπικά άτομα δια του γαστρεντερικού ανήκουν σε μία από τις οικογένειες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των προλινών και είναι οι **2S albumins**, οι **non – specific transfer proteins (nsLTPs)** και οι **inhibitors of alpha – amylase and / or trypsin** των σιτηρών(98). Όπως και όλα τα μέλη της υπεροικογένειας της προλίνης, οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από την παρουσία διατηρημένων μοριακών προτύπων των έξι ή οχτώ υπολειμμάτων κυστεϊνης που σχηματίζουν τρεις ή τέσσερις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι εκείνο το χαρακτηριστικό του μορίου τους που προσφέρει τη σταθερότητα σε θερμική επεξεργασία και διαδικασία πέψης στα μόρια αυτά, σημαντικό χαρακτηριστικό των αληθών

τροφικών αλλεργιογόνων(99). Όλες αυτές οι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες έχουν όμοια στερεοχημική δομή με τη διάταξη των δισουλφιδικών δεσμών να διαφέρει μόνο στις non – specific lipid transfer proteins (nsLTPs) σε σχέση με τις άλλες δύο υποοικογένειες(98).

2S albumins. Οι 2S σφαιρίνες είναι μείζονα ομάδα ή υποοικογένεια των πρωτεϊνών αποθήκευσης (storage proteins) ενός ποικίλου βοτανολογικά εύρους δικοτυλήδων φυτών. Περιλαμβάνουν καλλιέργειες ψυχρών κλιμάτων όπως η ελαιοκράμβη, το ηλιοτρόπιο, το λούπινο, η μουστάρδα αλλά και καλλιέργειες θερμών κλιμάτων όπως το σουσάμι και το φιστίκι. Πολλά από τα αλλεργιογόνα των ξηρών καρπών και οσπρίων, τα οποία όσπρια περιλαμβάνονται εδώ αλλά καταναλώνονται διαφορετικά λόγω διατροφικών συνηθειών, ανήκουν στις 2S σφαιρίνες. Τέτοια έχουν χαρακτηριστεί το καρύδι (*Jug r 1*, βοτανολογικά *Juglandaceae*)(100), τα κάσιου και φιστίκι Αιγίνης (*Ana 3*, βοτανολογικά *Anacardiaceae*)(101). Επίσης τα ρεβίθι, αμύγδαλο και σουσάμι.

Non-specific lipid transfer proteins (nsLTP). Οι μη ειδικές μεταφορείς λιπιδίων πρωτεΐνες, ονομάστηκαν αρχικώς λόγω της αποδιδόμενης ικανότητας τους να μεταφέρουν λιπίδια μέσω μεμβρανών, συνιστούν μία οικογένεια από 7kDa (*nsLTP 2*) και 9kDa (*nsLTP 1*) αλλεργιογόνες πρωτεΐνες ευρέως δεδομένες στο φυτικό βασίλειο(102). Ο ρόλος μεταφοράς λιπιδίων ωστόσο αμφισβητείται πλέον καθώς νεώτερα δεδομένα τις κατατάσσουν στις πρωτεΐνες άμυνας του φυτού σε μύκητες, βακτήρια, αντιβιοτικά και μη ειδικές συνθήκες stress (103). Τούτο επιβεβαιώνεται επίσης από την προαγωγή έκφρασης τους σε συνθήκες stress (κλιματικές μεταβολές, τεχνητές καλλιέργειες), την ανθεκτικότητα τους σε θερμική ή χημική (όξινο pH) επεξεργασία, διαδικασία πέψης (πρωτεόλυση) και την κατεξοχήν συγκέντρωση τους στο περικάρπιο (φλούδα) φρούτων και ξηρών καρπών(104). Αλλεργιογόνες nsLTPs ανευρίσκονται στις γύρεις δένδρων και θάμνων και σε ιστικά κύτταρα των φυτών και μπορούν να προκαλέσουν αναπνευστική και τροφική αλλεργία (κυρίως περικάρπιο φρούτων και ξηρών καρπών). Ωστόσο δεν έχουν προσδιοριστεί στις γύρεις των αγρωστωδών (γρασίδι) ενώ έχουν προσδιοριστεί στο λάστιχο (*latex*). Αλλεργιογόνες nsLTPs γύρεων έχουν χαρακτηριστεί σε περδικάκι (*Parietaria judaica – Par j 1,2*), ελιά (*Olea Europea – Ole e 7*), πλάτανο (*Platanus acerifolia – Pla a 3*), αρτεμισία (*Artemisia vulgaris – Art v 3*). Αλλεργιογόνες nsLTPs φυτικών τροφών έχουν χαρακτηριστεί σε φρούτα, ροδάκινο (*Prunus persica - Pru p 3*), σε ξηρούς καρπούς, φιστίκι (*Arachis hypogaea – Ara h 9*), φουντούκι (*Corylus avellana – Cor a 8*), καρύδι (*Juglans regia – Jug r 3*). Είναι υπεύθυνες για την εκδήλωση στοματοφαρυγγικού συνδρόμου έως και σοβαρής συστηματικής αντίδρασης (αναφυλαξίας) στην νότια Ευρώπη(54). Το μεταβαλλόμενο αυτό στάδιο κλινικής βαρύτητας στο οποίο τοποθετείται η IgE ευαισθητοποίηση σε nsLTPs, είναι ιδιαίτερα σημαντικό από πλευράς συχνότητας στη Μεσόγειο. Οι LTP αποτελούν αμυντικές πρωτεΐνες, τοποθετημένες στρατηγικά στην εξωτερική επιφάνεια των φυτικών δομών, σε ποσότητες που εξαρτώνται από το βαθμό της 'εξωτερικής απειλής' κατά τη φάση της ανάπτυξης. Σαν αποτέλεσμα, η περιεχόμενη ποσότητα LTP στον κάθε καρπό είναι ευρύτατα κυμαινόμενη, αναλόγως της συγκεκριμένης ποικιλίας, των συνθηκών καλλιέργειας ή του σταδίου ωρίμανσης(105). Για το λόγο αυτό, οι ασθενείς που είναι ευαισθητοποιημένοι σε LTP πρωτεΐνες των καρπών ενδέχεται να παρουσιάζουν μεταβλητή κλινική αντιδραστικότητα: κάποιες φορές να ανέχονται μικρές-μέτριες ποσότητες των καρπών, ενώ άλλες να αντιδρούν ακόμα και με συστηματικό

τρόπο, ειδικά κάτω από τη συν-επίδραση παραγόντων που αυξάνουν την αντιδραστικότητα, όπως η άσκηση, η λοίμωξη, η λήψη ΜΣΑΦ ή η παρατεταμένη νηστεία προ της κατανάλωσης του καρπού ενώ περιγράφονται και περιπτώσεις αναφυλακτικής αντίδρασης μετά απλή επαφή με τον καρπό, συνήθως το υψηλής περιεκτικότητας σε nsLPT χνουδωτό περικάρπιο του ροδάκινου(106). Στις περισσότερες των περιπτώσεων, οι συγκεκριμένη ομάδα ασθενών παρουσιάζει ευαισθητοποίηση και ενδεχόμενα αλλεργία και σε άλλους ξηρούς καρπούς, όσπρια ή και φρούτα και λαχανικά, καθώς οι LTP πρωτεΐνες παρουσιάζουν αξιόλογη δομική ομολογία μεταξύ των διαφόρων ειδών. Αντίθετα ευαισθητοποίηση σε nsLTPS σπάνια παρατηρείται στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη, όπου η αλλεργία σε αντίστοιχα φρούτα και ξηρούς καρπούς συσχετίζεται με αλλεργία στην σημύδα. Έχει προταθεί ότι αυτές οι γεωγραφικά παρατηρούμενες διαφορές, ερμηνεύονται από τις διαφορές στην κατανάλωση των φρούτων και την ένταση έκθεσης στις γύρεις, δηλαδή μόνο γύρη σημύδας στη κεντρική και βόρεια Ευρώπη, γύρεις ελιάς, πλάτανου και περδικάκι στην Μεσόγειο(107). Ωστόσο το ερώτημα αν οι nsLTPs των γύρεων ή των τροφών δρουν ως αλλεργιογόνα πρόκλησης της πρωτοπαθούς ευαισθητοποίησης δεν έχει απαντηθεί ακόμη.



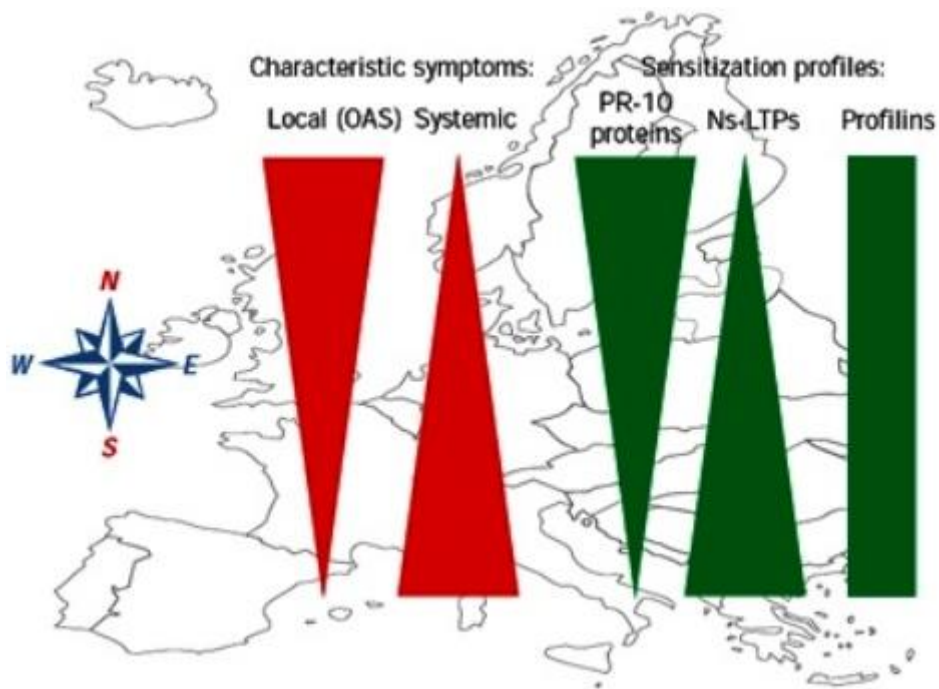
Εικόνα 6: Σημαντικές συσχετίσεις διασταυρούμενης αντιδραστικότητας, αλλεργιογόνων μορίων, οικογενειών πρωτεϊνών και των αντίστοιχων κοινών αλλεργιογόνων πηγών φυτικής προέλευσης

Seed Storage globulins. Οι αποθηκευτικές σφαιρίνες ή πρωτεΐνες των σπόρων ταξινομούνται σε δύο ομάδες σύμφωνα με το συντελεστή καθίζησης τους. Οι **7/8 S** πρωτεΐνες ανευρίσκονται σε ένα εύρος μονοκυτλήδων και δικοκυτλήδων ειδών και αναφέρονται και ως **vicilins**. Οι **11S – 12S** πρωτεΐνες είναι οι περισσότερο διαδεδομένες σε μονοκυτλήδονα και δικοκυτλήδονα ιδιαίτερα σε σπόρους όσπριων (*legume seeds*) αναφέρονται επομένως και ως **legumins**. Αμφότερες ανήκουν στην υπεροικογένεια των *cupins*, μία μεγάλη και λειτουργικά εξαιρετικά ποικίλη οικογένεια πρωτεϊνών με κοινή καταγωγή και εξέλιξη από τα βακτήρια στα ευκαρυωτικά, τα ζώα και τα ανώτερα φυτά(108, 109). Οι *cupins* περιλαμβάνοντας τις αποθηκευτικές πρωτεΐνες των σπόρων συνιστούν μείζονα στοιχεία της διατροφής του ανθρώπου, καθώς περιέχονται άφθονες, έως και 70% της περιεκτικότητας, σε πρωτεΐνη, σε σπόρους και καρπούς. Σταθερές σε συνθήκες stress, οι οποίες προάγουν την έκφραση τους και βρασμού, πέψης, μπορούν να προκαλέσουν αντίδραση ακόμη και σε

μαγειρευμένη τροφή. Ωριμες 7/8 S vicilins είναι ομοιοτριμερείς πρωτεΐνες χωρίς υπολείμματα κυστεΐνης και επομένως δισουλφιδικούς δεσμούς. Η καλύτερα μελετημένη 7/8S αλλεργιογόνος πρωτεΐνη είναι το μείζον αλλεργιογόνο του φιστικιού Ara h 1 – *Arachis hypogaea*, υπεύθυνο για την πλειοψηφία των περιπτώσεων θανατηφόρας, σχεδόν θανατηφόρας αναφυλακτικής αντίδρασης από τροφή φυτικής προέλευσης. Το Ara h 1 είναι κύρια αποθηκευτική πρωτεΐνη του φιστικιού και ανιχνεύεται από το 90% των αλλεργικών στο φιστίκι ατόμων(110, 111). Ανάλογα σημαντικές αλλεργιογόνες 7/8S πρωτεΐνες αποθήκευσης έχουν προσδιοριστεί το Jug r 2 στο καρύδι(111), το Ana o 2 στο κάσιου(112), το Ses i 3 στο σουσάμι (113), το Len c 1 στη φακή(114), το Pis s 1 στον αρακά(115), το Cor a 11 φουντούκι(116). Ωριμες 11 – 12 S legumins είναι εξαμερείς πρωτεΐνες δύο τριμερών συνδεδεμένων μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Το έλασσον αλλεργιογόνο του φιστικιού Ara h 3(117) ανήκει εδώ όπως και το Ber e 2 του βραζιλιάνικου φιστικιού (118) και το Ses i 6 από το σουσάμι(119).

Expansins – Expansin related proteins. Οι expansins είναι γλυκοπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος που καταλύουν μεταβολές του κατά την αναπτυξιακή διαδικασία του φυτού(120). Ανάλυση της φυλογενετικής εξέλιξης προσδιόρισε τέσσερις υποοικογένειες, τις α – expansins, β – expansins, expansin – like A, expansin – like B, με ταυτοσημία αλληλουχιών μεταξύ τους 40% περίπου. Διάφορες ομάδες αλλεργιογόνων ανήκουν εδώ με κυρίαρχη την ομάδα (group) 1 του γρασιδιού η οποία ανήκει στις β - expansins. Η ομάδα 1 είναι το μείζον αλλεργιογόνο του γρασιδιού και αναγνωρίζεται από το 90% των ευαισθητοποιημένων στο γρασίδι ατόμων. Οι ομάδες 2 και 3 του γρασιδιού συσχετίζονται ως προς την αλληλουχία τους με τις β – expansins κατά 35 – 45% και είναι ελάσσονα αλλεργιογόνα του γρασιδιού με μεγαλύτερη ειδικότητα ωστόσο στον προσδιορισμό της ευαισθητοποίησης του ατόμου και μερική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με την ομάδα 1 αντίστοιχα(52).

Pathogenesis related protein family 10 (PR – 10). Οι σχετιζόμενες με παθογένεια πρωτεΐνες των φυτών έχουν προσδιοριστεί ως πρωτεΐνες φορείς των στεροειδών με κύριο εκπρόσωπο και περισσότερο μελετημένη αλλεργιογόνο πρωτεΐνη, το μείζον αλλεργιογόνο Bet v 1 της σημύδας, ώστε να ορίζει την ομάδα και ως **Bet v 1 related proteins** (121, 122). Εδώ κατατάσσεται επίσης και η οικογένεια των αλλεργιογόνων του λάστιχου (latex). Επίσης πρωτεΐνες αλλεργιογόνα γύρεων δένδρων της βοτανικής τάξης των *fagales* ανήκουν εδώ με σημαντικούς εκπροσώπους εκτός της σημύδας τα Cor a 1 της φουντουκιάς και Aln g 1 της σκλήθρας από τα οποία εκδηλώνεται και η διασταυρούμενη αναπνευστική αλλεργία στις βόρειες περιοχές της Νότιας Ευρώπης. Τέλος διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με ομόλογες τροφές φυτικής προέλευσης αφορούν την βοτανική οικογένεια των *Rosaceae* με χαρακτηριστικούς εκπροσώπους τα Mal d 1 του μήλου(123), Pru av 1 του κερασιού(124) και Pyc 1 του αγλαδιού(125) για τα φρούτα καθώς και τα Api g 1 του σέλιου(126) και Dau c 1 του καρότου(127). Είναι πρωτεΐνες ευαίσθητες στη θερμότητα, επομένως μαγειρευμένη τροφή είναι ανεκτή. Προκαλούν αντίδραση στοματοφαρυγγικού συνδρόμου κυρίως στη Βόρεια Ευρώπη, σπάνια προδιαθέτουν σε αντίδραση σε φρούτα, ξηρούς καρπούς στη νότια Ευρώπη εκτός κάποιων περιπτώσεων από ευαισθητοποιήσεις στις αντίστοιχες γύρεις των δένδρων, φουντουκιά, σκλήθρα, όπως αναφέρθηκε για τις βόρειες περιοχές της Νότιας Ευρώπης.



Εικόνα 7: Κατανομή βαρύτητας συμπτωμάτων και βαθμού ευαισθητοποίησης σε σημαντικές οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης στην Ευρώπη

Profilins. Οι προφιλίνες είναι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος σημαντικές στην κυτταρική κίνηση, ανευρίσκονται σε όλα τα ευκαριωτικά κύτταρα και αποτελούν την πανταχού παρούσα οικογένεια αλλεργιογόνων πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης(128). Οι προφιλίνες των ψηλότερων φυτών αποτελούν ισχυρά διατηρημένα εξελικτικά ομάδα πρωτεϊνών με ταυτοσημία αλληλουχιών τουλάχιστον 75% ακόμη και μεταξύ απομακρυσμένων φυλογενετικά ειδών(129). Αρχικώς ανακαλύφθηκαν και περιγράφηκαν ως αλλεργιογόνες γύρεις διασταυρούμενης αλλεργιογονικότητας που προκαλούν IgE αντιδράσεις σε 10% με 20% των αλλεργικών ασθενών. Αργότερα περιγράφηκαν ως αλλεργιογόνα σε τροφές φυτικής προέλευσης και στα παράγωγα λάστιχου (*Hevea latex*)(129). Αλλεργιογόνες προφιλίνες γύρεων περιγράφονται σε φυτά των βοτανολογικά ταξινομημένων οικογενειών *Poaceae* (timothy – Phl p 12, Bermuda grass – Cyn d 12 - αγρωστώδη), *Oleaceae* (olive – Ole e 2 - ελιά), *Betulaceae* (birch – Bet v 2 - σημύδα) *Chenopodiaceae* (white goosfoot – Ch a 2 - χηνοπόδιο). Δεδομένου ότι ειδικά της προφιλίνης IgE συνήθως αντιδρούν διασταυρούμενα με ομόλογα τους από σχεδόν κάθε φυτό, ευαισθητοποίηση στις προφιλίνες χαρακτηρίζεται από πολυευαισθητοποίηση σε γύρεις και τροφές φυτικής προέλευσης περιορισμένης κλινικής σημασίας αν και νεότερα δεδομένα περιγράφουν ασθενείς με αναπνευστική αλλεργία στις προφιλίνες(130).

| Είδος αλλεργιογόνου | Οικογένειες πρωτεϊνών | | | | |
|--|--------------------------|----------|---------|---------|---------------------|
| | Μείζον ειδικό του είδους | Profilin | LTP | PR – 10 | Storage proteins |
| <i>Arachis hypogaea</i> – Peanut | Ara h 1, 2, 3, 6 | | Ara h 9 | Ara h 8 | Ara h 1, 2, 3, 6, 7 |
| <i>Glycine max</i> - Soybean | Gly m 5, 6 | | | Gly m 4 | |
| <i>Triticium aestivum</i> – Wheat | Tri a 19 | | | | |
| <i>Prunus persica</i> - Peach | Pru p 3 | Pru p 4 | Pru p 3 | Pru p 4 | |
| <i>Corylus avellana</i> – Hazel nut | Cor a 1, 8 | Cor a 2 | Cor a 8 | Cor a 1 | Cor a 9 |
| <i>Actinidia deliciosa</i> – Kiwi fruit | Act d 1, 2 | | | Act d 8 | |
| <i>Bertholletia excelsa</i> – Brazil nut | Ber e 1 | | | | Ber e 1 |
| <i>Juglans regia</i> – walnut | Jug r 1, 2, 4 | | Jug r 3 | | Jug r 1, 2, 4 |

Εικόνα 8: Σημαντικά αλλεργιογόνα μόρια και πηγές τους τροφικής αλλεργίας φυτικής προέλευσης

Polcalcins (Calcium binding proteins). Οι πολκαλσίνες είναι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και περιέχουν δύο πρωτεϊνικά μοτίβα, βραχιόνων σύνδεσης ασβεστίου (calcium – binding EF hand motif). Η πρωτεϊνική δομή, βραχιόνας σύνδεσης ασβεστίου (EF hand), είναι ένα μοτίβο έλικα – βρόγχου – έλικα (helix – loop – helix) παρών σχεδόν παντού σε πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου σε κύτταρα φυτικής και ζωικής προέλευσης(131). Οι πολκαλσίνες εκφράζονται ειδικά στους ανθήρες και τις γύρεις με άγνωστη μέχρι σήμερα βιολογική λειτουργία(132). Είναι η μεγαλύτερη οικογένεια αλλεργιογόνων γύρεων με σημαντικά κοινή δομή, τουλάχιστον 65% με 92% ταυτοσημία αλληλουχιών και χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ακόμη και μεταξύ απομακρυσμένων συγγενικά φυτών μεταξύ τους(133). Αλλεργιογόνες πολκαλσίνες γύρεων περιγράφονται σε φυτά των βοτανολογικά ταξινομημένων οικογενειών *Poaceae* (timothy – *Phl p 7*, Bermuda grass – *Cyn d 7* - αγρωστώδη), *Oleaceae* (olive – *Ole e 3* - ελιά, lilac - πασχαλιά), *Cupressaceae* (*Cypressus arizonica* – *Cup a 4* – κυπαρίσσι), *Brassicaceae* (oilseed rape - ελαιοκράμβη), *Betulaceae* (birch – *Bet v 4* - σημύδα, alder - σκλήθρα) *Chenopodiaceae* (white goosfoot – *Ch a 3* - χηνοπόδιο). Οι πολκαλσίνες είναι ελάσσονα αλλεργιογόνα προκαλώντας IgE αντιδραστικότητα σε 10 έως 45% των αλλεργικών στις γύρεις ασθενών. Εκτός των πολκαλσινών με δύο πρωτεϊνικά μοτίβα βραχιόνων σύνδεσης ασβεστίου

(calcium – binding EF hand motif) άλλα σχετικά της πολκαλσίνης αλλεργιογόνα γύρευαν με μοτίβα τριών (birch – Bet v 3 - σημόδα) και τεσσάρων (olive – Ole e 8 - ελιά, ragweed – Amb a 10 - αμβροσία) βραχιόνων σύνδεσης ασβεστίου έχουν περιγραφεί με ταυτοσημία αλληλουχιών 51% έως 59% με τις πολκαλσίνες. Μελέτες IgE αντιδραστικότητας σε αυτά τα αλλεργιογόνα έδειξαν ότι προκαλείται από διασταυρούμενη αντιδραστικότητα στις πολκαλσίνες (134). Δομικές μεταβολές της πρωτεΐνης των βραχιόνων σύνδεσης ασβεστίου που χαρακτηρίζονται από εξάντληση σύνδεσης ασβεστίου, συνοδεύονται από απώλεια της ικανότητας σύνδεσης IgE και της αλλεργιογονικότητας των πολκαλσινών. Όλες αυτές οι αλλεργιογόνες πολκαλσίνες έχουν μικρή ταυτοσημία αλληλουχιών, 39% έως 42%, με τις καλμοδουλίνες (calmodulins) και τις τύπου καλμοδουλίνης (calmoduline like) πρωτεΐνες, των φυτών που βλαστάνουν (καρποφορία), των ζώων και του ανθρώπου. Ευαισθητοποίηση συνεπώς στις πολκαλσίνες χαρακτηρίζεται από πολυευαισθητοποίηση σε γύρεις αλλά όχι και τροφές φυτικής προέλευσης.

| Είδος αλλεργιογόνου | Οικογένειες πρωτεϊνών | | | | |
|---|--------------------------|----------|------------|------------|---------|
| | Μείζον ειδικό του είδους | Profilin | Polcalcin | LTP | PR – 10 |
| <i>Phleum pratense</i> – timothy grass | Phl p 2, 5, 6, | Phl p 12 | Phl p 7 | | |
| <i>Cynodon dactylon</i> – Bermuda grass | Cyn d 1 | Cyn d 12 | Cyn d7 | | |
| <i>Parietaria judaica</i> – Pellitory | Par j 1, 2 | Par j 3 | Par j 4 | Par j 1, 2 | |
| <i>Artemisia vulgaris</i> – Mugwort | Art v 1, 3 | Art v 4 | Art v 5 | Art v 3 | |
| <i>Olea europea</i> – Olive tree | Ole e 1, 7, 9 | Ole e 2 | Ole e 3, 8 | Ole e 7 | |
| <i>Cypripedium arizonicum</i> – Cypripedium | Cup a 1 | | Cup a 4 | | |
| <i>Chenopodium album</i> – Lamb's quarter | Che a 1 | Ch a 2 | Ch a 3 | | |
| <i>Platanus acerifolia</i> – Plane tree | Pla a 1, 2 | Pla a 8 | | Pla a 3 | |
| <i>Salsola kali</i> – Russian thistle | Sal k 1, 3 | Sal k 4 | | | |
| <i>Betula verrucosa</i> – Birch | Bet v 1 | Bet v 2 | Bet v 3, 4 | | Bet v 1 |

Εικόνα 9: Σημαντικά αλλεργιογόνα μόρια και πηγές τους αναπνευστικής αλλεργίας

2.6 Μείζονες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης

Tropomyosins. Υπάρχουν 4 ισότυποι τροπομοουσίνης των μυών στα θηλαστικά. Οι αλληλουχίες τροπομοουσίνης των σπονδυλωτών από άλλα θηλαστικά, πτηνά και ψάρια είναι τουλάχιστον 90% ταυτόσημες με τουλάχιστον μία τροπομοουσίνη του ανθρώπου(96). Συνεπώς δεν έχει αναφερθεί σε αυτές κάποια αλλεργιογόνος(135). Αντίθετα αλλεργιογόνες τροπομοουσίνες περιορίζονται ευρισκόμενες σε ομάδες ασπόνδυλων, ιδιαίτερα αρθρόποδα (έντομα, οστρακόδερμα) και μαλάκια και κατά το μέγιστο 55% ταυτόσημες στις πλησιέστερες ομόλογες του ανθρώπου(136). Τροπομοουσίνες των αρθροπόδων από τα έντομα, οστρακόδερμα και νηματώδη (*Anisakis simplex*) είναι όμοιες μεταξύ τους και πλησιέστερα κατ' αλληλουχία στις τροπομοουσίνες των μαλακίων από των σπονδυλωτών. Τροπομοουσίνες έχουν επίσης ταυτοποιηθεί ως εισπνεόμενα αλλεργιογόνα, περιλαμβάνουν δύο διαφορετικά είδη, την κατσαρίδα (*cockroach – Per a 7, Bla g 7*) και το άκαρι της οικιακής σκόνης (*Der p 10*). Συμπεριφέρονται ανάλογα με τις τροπομοουσίνες των οστρακόδερμων με 78% ταυτόσημη αλληλουχία με την τροπομοουσίνη της γαρίδας (*Pen a 1*) αλλά 54% ταυτότητα αλληλουχιών με την τροπομοουσίνη του ανθρώπου. Ερμηνεύουν σημαντικά την IgE ευαισθητοποίηση και κλινικά εκδηλωμένη διασταυρούμενη αλλεργία μεταξύ, τροφικών τροπομοουσινών, οστρακοειδών (θαλασσινά, σαλιγκάρια) και εισπνεόμενων τροπομοουσινών, ακάρεων οικιακής σκόνης και κατσαρίδας(137).

Parvalbumins. Η δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια αλλεργιογόνων τροφικής προέλευσης, οι EF – βραχιόνες φέροντες πρωτεΐνες σύνδεσης του ασβεστίου, συντίθενται εξ ολοκλήρου από παρβαλβουμίνες, εκτός μιας απλής αλλεργιογόνου τροπονίνης του παράσιτου *Anisakis simplex*. Οι παρβαλβουμίνες διαιρούνται σε δύο διακριτές εξελικτικά καταγωγές τις α – παρβαλβουμίνες (α – parvalbumins) και β – παρβαλβουμίνες (β – parvalbumins) αν και οι στερεοχημικές δομές είναι αρκετά όμοιες(96). Οι α – παρβαλβουμίνες είναι άφθονες στους μύες ψαριών και αμφίβιων, λιγότερο στους ταχείας σύσπασης μύες των πτηνών και θηλαστικών και δεν είναι αλλεργιογόνα. Αντίθετα πολλές β – παρβαλβουμίνες, κυρίως αλλεργιογόνα, ανευρίσκονται σε ποικιλία ψαριών διαφόρων ειδών, και αν και έχουν όμοια κατανομή με τις α – παρβαλβουμίνες, απουσιάζουν από τους μύες του ανθρώπου. Εκφράζουν μόνο 56% ταυτότητα αλληλουχίας με την α – παρβαλβουμίνη του ανθρώπου(56). Πρωτεΐνες μύος των ψαριών με κοινή δομή και εκτεταμένη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ τους(138, 139). Σταθερές σε συνθήκες βρασμού, πέψης, μπορούν να προκαλέσουν αντίδραση ακόμη και σε μαγειρευμένη τροφή. Ωστόσο δομικές μεταβολές της πρωτεΐνης των βραχιόνων σύνδεσης ασβεστίου που χαρακτηρίζονται από εξάντληση της ικανότητας σύνδεσης ασβεστίου, συνοδεύονται από απώλεια της ικανότητας σύνδεσης IgE και της αλλεργιογονικότητας των παρβαλβουμινών(140). Πειράματα γενετικής μηχανικής σε αυτό το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της παρβαλβουμίνης, ως EF – βραχιόνες σύνδεσης ασβεστίου φέρουσα πρωτεΐνη, έδωσε υποαλλεργιογονικά παράγωγα εξαιρετικά μειωμένης σύνδεσης ειδικής IgE με ταυτόχρονη διατήρηση της αντιγονικότητας και συνεπώς πολλά υποσχόμενα ως εν δυνάμει μόρια ειδικής ανοσοθεραπείας στην αλλεργία στο ψάρι όπως θα αναλύσουμε στο ειδικό μέρος της παρούσας διατριβής(141).

Caseins. Η τρίτη οικογένεια αλλεργιογόνων τροφικής προέλευσης, οι καζεΐνες, είναι αποκλειστικά πρωτεΐνες θηλαστικών ευρισκόμενες στο γάλα τους(96). Οι β – καζεΐνες (β – caseins) από διάφορα θηλαστικά εκφράζουν 53% με 58% ταύτιση με την ανθρώπινη β – καζεΐνη. Αντίθετα, ταύτιση 90% και περισσότερο υπάρχει μεταξύ β – καζεΐνης, $\alpha S1$ – καζεΐνης και $\alpha S2$ – καζεΐνης της κατσίκας και του πρόβατου σε σχέση με την αγελάδα. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει γονίδιο έκφρασης της $\alpha S2$ - καζεΐνης στον άνθρωπο οι συγκρίσεις αλληλουχιών μεταξύ θηλαστικών γίνονται με τις αντίστοιχες του ανθρώπου $\alpha S1$ – καζεΐνη και β – καζεΐνη. Τα γνωστά μας αλλεργιογόνα είναι λιγότερο του 53% ταυτόσημα με τις αντίστοιχες αλληλουχίες του ανθρώπου με την $\alpha S2$ – καζεΐνη ταυτόσημη σε 16% μόνον. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν να συνδέονται ανάλογα με την IgE αντιδραστικότητα με τις μικρότερης ταύτισης καζεΐνες θηλαστικών να είναι οι περισσότερο αντιδραστικές. Επομένως των παιδιών με IgE μεσολαβούμενη αλλεργία στο γάλα αγελάδας, ποσοστό έως 90% εκφράζουν IgE εναντίον της $\alpha S2$ – καζεΐνης, 55% εναντίον της $\alpha S1$ – καζεΐνης και μόνον 15% εναντίον της β – καζεΐνης που έχει την υψηλότερη ταύτιση με την αντίστοιχη ανθρώπινη καζεΐνη. Η παρατήρηση αυτή συνιστά ότι η ταύτιση κατά 53% μεταξύ της βόειου και ανθρώπινης β – καζεΐνης περιορίζει την IgE αντιδραστικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι φυλογενετικές αυτές συσχετίσεις συμφωνούν με τις παρατηρήσεις της IgE μεσολαβούμενης διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ καζεϊνών και εκδήλωσης αλλεργίας στο γάλα διαφορετικών ζωικών ειδών(142). Ασθενείς με αλλεργία στο γάλα αγελάδας αντιδρούν επίσης στο γάλα κατσίκας ενώ ανέχονται γάλα γαϊδούρας καθώς οι καζεΐνες των ιπποειδών έχουν 22% με μέγιστο 66% ταύτιση αλληλουχίας με τις αντίστοιχες της αγελάδας(143). Η ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να διακρίνει μεταξύ σχετιζόμενων πρωτεϊνών ενισχύεται από την παρατήρηση των ατόμων με πρωτοπαθή IgE ευαισθητοποίηση σε γάλα κατσίκας, εξαιτίας κατανάλωσης κατσικίσιας τυριών, που εκδηλώνουν μεγαλύτερη IgE αντιδραστικότητα σε γαλακτοκομικά προϊόντα προβάτου παρά αγελάδας. Τέτοιες παρατηρήσεις ανακλούν το δεδομένο ότι γαλακτοκομικά προϊόντα κατσίκας και προβάτου σχετίζονται στενότερα μεταξύ τους από ότι με το γάλα αγελάδας(144). Οι ελάχιστονες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης εκδηλώνουν όμοιες εξελικτικές συσχετίσεις με εκείνες που περιγράφηκαν για τις τρεις μείζονες οικογένειες. Αρκετές από αυτές τις ελάχιστονες οικογένειες έχουν μικρό αριθμό μελών, ανευρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά σε γάλα και αυγό(145), έχουν ταυτοσημίες αλληλουχίας αμινοξέων που δεν ξεπερνούν το 76% με την πλησιέστερη ομόλογη του ανθρώπου και συμπεριλαμβάνουν εκπροσώπους σημαντικών εισπνεόμενων οικογενειών αλλεργιογόνων όπως οι λιποκαλίνες (lipocalins) (146).

| Είδος αλλεργιογόνου | Οικογένειες πρωτεϊνών | | | | |
|---|---------------------------|---------|-------------------|--------------------------------|--------------------|
| | Μείζον ειδικό του είδους | Caseins | B - lactoglobulin | Tropomyosin | Parvalbumin |
| <i>Gallus domesticus</i> – Egg | Gal d 1, 2, 3, 4 | | | | |
| <i>Bos pp</i> – Milk | Bos d 8, 5, 4 | Bos d 8 | Bos d 5 | | |
| <i>Penaeus aztecus, indicus, monodon, eous</i> – Shrimp | Pen a 1, Pen I 1, Pen m 1 | | | Pen a 1 Der p 10 Ani s 3 | |
| <i>Gadus morhua</i> – Cod, <i>Cyprinus carpio</i> – Carp Fish | Cad c 1 Cyp c 1 | | | | Cad c 1 Cyp c 1 |

Εικόνα 10: Σημαντικά αλλεργιογόνα μόρια και πηγές τους τροφικής αλλεργίας ζωικής προέλευσης

Αντίθετα από τις οικογένειες αλλεργιογόνων φυτικής προέλευσης, σχεδόν όλες οι οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης έχουν αντίστοιχα ομόλογες πρωτεΐνες στον άνθρωπο, δεδομένο το οποίο επηρεάζει τον τρόπο αναγνώρισης τους από το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Για τις τρεις μείζονες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, η ικανότητα να δρουν ως αλλεργιογόνα σχετίζεται σημαντικά με τον βαθμό ομολογίας με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του ανθρώπου. Χαρακτηριστικά οι αλλεργιογόνες τροπομοσίνες των ασπόνδυλων έχουν το μέγιστο 55% ταυτοσημία αλληλουχιών με του ανθρώπου, ενώ οι μη αλλεργιογόνες τροπομοσίνες των θηλαστικών, πτηνών και ψαριών έχουν τουλάχιστον 90% ταυτοσημία με τις αντίστοιχες αλληλουχίες του ανθρώπου(136). Η διάκριση αυτή πιθανόν να αντανακλά την εξέλιξη από τα ασπόνδυλα στα σπονδυλωτά. Οι παρβαλβουμίνες που ανευρίσκονται μόνο στα σπονδυλωτά δείχνουν διαφορετική εξελικτική πορεία. Από τις δύο διακριτές εξελικτικές καταγωγές των, μόνο τα μέλη της οικογένειας των β – παρβαλβουμινών οι οποίες είναι και οι αλλεργιογόνες δεν ανευρίσκονται στους μύες του ανθρώπου. Οι καζεΐνες τέλος περιορίζονται ακόμη περισσότερο ως προς την αλλεργιογονικότητα τους ως αποκλειστικά πρωτεΐνες των θηλαστικών. Εδώ ο βαθμός ταυτοσημίας των αντίστοιχων αλληλουχιών πρωτεϊνών, είναι το καθοριστικό χαρακτηριστικό σε σχέση ευθέως αντίστροφη με την αλλεργιογονικότητα τους για τον άνθρωπο.

Καταδεικνύεται από όλα τα ανωτέρω ότι η κατανομή και κατανόηση εξ αυτού των φυλογενετικών και μοριακών χαρακτηριστικών των αλλεργιογόνων, σε οικογένειες πρωτεϊνών

φυτικής και ζωικής προέλευσης είναι σαφώς περιορισμένη, αναδεικνύοντας το γεγονός ότι αν και θεωρητικά όλες οι πρωτεΐνες μπορούν να είναι αλλεργιογόνες αυτό δε συμβαίνει στην πράξη. Επί του παρόντος απλώς αρχίζουμε να κατανοούμε, με την βοήθεια της μοριακής αλλεργιολογίας και των δυνατοτήτων που μας παρέχουν τα ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα, ποια στοιχεία και χαρακτηριστικά κάνουν κάποιες πρωτεΐνες αλλεργιογόνες σε σύγκριση με ομόλογές τους. Το επίπεδο έκθεσης είναι σημαντικό, συνεπώς αλλεργιογόνα διαφέρουν μεταξύ χωρών ή/και περιοχών ηπείρων ή εντός των χωρών λόγω διαφορών σε βοτανολογικές και ζωικές οικογένειες. Αντίστοιχα διαφέρουν ο τρόπος ζωής των ανθρώπων και οι κλιματικές συνθήκες για τις γύρεις και οι διαιτητικές συνήθειες τους για τις τροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης. Στη Βόρεια Ευρώπη όπου αφθονεί η σημύδα υπάρχει υψηλή επίπτωση αναπνευστικής αλλεργίας στη γύρη της και τροφικής αλλεργίας στο μήλο λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας(147). Στη Μεσόγειο όπου απουσιάζει η σημύδα και το nsLTP του ροδάκινου είναι κύριο αλλεργιογόνο, αποικοί ασθενείς αντιδρούν επίσης στο nsLTP του μήλου αν και το nsLTP δεν ανευρίσκεται σε τόση αφθονία σε αυτό το φρούτο(54). Τα περισσότερα τροφικά μείζονα αλλεργιογόνα, που ευαισθητοποιούν και προκαλούν αντιδράσεις μέσω της γαστρεντερικής οδού, είναι παρόντα σε έως και 1% της συνολικής πρωτεΐνης του υπεύθυνου φρούτου. Επομένως ο βαθμός έκθεσης και η αφθονία του αλλεργιογόνου είναι σημαντικά, αλλά πιθανώς δευτερεύοντα της σταθερότητας της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης. Συμπαγής τριτοταγής δομή, ύπαρξη δισουλφιδικών δεσμών, γλυκοσυλιώσεις του μορίου, συνεισφέρουν στη σταθερότητα της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης(99). Επιπλέον, φυλογενετικά χαρακτηριστικά που την κατατάσσουν στις απαραίτητες πρωτεΐνες επιβίωσης και εξέλιξης του συγκεκριμένου είδους και προάγουν την έκφραση και σταθερότητα της σε συνθήκες stress (οριακές θερμοκρασίες, όξινο pH, ενζυμική δραστηριότητα) αποτελούν μάλλον χαρακτηριστικά αλλεργιογονικότητας της. Επίσης εύκολη φυσική έκλυση από την αλλεργιογόνο πηγή προέλευσης, λιποφιλική συμπεριφορά και τάση δημιουργίας αθροιστικών συσσωματώσεων στα επιθήλια επαφής του ανθρώπου, φαίνεται να αυξάνουν τη δυνατότητα πρόκλησης ευαισθητοποίησης, αλλεργικής αντίδρασης ή /και φλεγμονής(148). Μελετώντας την εκδήλωση διασταυρούμενης αλλεργιογονικότητας μεταξύ αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, ακόμη και απομακρυσμένων φυλογενετικά οικογενειών, έγινε κατανοητό ότι ο βαθμός ταυτοσημίας της αλληλουχίας αμινοξέων μεταξύ τους καταδεικνύει αλλά όχι ανάλογα τον βαθμό διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Αυτή διατρέχει, μεταξύ διαφόρων οικογενειών αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, όλη την κλίμακα από την υψηλή έως καθόλου διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Τούτο συμβαίνει, όπως μάθαμε με τη βοήθεια της μοριακής αλλεργιολογίας, διότι η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα είναι κυρίως και άμεσα εξαρτώμενη από την προσβασιμότητα του ειδικού IgE αντισώματος στην συγκεκριμένη επιφάνεια, τμήμα, της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης. Δηλαδή σε οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών όπου η διατήρηση της αλληλουχίας αμινοξέων και η διατήρηση της έκφρασης τους στην επιφάνεια του μορίου είναι υψηλές, εκδηλώνεται ευρεία διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η οικογένεια των προφιλινών (profilins) που εμφανίζουν περισσότερο του 75% ταυτοσημία αλληλουχίας των αμινοξέων τους. Η κατανομή, ωστόσο, των διατηρούμενων και μεταβαλλόμενων υπολειμμάτων στην επιφάνεια του μορίου τους, δεικνύει ότι ο βαθμός της διατήρησης αλληλουχίας επιφάνειας είναι μικρότερος της πλήρους διατηρούμενης αλληλουχίας και επομένως ικανός για την εκδήλωση ευρείας διασταυρούμενης αντιδραστικότητας, όχι όμως έως του ποσοστού 75% της αντίστοιχης

ταυτοσημίας τους(129). Παρά την αυξανόμενη γνώση μας σε μοριακό επίπεδο μένουν όμως ακόμη σημαντικά αναπάντητα ερωτήματα. Όπως το να κατανοήσουμε γιατί κάποιες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών διατηρούν την δραστικότητα τους ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης ή την οδό ευαισθητοποίησης, με παραδείγματα τις τροπομυοσίνες (tropomyosins) και τις πρωτεΐνες φέρουσες EF βραχίονες δέσμευσης ασβεστίου (EF – hand calcium binding proteins) που εκφράζονται ως εισπνεόμενα και τροφικά αλλεργιογόνα. Επίσης να κατανοήσουμε το πώς ορισμένες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, όπως χαρακτηριστικά η αναφερθείσα οικογένεια των πρωτεϊνών φερόντων EF βραχίονες δέσμευσης ασβεστίου (EF – hand calcium binding proteins), έχουν μέλη αλλεργιογόνες και μη αλλεργιογόνες οικογένειες πρωτεϊνών. Αυτή η οικογένεια των πρωτεϊνών φερόντων EF βραχίονες δέσμευσης ασβεστίου (EF – hand calcium binding proteins) αποτελεί μία υπεριοικογένεια με αρκετές οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών όπως οι πολκαλσίνες (polcalsins) στις γύρες, οι παρβαλβουμίνες (parvalbumins) ως τροφικά αλλεργιογόνα στα ψάρια και τις καλμοδουλίνες (calmodulins) σημαντική μη αλλεργιογόνος οικογένεια σε αφθονία σε φυτικό, ζωικό βασίλειο και τον άνθρωπο.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, εκατοντάδες αλλεργιογόνες πρωτεΐνες από όλα τα σχετικά βιολογικά υλικά έχουν ταυτοποιηθεί και οι αλληλουχίες των αμινοξέων τους διατίθενται σε διάφορες βάσεις δεδομένων αλλεργιογόνων. Η εξέλιξη αυτή πρόσφερε τη δυνατότητα της ταξινόμησης των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε εξελικτικά και δομικά φυλοσύνδετες οικογένειες πρωτεϊνών. Τούτο βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση των ειδικών χαρακτηριστικών τους και την σχέση και συσχέτιση μεταξύ τους ως αλλεργιογόνα μόρια. Η περιορισμένη κατανομή των αλλεργιογόνων σε λίγες οικογένειες πρωτεϊνών επιβεβαίωσε την υπόθεση ότι δεν είναι κάθε πρωτεΐνη ικανή να γίνει αλλεργιογόνος. Ωστόσο, η γνώση των μοριακών χαρακτηριστικών που ελέγχουν την αλλεργιογονικότητα των πρωτεϊνών και των οικογενειών τους, βρίσκεται ακόμη στην αρχή. Απαιτείται μια διεπιστημονική προσπάθεια που να εμπλέκει την αλλεργιολογία, την δομική ή / και εξελικτική βιολογία και την βιοπληροφορική για την διερεύνηση νέων ιδεών στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο.

3. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ (recombinant) ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ

Όταν υιοθετήθηκε από την Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το σύστημα Ονοματολογίας των αλλεργιογόνων το 1986 τα αλλεργιογόνα ταυτοποιούνται με βάση την συμπεριφορά τους κατά την ηλεκτροφόρηση και χρωματογραφία και την αντιδραστικότητα τους σε δεδομένους γνωστούς αντιορούς. Ο τρόπος αυτός ταυτοποίησης δεν ήταν ικανοποιητικός όχι μόνο για την προτυποποίηση και τυποποίηση των αλλεργιογόνων αλλά και εξίσου σημαντικό, την μελέτη των διαδικασιών της αλλεργικής ευαισθητοποίησης και ειδικής ανοσοθεραπείας στα πλαίσια της ειδικής αντιγονοπαρουσίασης και των αντίστοιχων T- και B – κυτταρικών επιτόπων. Η τεχνολογία του γενετικού ανασυνδυασμού που αναπτύχθηκε από τη δεκαετία του 1980 για την κλωνοποίηση cDNA από περιορισμένης ποσότητας mRNA, επέτρεψε την κλωνοποίηση αλλεργιογόνων μορίων και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό σημαντικών αλλεργιογόνων, με πρώτο το μείζον ειδικό του είδους rDer p 1 των ακάρεων, στην διάγνωση της αλλεργίας και την ανάπτυξη νέων εν δυνάμει τύπων ειδικής ανοσοθεραπείας. Τα γενετικά ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα μόρια χρησιμοποιούνται για την επίλυση των τριτοταγών δομών ακέραιων αλλεργιογόνων και επ' αυτού πώς τα αλλεργιογόνα αλληλεπιδρούν με την έμφυτη και επίκτητη ανοσιακή απόκριση. Πλέον, κατάλληλα ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα χρησιμοποιούνται σε βελτιωμένες σύνθετες διαγνωστικές δοκιμασίες(149).

Ο ανοσοχημικός χαρακτηρισμός των αλλεργιογόνων ξεκίνησε την εποχή που έγινε αποδεκτό ότι ήταν αδύνατο για πρακτικά χρήσιμες ποσότητες των περισσότερων κοινών αλλεργιογόνων να επιτευχθεί ομοιογενής κάθαρση. Υπήρχε δηλαδή ο προβληματισμός ότι οι κρίσιμα μικρές ποσότητες – δόσεις αλλεργιογόνου, ικανές για πρόκληση ευαισθητοποίησης και αντίδραση ήταν μικρότερες εκείνων που μπορούσαν να ελεγχθούν κατά την εκχύλιση τους για ομοιογένεια και καθαρότητα. Ωστόσο ήταν ήδη γνωστό ότι περισσότερα του ενός αλλεργιογόνα μόρια, από μία συγκεκριμένη αλλεργιογόνο πηγή, ήταν υπεύθυνα για την πρόκληση αλλεργιογόνων αντιδράσεων και ότι κάθε αλλεργιογόνος πηγή διέθετε μείζονα ή κύρια και ελάσσονα ή δευτερεύοντα αλλεργιογόνα(150).

Ο ανοσοχημικός χαρακτηρισμός του μείζονος αλλεργιογόνου Amb a 1 της αμβροσίας (ragweed), υπήρξε πρωτοπόρος για τα εισπνεόμενα αλλεργιογόνα. Ο ανοσοχημικός χαρακτηρισμός του τροφικού αλλεργιογόνου του μπακαλιάρου (cod), την ίδια εποχή επίσης, επέτρεψε τον προσδιορισμό της αλληλουχίας αμινοξέων και την ταυτοποίηση του ως η πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη (parvalbumin), ρυθμιστής ασβεστίου των μυών των ιχθύων. Η παρβαλβουμίνη παραμένει το μείζον αλλεργιογόνο των ιχθύων(56). Ορισμένα άλλα μείζονα αλλεργιογόνα χαρακτηρίστηκαν ανοσοχημικά πριν την διαπίστωση τους ως κλινικά ενεργά αλλεργιογόνα όπως οι ovalbumin και ovomucoid του αυγού και οι β- lactoglobulin και casein του γάλακτος(73). Ωστόσο αν και υπήρξαν σημαντικές πρόοδοι στις τεχνικές κάθαρσης ο ανοσοχημικός χαρακτηρισμός των αλλεργιογόνων απαιτούσε τεράστιες ποσότητες και έτσι επήλθε περίοδος στασιμότητας στην μελέτη των πρωτεϊνών αλλεργιογόνων. Ακολούθως όμως ορισμένα άλλα επιτεύγματα ώθησαν την έρευνα προς την μηχανική του γενετικού ανασυνδυασμού και την κλωνοποίηση των αλλεργιογόνων(151).

Η σύνθεση στερεής φάσης (solid – phase synthesis) πεπτιδίων έκανε ρουτίνα την σύνθεση πολυπεπτιδίων έως 50 αμινοξέων - έτσι συνθετικά πεπτίδια εκπρόσωποι ακολουθιών αντιγόνων χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση πειραματοζώων και την πρόκληση

δημιουργίας αντισωμάτων που αντιδρούν με το μητρικό αντιγόνο. Κατ αναλογία πριν οι αρχές της αντιγονοεπεξεργασίας και αντιγονοπαρουσίασης διευκρινισθούν ήταν γνωστό ότι 10 έως 12μερή πεπτίδια γραμμικής ακολουθίας μητρικού αντιγόνου μπορούσαν να δρουν ως T – κυτταρικοί επίτοποι και να ανοσοποιούν πειραματόζωα. Τούτο κατέδειξε την πιθανότητα νέων τύπων ανοσοθεραπείας(152, 153). Ανάλογες μελέτες που έδειξαν ότι μεταβολές στην αλληλουχία T – κυτταρικών επιτόπων σε εξελικτικά συγγενή αντιγόνα μεταβάλλουν αξιοσημείωτα τις ανοσιακές απαντήσεις, επηρέασαν ιδιαίτερα την έναρξη κλωνοποίησης μέσω γενετικού ανασυνδυασμού αλλεργιογόνων μορίων.

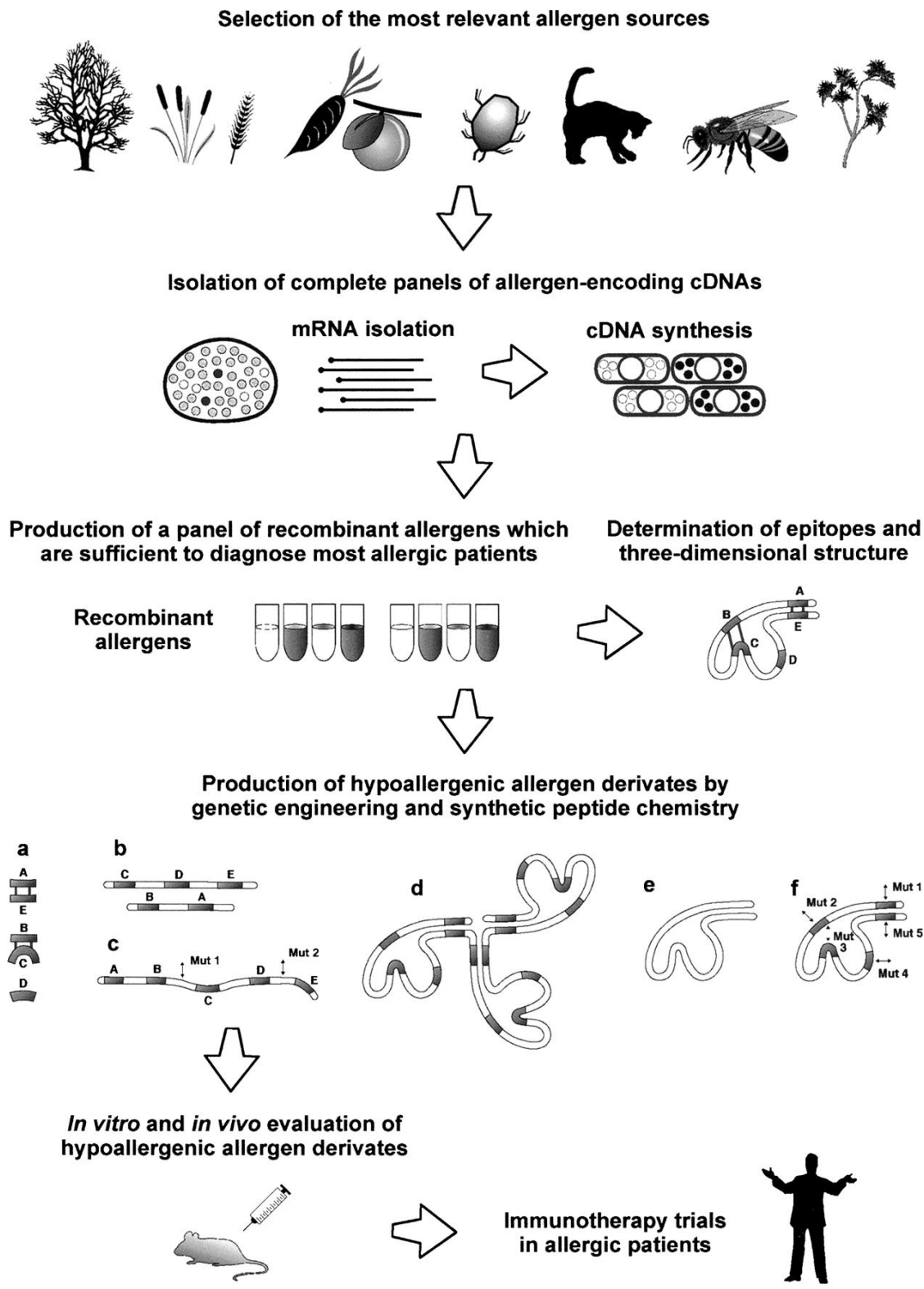
Η μοριακή κλωνοποίηση προέκυψε από την πραγματοποίηση μεταφοράς και πλήρους λειτουργίας του DNA κωδικοποίησης ενός γονιδίου από έναν οργανισμό σε άλλο γενετικά διαφορετικό οργανισμό. Η συχνότερη υλοποίηση αυτής της διαδικασίας είναι η μεταφορά ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει στο βακτήριο *Escherichia coli*, όπου κάθε στέλεχος *E. coli* παράγει 10 έως 100 αντίγραφα του γονιδίου. Η κλωνοποίηση προκύπτει από τη δυνατότητα μεταφοράς ενός (1) γονιδίου σε κάθε στέλεχος *E. coli*. Ο πολλαπλασιασμός του βακτηρίου στη συνέχεια παράγει απεριόριστους απογόνους. Η κλωνοποίηση του DNA επιτρέπει την απομόνωση του για ανάλυση και γενετικό μηχανικό χειρισμό, και το βακτήριο ξενιστής του στη συνέχεια μπορεί να ρυθμιστεί να παράγει το παράγωγο του γονιδίου. Πρακτικά το DNA που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, φτιάχνεται σαν συμπληρωματικό αντίγραφο του μεταγραφικού mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη (complementary – cDNA). Η κλωνοποίηση του DNA που μεταφέρει αντίσταση σε αντιβιοτικά μεταξύ βακτηρίων, που επετεύχθη το 1973, υπήρξε ένα ξεκάθαρο δεδομένο, αν και χρειάστηκε να επιτευχθούν αρκετά ακόμη στην δυνατότητα μεταφοράς αντίστασης μεταξύ βακτηρίων, πριν η τεχνολογία εφαρμοστεί στον χαρακτηρισμό και παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών(154). Εξαιτίας της αφθονίας mRNA στην σάλπιγγα της όρνιθας, η μοριακή κλωνοποίηση του αλλεργιογόνου ovalbumin, Gal d 2 υπήρξε πρωτοπόρος καθώς η αλληλουχία νουκλεοτιδίων αναλύθηκε ταυτόχρονα με την εξέλιξη της ίδιας της μεθοδολογίας ανάλυσης αλληλουχιών.

Η επιτυχία της κλωνοποίησης συμπληρωματικού cDNA για τα αλλεργιογόνα του ακάρεος καταδείχθηκε με την ανίχνευση του μορίου *Der p 1* και άλλων πολυπεπτιδίων μεταξύ των *in vitro* μεταγραφικών προϊόντων του mRNA προερχομένων από σώματα ακάρεων *Dermatophagoides pteronyssinus*. Οι κλώνοι κωδικοποίησης του *Der p 1* ταυτοποιήθηκαν δια της μεταγραφείσας αλληλουχίας αμινοξέων, η οποία επίσης εμφάνιζε υψηλή ταυτοποίηση με την αντίστοιχη ακολουθία του *Der f 1* του *Dermatophagoides farinae* (155). Η σύνδεση του ειδικού IgE στο παραχθέν *Der p 1* απεδείχθη σε δεύτερο χρόνο λόγω ευαισθησίας στη μετουσίωση και σημαντικής προσπάθειας να επιτευχθεί. Οι πρώτες αναφορές ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων που συνδέουν σταθερά το ειδικό τους IgE προήλθαν από τη χρήση IgE ανοσοχημικών τεχνικών στην διαλογή συμπληρωματικού cDNA βιβλιοθηκών έκφρασης. Τα ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα *Der p 2* και *Der p 5* του ακάρεος και *Bet v 1* της σημύδας κλωνοποιήθηκαν με αυτή την τεχνική(122, 156, 157). Η κλωνοποίηση μάλιστα του *Bet v 1* με τις συγκεκριμένες τεχνικές σύνδεσης IgE αποκάλυψε την αλλεργιογονικότητα της οικογένειας των PR-10 (pathogenesis related proteins) πρωτεϊνών στην οποία ανήκει και επέτρεψε την αναγνώριση των ειδικών IgE απαντήσεων σε ποικίλο εύρος γύρεων και φυτικών τροφών που χαρακτήρισαν στη συνέχεια το στοματοφαρυγγικό σύνδρομο.

Η μοριακή κλωνοποίηση, μέσω γενετικού ανασυνδυασμού, αλλεργιογόνων όπως αναμενόταν οδήγησε στην δυνατότητα παραγωγής απεριόριστων ποσοτήτων γενετικά κεκαθαμένων αλλεργιογόνων και στην δυνατότητα, με τη χρήση επιπρόσθετα της γενετικής μηχανικής, μελέτης αλλεργιογόνων επιτόπων και παραγωγής νέων αλλεργιογόνων μορίων για στοχευόμενη διάγνωση και θεραπεία(158). Αλλεργιογόνα που αρχικά κλωνοποιήθηκαν με εφαρμογή IgE ανοσοχημικών μεθόδων, στη συνέχεια εκφράστηκαν σε *E. Coli* σε πρωτεΐνες, με δυσδιάκριτη διαφορά αλλεργιογονικότητας σε σχέση με τα φυσικά ανάλογα τους. Τούτο δείχθηκε σε μελέτες αντιδραστικότητας δια δερματικών δοκιμασιών με νυγμό και αποκοκκίωσης βασεοφίλων κυττάρων στο εργαστήριο(159). Τα μείζονα αλλεργιογόνα του αγρωστώδους Phl p 1, και Phl p 5 εκφράστηκαν ως γενετικά ανασυνδυασμένα μόρια με υψηλή IgE δεσμευτική δραστηριότητα και συνδυασμένα με τα Phl p 2, Phl p 6, στη συνέχεια και την μη ειδική του είδους προφιλίνη (profilin) Phl p 12, έδειξαν ικανότητα να δεσμεύουν την IgE ορών αλλεργικών που ελέγχθηκαν με το αντίστοιχο εκχύλισμα του αγρωστώδους(158). Η παραγωγή του μείζονος ειδικού του είδους αλλεργιογόνου της γάτας rFel d 1 αποτελεί μία άλλη χαρακτηριστική ερευνητική προσπάθεια. Πρώιμες μελέτες διαχωρισμένης έκφρασης των δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων του αλλεργιογόνου επέτυχαν την παραγωγή ενός χαμηλής σύνδεσης του IgE πολυπεπτιδίου. Επόμενες μελέτες κατέδειξαν ότι η ευθεία αντιμετάθεση του DNA κωδικοποίησης των δύο πεπτιδίων παράγει το ακεραίας στερεοχημικής αναδίπλωσης και πλήρους λειτουργικά σύνδεσης του IgE μορίου, που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια σε όλες τις ανοσολογικές μελέτες. Το μείζον αλλεργιογόνο rFel d 1 της γάτας είναι ένα διμερές πολυπεπτίδιο προερχόμενο από ένα αρχικό φυσικό ετεροδιμερές και έδειξε ότι η δομές πολλαπλών, σύνθετων πεπτιδικών αλυσίδων δεν αποτελούν εμπόδιο στην μηχανική την ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων(160).

Αν και τα περισσότερα αλλεργιογόνα, μπορούν πλέον να παραχθούν ως γενετικά ανασυνδυασμένα μόρια, παραμένουν περιοχές δυσκολίας στην μεθοδολογία. Αλλεργιογόνα για τα οποία δεν επιτυγχάνεται αρχικά ακέραια στερεοχημική αναδίπλωση του μορίου σε ένα ξενιστή όπως το *E.coli*, θα χρειασθεί επιλογή κάποιου άλλου όπως ο ζυμομύκητας *Pichia pastoris*, ή αρχική παραγωγή σε προμορφή πρωτεΐνης και ωρίμανση σε δεύτερο στάδιο σε όξινο περιβάλλον αποκοπής του εναρκτήριου προπεπτιδίου(161). Σε αλλεργιογόνα τα οποία προέρχονται από οικογένεια γονιδίων πρωτεΐνης με σημαντικά ανόμοια αλληλουχία αμινοξέων είναι πιθανό ένα τυποποιημένο γενετικά ανασυνδυασμένο μόριο να παρακάμψει φυσιολογικές παραλλαγές στα μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας που όμως ανευρίσκονται στο εκχύλισμα αλλεργιογόνου. Απαιτείται περισσότερη γνώση και περισσότερο εξελιγμένη τεχνολογία για την επίλυση αυτών των ερωτημάτων όπως και νεώτερων που αφορούν μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις μορίων και σύνθετα συμπλέγματα πρωτεϊνικών μορίων με μη πρωτεϊνικούς συνδέτες (υδατάνθρακες) που χαρακτηρίζουν τις δομές ορισμένων φυσικών αλλεργιογόνων. Η κλωνοποίηση με χρήση συμπληρωματικού cDNA προμήθευσε ένα επιπλέον εναλλακτικό τρόπο για την μελέτη των εκχυλισμάτων και την ανάλυση του φάσματος των αλλεργιογόνων ισοτύπων μια αλλεργιογόνου πηγής. Το άκαρι της οικιακής σκόνης αποτελεί και εδώ χαρακτηριστικό παράδειγμα. Η κάθαρση των αλλεργιογόνων μορίων από εκχυλίσματα με ομοιογένεια και απόδοση που απαιτείται για ανάλυση δεν είναι απλώς δύσκολη, αλλά επίσης η εκπροσώπηση των αλλεργιογόνων μορίων στα εκχυλίσματα πιθανόν είναι ποιοτικά και ποσοτικά διαφορετική από ότι στο περιβάλλον. Δεν μας είναι γνωστό πώς τα αλλεργιογόνα διαδίδονται από τα ακάρεα στον εισπνεόμενο αέρα, ενώ υπάρχουν αρκετές

ενδείξεις αποδόμησης τους εντός των εκχυλισμάτων και ποικίλλουσα παραγωγή τους σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Ανάλυση με χρήση ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων απλοποίησε την κατανόηση μας για τους σημαντικούς αλλεργιογόνους ισότυπους. Αν και παραμένουν κάποια σημεία αβεβαιότητας η ανάλυση του ακάρεος *D. Pteronyssinus* έδειξε ότι τα μείζονα ειδικά του είδους *Der p 1* και *Der p 2* είναι υπεύθυνα για το 50% έως 60% της IgE αντιδραστικότητας και το σημαντικότερο της υπόλοιπης αντιδραστικότητας αφορά τα *Der p 4*, *5*, *7*, *21*. Τα *Der p 5*, *7*, *21* έχουν σχεδόν αποκλειστικά μελετηθεί ως ανασυνδυασμένα με μικρή συμμετοχή στην συνολική αλλεργιογονικότητα του ακάρεος(162).



Εικόνα 12: Σχηματικά η διαδικασία παραγωγής τα παράγωγα και οι εφαρμογές των ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων

3.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων

Το υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης – αλλεργιογόνου μεταγραφικό mRNA ανιχνεύεται και απομονώνεται από την πρωτογενή αλλεργιογόνο πηγή και στη συνέχεια μεταγράφεται αντίστροφα ώστε μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (complementary – cDNA). Το συμπληρωματικό cDNA προσδένεται στο DNA βακτηριοφάγου που έχει επιλεγεί για τις δυνατότητες του να παράγει μεγάλης αλληλουχίας ή/και ποσότητας – αριθμού βιβλιοθήκες συμπληρωματικού cDNA (gt10, gt11 bacteriophages) ώστε να επιτρέπεται υψηλής πυκνότητας και ακρίβειας διαλογή στις βιβλιοθήκες. Στη συνέχεια ο βακτηριοφάγος φέρων το συμπληρωματικό cDNA εισάγεται “μολύνοντας” συγκεκριμένα προκαρυωτικά ή ευκαρυωτικά συστήματα κυττάρων έκφρασης, αποτελούμενα από βακτήρια, κυρίως *E. Coli*, ζυμομύκητες ή κύτταρα εντόμων. Το συμπληρωματικό cDNA, υπεύθυνο για την κωδικοποίηση του ταυτοποιούμενου αλλεργιογόνου, εκφράζεται ως συγχωνευθείσα του βακτηριοφάγου πρωτεΐνη (fusion protein) επιτυγχάνοντας μαζική παραγωγή σε χαμηλό κόστος και υψηλή καθαρότητα. Οι συγχωνευθείσα πρωτεΐνη – αλλεργιογόνο και ο αντίστοιχος κλώνος βακτηριοφάγου, διαχωρίζεται επακριβώς στο επόμενο στάδιο, με την εφαρμογή των ειδικών αντίστοιχων για το ταυτοποιούμενο αλλεργιογόνο IgE αντισωμάτων από αλλεργικούς ασθενείς. Η διαδικασία αυτή, παραγωγής υψηλής καθαρότητας, προσδίδει σημαντικά πλεονεκτήματα στα γενετικά ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα μόρια σε σύγκριση με τα αντίστοιχα τους φυσικά εκχυλίσματα(163-165).

Ταυτόχρονα επιτρέπει με τεχνικές γενετικής μηχανικής, την παρέμβαση για δημιουργία και παραγωγή ανασυνδυασμένων μορίων με ιδιαίτερα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως επιλογή και συγκέντρωση των μειζόνων αλλεργιογονικών επιτόπων σε ένα μόριο αυξημένης διαγνωστικής ακρίβειας, ή αντίστοιχα και αντίθετα την δημιουργία αλλεργιογόνων μορίων των μειζόνων επιτόπων με μειωμένη αλλεργιογονικότητα αλλά διατηρημένη αντιγονικότητα για χρήση στην ειδική ανοσοθεραπεία(166).

Συγκεκριμένα για τα επιμέρους μόρια:

Ανασυνδυασμένο άγριου τύπου αλλεργιογόνο (recombinant wild type allergen) ορίζουμε το ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο μόριο το οποίο έχει κατασκευασθεί ώστε να ομοιάζει πλήρως δομικά, φυσικοχημικά και ανοσολογικά στο αντίστοιχο φυσικό αλλεργιογόνο εμπεριέχοντας IgE αντιδραστικότητα, αλλεργιογονική δραστηριότητα, T-κυτταρικούς επιτόπους, στερεοχημική αναδίπλωση και ανοσογονικότητα. Όταν ένα ανασυνδυασμένο άγριου τύπου αλλεργιογόνο πληρεί όλα τα κριτήρια τα οποία και ελέγχονται σε σύγκριση με το αντίστοιχο κεκαθαρμένο φυσικό αλλεργιογόνο σε ανοσολογικές, φυσικοχημικές και *in vivo* δοκιμασίες σε πειραματόζωα και ανθρώπους, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αλλεργιογόνο αναφοράς(166).

Σε κάποιες αλλεργιογόνες πηγές (πχ. γάτα, ψάρι) ένα μείζον – κύριο, ειδικό του είδους αλλεργιογόνο μόριο φέρει το πλήρες σχεδόν σύνολο των αλλεργιογόνων επιτόπων της αντίστοιχης πηγής. Συνεπώς δύναται να αντικατασταθεί, για διαγνωστικού σκοπούς, από το αντίστοιχο ένα ανασυνδυασμένο άγριου τύπου αλλεργιογόνο μόριο (πχ. γάτα – rFel d 1, ψάρι – rCyp c 1)(139, 167). Ανάλογα, στην περίπτωση ειδικής ανοσοθεραπείας, το εκχύλισμα αλλεργιογόνου πηγής που χρησιμοποιείται, δύναται να αξιολογηθεί ως προς την περιεκτικότητα του ή να εμπλουτισθεί σε περιεκτικότητα ή και να αντικατασταθεί εν δυνάμει

πλήρως, σύμφωνα με τρέχουσες μελέτες, με το αντίστοιχο ανασυνδυασμένο άγριου τύπου αλλεργιογόνο μόριο(168, 169).

Στις περισσότερες αλλεργιογόνες πηγές (πχ. ακάρεα, γρασίδι) περισσότερα του ενός ειδικά του είδους, κάποια μείζονα – κύρια και κάποια ελάσσονα – δευτερεύοντα, αλλεργιογόνα μόρια φέρουν αθροιστικά το πλήρες σχεδόν σύνολο των αλλεργιογόνων επιτόπων της αντίστοιχης πηγής, της αλλεργιογονικότητας μεταβαλλόμενης ανάλογα με τον συγκεκριμένο ασθενή ή κυρίως τη γεωγραφική περιοχή που αναφέρεται. Ωστόσο, για τις περισσότερες αλλεργιογόνες πηγές το σύνολο σχεδόν των αλλεργιογόνων επιτόπων μπορεί να αντιπροσωπεύεται από έναν αριθμό ειδικών του είδους μειζόνων – κύριων αλλεργιογόνων μορίων, συνήθως μικρότερο των έξι (6) μορίων (πχ. ακάρεα – Der p 1, rDer p 2, γρασίδι – rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, rPhl p 6)(170). Συνεπώς δύναται να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς, όταν αναζητείται η ειδική για την αλλεργιογόνο πηγή διάγνωση και η διαφορική διάγνωση πιθανής ύπαρξης συν ευαισθητοποιήσεων ή διασταυρούμενων ευαισθητοποιήσεων σε άλλες πηγές, ένα επιλεγμένο **μείγμα (cocktail)** των ανωτέρω ανασυνδυασμένων άγριου τύπου αλλεργιογόνων μορίων(171). Ανάλογα, στην περίπτωση ειδικής ανοσοθεραπείας, το εκχύλισμα αλλεργιογόνου πηγής που χρησιμοποιείται, δύναται να αξιολογηθεί ως προς την περιεκτικότητα του ή να εμπλουτισθεί σε περιεκτικότητα ή και να αντικατασταθεί εν δυνάμει πλήρως, σύμφωνα με τρέχουσες μελέτες για κάποιες από τις αλλεργιογόνες πηγές, με το αντίστοιχο επιλεγμένο **μείγμα (cocktail)** των μειζόνων ειδικών του είδους, ανασυνδυασμένων άγριου τύπου αλλεργιογόνων μορίων(169).

Υβρίδιο ανασυνδυασμένο άγριου τύπου αλλεργιογόνο (Hybrid recombinant wild type allergen) ορίζουμε το ανασυνδυασμένο άγριου τύπου υβριδικό αλλεργιογόνο μεγαλομόριο που αναπτύσσεται υβριδικά με μοριακές τεχνικές ώστε να περιέχει τα περισσότερα του ενός σημαντικά αλλεργιογόνα μόρια μιας δεδομένης αλλεργιογόνου πηγής. Η κατασκευή ενός τέτοιου υβριδικού μεγαλομορίου επιτρέπει όλα τα μείζονα αλλεργιογόνα μόρια, υπεύθυνα για ευαισθητοποίηση και νόσο, μιας σύνθετης αλλεργιογονικά πηγής να ενσωματωθούν σε ένα μόριο διευκολύνοντας τη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση των συγκεκριμένων ασθενών(170). Διαγνωστικά εφ' όσον αποδειχθεί και στην κλινική πράξη ότι εκφράζει αθροιστικά την μέγιστη, ως προς ευαισθησία και ειδικότητα, αλλεργιογονικότητα της σύνθετης αλλεργιογόνου πηγής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση εξατομικευμένα και τον έλεγχο ευαισθητοποίησης μαζικά στον πληθυσμό(171). Θεραπευτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ειδική ανοσοθεραπεία στη συνέχεια με αυξημένη θεωρητικά ανοσογονικότητα εξαιτίας της σύντηξης των μειζόνων αλλεργιογόνων μορίων σε ένα μεγαλομόριο(172). Ωστόσο σημαντικό μειονέκτημα ενός τέτοιου ανασυνδυασμένου άγριου τύπου αλλεργιογόνου μορίου ή μεγαλομορίου παραμένει η υψηλή και ακριβής αλλεργιογονικότητα του, δυνάμενη να προκαλέσει μέσω ειδικού IgE αντισώματος και T – κυττάρου μεσολαβούσες παρενέργειες κατά την ανοσοθεραπεία. Το μειονέκτημα αυτό μπορεί να παρακαμφθεί με την μετατροπή του άγριου τύπου αλλεργιογόνου σε ανασυνδυασμένο υποαλλεργιογονικό αλλεργιογόνο παράγωγο(173).

Υποαλλεργιογόνο παράγωγο (Hypoallergenic derivative) αλλεργιογόνου ορίζουμε εκείνο το παράγωγο αλλεργιογόνου που έχει κατασκευαστεί ώστε να εκδηλώνει μειωμένη ή μηδενική αλλεργιογονικότητα διατηρώντας την μέγιστη ανοσογονικότητα του, προκειμένου να

χρησιμοποιηθεί για ασφαλέστερη ειδική ανοσοθεραπεία. Για την παραγωγή υποαλλεργιογονικών παραγώγων χρησιμοποιούνται τεχνολογία ανασυνδυασμού DNA και χημεία σύνθεσης πεπτιδίων κυρίως οι στρατηγικές, παραγωγής αλλεργιογόνων πρωτεϊνικών θραυσμάτων (fragment), εισαγωγής κατευθυνόμενων μεταλλάξεων θέσης στην αλλεργιογόνο πρωτεΐνη (site – directed mutagenesis), παραγωγής πεπτιδίων εκπροσώπων των B – ή και T – κυτταρικών επιτόπων και τέλος χημικής τροποποίησης της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης(164).

Ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα θραύσματα (recombinant allergen fragments). Δύο τύποι IgE επιτόπων έχουν προσδιοριστεί στις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες. IgE επίτοποι που εκφράζονται σε τεταμένη σειρά αμινοξέων, γραμμικοί συνεχείς επίτοποι (continuous epitopes). IgE επίτοποι που εκφράζονται συντιθέμενοι από τουλάχιστον δύο διαφορετικές περιοχές του πρωτεϊνικού μορίου και φέρονται σε συνέχεια κατά την δομική αναδίπλωση του μορίου, ασυνεχείς διαμορφωτικοί επίτοποι (discontinuous, conformational epitopes). Δεδομένου ότι οι συνεχείς γραμμικοί επίτοποι εξαρτώνται από την σωστή σειρά των αμινοξέων, τμηματική ανά τμήματα – θραύσματα πεπτιδίων αναδιάταξη της σειράς αμινοξέων μπορεί να μειώσει την δυνατότητα σύνδεσης IgE και επομένως την αλλεργιογονικότητα του μορίου. Δεδομένου επίσης ότι οι διαμορφωτικοί επίτοποι εξαρτώνται από την σωστή διαμόρφωση της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, αποδιοργάνωση της τρισδιάστατης δομής μπορεί να μειώσει την δυνατότητα σύνδεσης IgE και επομένως την αλλεργιογονικότητα του μορίου. Τούτο μπορεί να επιτευχθεί με την έκφραση ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων τμημάτων – θραυσμάτων, που περιέχουν ωστόσο τους αναγκαίους T – κυτταρικούς επιτόπους, σε ετερόλογους ξενιστές οργανισμούς. Έτσι κατά την τελική ανασύνθεση της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης επιτυγχάνεται η επιθυμητή αναδιάταξη των τμημάτων – θραυσμάτων πεπτιδίων ως μεγαλύτερα **τμήματα – θραύσματα (fragments)** ή σε νέα **πρωτεΐνη – μωσαϊκό (mosaic)** με μειωμένη αλλεργιογονικότητα και διατηρημένη την ανοσογονικότητα της (174-176).

Ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο μεταλλαγμένο (Recombinant allergen mutant). Με τη χρήση, κατευθυνόμενης σε θέσεις, μεταλλαξιογένεσης εισάγονται μεταλλάξεις σημείων της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης που μπορούν να μειώσουν την ικανότητα IgE σύνδεσης του αλλεργιογόνου με δύο διαφορετικούς τρόπους. Πρώτον, μεταλλάξεις σημείων εκτός του επιτόπου σύνδεσης της ειδικής IgE μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγή της τρισδιάστατης δομής του αλλεργιογόνου, με αποτέλεσμα την χάλαση των διαμορφωτικών IgE επιτόπων. Τούτο επιτυγχάνεται επίσης με καταστροφή των υπολειμμάτων κυστεΐνης του μορίου και επομένως των αντίστοιχων δισουλφιδικών δεσμών με *in vitro* μεταλλαξιογένεση(177). Δεύτερον, μεταλλάξεις σημείων ή διαγραφή ορισμένων αμινοξέων εντός του επιτόπου σύνδεσης της ειδικής IgE μπορούν να μειώσουν την δυνατότητα σύνδεσης με κατάργηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου – αντισώματος(141, 178). Αυτή η δεύτερη στρατηγική μάλλον οδηγεί σε αλλαγή του ειδικού για την IgE επιτόπου παρά στην αλλαγή της τρισδιάστατης δομής του αλλεργιογόνου και αποτελεί επιλογή μετατροπής αλλεργιογόνων που περιέχουν συνεχείς – γραμμικούς επιτόπους σε υποαλλεργιογονικά παράγωγα. Ανεξάρτητα από το εάν οι μεταλλάξεις σημείων εισάγονται εντός ή εκτός των επιτόπων σύνδεσης της ειδικής IgE πρέπει να διατηρούνται ακέραιοι οι T – κυτταρικοί επίτοποι και η ανοσογονικότητα του μορίου. Μεταλλαχθέντα αλλεργιογόνα διατηρούν κατά κανόνα συγκρίσιμα μεγέθη και βιοχημικά χαρακτηριστικά με τα φυσικά ομόλογα τους και επομένως όμοια ανοσογονικότητα.

T- κυτταρικούς ή B – κυτταρικούς επίτοπους περιέχοντα υποαλλεργιογόνα αλλεργιογονικά παράγωγα (T – cell or B – cell epitope containing hypoallergenic allergen derivatives). Η παραγωγή πεπτιδίων περιέχοντα T – κυτταρικούς ή B – κυτταρικούς επίτοπους είναι ευρέως εφαρμοζόμενη τεχνική για την δημιουργία υποαλλεργιογονικών αλλεργιογόνων παραγώγων. Το μόνο προαπαιτούμενο είναι η σαφής γνώση των περιοχών όπου ανευρίσκονται οι επίτοποι, το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί με πειραματική τεχνική χαρτογράφησης επιτόπων. Έτσι ενώ T – κυτταρικούς επιτόπους περιέχοντα παράγωγα συνθετικά πεπτίδια προκαλούν ανοχή ή ανεργία σε ειδικά για το αλλεργιογόνο T – κύτταρα, IgE – επιτόπων παράγωγα συνθετικά πεπτίδια έχουν σκοπό να προκαλέσουν δεσμευτικά IgG αντισώματα. Προαπαιτούμενο εδώ είναι τα συντιθέμενα παράγωγα πεπτίδια να είναι μεγέθους μεταξύ 25 και 35 αμινοξέων. Τούτο διότι πεπτίδια μικρότερα των 25 αμινοξέων πιθανόν να είναι μειωμένης ανοσογονικότητας ακόμη και αν δεσμευτούν σε φορείς ανοσοενίσχυσης, ενώ μεγαλύτερα των 35 αμινοξέων καθίστανται ενεργού αλλεργιογονικότητας(179).

Χημικά τροποποιημένα αλλεργιογόνα παράγωγα (Chemically modified allergen derivatives). Η χημική τροποποίηση των αλλεργιογόνων μορίων και εκχυλισμάτων για τη μείωση της αλλεργιογονικότητας τους αποτελεί πρακτική και συνεχής ερευνητική διαδικασία για χρόνια. Πολυμερισμός των αλλεργιογόνων με επεξεργασία αλδεϋδης όπως και σύζευξη μεθοξυ – πολυεθυλενο γλυκόλης (methoxy – polyethylene glycol – mPEG) σε αλλεργιογόνα αποδίδουν αλλεργοειδή με διατηρημένη ανοσογονικότητα και μειωμένη αλλεργιογονικότητα(180). Μελέτες εμβολιασμού με γονίδια πλασμιδίων έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη ανοσοενισχυτικών αλληλουχιών DNA (ISS – ODN, cytosine – phosphate – quinine, CPG motifs) στα βακτήρια ξενιστές με ανοσοενισχυτική δραστηριότητα. Όταν το ανοσοενισχυτικό, ISS – ODN, αναμειγνύεται με το αλλεργιογόνο προάγει την ισχυρή Th1 απάντηση έναντι του αλλεργιογόνου(181, 182). Ωστόσο η βέλτιστη αναλογία σύζευξης ανοσοενισχυτικού – αλλεργιογόνου παραμένει ζητούμενο να καθοριστεί καθώς έχει δειχθεί ότι αύξηση της αναλογίας ανοσοενισχυτικού – αλλεργιογόνου οδηγεί σε μείωση της αλλεργιογονικότητας, αλλά μετά μια κρίσιμη αναλογία και σε μείωση της ανοσογονικότητας(183). Η μείωση της αλλεργιογονικότητας των συζευγμένων μορίων αλλεργιογόνου – ανοσοενισχυτικού μάλλον προκύπτει από την δομική απόκρυψη των IgE επιτόπων, αρχή λειτουργίας που έχει προταθεί και για την μείωση της αλλεργιογονικότητας των κλασικών, πολυμερισμένων με επεξεργασία γλουταραλδεϋδης, αλλεργοειδών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη(184). Το πλεονέκτημα των ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων εδώ είναι ότι, πρώτον μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες και δεύτερον και πιο σημαντικό ότι προσφέρονται για χειρισμούς εισαγωγής κατευθυνόμενων σε θέσεις χημικών τροποποιήσεων που θα επιτρέπουν βέλτιστη σύζευξη του ανοσοενισχυτικού ή μείωση της αλλεργιογονικότητας.

3.2 Εφαρμογές και χρήση των ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων

Η ευρεία εφαρμογή των ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων στην έρευνα αλλά και την κλινική πράξη έχει ακόμη σημαντικές προοπτικές υλοποίησης(149). Ωστόσο η αρχή έχει γίνει και προστίθενται συνεχώς νέα δεδομένα στην ήδη υπάρχουσα δεξαμενή γνώσης που κατέσπει

δυνατόν να δημιουργηθεί με την κλωνοποίηση των αλλεργιογόνων και την εξαιτίας αυτών δημιουργία νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών δυνατοτήτων όπως:

- Ορισμός αλλεργιογόνων: Ονοματολογία αλλεργιογόνων βασισμένη στην αλληλουχία αμινοξέων, πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή δομή
- Ανακάλυψη αλλεργιογόνων, πριν την εκδήλωση αλλεργίας
- Ιεράρχηση των αλλεργιογόνων ιστύπων δεδομένης αλλεργιογόνου πηγής
- Αναγνώριση και κατανόηση διασταυρούμενων αλλεργικών αντιδράσεων
- Διευκρίνιση των οικογενειών γονιδίων των μειζόνων αλλεργιογόνων
- De novo αλλεργιογόνα προς επίλυση τρισδιάστατων δομών αλλεργιογόνων
- Γεωγραφική κατανομή – μεταβλητότητα αλληλουχιών αλλεργιογόνων
- Αλληλουχίες καθορισμένες για ανοσοθεραπεία πεπτιδίων
- Ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες για έρευνα με χρήση σαφώς ορισμένων και αναπαραγώγιμων αντιδραστηρίων
- Ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα για ειδική στοιχειακή διάγνωση και ειδική στοιχειακή ανοσοθεραπεία
- Αλληλουχίες πεπτιδίων για μελέτη T – κυτταρικών αποκρίσεων
- Ειδικά του είδους αλλεργιογόνα για επιδημιολογικές μελέτες
- Γενετική μηχανική για δημιουργία υποαλλεργιογόνων μορίων
- Γενετική μηχανική για την ενίσχυση της ειδικής ανοσοθεραπείας

Με την πρόσφατη εισαγωγή των κατάλληλων ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων, ερευνητικά εργαστήρια διεθνώς μπορούν να πειραματίζονται με ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα, διεξάγοντας έρευνες με χρήση γνωστών, δεδομένων και αναπαραγομένων ταυτόσημα συνεχώς, χωρίς γενετικές, βιολογικές ή ακόμη και από παρτίδα σε παρτίδα διαφορές, επιθυμητών ποσοτήτων αλλεργιογόνων. Μείζον στόχος είναι με εφαρμογή της ειδικής στοιχειακής διάγνωσης, η διαφοροποίηση μεταξύ συν ευαισθητοποίησης – αντιδραστικότητας και διασταυρούμενης ευαισθητοποίησης – αντιδραστικότητας σε διαφορετικές αλλεργιογόνες πηγές, με σκοπό την ταυτοποίηση ασθενών με προβλήματα διασταυρούμενης αντιδραστικότητας όπως η συνήθης περίπτωση, ιδιαίτερα στην Νότια Ευρώπη, του στοματοφαρυγγικού συνδρόμου τροφής, γύρεων(185). Ενώ αξιοσημείωτη επιτυχία υπήρξε χαρακτηριστικά η ανάδειξη των ασθενών με θετική αντίδραση στο αντιδραστήριο – εκχύλισμα του (latex) εξαιτίας απλώς διασταυρούμενης αντιδραστικότητας στην προφιλίνη (profilin) Heb v 8 λόγω ευαισθητοποίησης σε γύρεις και οι οποίοι ασθενείς μπορούν τώρα να χειρουργούνται ελεύθερα χωρίς latex – free διαδικασίες. Επίσης σημαντικό παράδειγμα η κλωνοποίηση και διαθεσιμότητα του ανασυνδυασμένου rBlo t 5 του *Blomia tropicalis* της οικογένειας των ακάρεων και η διαφοροποίηση του από τα υπόλοιπα μέλη, επέτρεψε την μελέτη ενός μείζονος προβλήματος αλλεργίας στις τροπικές και υποτροπικές χώρες όπου η επίπτωση των αλλεργικών νοσημάτων αυξάνει συνεχώς.

Μελέτες ειδικής ανοσοθεραπείας με χορήγηση γενετικά ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων έχουν επίσης διεξαχθεί ή βρίσκονται σε εξέλιξη. Σχετικά πρόσφατες δοκιμές με χορήγηση υποδορίως, του ανασυνδυασμένου μείζονος rBet v 1της σημύδας όπως και του μείγματος των μειζόνων ειδικών του είδους rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, rPhl p 6, του γρασιδιού (αγρωστώδη), έδειξαν την ίδια αποτελεσματικότητα με την ίδια ασφάλεια, με το ομόλογο τους

εκχύλισμα στην θεραπεία της αλλεργικής ρινίτιδας(169, 186). Ανοσοθεραπεία με χορήγηση υποδορίως του rBet v 1, τροποποιημένου μετά τμηματοποίηση και πολυμερισμό, έδωσε υποσχόμενα αποτελέσματα αλλά χωρίς την προσδοκώμενη αύξηση της αποτελεσματικότητας με μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών σε σχέση με το ομόλογο εκχύλισμα του όπως ήταν αναμενόμενο από ένα υποαλλεργιογόνο μόριο. Η δυνατότητες των υποαλλεργιογόνων μορίων θα γίνουν εμφανείς όταν δοκιμαστούν σε ανάλογες μελέτες γενετικά σχεδιασμένα αλλεργιογόνα τα οποία διατηρούν την φυσική αναδίπλωση της πρωτεΐνης που απαιτείται για την αντιγονική διέγερση με μειωμένη την μέσω IgE σύνδεση – αντιδραστικότητα στους επίτοπους επιφανείας του μορίου(141). Επιπρόσθετα μεγάλο μέρος της σύγχρονης έρευνας στην ειδική ανοσοθεραπεία κατευθύνεται στην υπογλώσσια ειδική ανοσοθεραπεία, η οποία μπορεί να λαμβάνεται αυτόνομα από τον ίδιο τον ασθενή και αντιμετωπίζεται προφανώς καλύτερα από την ανάγκη υποδόριων ενέσεων(187, 188). Η αναπτυσσόμενη γνώση και τεχνολογία του γενετικού ανασυνδυασμού αλλεργιογόνων μορίων εκτιμάται ότι θα αποδειχθεί σημαντική όχι μόνο για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων επιθυμητών αλλεργιογόνων σε σχεδόν ιδανικές συνθήκες αλλά και για περαιτέρω δοκιμή και μελέτη αυτής ταύτης της οδού χορήγησης.

Εξίσου σημαντικό, όλη η γνώση και η τεχνολογία που έχει καταστεί διαθέσιμη με τον γενετικό ανασυνδυασμό αλλεργιογόνων καθιστά αντίστοιχα δυνατή την έρευνα στην αλλεργιολογία να διεξάγεται εντός του πλαισίου της επικρατούσας τάσης στην ανοσολογία. Η σύνθεση γονιδίων, η οποία δε θεωρούνταν εφικτή όταν ξεκίνησε η κλωνοποίηση με γενετικό ανασυνδυασμό των αλλεργιογόνων μορίων, καθιστά ικανό κάθε οργανωμένο ερευνητικό εργαστήριο να συνθέτει, με οικονομικά αποδοτικό τρόπο, αλλεργιογόνα της επιλογής του και να χρησιμοποιεί έτσι επιλεγμένα πεπτίδια για την μέτρηση T-κυτταρικών απαντήσεων έναντι επιτόπων από όλο το φάσμα των αλλεργιογόνων μορίων που εμπεριέχονται στα εκχυλίσματα αλλεργιογόνων(189). Οι μοριακές δομές που επιλύθηκαν δια μέσου των διαθέσιμων γενετικά ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων έχουν προμηθεύσει σημαντικούς οδηγούς για τον προσδιορισμό του πως τα αλλεργιογόνα αλληλεπιδρούν με το σύστημα της έμφυτης ανοσίας, το οποίο αυξανόμενα αναγνωρίζεται πλέον ως αναπόσπαστο τμήμα και βήμα της εναρκτήριας αλλεργικής ευαισθητοποίησης(162).

4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ

Τα αλλεργικά νοσήματα διαγιγνώσκονται και αντιμετωπίζονται σύμφωνα με το ληφθέν κλινικό ιστορικό των περιγραφόμενων συμπτωμάτων του ασθενούς, τη φυσική εξέταση συνολικά και των όποιων συστηματικών σημείων αλλεργικής νόσου αλλά κυρίως από τα επιμέρους όργανα στόχους της αλλεργικής νόσου. Προς επιβεβαίωση των όποιων ανωτέρω ευρημάτων, δηλαδή αλλεργικής ευαισθητοποίησης που επάγει νόσο ή άμεσου τύπου αλλεργικής αντίδρασης, εκτελούνται συμπληρωματικά, αλλά συχνά απαραίτητα, *in vivo* ή/και *in vitro* εξετάσεις. Στην περίπτωση υποψίας IgE μεσολαβούμενης αλλεργικής νόσου, για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό των υπεύθυνων ειδικών IgE αντισωμάτων.

Το 1967 αναγνωρίστηκε το IgE αντίσωμα (190000 d) το οποίο συμμετέχει ενεργά στην άμεσου τύπου αλλεργική αντίδραση. Αποτελεί μόλις το 0.0005% του ολικού ποσοστού ανοσοσφαιρινών που υπάρχουν στον ορό και η ποσότητά του έχει σχέση με την ηλικία. Έτσι, στα 10 με 15 έτη έχει φτάσει στα μεγαλύτερα ποσοστά του και από το τέλος της δεύτερης δεκαετίας και ύστερα μειώνεται σταδιακά (190). Στην ηλικία των 14 περίπου ετών επίπεδα της ολικής IgE στον ορό πάνω από 333 kU/L (800μg/L) θεωρούνται αυξημένα και κατευθύνουν διαγνωστικά προς τα ατοπικά νοσήματα, όπως η ατοπική δερματίτιδα, η αλλεργική ρινίτιδα και το άσθμα(191).

Η ειδική IgE παράγεται από την αλληλεπίδραση ενός αριθμού κυττάρων μετά την είσοδο και με την επαφή με το αντιγόνο – αλλεργιογόνο δια της αναπνευστικής οδού, του δέρματος, του γαστρεντερικού ή της παρεντερικής οδού. Με την πρόσληψη του από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα το αντιγόνο επεξεργάζεται και παρουσιάζεται στα T-βοηθητικά κύτταρα. Αυτά εκκρίνουν κατάλληλες κυτταροκίνες που οδηγούν τα B λεμφοκύτταρα στον πολλαπλασιασμό τους και στην παραγωγή αντισωμάτων. Κάποια από αυτά παράγουν τελικά το IgE αντίσωμα. Αυτό μπορεί και δεσμεύεται στους υποδοχείς υψηλής συγγένειας Fcε που υπάρχουν κυρίως στην επιφάνεια των σιτευτικών κυττάρων στους ιστούς και στα βασεόφιλα της συστηματικής κυκλοφορίας, δημιουργώντας έτσι μία κατάσταση ενεργού ευαισθητοποίησης στον οργανισμό. Σε κάθε επόμενη έκθεση στο αλλεργιογόνο τα ήδη δεσμευμένα στους υποδοχείς των κυττάρων IgE αντισώματα «γεφυρώνονται» μεταξύ τους μέσω του δεσμευμένου αλλεργιογόνου. Με τη «γεφύρωση»- επαφή αυτή δημιουργείται το ενδοκυττάριο σήμα - που σε αυτή την περίπτωση είναι η αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου- και επέρχεται η απελευθέρωση τόσο των προσχηματισμένων (πχ. ισταμίνη και πρωτεάσες), όσο και νέο συντιθέμενων από λιπίδια μεσολαβητών (πχ. λευκοτριένια και προσταγλανδίνες). Οι αλλαγές που θα προκληθούν από τους μεσολαβητές αυτούς, σε πρώτο χρόνο προκαλούν εκδήλωση των άμεσων συμπτωμάτων και σε δεύτερο χρόνο οργανώνουν την αλλεργική φλεγμονή και διαμορφώνουν την κλινική εικόνα του ασθενούς. Συνεπώς και ο προσδιορισμός του εκάστοτε ειδικής IgE αντισώματος είναι στο επίκεντρο της διερεύνησης των αλλεργικών νοσημάτων, αφού αποτελεί το βασικότερο παράγοντα που καθορίζει την αλλεργική αντίδραση (192).

Όλα τα άτομα έρχονται σε επαφή με τα δυνητικά αλλεργιογόνα του περιβάλλοντος ένας αριθμός όμως από αυτά θα αναπτύξει ειδικά IgE αντισώματα έναντι αυτών και ένας ακόμη μικρότερος αριθμός είναι εκείνα τα οποία θα αναπτύξουν αλλεργική φλεγμονή και θα εκδηλώσουν την αντίστοιχη συμπτωματολογία. Έτσι, το ένα τρίτο περίπου του γενικού

πληθυσμού θα αναπτύξει ειδικά IgE αντισώματα και μόνο οι μισοί από αυτούς θα εκδηλώσουν τελικά αλλεργική νόσο με πλήρη εξέλιξη των συμπτωμάτων τους. Χαρακτηριστικά θα παρουσιάσουν αλλεργική ρινίτιδα, αλλεργικό άσθμα ή και ατοπική δερματίτιδα, καταλήγοντας έτσι να αποτελούν ακόμα και το 25% του γενικού πληθυσμού που πάσχει σε κάποιες περιοχές από αναπνευστική αλλεργία, άλλοτε άλλου βαθμού και βαρύτητας. Ποιοι από αυτούς που αναπτύσσουν τα ειδικά IgE αντισώματα (απλή ευαισθητοποίηση) θα καταλήξουν να είναι οι ασθενείς (αλλεργική νόσος) παραμένει ένα σημαντικό, υπό συνεχή συστηματική διερεύνηση, αναπάντητο ερώτημα των επιστημών που μελετούν την Αλλεργία(193).

Η προσέγγιση συνεπώς των αλλεργικών νοσημάτων περνάει καταρχήν μέσα από το διαγνωστικό πρίσμα του κλινικού, δηλαδή το λεπτομερές ιστορικό και την κλινική εξέταση. Το ατομικό, οικογενειακό, ακόμα και το περιβαλλοντικό ιστορικό, καθώς και η κλινική εικόνα είναι τα πρώτα που θα θέσουν την υποψία της ευαισθητοποίησης σε αλλεργιογόνο/α και το ερώτημα για περαιτέρω έλεγχο ή θα οδηγήσουν στη συμπτωματική θεραπεία του ασθενούς. Στην πρώτη περίπτωση πρωταρχικός στόχος είναι η επιβεβαίωση του αλλεργικού μηχανισμού μέσα από την ανίχνευση των ειδικών IgE αντισωμάτων, οπότε και πιστοποιείται με σχετική ακρίβεια η διάγνωση της αλλεργικής νόσου. Πρόκειται για τις *in vivo* και *in vitro* διαγνωστικές μεθόδους για τις οποίες ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια γίνεται συνεχής και συστηματική προσπάθεια βελτιστοποίησης τους ως προς την ειδικότητα και ευαισθησία τους(21).

Από τις *in vivo* μεθόδους οι δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού αποτελούν από τη στιγμή της επινόησης τους την πιο άμεση μέθοδο στα χέρια του ειδικού προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του IgE αντισώματος. Είναι μέθοδος γρήγορη, ασφαλής, έχει λίγους περιορισμούς όσον αφορά στη διενέργεια της και τα αποτελέσματα που δίνει είναι σημαντικής ειδικότητας και ευαισθησίας. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της ανάλογα με τη διαδικασία εκτέλεσης του νυγμού, τη φυσιολογία του δέρματος που εκτελείται η διαδικασία και τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που μπορεί να χρησιμοποιείται κάθε φορά. Ωστόσο ελάχιστα διαφοροποιούνται ως προς τη διαγνωστική τους ακρίβεια και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα ή ακόμα και οι παρενέργειες είναι αυτά που κυρίως απασχολούν τις περισσότερες φορές.

Σε παράλληλη πορεία και οι *in vitro* δοκιμασίες μπορούν να αποβούν το ίδιο ή και περισσότερο χρήσιμες ανάλογα με την περίπτωση. Απαιτούν την παρουσία εργαστηρίου και συνήθως είναι υψηλότερου κόστους, ωστόσο μετρούν ποσοτικά τα επίπεδα των IgE αντισωμάτων, είναι πιο πρακτικές σε περιπτώσεις δερμογραφισμού, χρήσης αντισταμινικών, ή δερματικού νοσήματος.

Στη διαγνωστική διαδικασία περιλαμβάνονται και η διενέργεια προκλήσεων, με χρήση πρωτοκόλλων χορήγησης τιλοδοτημένης δόσης, των ειδικών οργάνων στόχων, όπως η μύτη και οι πνεύμονες από το αναπνευστικό αλλά και το γαστρεντερικό, που αναπαράγουν τοπικά και ελεγχόμενα την αλλεργική αντίδραση ή την έξαρση της αλλεργικής φλεγμονής σε ειδικό κάθε φορά αλλεργιογόνο. Στην ουσία αναπαριστούν με αδρό τρόπο τις περιβαλλοντικές συνθήκες και αξιολογούν την αντιδραστικότητα ή όχι του οργάνου εφόσον υφίσταται η ειδική IgE ανοσοσφαιρίνη. Αν και από πολλούς αναφέρονται ως μέθοδοι αναφοράς (*gold standard*) δεν προσφέρουν πάντα απόλυτα ασφαλή και σαφή συμπεράσματα.

Η ειδική IgE ως διαγνωστικός στόχος

Η ανίχνευση και πιστοποίηση των ειδικών IgE αντισωμάτων για τα αλλεργιογόνα ή μέρους των μοριακών δομών τους ήταν και παραμένει μέχρι σήμερα το ζητούμενο στα αλλεργικά νοσήματα. Η παρατήρηση και αξιολογήση του προβλήματος, με τις αρχικά ελάχιστες εμπειρικές γνώσεις, αποτέλεσαν τα πρώτα εργαλεία στη διερεύνηση της αναπνευστικής αλλεργίας. Η πρώτη δερματική δοκιμασία νυγμού από τον Blackley το 1867, η ανακάλυψη της ειδικής ανοσοσφαιρίνης IgE από τους Isizaka & Johanson το 1967, ήταν από τις πρώτες καθοριστικής σημασίας προσπάθειες για την κατανόηση των αλλεργικών νοσημάτων και την ανίχνευση της αλλεργικής IgE μεσολαβούμενης αντίδρασης(194, 195).

Σαφές κλινικό ιστορικό και κλινική εξέταση μπορεί να κατευθύνουν, ωστόσο δεν μπορούν να πιστοποιήσουν την ευαισθητοποίηση στο/α αλλεργιογόνο/α και να ανιχνεύσουν ή να μετρήσουν την ειδική IgE. Οι δερματικές δοκιμασίες και εργαστηριακές μέθοδοι συνδυαστικά έχουν τη δυνατότητα να πιστοποιήσουν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο αυτή την IgE ευαισθητοποίηση. Οι πρώτες ποιοτικά, αλλά αξιόπιστα, προσδιορίζουν την ευαισθητοποίηση και μπορεί σε συνδυασμό με την κλινική εμπειρία να δώσουν τα πρώτα συμπεράσματα σχετικά με την έντασή της. Οι δεύτερες με μεγαλύτερη ακρίβεια ανιχνεύουν και παράλληλα δίνουν ακριβείς μετρήσεις της ευαισθητοποίησης, τα επίπεδα δηλαδή της ειδικής IgE στον ορό. Τα κλινικά και ερευνητικά δεδομένα την τελευταία δεκαετία υπόσχονται βελτίωση των in vivo και in vitro διαγνωστικών μεθόδων μέσω των εξελίξεων στη μοριακή βιολογία για μία πληθώρα αλλεργιογόνων.

4.1 In vivo διαγνωστικές μέθοδοι – ποιοτικοί – προσδιορισμού της ειδικής IgE

Οι δερματικές δοκιμασίες εξακολουθούν να αποτελούν και σήμερα, την κύρια εξέταση επιβεβαίωσης της ύπαρξης ειδικών IgE αντισωμάτων, για την διάγνωση της αλλεργικής νόσου. Το εκχύλισμα αλλεργιογόνου εισάγεται στο δέρμα είτε με δερματικό σκαριφισμό είτε με ενδοδερμική ένεση. Οι δερματικές δοκιμασίες έχουν υψηλότερη ευαισθησία αλλά μικρότερη ειδικότητα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες in vitro δοκιμασίες προσδιορισμού της ειδικής IgE και εφαρμόζονται σε όλους τους υπό διερεύνηση ασθενείς χωρίς περιορισμό ηλικίας. Οι Lewis και Grant περιέγραψαν την δοκιμασία του δερματικού σκαριφισμού για πρώτη φορά το 1924 ο οποίος και βελτιώθηκε στη συνέχεια από τον Perys το 1970. Οι δερματικές δοκιμασίες είναι μια λεπτή τεχνική διαδικασία, που απαιτεί εκπαίδευση και εμπειρία στο να εκτελούνται με ακρίβεια, σταθερότητα, επαναληψιμότητα και να ερμηνεύονται τα αποτελέσματά τους. Στα χέρια του έμπειρου ιατρού παραμένουν μια γρήγορη, εύκολη για τον ασθενή, χαμηλού κόστους και υψηλής ευαισθησίας εξέταση διάγνωσης της ύπαρξης ενεργής ειδικής IgE.

Επιδερμικές Δοκιμασίες Νυγμού

Η διαδικασία των επιδερμικών δοκιμασιών νυγμού περιλαμβάνει την τοποθέτηση σταγόνας διαλύματος σταθεροποιημένου με γλυκερίνη, από το εκχύλισμα της πηγής του αλλεργιογόνου (π.χ. γύρη ελιάς, περδικάκι, αγρωστώδη, γάλα, αυγό, ψάρι), στην επιφάνεια του δέρματος. Με τη χρήση ειδικής καρφίδας διαπερνάται η σταγόνα και εισέρχεται επιφέροντας ήπιο νυγμό στην επιδερμίδα. Ένα λεπτό μετά με χρήση ειδικού απορροφητικού χαρτιού και κίνηση επιποματισμού αφαιρείται το εκχύλισμα που έχει απομείνει στην επιφάνεια του δέρματος. Η αναμενόμενη άμεση αντίδραση, με σχηματισμό δεδομένου πομφού και περιφερικού του ερυθρήματος στο σημείο νυγμού, καταγράφεται στα επόμενα 15 με 20 λεπτά, οπότε και

ολοκληρώνεται η μεγιστοποίησή της. Πρόκειται για τοπική αναπαραγωγή της αλλεργικής αντίδρασης όπου το αλλεργιογόνο δεσμεύεται με τα ειδικά IgE αντισώματα που είναι ήδη προσκολλημένα στα σιτευτικά κύτταρα του δέρματος με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγούμενα. Τα διαφορετικά εκχυλίσματα των αλλεργιογόνων που ελέγχονται τοποθετούνται σε μία υπολογισμένη, κατά μέσο όρο 2 με 3 cm, απόσταση ώστε οι τυχόν θετικές αντιδράσεις να μην αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ τους. Συνίσταται να χρησιμοποιείται ξεχωριστή καρφίδα για κάθε διαφορετικό εκχύλισμα, προκειμένου να αποφεύγεται η ανάμειξη των ελεγχόμενων αλλεργιογόνων που θα οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Εκτελούνται συνήθως στις έσω επιφάνειες των πήχων και σε ορισμένες περιπτώσεις στην πλάτη του ασθενούς. Παράλληλα με εκχυλίσματα των αλλεργιογόνων χρησιμοποιούνται τα διαλύματα αναφοράς δηλαδή η ισταμίνη (θετικός μάρτυρας) και ο φυσιολογικός ορός (αρνητικός μάρτυρας), προκειμένου συγχυτικοί παράγοντες, όπως η χορήγηση αντιισταμινικών και ο δερμογραφισμός, να δύναται να αξιολογηθούν στην εκτίμηση του τελικού αποτελέσματος(196).

Ενδοδερμικές Δοκιμασίες Νυγμού

Οι ενδοδερμικές δοκιμασίες νυγμού γίνονται με την έγχυση 0.01-0.05 mL αλλεργιογόνου με τη χρήση σύριγγας φυματίνης. Αφού σχηματιστεί ο αρχικός πομφός αμέσως μετά την έγχυση το αποτέλεσμα διαβάζεται μετά από 15 έως 20 λεπτά, οπότε και θεωρείται ότι τόσο ο πομφός, όσο και η ερυθρότητα είναι μέγιστα. Υποδόρια έγχυση του αλλεργιογόνου (σε βαθύτερα δηλαδή στρώματα της επιδερμίδας) μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ενώ από την άλλη μεριά η ελάχιστη αλλαγή στη δόση του αλλεργιογόνου δεν τροποποιεί αισθητά το αποτέλεσμα πομφού – ερυθρήματος. Η συγκέντρωση δε του αλλεργιογόνου ή ακόμα και η πρόσμιξη ισταμίνης μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές προς τη λάθος διάγνωση. Εκτός όμως από μία συγκέντρωση είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί ο ίδιος έλεγχος σε διάφορες συγκεντρώσεις του αλλεργιογόνου. Το αποτέλεσμα αυτής της τιτλοποίησης του αλλεργιογόνου κατά τη δοκιμασία προσφέρει τη δυνατότητα της διερεύνησης της ευαισθητοποίησης – ευαισθησίας του ασθενούς στο αλλεργιογόνο. Αντίδραση σε πιο μικρή συγκέντρωση του αλλεργιογόνου είναι δυνατό να διαγνώσει ένα περισσότερο ευαίσθητο άτομο σε σχέση με άλλα που δίνουν την ίδια τοπική αντίδραση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλλεργιογόνου. Προκειμένου να παραχθεί αντίστοιχη αντίδραση σε σχέση με την αντίδραση στην επιδερμική δοκιμασία πρέπει η αντίστοιχη συγκέντρωση του αλλεργιογόνου να είναι το 1/1000 της πρώτης.

Το τελικό αποτέλεσμα όπως και στην επιδερμική δερματική δοκιμασία αποτυπώνεται με κολλητική ταινία κυτταρίνης, έτσι ώστε προηγούμενος σχεδιασμός των ορίων του πομφού και του ερυθρήματος με στυλό διαρκείας να είναι ορατός κατά την τελική τοποθέτηση της ταινίας πάνω σε χαρτί. Κατά αυτό τον τρόπο μπορεί με σχετική ακρίβεια να κρατηθεί αρχείο της εξέτασης δίνοντας τη δυνατότητα και σε άλλους γιατρούς μελλοντικά να εκτιμήσουν τον ασθενή.

Atopy patch test

Διάφορα αλλεργιογόνα τα οποία προκαλούν IgE ευαισθητοποίηση, με την απλή επαφή τους στο δέρμα με τη μορφή διαλύματος μπορεί να προκαλέσουν τοπική αντίδραση. Η μέθοδος είναι προς το παρόν υπό αξιολόγηση όσο αφορά τις αναπνευστικές αλλεργίες, ενώ εμφανίζεται θετική σε περιπτώσεις όπου η ειδική IgE με τις προαναφερόμενες μεθόδους δεν

επιβεβαιώνεται (Seidenari S et al., 1992). Μέχρι στιγμής η χρήση της περιορίζεται σε ειδικές περιπτώσεις κυτταρομεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας (π.χ. ηωσινοφιλική οισοφαγίτιδα) και στην αποτική δερματίτιδα(197). Υπόκειται σε περιορισμούς που έχουν να κάνουν με τη συγκέντρωση του διαλύματος, την αξιολόγηση της αντίδρασης στα πλαίσια της κλινικής εικόνας και τη διαφορική διάγνωσή της από ερεθιστικές αντιδράσεις.

Περιορισμοί και προβλήματα

Περιορισμοί και σφάλματα κατά την ερμηνεία των δερματικών δοκιμασιών νυγμού μπορούν να προκύψουν από πλήθος παραγόντων και καταστάσεων που πρέπει πάντα να συνεκτιμά και να λαμβάνει υπόψη του ένας κλινικός γιατρός. Έτσι, η ποιότητα των εκχυλισμάτων των αλλεργιογόνων, η ηλικία του ασθενούς, το υγιές ή και υπεραντιδραστικό δέρμα, η εποχή του έτους που διενεργούνται οι δοκιμασίες, η χρήση φαρμάκων που καταστέλλουν την αντιδραστικότητα του δέρματος, όπως τα αντιισταμινικά, μπορούν να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα των επιδερμικών δοκιμασιών. Σε ηλικιωμένα άτομα το μέγεθος του πομφού της αντίδρασης είναι ελαττωμένο σε σχέση με πιο νεαρά άτομα, η αντιδραστικότητα του δέρματος είναι αυξημένη κατά και αμέσως μετά την εποχή της γυρεοφορίας του αντίστοιχου αλλεργιογόνου (γύρεις) και στη συνέχεια ελαττώνεται σταδιακά μέχρι την επόμενη περίοδο. Η χρήση τοπικών στεροειδών επηρεάζει το αποτέλεσμα των δερματικών δοκιμασιών. Σημαντικοί παράγοντες όπως ο δερμογραφισμός και ο αιμορραγικός τραυματισμός της επιδερμίδας κατά την εκτέλεση του νυγμού μπορούν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ο ίδιος ο εξεταστής, η τεχνική που θα χρησιμοποιήσει, ο τρόπος με τον οποίο θα ερμηνεύσει, θα καταγράψει και θα μεταφέρει τα αποτελέσματα μπορούν εύκολα να τροποποιήσουν την εγκυρότητα, την αξιοπιστία και τη διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου(198). Σε μελέτη που έγινε από τους Antico et al. βρέθηκε ότι ακόμα και ο ελάχιστος διαφορετικός όγκος του εκχυλίσματος που ενοφθαλμίζεται κάθε φορά μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

4.2 In vitro διαγνωστικές μέθοδοι – ποσοτικοί προσδιορισμού ειδικής IgE

Τα ειδικά για το αλλεργιογόνο/α IgE αντισώματα είναι προεξάρχουσας σημασίας για την κλινική διερεύνηση, διάγνωση και θεραπεία της αλλεργίας. Αυτά μπορούν να μετρηθούν στο αίμα του αλλεργικού ασθενούς με διάφορες διαθέσιμες εμπορικές μεθόδους(199). Αποτελούν έτσι έναν ακόμα τρόπο ανίχνευσης των ευαισθητοποιήσεων του ασθενούς σε περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα με έναν περισσότερο ποσοτικό τρόπο σε σχέση με τις δερματικές δοκιμασίες. Κοινή αρχή όλων των μεθόδων είναι η παρουσία του αλλεργιογονικού παράγοντα ειδικού ως προς το IgE αντίσωμα το οποίο επιθυμούμε να μετρήσουμε, καθώς και η ύπαρξη ενός άλλου αντισώματος (IgG τις περισσότερες φορές) το οποίο είναι ειδικό για τους διάφορους ισότυπους της ειδικής IgE.

Στην πλέον καθιερωμένη μέθοδο, ανοσο/αλλεργοπροσοφνητικού τύπου, ένα δείγμα πλάσματος ή ορού επωάζεται με την σταθερή φάση της δοκιμασίας η οποία περιέχει προσροφημένο αλλεργιογόνο που με τη σειρά του θα ακινητοποιήσει και θα δεσμεύσει πάνω του ειδικά ως προς αυτό αντισώματα (όχι μόνο IgE). Το ζητούμενο είναι ο προσδιορισμός των ειδικών για το αλλεργιογόνο IgE αντισωμάτων, στα οποία οφείλεται τελικά και η αλλεργικού τύπου αντίδραση. Αυτό θα γίνει στη συνέχεια με δευτερεύον αντίσωμα το οποίο θα δεσμεύσει μόνο τα IgE αντισώματα (που είναι πλέον ακινητοποιημένα πάνω στο αλλεργιογόνο της στέρεως

φάσης) και είναι σημασμένο με ραδιενεργή ουσία ή ένζυμο έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο όταν γίνει η έκπλυση στο τέλος της διαδικασίας. Έτσι, δεν ανιχνεύεται αυτή καθαυτή η IgE αλλά το αντίσωμα το οποίο είναι δεσμευμένο πάνω της και το οποίο με ειδικό τρόπο έχουμε φροντίσει να ανιχνεύουμε.

Στην ακριβώς αντιστρόφου τύπου μεθοδολογία το ειδικό αντίσωμα δεσμεύεται πρώτα με μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο πλέον δεν είναι σημασμένο με κάποιο παράγοντα και στη συνέχεια προστίθεται το αλλεργιογόνο στο τέλος. Το αλλεργιογόνο όμως αυτή τη φορά είναι αυτό που έχει σημασθεί με ραδιενεργό, ενζυμικό ή άλλο παράγοντα.

Μία ακόμα μέθοδος, με τις ίδιες ωστόσο αρχές, είναι και αυτή όπου το IgE αντίσωμα και το αλλεργιογόνο αφήνονται να δεσμευτούν σε φάση διαλύματος. Στη συνέχεια μόνο το ειδικό αυτό σύμπλεγμα μέσω του αλλεργιογόνου δεσμεύεται σε στέρεη φάση (με θέση πρόσδεσης του αλλεργιογόνου), όπου τελικά με προσθήκη αντι-IgE μονοκλωνικού αντισώματος θα ανιχνευθεί για ακόμα μια φορά με έμμεσο τρόπο η παρουσία του ειδικού για το αλλεργιογόνο IgE αντισώματος(200).

Σε όλες τις παραπάνω μεθόδους όπου χρησιμοποιείται το αλλεργιογόνο στη σταθερή φάση η μέθοδος (π.χ. ImmunoCAP, Phadia, Sweden) χρησιμοποιεί καμπύλες βασισμένες σε προηγούμενους υπολογισμούς με διεθνή standard της καθαρής IgE ανοσοσφαιρίνης. Με τον τρόπο αυτό η εκάστοτε μέθοδος έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει το σήμα που λαμβάνεται, ανάλογα με τη σήμανση που υπάρχει, σε μονάδες μάζας του ειδικού IgE αντισώματος (International Unit per mL, IU/mL) στον ορό. Ανάλογα με το πόσο τεχνολογικά εξελιγμένες είναι οι μέθοδοι υπάρχει μία σειρά εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων. Γενικά η ευαισθησία και ειδικότητα της μέτρησης της ειδικής IgE δε φαίνεται να διαφοροποιείται αισθητά σε σχέση με τις δερματικές δοκιμασίες που υπάρχουν μέχρι στιγμής.

Περιορισμοί και προβλήματα

Αν και πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τη μέτρηση της ειδικής IgE ως τον πιο αντικειμενικό δείκτη στη διάγνωση της αλλεργικής νόσου, η εφαρμογή του στην κλινική πράξη επιδέχεται αμφισβητήσεις όσο αφορά στην τελική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Δεν υπάρχουν σαφή όρια πάνω από τα οποία η κλινική σημασία των ευαισθητοποιήσεων είναι αναμφισβήτητη, ενώ στην αναπνευστική αλλεργία όπως και στην τροφική, φαρμακευτική ή έναντι νυγμού υμενοπτέρων υπάρχουν περιπτώσεις το θετικό αποτέλεσμα είναι πολλές φορές χωρίς υπαρκτό κλινικό πρόβλημα. Πάντα κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων ο ειδικός καλείται να γνωρίζει την πιθανή συσχέτιση των αλλεργιογόνων που μπορεί να διαφέρουν λιγότερο ή περισσότερο ταξονομικά και να δίνουν και αντίστοιχες λιγότερο ή περισσότερο σημαντικές συσχετίσεις κατά την ανίχνευση των ευαισθητοποιήσεων. Αλλεργιογόνα από διαφορετικές πηγές είναι δυνατό με αυτό τον τρόπο να δίνουν όλα μαζί ευαισθητοποιήσεις που στην ουσία μόνο μία από αυτές καθορίζει τα κλινικά συμπτώματα του ασθενούς. Η διασταυρούμενη αυτή αντιδραστικότητα αντικατοπτρίζεται όπως είναι λογικό όχι μόνο κατά την ανίχνευση της ειδικής IgE, αλλά και κατά τις δερματικές δοκιμασίες. Η ομοιότητα αυτή ανάμεσα στο πρωτεϊνικά μόρια μπορεί να πηγάζει από την ομοιότητα συγκεκριμένων δομών που παραμένουν σταθερές ασχέτως της πηγής προέλευσης. Παραδείγματα τέτοιων δομών είναι οι προφιλίνες στα τροφικά κυρίως αλλεργιογόνα και οι υδατανθρακικοί καθοριστές (crossreactive carbohydrate determinants - CCDs) σε πολλά αεροαλλεργιογόνα(201). Παρόλ'αυτά η εξέταση για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων δεν αποτελεί λύση στη

διαλεύκανση της κλινικής σημαντικότητας τέτοιου είδους ευαισθητοποιήσεων. Γίνεται λοιπόν σαφές ότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων τέτοιων εξετάσεων πρέπει κάθε φορά να γίνεται μέσα στα πλαίσια του ιστορικού και της κλινικής εξέτασης του ασθενούς.

Πέρα από την ερμηνεία της μέτρησης της ειδικής IgE κατά τη διαδικασία αυτή καθαυτή προκύπτουν προβληματισμοί και περιορισμοί όσο αφορά στο τεχνικό μέρος και συγκεκριμένα στο αλλεργιογόνο και στη μορφή που χρησιμοποιείται ανάλογα με την εξειδικευμένη μέθοδο. Τόσο κατά την παρασκευή και απομόνωσή του όσο και κατά την ίδια τη διαδικασία της μεθόδου η καταστροφή ή αλλοίωσή του είναι πιθανό να συμβεί σε άλλοτε άλλο βαθμό. Έτσι, χρήσιμη πληροφορία μπορεί να χαθεί και αρκετά άτομα με ευαισθητοποίηση να βρεθούν με αρνητικά ή και με μη ισχυρά θετικά αποτελέσματα. Τέλος, όσο και να είναι επιθυμητό υπάρχουν περιπτώσεις όπου η καθαρότητα του αλλεργιογόνου δεν είναι η ιδανική, ενώ μπορεί ακόμα και να διαφοροποιείται από παρασκευαστή σε παρασκευαστή. Η κλινική ερμηνεία υπό τέτοιου είδους συνθήκες περιπλέκεται ακόμα περισσότερο, οπότε η ανάγκη για βελτίωση της ακρίβειας και της αξιοπιστίας των μεθόδων με βάση την παρούσα γνώση σε μοριακό επίπεδο είναι το επόμενο βήμα στο διαγνωστικό έλεγχο των αλλεργικών νοσημάτων.

4.3 Άλλες in vitro μέθοδοι προσδιορισμού ειδικής IgE

Η αντίδραση υπερευαισθησίας των βασεοφίλων (*basophil hypersensitivity response - BHR*) χρησιμοποιείται κυρίως στην έρευνα και στόχο έχει την ανίχνευση των ειδικών IgE αντισωμάτων έναντι του αλλεργιογόνου. Συσχετίζεται ικανοποιητικά με τις δερματικές δοκιμασίες και με την ειδική βρογχική πρόκληση(202). Με ειδική εργαστηριακή τεχνική (άμεση και έμμεση μέθοδος) τα κύτταρα εκτίθενται στο αλλεργιογόνο και 30 λεπτά μετά την αποκοκκίωσή τους –λόγω της δέσμευσής τους από την ειδική IgE- μετρώνται η ισταμίνη και τα λευκοτριένια. Η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να δίνει λύση σε διαφορούμενα αποτελέσματα ανάμεσα στις δερματικές δοκιμασίες και στη μέτρηση της ειδικής IgE όσο αφορά την οποιαδήποτε ευαισθητοποίηση απέναντι σε περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα.

Αντίστοιχη μέθοδος είναι και η ανίχνευση δεικτών ενεργοποίησης πάνω στα βασεόφιλα μετά από την έκθεση τους σε αλλεργιογόνο (*basophil activation*) το οποίο πάντα συνδέεται προηγούμενα με την ειδική IgE. Η ύπαρξη των δεικτών αυτών (CD63, CD203c) πιστοποιείται και πάλι με τη βοήθεια αντισωμάτων τα οποία είναι ειδικά έναντι αυτών. Τα τελευταία είναι επίσης σημασμένα με τρόπο που στη συνέχεια (κυτταρομετρία ροής) να γίνονται οι ανάλογες μετρήσεις που θα εκτιμούν την ευαισθησία στο αλλεργιογόνο ή όχι. Όπως ήταν φυσικό και στη μέθοδο αυτή όπως και στην προηγούμενη υπάρχουν οι περιορισμοί που έχουν να κάνουν με την αποκοκκίωση και την ενεργοποίηση των βασεοφίλων (εκτός του αλλεργιογόνου που ελέγχεται) ενώ είναι ακόμα υπό διερεύνηση ποιοί δείκτες και ουσίες ή ακόμα και συνδυασμοί τους είναι πιο κατάλληλοι/ες για το τελικό διαγνωστικό αποτέλεσμα της ευαισθησίας έναντι του αλλεργιογόνου.

4.4 In vivo ειδικές προκλήσεις

Υπάρχουν περιπτώσεις όπου το κλινικό ιστορικό δε συμβαδίζει με τις ευαισθητοποιήσεις που ανιχνεύονται με τη βοήθεια των in vivo ή/και in vitro εργαστηριακών εξετάσεων. Προκειμένου να γίνουν οι κατάλληλοι θεραπευτικοί χειρισμοί υπάρχει η δυνατότητα για τη

διενέργεια ειδικών προκλήσεων. Στόχος δεν είναι απλά η διερεύνηση της ευαισθητοποίησης στο αλλεργιογόνο, αλλά και η άμεση σχέση αυτής της ευαισθητοποίησης με την κλινική εικόνα του αλλεργικού ασθενούς.

Ρινική πρόκληση

Κατά τη ρινική πρόκληση με ελεγχόμενο τρόπο και σε συνεχώς αυξανόμενες συγκεντρώσεις μέχρι ενός κριτικού ορίου προωθείται το διάλυμα του αλλεργιογόνου στη ρινική κοιλότητα(203). Προηγούμενα έχει χορηγηθεί ο διαλύτης χωρίς πρόκληση συμπτωμάτων, ενώ και από την κλινική εξέταση δεν υφίσταται άλλος συγχυτικός παράγοντας που να προκαλεί με οποιοδήποτε τρόπο συμπτώματα ρινίτιδας. Στο τέλος της διαδικασίας ένα σύνολο συμπτωμάτων (αριθμός πταρμών, ρινική καταρροή, κνησμός, κ.α.) αφού αξιολογηθούν και βαθμονομηθούν διαμορφώνουν ένα τελικό σκόρ. Στην όλη διαδικασία μπορεί επίσης να γίνει συγκέντρωση και μέτρηση παραγόντων και μεσολαβητών φλεγμονής από το ρινικό έκκριμα, όπως επίσης *N-tosyl-L-arginine methyl ester [TAME] esterase* ή ισταμίνης(204). Οι αντιστάσεις κατά τη ροή του αέρα μπορεί επίσης να μετρηθούν πριν και μετά τη χορήγηση του αλλεργιογόνου. Στην κλινική πράξη πρόκειται για μεθόδους που είναι εφαρμόσιμες σε ερευνητικό επίπεδο και λιγότερο πρακτικές σε σχέση με τις δερματικές δοκιμασίες και τη μέτρηση της ειδικής IgE στον ορό.

Βρογχική πρόκληση

Με ανάλογο τρόπο η χορήγηση του αλλεργιογόνου στην κατώτερη αναπνευστική οδό (πνεύμονες – βρογχικό επιθήλιο) αναμένεται να προκαλέσει συμπτώματα σε έναν αλλεργικό και άρα ευαισθητοποιημένο ασθενή. Η αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων με τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί θα προκαλέσει τα ανάλογα συμπτώματα (βρογχόσπασμος, βήχας, αίσθημα δύσπνοιας) εφόσον ο ασθενής είναι κλινικά ευαισθητοποιημένος στο αλλεργιογόνο(205). Απαραίτητη πάντα προϋπόθεση είναι η παρουσία της ειδικής έναντι του αλλεργιογόνου IgE της οποίας η ύπαρξη τελικά με αυτό τον τρόπο πιστοποιείται. Θετική είναι η δοκιμασία όταν αντικειμενικά ευρήματα όπως η μείωση της FEV1 κατά τη σπιρομέτρηση μειώνεται κατά 20% σε σχέση με την αρχική μέτρηση (προ αλλεργιογόνου) μετά την ανάλογη συγκέντρωση του διαλύματος με το αλλεργιογόνο.

Πρόκληση επιπεφυκότα

Το σκεπτικό είναι όμοιο και στην περίπτωση του οφθαλμικού επιπεφυκότα. Εφόσον τα μαστοκύτταρα του αντίστοιχου επιθηλίου είναι κατειλημένα από ειδική ανοσοσφαιρίνη IgE έναντι του ελεγχόμενου αλλεργιογόνου αναπτύσσεται με ίδιο ακριβώς τρόπο η αλλεργική φλεγμονή. Οι ίδιοι μεσολαβητές μπορούν και πάλι να μετρηθούν και να αξιολογηθούν όπως και στην ρινική πρόκληση, ενώ βάρος δίνεται και στα τυχόν συμπτώματα επιπεφυκίτιδας που θα παρουσιαστούν. Για άλλη μια φορά στα πλαίσια των προκλήσεων των οργάνων στόχων στην αναπνευστική αλλεργία επισημαίνεται ότι θετική πρόκληση επιβεβαιώνει την ύπαρξη της ειδικής IgE, ωστόσο το αρνητικό αποτέλεσμα δεν μπορεί να την αποκλείσει λόγω του ποσοστού ασθενών που αν και ευαισθητοποιημένοι (υπαρκτή ειδική IgE) δε θα εκδηλώσουν αλλεργική νόσο.

5. ΕΙΔΙΚΗ ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ

5.1 Τι είναι η ειδική στοιχειακή διάγνωση της αλλεργίας

Η διάγνωση της τύπου I ή ειδικής IgE μεσολαβούμενης αλλεργίας βασίζεται στην ανίχνευση του ειδικού IgE αντισώματος για το αλλεργιογόνο στον ορό του αίματος ή στην άμεση εκδήλωση των συμπτωμάτων με τη δοκιμασία πρόκλησης στο υπεύθυνο αλλεργιογόνο (δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού, ρινική, βρογχική, επιπεφυκότα πρόκληση). Η αντιμετώπιση της αλλεργικής νόσου μπορεί να επιτευχθεί στο επίπεδο ελέγχου των συμπτωμάτων και επιβράδυνσης εξέλιξης



της φλεγμονής με την κατευθυνόμενη αποφυγή του αλλεργιογόνου όταν αυτό είναι δυνατό και την χορήγηση κατάλληλης φαρμακοθεραπείας. Η ειδική για το αλλεργιογόνο ανοσοθεραπεία αποτελεί και με τις σύγχρονες γνώσεις μας, την μόνη αιτιολογική και δυνάμενη να οδηγήσει σε αποδρομή της νόσου ή πρόληψη εξέλιξης της, θεραπεία(206, 207). Καθίσταται επομένως προφανής η ανάγκη για ακριβή ανίχνευση του προκαλούντος την νόσο υπευθύνου αλλεργιογόνου μορίου κατά τη διάγνωση όπως και η βέβαιη γνώση ότι το συγκεκριμένο μόριο εμπεριέχεται στην αναγκαία ποσότητα στην χορηγούμενη ανοσοθεραπεία. Στον ανωτέρω προβληματισμό είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη ότι, το προδιατεθειμένο άτομο να εκδηλώσει αλλεργική νόσο φυσιολογικά εκτίθεται σε σύνθετα βιολογικά υλικά εν δυνάμει πηγές αλλεργιογόνων και ότι η διάγνωση όπως και η ειδική ανοσοθεραπεία εκτελείται με εκχύλισμα των αλλεργιογόνων πηγών.

Ο όρος αλλεργιογόνος πηγή ή πρότυπο ορίζει το βιολογικό υλικό προέλευσης του αλλεργιογόνου ενώ ο όρος αλλεργιογόνο εκχύλισμα χαρακτηρίζει το μείγμα αλλεργιογόνων και μη αλλεργιογόνων τμημάτων που λαμβάνουμε, με την βέλτιστη μεθοδολογία εκχύλισης συνήθως υδατικής, από την αλλεργιογόνο πηγή. Αποτελεί ωστόσο κοινή συνήθεια να ονομάζουμε και χαρακτηρίζουμε τελικά "αλλεργιογόνο" την αλλεργιογόνο πηγή ή το εκχύλισμα αλλεργιογόνου. Κατά τη γνώμη των ερευνητών τούτο είναι ατυχές καθώς συχνά προκαλεί σύγχυση δεδομένου ότι, τουλάχιστον στην επιστημονική κοινότητα και την μεταξύ των επιστημόνων επικοινωνία, αλλεργιογόνο ορίζεται εκείνη η μοριακή οντότητα που δύναται να δεσμεύει με ικανή ακρίβεια σε κάποια συγκεκριμένα σημεία της, τους αλλεργιογονικούς επιτόπους, τα ειδικά IgE αντισώματα και να προκαλεί αλλεργική αντίδραση(208).

Η Εικόνα 11 αποσκοπεί στην απεικόνιση των ανωτέρω ορισμών

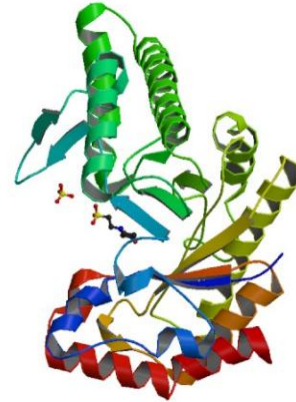
Αλλεργιογόνος πηγή



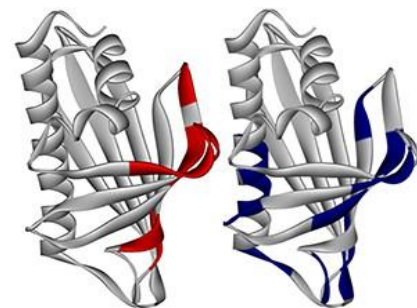
Εκχύλισμα αλλεργιογόνου



Αλλεργιογόνο μόριο, στοιχείο



Αλλεργιογόνος επίτοπος μορίου



Εικόνα 11: Απεικόνιση των ανωτέρω ορισμών

Επομένως, κατά την κρίση των ερευνητών, καθίσταται πλέον θεμιτή η σύσταση για περισσότερο περιοριστική και αυστηρή χρήση του όρου "αλλεργιογόνο" προς αποφυγή σύγχυσης αλλά και εξέλιξης της γνώσης στην επιστημονική κοινότητα.

Αν κι η προσπάθεια για ακριβή διαχωρισμό μεταξύ των όρων αλλεργιογόνος πηγή, εκχύλισμα αλλεργιογόνου και αλλεργιογόνο μόριο δείχνει κατ' αρχή σχολαστική, ήσσονος σημασίας, είναι σημαντική στην κατανόηση πολλών όψεων και αναφερόμενων ερωτημάτων της αλλεργικής νόσου. Τυπικά είναι γνωστό ότι αλλεργικά άτομα μπορεί να εκδηλώσουν άτυπες ή καθόλου αντιδράσεις μετά επαφή με την υπεύθυνη αλλεργιογόνο πηγή σε διαφορετικές, φαινομενικά όμοιες και συγκρίσιμες περιπτώσεις(193). Τούτο μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας παραγόντων, φαινομενικά όμοιων και συγκρίσιμων αντίστοιχα, αλλά τελικά σε μοριακό επίπεδο διαφορετικών. Συμβαίνει συχνά όταν η αλλεργική αντίδραση οφείλεται σε ένα αλλεργιογόνο που ανευρίσκεται ως σποραδική "επιμόλυνση" μίας άλλης αλλεργιογόνου πηγής, όπως η παρουσία ακάρεων οικιακής σκόνης σε εκχυλίσματα επιθηλίων ζώων(209). Επίσης όταν συγκεκριμένα αλλεργιογόνα για εξελικτικούς ή άλλους λόγους ανάπτυξης του αλλεργιογόνου είδους δεν εκφράζονται ή δεν εκφράζονται πλήρως στην αλλεργιογόνο πηγή, όπως αρκετά αλλεργιογόνα μόρια γύρεων εκφράζονται μόνο στην ώριμη, πριν την απελευθέρωση της, γύρη(210). Επίσης για τους ίδιους εξελικτικούς λόγους έκφρασης του αλλεργιογόνου μορίου της παρβαλβουμίνης, ορισμένα είδη ιχθύων το εκφράζουν σε άλλοτε άλλη ποσότητα, συμπεριφερόμενα ως υπο-αλλεργικά ή υπερ-αλλεργικά σε κάποιους ασθενείς, πρόβλημα μείζονος σημασίας προς επίλυση στη Νότια Ευρώπη και τη χώρα μας(56, 211). Η έκφραση των αλλεργιογόνων μορίων των μυκήτων, ποικίλει ευρέως εξαρτώμενη από τις συνθήκες καλλιέργειας του δεδομένου είδους μύκητα(212). Γνωστό επίσης πρόβλημα αποτελεί η φτωχή ποσοτικά ή αλλοιωμένη, εξαιτίας μετουσίωσης της πρωτεΐνης κατά τη διαδικασία, εκχύλιση αλλεργιογόνων μορίων ευαίσθητων αλλεργιογόνων πηγών όπως των προερχόμενων από φυτά τροφικών αλλεργιογόνων, δηλαδή φρούτων και λαχανικών, επίσης ιδιαίτερης σημασίας για την Νότια Ευρώπη και την χώρα μας. Αντίθετα, η χρήση καθορισμένων αλλεργιογόνων μορίων στη διαγνωστική πράξη εκτιμούμε ότι θα εξασφαλίσει σταθερής ειδικότητας και διαχωρισμού ανάλυση του ειδικού IgE αντιδρώντος προφίλ του ασθενούς, που επιτυγχάνεται μερικώς με τις κλασσικές βασισμένες σε εκχυλίσματα τεχνικές που χρησιμοποιούμε ως σήμερα. Όλα τα ανωτέρω παραδείγματα καταδεικνύουν εμφατικά ότι η διάγνωση με χρήση αλλεργιογόνων εκχυλισμάτων μπορεί να ταυτοποιήσει την ευαισθητοποίηση σε συγκεκριμένη αλλεργιογόνο πηγή, αλλά αδυνατεί να δώσει λεπτομερείς πληροφορίες για την μοριακή οντότητα του προκαλούντος τη νόσο αλλεργιογόνου, όπως και για τους λειτουργούντες υποκείμενους ανοσολογικούς μηχανισμούς. Αντίθετα η διάγνωση με τη χρήση γενετικά ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων μπορεί να καταγράψει με ακρίβεια και στοιχειακά τις αντισωματικές, κυτταρικές και βιολογικές αντιδράσεις έναντι σαφώς καθορισμένης μοριακής οντότητας. Η συγκεκριμένη αρχή, της χρήσης καθορισμένων αλλεργιογόνων μορίων σε αντίθεση με τα αλλεργιογόνα εκχυλίσματα για την διάγνωση της τύπου I ή IgE μεσολαβούμενης αλλεργίας, ορίζεται και καλείται ειδική στοιχειακή διάγνωση αλλεργίας(208).

Η ακριβής διάγνωση βελτιστοποιεί στο μέγιστο δυνατό, τη λεπτομερή καταγραφή και κατανόηση του προφίλ ευαισθητοποίησης του αλλεργικού ασθενούς και παρέχει συνεπώς τα μέσα για τη βελτιστοποίηση μιας ουσιαστικής και επιτυχούς αντιμετώπισης της αλλεργικής νόσου. Η ειδική στοιχειακή διάγνωση, επομένως όπως ορίστηκε, καθιστά δυνατή:

- Τη βέλτιστη αντιμετώπιση της αλλεργικής νόσου, δηλαδή μια ειδική στοιχειακή αντιμετώπιση δυνάμενη να εξατομικεύεται στο συγκεκριμένο ασθενή ώστε να επιτρέπει:
- Τον αποτελεσματικό καθορισμό της πρωτοπαθούς ευαισθητοποίησης σε αλλεργιογόνο πηγή, προσδιορίζοντας την ευαισθητοποίηση σε μείζον ή/και ειδικό του είδους αλλεργιογόνο και αποκαλύπτοντας συν-ευαισθητοποίηση σε πρωτοπαθή αλλεργιογόνα ή/και διασταυρούμενη ευαισθητοποίηση σε παν-αλλεργιογόνα προερχόμενα από διαφορετικές αλλεργιογόνες πηγές.
- Την ακριβή, εξατομικευμένη καθοδήγηση τους ασθενούς στην αποφυγή ή μη συγκεκριμένων αλλεργιογόνων πηγών, αποφεύγοντας αναίτιους περιορισμούς που μπορούν να επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα της ζωής του.
- Τη βελτιστοποίηση της διενέργειας μόνο των απαραίτητων τροφικών προκλήσεων, σε τροφική αλλεργία, αποφεύγοντας τις χρονοβόρες δαπανηρές για την παροχή υπηρεσιών υγείας και εν δυνάμει απειλητικές για τη ζωή αλλεργικές αντιδράσεις.
- Την επιλογή του κατάλληλου, ειδικού για τον συγκεκριμένο ασθενή και την γεωγραφική περιοχή κατοικίας του, προσδιορισμένο σύμφωνα με το μείζον ή/και ειδικό του είδους αλλεργιογόνο, εκχυλίσματος για την εφαρμογή ειδικής ανοσοθεραπείας.
- Την απόκτηση προοπτικά κατάλληλων, εμπλουτισμένων σε ειδικά στοιχειακά αλλεργιογόνα μόρια εκχυλισμάτων, γενετικά ανασυνδυασμένων μείζονων αλλεργιογόνων ή τροποποιημένων υποαλλεργιογονικών παραγώγων, επακριβώς προσδιορισμένης μονομοριακής ή πολύ-μοριακής σύνθεσης, για την εφαρμογή ειδικής ανοσοθεραπείας.
- Την πρόβλεψη μιας περισσότερο ακριβούς πρόγνωσης της αλλεργίας.
- Τη μελέτη της φυσικής πορείας της νόσου, μέσω πιο ακριβούς καταγραφής, κατανόησης και παρακολούθησης της συμμετοχής του IgE μεσολαβούμενου και κυτταρομεσολαβούμενου παθοφυσιολογικού μηχανισμού της αλλεργικής φλεγμονής
- Τη μελέτη της εξέλιξης της εφαρμοζόμενης ειδικής ανοσοθεραπείας μέσω λεπτομερούς διερεύνησης των υποκείμενων ενεργοποιούμενων ανοσολογικών μηχανισμών και των επιτυγχανόντων θεραπευτικών αποτελεσμάτων.

Η ειδική στοιχειακή διάγνωση και η εξ' αυτής κατευθυνόμενη ειδική στοιχειακή αντιμετώπιση της αλλεργικής νόσου και του υποκείμενου ασθενούς, έχει δώσει ήδη αρκετές από τα αναμενόμενες εξελίξεις στον τομέα της αλλεργιολογίας. Αρκετά επίσης μένουν ακόμη να υλοποιηθούν με κυρίαρχο στόχο την απόκτηση προοπτικά ειδικών αλλεργιογόνων μορίων που να επιτρέπουν κατ' αντιστοιχία την εφαρμογή ειδικής στοιχειακής ανοσοθεραπείας. Έως τότε και σε παράλληλη εξέλιξη η συνεχής μελέτη του προφίλ ευαισθητοποίησης και νόσου, ασθενών και γεωγραφικών περιοχών, σε επίπεδο μοριακών αλλεργιογόνων θα επιτρέψει την βέλτιστη αντιμετώπιση της αλλεργικής νόσου και σε τούτο ευελπιστεί να συμβάλει και η παρούσα ερευνητική προσπάθεια με τα αποτελέσματά της.

5.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ειδικής στοιχειακής διάγνωσης της Αλλεργίας

5.2.1 Εν δυνάμει πλεονεκτήματα της ειδικής στοιχειακής διάγνωσης της Αλλεργίας

- Μείωση του αναγκαίου αριθμού ελεγχόμενων αλλεργιογόνων για την ταυτοποίηση δεδομένων αλλεργιογόνων προτύπων πηγών (έλεγχος μειζόνων αλλεργιογόνων).
- Πρόβλεψη της βαρύτητας των συμπτωμάτων και της επιμονής της νόσου (αλλεργιογόνα ανθεκτικά σε stress, θερμότητα, πέψη).
- Διάκριση μεταξύ διαφορετικών κλινικών οντοτήτων (αναπνευστική, τροφική αλλεργία) που προκαλούνται από έκθεση στην ίδια αλλεργιογόνο πρότυπο πηγή ή σε στενά συσχετιζόμενες μεταξύ τους πηγές.
- Ερμηνεία της ευαισθητοποίησης (εκτεταμένη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα) χωρίς συνοδό εκδήλωση συμπτωμάτων αλλεργικής νόσου.
- Βέλτιστη ταυτοποίηση της βέλτιστης θεραπείας (ακριβής επιλογή της κατάλληλης ανοσοθεραπείας).

5.2.2 Εν δυνάμει λανθασμένη χρήση της ειδικής στοιχειακής διάγνωσης της Αλλεργίας

- Λανθασμένη επιλογή των προς διερεύνηση, ασθενών. Ασθενείς με ήπια κλινική εικόνα ή μη σχετιζόμενη με το βασικό έλεγχο με χρήση εκχυλισμάτων δε χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης με αλλεργιογόνα μόρια.
- Λανθασμένη επιλογή των στοιχειακών αλλεργιογόνων μορίων. Ασθενείς με αναπνευστική αλλεργία και τροφική αλλεργία ζωικής προέλευσης, δε χρήζουν διερεύνησης με αλλεργιογόνα μόρια φυτικής προέλευσης.
- Λανθασμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Όπως ασθενείς με μόνη εκδήλωση αναπνευστική αλλεργία και θετικό το αλλεργιογόνο LTP δε χρήζουν διερεύνησης για διασταυρούμενη τροφική αλλεργία εξαιτίας του LTP, γιατί το μόριο δεν εκφράζεται μέσω των αναπνευστικών αλλεργιογόνων.

5.3 Αιτιολογική προσέγγιση με την ειδική στοιχειακή διάγνωση της Αλλεργίας

Πότε; Σε περιστατικά με κλινική εικόνα πολυευαισθητοποίησης που υπάρχει ανάγκη λεπτομερούς προσδιορισμού των υπεύθυνων αλλεργιογόνων. Όπως στην αναπνευστική αλλεργία σε γύρεις φυτών και ταυτόχρονη τροφική αλλεργία σε τροφές προερχόμενες από φυτά της ίδιας οικογένειας (φρούτα, όσπρια, ξηροί καρποί). Επίσης σε περιστατικά δυσκολίας στην ταυτοποίηση του υπεύθυνου υμενόπτερου (μέλισσα, σφήκα) μιας αναφυλακτικής αντίδρασης.

Γιατί; Κυρίως για να αποφύγουμε ή αν είναι δυνατόν να προβλέψουμε τον πιθανό κίνδυνο μιας σοβαρής, εν δυνάμει απειλητικής για τη ζωή αλλεργικής αντίδρασης. Όπως σε περίπτωση δυσκολίας στην ταυτοποίηση του υπεύθυνου υμενόπτερου (μέλισσα, σφήκα) μιας αναφυλακτικής αντίδρασης. Για να ερμηνεύσουμε απρόβλεπτες αντιδράσεις όταν η εικόνα μετά τον έλεγχο με αλλεργιογόνα εκχυλίσματα δε σχετίζεται ικανοποιητικά με την κλινική εικόνα. Στον προγραμματισμό τροφικής πρόκλησης όταν μπορεί να προβλεφθεί μια πιθανή σοβαρή αντίδραση, όπως στην αλλεργία σε αβγό. Στον προγραμματισμό χορήγησης ανοσοθεραπείας ώστε να επιτευχθεί ο ακριβέστερος προσδιορισμός του χορηγούμενου μείγματος αλλεργιογόνων, όπως στην εποχική (εαρινή) αναπνευστική αλλεργία.

Ποια αλλεργιογόνα και στοιχειακά αλλεργιογόνα μόρια; Κλινικά σχετιζόμενα αλλεργιογόνα εκχυλίσματα και μόρια ή/και άσχετα μόρια με βάση την σαφή γνώση τους. Κυρίως προς επιβεβαίωση ύπαρξης ή όχι μιας ευαισθητοποίησης που προσδιορίστηκε με το αλλεργιογόνο εκχύλισμα και μπορεί να οδηγήσει σε άσκοπους διαιτητικούς ή περιβαλλοντικούς περιορισμούς και ανησυχίες του ασθενή.

Ποιος ερμηνεύει τα αποτελέσματα και αναλαμβάνει την ευθύνη του αποτελέσματος; Ο εκπαιδευμένος στην αλλεργιολογία και μοριακή αλλεργιολογία, θεράπων ιατρός που κατανοεί τις εμπλεκόμενες οικογένειες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών και τις μεταξύ τους συσχετίσεις. Κυρίως έχει την εμπειρία να αποκωδικοποιήσει μεταξύ μιας λιγότερο σοβαρής αντίδρασης και μιας εν δυνάμει απειλητικής για τη ζωή του ασθενούς.

Συμπερασματικά η μοριακή αλλεργιολογία αποκαλύπτει ένα βάθος και έκταση λεπτομερειών της αλλεργικής νόσου, που καθιστά ακριβέστερη τη διάγνωση και την επιλογή της αιτιολογικής θεραπείας (ανοσοθεραπείας).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ταυτοποίηση του υπεύθυνου αλλεργιογόνου αποτελεί τη βάση της διάγνωσης, θεραπείας και συνολικής αντιμετώπισης της μέσω ειδικού IgE αντισώματος μεσολαβούμενης αλλεργικής νόσου. Οι διαγνωστικές τεχνικές που εφαρμόζουμε έως και σήμερα αποδεικνύονται μερικώς ατελείς καθώς τα εκχυλίσματα αλλεργιογόνων που χρησιμοποιούμε είναι σύνθετα μίγματα αλλεργιογόνων και μη αλλεργιογόνων μορίων και υπολείπονται ειδικότητας. Τέτοιοι προβληματισμοί αναδεικνύονται ακόμη περισσότερο στη Νότια Ευρώπη, συμπεριλαμβανόμενης της Ελλάδας, όπου οι αλληλοεπικαλυπτόμενες περίοδοι ανθοφορίας των φυτών και η κατανάλωση αρκετών τροφών φυτικής προέλευσης όπως και κατανάλωση αφθονίας ψαριών και θαλασσινών συσκοτίζουν την τελική ακριβή διάγνωση.

Τα τελευταία χρόνια η μοριακή αλλεργιολογία έκανε σημαντικά βήματα επιτρέποντας ακριβέστερη ταυτοποίηση του υπευθύνου αλλεργιογόνου, ξεπερνώντας τα μειονεκτήματα των φυσικών εκχυλισμάτων, μειγμάτων αλλεργιογόνων μορίων, με κάποια μόρια ειδικά της αλλεργιογόνου πηγής και άλλα διασταυρούμενης ή άγνωστης ακόμη αλλεργιογονικότητας.

Οι νέες τεχνικές γενετικού ανασυνδυασμού και παρέμβασης στην παραγωγή αλλεργιογόνων μορίων προσφέρουν τη δυνατότητα για ακριβή ειδική στοιχειακή διάγνωση ιδιαίτερα σε πολυευαισθητοποιημένους αλλεργικούς ασθενείς και ασθενείς με διασταυρούμενη αλλεργία. Επιπλέον παρέχουν την επιλογή εξατομικευμένης ειδικής επί στοιχειακών μορίων αντιμετώπισης και επιλογής όπου καθίσταται δυνατόν ειδικής ανοσοθεραπείας.

7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διαγνωστική διερεύνηση αλλεργικών ασθενών σε παιδιατρικό πληθυσμό για τρία μείζονα αλλεργιογόνα: τα ακάρεα της οικιακής σκόνης, το μείζον των αγρωστωδών, γρασίδι είδους Timothy και το ψάρι, με συγκριτική εφαρμογή των γνωστών χρησιμοποιούμενων εκχυλισμάτων και αντίστοιχων γενετικά ανασυνδυασμένων μορίων τους. Το προσδοκώμενο όφελος είναι η βελτίωση, με τη χρήση των γενετικά ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων, της διάγνωσης της μέσω ειδικής IgE μεσολαβούμενης αλλεργικής νόσου, κυρίως στις περιπτώσεις διασταυρούμενης αλλεργικής αντίδρασης και η εν δυνάμει προοπτική χρήση των υποαλλεργιογόνων παραγώγων τους στην εφαρμογή περισσότερο ασφαλούς και αποτελεσματικής ειδικής ανοσοθεραπείας στην αντιμετώπισή της.

8. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1 Συγκέντρωση ασθενων

Ο πληθυσμός της μελέτης περιελάμβανε παιδιά σχολικής ηλικίας και κατ' εξαίρεση προσχολικής ηλικίας, προερχόμενα από τον πληθυσμό των παιδιών που παρακολουθούνται στη Μονάδα Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας της 2^{ης} Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παιδών «Π & Α ΚΥΡΙΑΚΟΥ». Ο πληθυσμός των παιδιών που προσέρχονται στη Μονάδα μας αιτιώνται κατά την εκτίμηση των γονέων και συνηθέστερα την εκτίμηση του παιδίατρου τους συμπτώματα και σημεία που υποδηλώνουν:

- ιστορικό αλλεργικής προδιάθεσης που χρειάζεται οδηγίες και χειρισμούς πρωτογενούς πρόληψης
- ιστορικό αλλεργικής αντίδρασης σε γνωστό ή προς διερεύνηση αίτιο που χρειάζεται διάγνωση της αναφερόμενης αλλεργικής αντίδρασης, σταδιοποίηση της βαρύτητας της, ακριβή προσδιορισμό του υπεύθυνου αιτίου, οδηγίες αποφυγής ή αντιμετώπισης και φαρμακευτικής αγωγής σε πιθανή εκ νέου εκδήλωση της αντίδρασης
- αλλεργική νόσο που χρειάζεται αποσαφήνιση της διάγνωσης, προσδιορισμό του υπεύθυνου αιτίου, κατάταξη του φαινοτύπου και της βαρύτητας, οδηγίες αποφυγής του υπεύθυνου αιτίου, φαρμακευτική αγωγή ελέγχου των συμπτωμάτων ή αιτιολογική θεραπεία με χορήγηση ειδικής ανοσοθεραπείας.

Επιπλέον κατά τη χορήγηση των οδηγιών και της όποιας επιλεχθείσας αγωγής αντιμετώπισης, λαμβάνεται υπόψη το μορφωτικό και κοινωνικό επίπεδο της οικογένειας ώστε οι οδηγίες να μπορούν να εφαρμοστούν κατάλληλα και η δυνατότητα πρόσβασης στον παιδίατρο ή σε νοσηλευτική μονάδα για περισσότερο σύνθετη αντιμετώπιση.

Εκ του περιγραφέντος πληθυσμού που αφορά περίπου πέντε χιλιάδες (5.000) παιδιά κατ' έτος προήλθαν μετά συνεχή και συστηματική αξιολόγηση οι αντίστοιχοι υποπληθυσμοί – ομάδες παιδιών για κάθε ένα των μελετώμενων αλλεργιογόνων, ακάρεα, αγρωστώδη, ψάρι. Οι αντίστοιχοι υποπληθυσμοί έπρεπε να πληρούν καταρχήν ορισμένες γενικές προϋποθέσεις συμμετοχής στη μελέτη κατά την κρίση των ερευνητών και στη συνέχεια τα ειδικά κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη.

Ως γενικές προϋποθέσεις συμμετοχής στη μελέτη, εξαιτίας της εφαρμοζόμενης για πρώτη φορά ειδικής στοιχειακής διάγνωσης με χρήση γενετικά ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων, ορίσθηκαν το μορφωτικό και κοινωνικό επίπεδο των γονέων – κηδεμόνων και η δυνατότητα πρόσβασης σε νοσηλευτική μονάδα δευτεροβάθμιου ή τριτοβάθμιου Νοσοκομείου, καθώς καταβλήθηκε προσπάθεια να συμμετέχουν παιδιά και εκτός περιοχής Αττικής.

Συγκεκριμένα το μορφωτικό και κοινωνικό επίπεδο των γονέων – κηδεμόνων ορίστηκε ως προϋπόθεση προκειμένου να κατανοούν κατ' ελάχιστον τα εν δυνάμει πλεονεκτήματα των νέων αλλεργιογόνων μορίων και της ειδικής στοιχειακής διάγνωσης ώστε να αποδεχθούν και να συναινέσουν εν γνώσει τους στην εφαρμογή δερματικών δοκιμασιών δια νυγμού και της συνοδού αιμοληψίας, επιπλέον των αλλεργιογόνων εκχυλισμάτων κατά την αξιολόγηση των

μικρών ασθενών. Εν συνεχεία και πριν την ένταξη των παιδιών στη μελέτη καλούνταν να εκφράσουν ενυπόγραφα και εντύπως τη συγκατάθεσή τους.

Η δυνατότητα πρόσβασης σε νοσηλευτική μονάδα δευτεροβάθμιου ή τριτοβάθμιου Νοσοκομείου κρίθηκε απαραίτητη, τουλάχιστον για τις επόμενες 72 ώρες μετά τη διενέργεια των δερματικών δοκιμασιών με τα μοριακά αλλεργιογόνα, προκειμένου να υπάρχει πρόβλεψη αντιμετώπισης της όποιας επιβραδυνόμενης αντίδρασης ενώ υπήρχε συνεχής επικοινωνία με τους διεξάγοντες τη μελέτη ερευνητές. Τούτο αποφασίστηκε, καθ' υπερβολή, για την ασφάλεια των μικρών ασθενών, δεδομένου ότι τα υπό μελέτη μοριακά αλλεργιογόνα είχαν δοκιμασθεί ήδη σε αρκετές σειρές ενηλίκων ασθενών πριν επιλεγούν για μελέτη στον παιδιατρικό πληθυσμό μας, το οποίο αποτελούσε και ένα από νέα δεδομένα της παρούσας μελέτης.

Επιλεγήκαν μετά προσεκτική αξιολόγηση μεταξύ του πληθυσμού των αλλεργικών ασθενών μας:

Συνολικά, εντάχθηκαν στη μελέτη εκατόν σαράντα τρία (143) παιδιά.

Εκ του Ιατρείου Αναπνευστικής Αλλεργίας αξιολογήθηκαν ως ακολούθως:

Τριάντα επτά (37) παιδιά με κλινικές εκδηλώσεις ολοετούς ρινίτιδας ή/και άσθματος εκτός ιώσεων τουλάχιστον τα δύο προηγούμενα χρόνια και δυνάμενες να αποδοθούν σε ακάρεα της οικιακής σκόνης με συνοδά θετικές δοκιμασίες δια νυγμού σε εκχυλίσματα ακάρεων ή/και ειδικές IgE ορού (CAP- FEIA, PHADIA) σε χρόνο προηγηθέντα του χρόνου διεξαγωγής της μελέτης. Εξ' αυτών τα δώδεκα (12) παιδιά αρνήθηκαν εξ' αρχής τη συμμετοχή στη μελέτη, τα δέκα (10) αρνήθηκαν την εκτέλεση της συνοδού αιμοληψίας ενώ πέντε (5) παιδιά αποκλείστηκαν καθώς δεν πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη. Επιλέγησαν τελικά δέκα παιδιά (6 αγόρια, 6 – 14 ετών) με κλινικές εκδηλώσεις ολοετούς ρινίτιδας ή/και άσθματος εκτός ιώσεων τουλάχιστον για τα δύο προηγούμενα χρόνια και δυνάμενες να αποδοθούν μετά προσεκτική αξιολόγηση των εκδηλωμένων εξάρσεων στην παρουσία αυξημένου φορτίου ακάρεων οικιακής σκόνης στο περιβάλλον και θετικές δοκιμασίες δια νυγμού σε εκχυλίσματα ακάρεων ή/και ειδικές IgE ορού (CAP- FEIA, PHADIA) σε χρόνο προηγηθέντα του χρόνου διεξαγωγής της μελέτης και μετείχαν στη μελέτη. Δέκα (10) παιδιά κατ' αντιστοιχία φύλου και ηλικίας με κλινικές εκδηλώσεις ρινίτιδας ή/και άσθματος σε αεροαλλεργιογόνα άλλα των ακάρεων συμμετείχαν ως ομάδα ελέγχου (controls) στη μελέτη.

Ο μικρός σχετικά αριθμός των συμμετεχόντων παιδιών κρίθηκε ικανοποιητικός

A) λόγω των δυσκολιών επαρκούς διάκρισης των συμπτωμάτων ρινίτιδας και άσθματος εξαιτίας ιώσεων ή αποδιδόμενων στα ακάρεα σε αυτή την ηλικία.

B) εξ' αιτίας των δεδομένων παράλληλης μελέτης που υπήρχαν ήδη στους ενήλικες για τη συμπεριφορά των μελετώμενων μορίων του ακάρεος και της οποίας μελέτης αποτελούσαν υποομάδα τα παιδιά μας.

Ενενήντα οκτώ (98) παιδιά με ευαισθητοποίηση ή εκδηλωμένη ρινίτιδα, επιπεφυκίτιδα ή/και άσθμα σε αγρωστώδη τουλάχιστον για τα δύο προηγούμενα χρόνια (εποχές) και θετικές δοκιμασίες δια νυγμού σε εκχυλίσματα αγρωστωδών ή/και ειδικές IgE ορού (CAP- FEIA, PHADIA) σε χρόνο προηγηθέντα του χρόνου διεξαγωγής της μελέτης. Εξ' αυτών εννέα (9) παιδιά αρνήθηκαν εξ' αρχής τη συμμετοχή στη μελέτη ενώ δέκα τρία (13) παιδιά αρνήθηκαν

την εκτέλεση της συνοδού αιμοληψίας. Επελέγησαν τελικά εβδομήντα έξι (76) παιδιά (15 κορίτσια, 5 – 15 ετών) με ευαισθητοποίηση ή εκδηλωμένη ρινίτιδα, επιπεφυκίτιδα ή/και άσθμα σε αγρωστώδη τουλάχιστον για τα δύο προηγούμενα χρόνια (εποχές) και θετικές δοκιμασίες δια νυγμού σε εκχυλίσματα αγρωστωδών ή/και ειδικές IgE ορού (CAP- FEIA, PHADIA) σε χρόνο προηγηθέντα του χρόνου διεξαγωγής της μελέτης και μετείχαν στη μελέτη. Εξ' αυτών, σαράντα τρία (43) παιδιά εμφάνιζαν εποχική αλλεργική νόσο, με ελεύθερο το υπόλοιπο διάστημα του χρόνου. Είκοσι (20) παιδιά εμφάνιζαν εποχική έξαρση αλλεργικής νόσου αποδιδόμενη στα αγρωστώδη με συνυπάρχουσα νοσηρότητα το υπόλοιπο διάστημα του χρόνου αποδιδόμενη σε άλλα αλλεργιογόνα. Δέκα τρία (13) παιδιά εμφάνιζαν απλή ευαισθητοποίηση στα αγρωστώδη με αλλεργική νόσο αποδιδόμενη σε άλλα αλλεργιογόνα. Εννέα (9) παιδιά κατά αντιστοιχία φύλου και ηλικίας με ευαισθητοποίηση ή εκδηλωμένη νόσο σε αεροαλλεργιογόνα άλλα από αγρωστώδη συμμετείχαν ως ομάδα ελέγχου (controls) στη μελέτη.

Εκ του Ιατρείου Τροφικής Αλλεργίας αξιολογήθηκαν ως ακολούθως:

Τριάντα πέντε (35) παιδιά με βεβαιωμένο κλινικά ενεργό ιστορικό καλώς χαρακτηρισμένης αλλεργικής αντίδρασης σε ψάρι και θετικές δοκιμασίες δια νυγμού σε εκχυλίσματα μείγματος ψαριών και θετικές δια νυγμού δοκιμασίες prick to prick σε φυσικά παρασκευάσματα διαφορετικών ειδών ψαριού και θετικές ειδικές IgE ορού (CAP- FEIA, PHADIA) σε χρόνο προηγηθέντα του χρόνου διεξαγωγής της μελέτης. Εξ' αυτών τρία (3) παιδιά αρνήθηκαν εξ' αρχής τη συμμετοχή στη μελέτη ενώ πέντε (5) παιδιά αρνήθηκαν τη εκτέλεση της συνοδού αιμοληψίας.

Επελέγησαν τελικά είκοσι επτά (27) παιδιά με βεβαιωμένο κλινικά ενεργό ιστορικό καλώς χαρακτηρισμένης αλλεργικής αντίδρασης σε διαφορετικά είδη ψαριών εντός των προηγουμένων πέντε ετών. Η αλλεργική αντίδραση να καλύπτει όλο το εύρος βαρύτητας από απλή κνίδωση έως συστηματική αντίδραση αναφυλαξίας. Να έχουν θετικές δοκιμασίες δια νυγμού σε εκχυλίσματα μείγματος ψαριών και θετικές δια νυγμού δοκιμασίες prick to prick σε φυσικά παρασκευάσματα διαφορετικών ειδών ψαριού και θετικές ειδικές IgE ορού (CAP- FEIA, PHADIA) σε χρόνο προηγηθέντα του χρόνου διεξαγωγής της μελέτης. Σε όλα έγιναν οι δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες με το άγριου τύπου (wild) αλλεργιογόνο μόριο rCyp c 1 της παρβαλβουμίνης του κυπρίνου.

Εξ' αυτών των είκοσι τεσσάρων, επελέγησαν δώδεκα παιδιά (8 αγόρια, 3,5 – 14 ετών) με βεβαιωμένο κλινικά ενεργό ιστορικό καλώς χαρακτηρισμένης, ώστε να είναι δυνατόν να βαθμονομηθεί ως προς τη βαρύτητά της, συστηματικής αντίδρασης αναφυλαξίας. Στα παιδιά αυτά έγιναν επιπλέον οι δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες με το υποαλλεργιογονικό (mutant) αλλεργιογόνο μόριο mCyp c 1 της παρβαλβουμίνης του κυπρίνου.

Έντεκα (11) παιδιά κατά αντιστοιχία φύλου και ηλικίας με ευαισθητοποίηση ή εκδηλωμένη νόσο σε αλλεργιογόνα άλλα από την παρβαλβουμίνη του ψαριού συμμετείχαν ως ομάδα ελέγχου (controls) στη μελέτη.

ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η Αλλεργιολογική Μονάδα της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών διοργανώνει μελέτη με σκοπό τον καθορισμό των ειδικών IgE ευαισθητοποιήσεων σε αγρωστώδη, ακάρεα οικιακής σκόνης και ψάρι σε Έλληνες αλλεργικούς ασθενείς. Η μελέτη θα εκτελεστεί με ειδική στοιχειακή διάγνωση, σε σύγκριση με αντίστοιχα φυσικά εκχυλίσματα και ταυτόχρονη ανάλυση των αντισωμάτων του ορού.

Ως ειδική στοιχειακή διάγνωση (component-resolved diagnosis-CRD) ορίζεται η διαγνωστική προσέγγιση με χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για τον καθορισμό του ακριβούς πλαισίου ευαισθητοποίησης των αλλεργικών ασθενών, τον εντοπισμό δηλαδή των συγκεκριμένων μορίων που προκαλούν τη νόσο τους. Αυτά θα μπορέσουν στη συνέχεια να χρησιμεύσουν ως βάση για το σχεδιασμό 'ατομικών' σχημάτων ανοσοθεραπείας, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες, μία προσέγγιση που χαρακτηρίζεται ως 'ειδική στοιχειακή ανοσοθεραπεία' (component-resolved immunotherapy-CRIT).

Η διαδικασία περιλαμβάνει δερματικές δοκιμασίες νυγμού (αλλεργικά τεστ) και αιμοληψία.

ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΜΦΩΝΙΑΣ

Ο/Η
γονέας/κηδεμόνας του/της.....
ενημερώθηκα για τους στόχους και τις διαδικασίες διενέργειας της μελέτης ειδικής
στοιχειακής διάγνωσης και συμφωνώ να συμμετάσχει το παιδί μου σε αυτή (συμπληρώνεται
ιδιοχείρως από το γονέα – κηδεμόνα).

Ημερομηνία

Υπογραφή (Αναγραφή του ονόματος ολογράφως)

8.2 Κριτήρια εισαγωγής των ασθενών στη μελέτη

- Για το αλλεργιογόνο του **ακάρεος** της οικιακής σκόνης τα παιδιά να έχουν για τουλάχιστον δύο συνεχή προηγούμενα έτη συμπτώματα αλλεργικής νόσου αποδιδόμενης και ισχυρά συσχετιζόμενης με το προς μελέτη αλλεργιογόνο.
- Για το αλλεργιογόνο του **αγρωστώδους**, είδος Timothy, τα παιδιά να έχουν για τουλάχιστον δύο συνεχή προηγούμενα έτη συμπτώματα αλλεργικής νόσου αποδιδόμενης και ισχυρά συσχετιζόμενης, ή ευαισθητοποίησης επιβεβαιωμένης με θετικές δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού ή/και ειδικές IgE ορού (CAP- FEIA, PHADIA), με το προς μελέτη αλλεργιογόνο. Επίσης κάποια των παιδιών να έχουν επιπλέον βεβαιωμένο κλινικά ενεργό ιστορικό τροφικής αλλεργίας σε κάποιο των φυτικής προέλευσης αλλεργιογόνων όπως φρούτα, όσπρια και ξηροί καρποί.
- Για το αλλεργιογόνο **παρβαλβουμίνη** του ψαριού να έχουν βεβαιωμένο κλινικά ενεργό ιστορικό αλλεργικής αντίδρασης έστω και σε χρόνο μεγαλύτερο των δύο προηγούμενων ετών. Η αλλεργική αντίδραση να καλύπτει όλο το εύρος βαρύτητας από την κνίδωση έως τη συστηματική αντίδραση αναφυλαξίας. Όλα τα μετέχοντα στη μελέτη παιδιά, να έχουν τουλάχιστον μία φορά εκτελεσθείσες, θετικές δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού (μέση διάμετρος πομφού > 3 χιλ) (100 IR/MI, Stallergens, France) ή/και ειδικές IgE ορού (τουλάχιστον 0.7 kUA/L, >= RAST class 2) (CAP- FEIA, PHADIA) σε εκχυλίσματα του μελετώμενου αλλεργιογόνου, σε χρόνο προηγηθέντα του χρόνου διεξαγωγής της μελέτης. Να μη λαμβάνουν κατά τη διεξαγωγή της μελέτης, ή να έχουν λάβει κατά τα προηγούμενα 5 έτη, ειδική ανοσοθεραπεία με το υπεύθυνο υπό μελέτη αλλεργιογόνο.
- Ως μη επιλεγέντα κριτήρια εισαγωγής ή αποκλεισμού από τη μελέτη κάποια των παιδιών θα έχουν θετικό ατομικό αναμνηστικό (ατοπική δερματίτιδα, τροφική αλλεργία) ή/ και θετικό οικογενειακό ιστορικό (συγγενής πρώτου βαθμού ατοπικός) ατοπίας.

8.3 Κριτήρια αποκλεισμού των ασθενών από τη μελέτη

- Να πάσχουν κατά τη διενέργεια της μελέτης από όποια μορφή ανοσολογικής ανεπάρκειας, νεοπλασίας, νόσου του συνδετικού ιστού, μεταβολικής νόσου, διαταραχής της ψυχοκινητικής ανάπτυξης.
- Να εκδηλώνουν κατά τη διενέργεια της μελέτης συστηματική ή τοπική, ιδιαίτερα από το δέρμα, λοίμωξη όποιας βαρύτητας.
- Να εκδηλώνουν κατά τη διενέργεια της μελέτης μη ελεγχόμενη ατοπική δερματίτιδα ή συμπτωματικό δερμογραφισμό, δηλαδή εκείνες τις μορφές υπεραντιδραστικότητας του αλλεργικού ασθενούς που μπορούν να δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά την εκτέλεση δια νυγμού δερματικών δοκιμασιών.

8.4 Επιλογή των προς μελέτη ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων

Η επιλογή των προς μελέτη ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων έγινε με κριτήρια:

- Να καλύπτεται το μέγιστο δυνατό εύρος της επιπολάζουσας αλλεργίας στη Νότια Ευρώπη και ιδιαίτερα στην Ελλάδα. Επιλέγησαν το μείζον ενδοοικιακό, υπεύθυνο ολοετούς νόσου αλλεργιογόνο, άκαρι της οικιακής σκόνης, το μείζον εξωοικιακό, υπεύθυνο εποχικής νόσου αλλεργιογόνο, γρασίδι είδους Timothy και το μείζον τροφικό Μεσογειακής χώρας, υπεύθυνο κατά τις διαιτητικές συνήθειες για συχνή επίμονη σοβαρή τροφική αλλεργία, αλλεργιογόνο του ψαριού.
- Να καλύπτονται κατά το δυνατό ορισμένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα των ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων εκτός της αναμενόμενης και προς μελέτη ευαισθησίας και ειδικότητας. Συγκεκριμένα, για το άκαρι και το μείζον αλλεργιογόνο του **Der p 2**, ένα ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο με χαρακτηριστικά **αναδιατεταγμένου υποαλλεργιογόνου υβριδίου θραύσματος (hybrid – fragment) rDer p 2** με σκοπό τη μελέτη της υποαλλεργιογονικότητας, μετά τη γενετική παρέμβαση, του μορίου. Για το γρασίδι είδους Timothy ένα ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο με χαρακτηριστικά ανασυνδυασμένου **άγριου τύπου υβριδικού μεγαλομορίου (hybrid)** που περιέχει τα τέσσερα σημαντικά μείζονα αλλεργιογόνα μόρια **Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6**, ταυτόχρονα με τα επιμέρους μείζονα αλλεργιογόνα μόρια **Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6** του γρασιδιού με σκοπό τη μελέτη του ειδικού αλλεργικού προφίλ των ελλήνων ασθενών και της μέγιστης αθροιστικά, μετά τη γενετική παρέμβαση, αλλεργιογονικότητας του υβριδικού μορίου σύνθετης αλλεργιογόνου πηγής. Τέλος για το ψάρι και το μείζον αλλεργιογόνο του **Cyp c 1** ένα ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο με χαρακτηριστικά **υποαλλεργιογόνου μεταλλαγμένου (mutant) rCyp c 1** μορίου ταυτόχρονα με το **άγριου τύπου μεταλλαγμένο (wild type)** μόριο με σκοπό τη συγκριτική μελέτη του βαθμού υποαλλεργιογονικότητας, μετά τη γενετική παρέμβαση, του μορίου ώστε να χρησιμοποιηθεί προοπτικά ως εμβόλιο ειδικής ανοσοθεραπείας στο ψάρι.

Τα προς μελέτη ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα μόρια, επελέγησαν σε συνεργασία και στη συνέχεια παραχωρήθηκαν ευγενώς από το Αλλεργιολογικό Ερευνητικό Εργαστήριο Christian Doppler του Καθηγητή Rudolf Valenta και των συνεργατών του, Susan Vrtala (Υπεύθυνη για το μόριο του ακάρεος), Birgit Linhart (Υπεύθυνη για το μόριο του γρασιδιού, είδους Timothy), Ines Swoboda (Υπεύθυνη για το μόριο του ψαριού), από το Τμήμα Παθολογικής Ανοσολογίας, του Κέντρου Φυσιολογίας και Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Βιέννης. Τα ειδικά χαρακτηριστικά των επιλεγέντων μορίων περιγράφονται στις δημοσιευθείσες εργασίες τους (139, 141, 170, 176).

8.5 Χαρακτηριστικά των επιλεγέντων προς μελέτη ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων

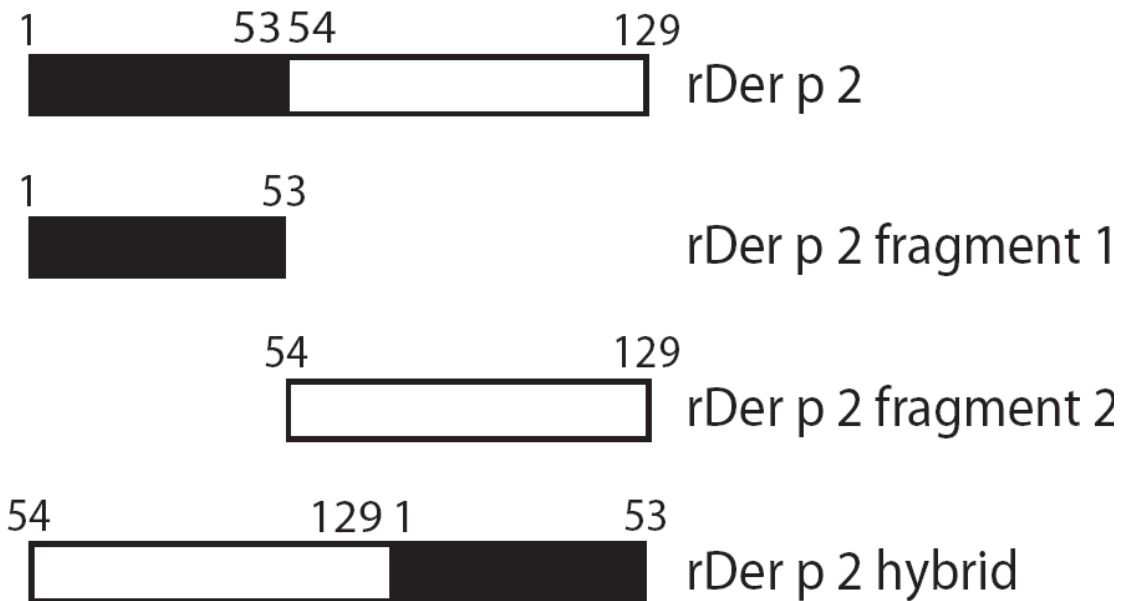
Υποαλλεργιογόνο παράγωγο υβρίδιο θραύσμα (hybrid - fragment) τα επιμέρους τμήματα (fragments) και το άγριου τύπου (wild type) αλλεργιογόνο μόριο rDer p 2 του μείζονος αλλεργιογόνου των ακάρεων Der p 2.

Η αλλεργία στα ακάρεα της οικιακής σκόνης ανήκει στις πιο κοινές αλλεργίες διεθνώς και προσβάλλει περισσότερο του 50% των αλλεργικών ασθενών (213). Μεταξύ των διαφορετικών αλλεργιογόνων των ακάρεων τα αλλεργιογόνα της ομάδας 2 ταυτοποιούνται ως μείζονα αλλεργιογόνα έναντι των οποίων ευαισθητοποιούνται πάνω από 80% των ασθενών (214, 215). Ανευρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα περιττώματα των ακάρεων (216) και εκδηλώνουν υψηλή δεσμευτική ικανότητα του ειδικού IgE αντισώματος και αλλεργιογονική δραστηριότητα (214). Τα αλλεργιογόνα της ομάδας 2 χαρακτηρίστηκαν αρχικά στα είδη ακάρεων της οικιακής σκόνης, *D. Pteronyssinus* και *D. Farinae* ως 14000 – 18000 Da διασταυρούμενα αλλεργιογόνα (217, 218). Τα ονομαζόμενα *Der p 2* και *Der f 2* περιέχουν τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς και εμφανίζουν 87% ταυτοσημία αλληλουχίας αμινοξέων (219). Οι T – κυτταρικοί επίτοποι εμφανίζουν διασπορά σε όλη την πρωτεΐνη ενώ η πλειοψηφία των IgE – αντιδρώντων επιτόπων έχουν διαμορφωτική δομή (220-222).

Η ειδική δια αλλεργιογόνου ανοσοθεραπεία αποτελεί αιτιολογική θεραπεία της αλλεργίας στα ακάρεα της οικιακής σκόνης και αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά της (223, 224). Ωστόσο η ειδική ανοσοθεραπεία στα ακάρεα έχει εμφανίσει ανεπιθύμητες ενέργειες ενίοτε σημαντικές (225), ενώ επίσης έχει περιγραφεί ότι μπορεί να προκαλέσει νέες IgE ευαισθητοποιήσεις και αντιδραστικότητα στα οστρακοειδή μέσω του διασταυρούμενου αλλεργιογόνου *Der p 10*, της τροπομοσίνης (226).

Προκειμένου να μειωθούν οι ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες της δια εκχυλίσματος ανοσοθεραπείας έχουν εφαρμοστεί διαφορετικές στρατηγικές παραγωγής υποαλλεργιογονικών της ομάδας 2 αλλεργιογόνων των ακάρεων της οικιακής σκόνης παραγώγων (227-230). Διαφορετικά *Der p 2* παράγωγα έχουν κατασκευαστεί με μειωμένη IgE αντιδραστικότητα μέσω κατευθυνόμενης σε θέσεις μεταλλαξιογένεσης (177, 227, 230) ή άλλες τεχνικές εισαγωγής μεταλλάξεων στο αλλεργιογόνο μόριο (228, 229, 231). Έχει δειχθεί ότι αυτά τα παράγωγα εκδηλώνουν μειωμένη IgE αντιδραστικότητα και αλλεργιογονική δραστηριότητα με πειράματα απελευθέρωσης ισταμίνης από βασεόφιλα κύτταρα αλλεργικών στα ακάρεα ασθενών.

Για τη μελέτη μας κατασκευάστηκαν γενετικά τροποποιημένα *Der p 2* παράγωγα που χαρακτηρίζονται από μειωμένη αλλεργιογονικότητα, διατηρούμενη ανοσογονικότητα και μειωμένη IgE αντιδραστικότητα σε σύγκριση με το αντίστοιχο του άγριου τύπου αλλεργιογόνο μόριο. Δύο γενετικά ανασυνδυασμένα θραύσματα από το *Der p 2* αλλεργιογόνο μόριο που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα 1 - 53 και 54 – 129 παράχθηκαν ώστε να καταστραφούν οι B – κυτταρικοί διαμορφωτικοί επίτοποι και να διατηρηθούν οι T – κυτταρικοί γραμμικοί επίτοποι. Επιπλέον ένα ανασυνδυασμένο υβρίδιο μόριο θραύσμα με σειρά αμινοξέων ως ακολούθως (54 – 129 + 1 – 53), στο οποίο τα δύο *rDer p 2* επιμέρους θραύσματα ανασυντέθηκαν σε αντίστροφη αναδιάταξη με τεχνική PCR γενετικού ανασυνδυασμού, κατασκευάστηκε με σκοπό να συνδυάσει τα δύο υποψήφια εμβόλια θραύσματα σε ένα μόριο (όπως ακόλουθο σχήμα).



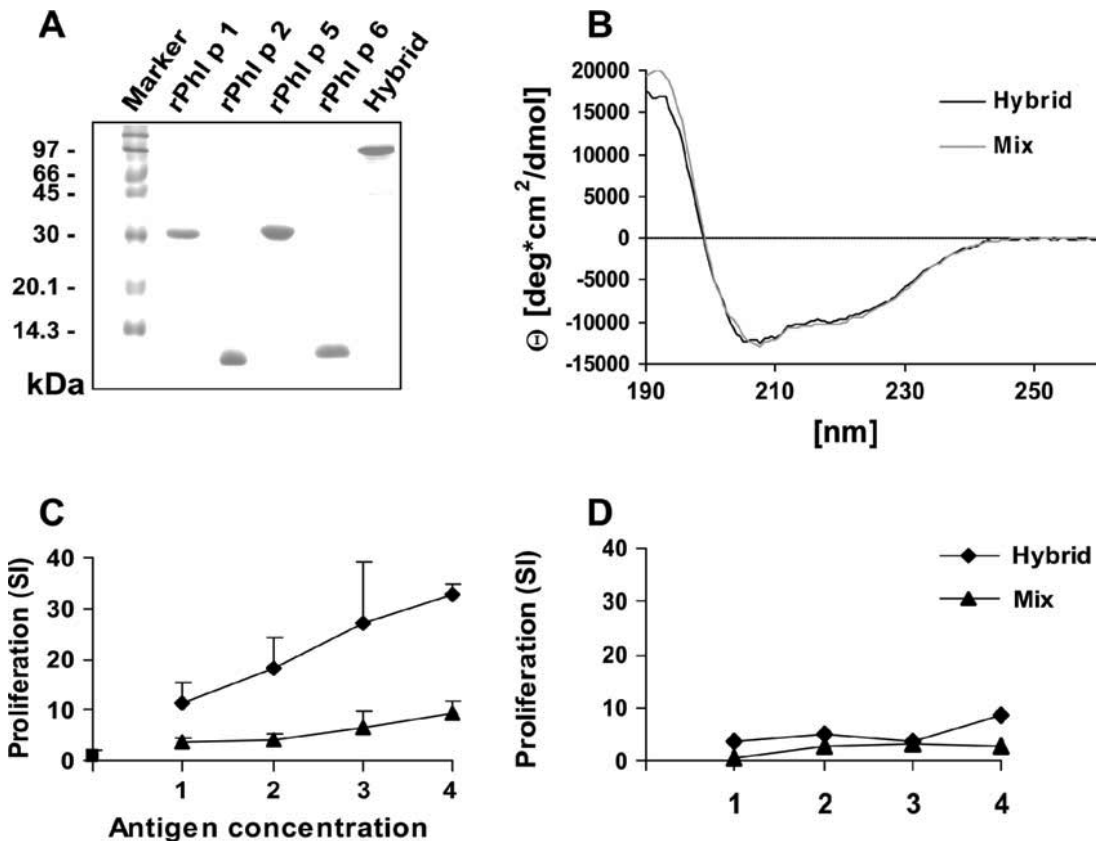
Τα δύο ανασυνδυασμένα Der p 2 παράγωγα εκφράστηκαν σε *E.coli*, καθάρθηκαν προς ομοιογενοποίηση και αναλύθηκαν ως προς τη στερεοχημική δομή τους με χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης. Επιπλέον μελετήθηκε η IgE αντιδραστικότητα των ανασυνδυασμένων παραγώγων με εφαρμογή ειδικής IgE ορού αλλεργικών στα ακάρεα ασθενών και η αλλεργιογονική δραστηριότητα με πειράματα απελευθέρωσης ισταμίνης *in vitro* από βασεόφιλα των ίδιων ασθενών.

Επίσης πειραματόζωα εμβολιάστηκαν με τα ανασυνδυασμένα παράγωγα προκειμένου να μελετηθεί η δυνατότητα παραγωγής IgG αντισωμάτων που αναγνωρίζουν όμοια το άγριου τύπου αλλεργιογόνο. Τέλος μελετήθηκε η *in vivo* αλλεργιογονικότητα, δηλαδή η πρόκληση ειδικής IgE αντίδρασης, των rDer p 2 παραγώγων σε σύγκριση με το άγριου τύπου rDer p 2 αλλεργιογόνο μόριο προκειμένου να αξιολογηθεί η εν δυνάμει χρήση τους στην χορήγηση ειδικής ανοσοθεραπείας.

Αλλεργιογόνο μεγαλομόριο υβρίδιο (hybrid) του αγρωστώδους Timothy συνιστώμενο εκ των μείζονων αλλεργιογόνων μορίων Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 και τα ίδια μείζονα αλλεργιογόνα μόρια.

Οι γύρεις των αγρωστωδών ανήκουν στις σημαντικές πηγές εισπνεόμενων αλλεργιογόνων σε όλο τον κόσμο και μπορούν να εκλύουν αλλεργικές εκδηλώσεις από τη ρινοεπιπεφυκτίδα έως το άσθμα (213-215). Οι γύρεις των διαφόρων ειδών αγρωστωδών περιέχουν ευρέως διασταυρούμενα αλλεργιογόνα, τα οποία με βάση μελέτες βιοχημικών χαρακτηριστικών και ειδικής IgE αντιδραστικότητας ασθενών, κατατάσσονται σε συγκεκριμένες ομάδες. Δεκατρία αλλεργιογόνα προσδιορίζονται στις γύρεις των αγρωστωδών, αλλά οι σημαντικές συχνότητες αντιδραστικότητας αφορούν την ομάδα 1 (>90%) (216), την ομάδα 2 (>60%) (217), την ομάδα 5 (<90%) (218, 220), και την ομάδα 6 (>76%) (219). Κάποιες από τις ομάδες αλλεργιογόνων δεν περιέχονται σε κάθε είδος αγρωστώδους. Έτσι η γύρη της βερμούδας (*Bermuda Grass*) δεν περιέχει ανιχνεύσιμα αλλεργιογόνα των 2, 5, και 6 ομάδων (221).

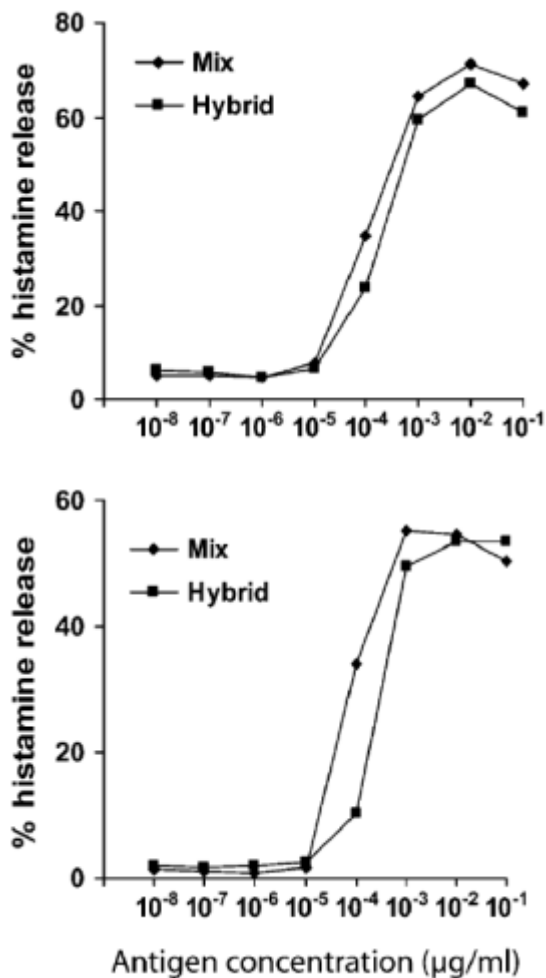
Αντίθετα η γύρη του Timothy όπως και του αγρωστώδους Rye περιέχει την πλειοψηφία των ειδικών IgE επιτόπων που περιέχονται στα περισσότερα είδη των αγρωστωδών (221). Για το λόγο αυτό, τα αλλεργιογόνα της γύρης του Timothy έχουν χαρακτηριστεί λεπτομερώς σε μοριακό επίπεδο και έχουν κατασκευαστεί γενετικά ανασυνδυασμένα μόρια που μιμούνται



πλήρως τα ανοσολογικά τους χαρακτηριστικά (52, 208). Έχει δειχθεί ότι τα ανασυνδυασμένα αυτά μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν αξιόπιστα για τη διάγνωση *in vitro* και *in vivo* της αλλεργίας στα αγρωστώδη αντικαθιστώντας τα αντίστοιχα εκχυλίσματα τους (223-226).

Τούτο κατ'έξοχον διότι τα διαθέσιμα εκχυλίσματα γύρεων αγρωστωδών αποτελούν σύνθετα, μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα, μείγματα αλλεργιογόνων μορίων, τα οποία υπο ή υπερ εκπροσωπούνται κατά περίπτωση στο μείγμα (227).

Για τη μελέτη μας, προκειμένου να βελτιστοποιηθούν περαιτέρω οι διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές των ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων, κατασκευάστηκε ένα υβρίδιο μόριο αποτελούμενο από τα μόρια των πιο σημαντικών αλλεργιογόνων ομάδων γύρεων των αγρωστωδών Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, και Phl p 6 αντίστοιχα (170, 172). Τα συμπληρωματικά DNAs (cDNAs) που κωδικοποιούν τα τέσσερα μείζονα αλλεργιογόνα υπέστησαν διάχυση βασισμένη σε τεχνική PCR γενετικού ανασυνδυασμού και το επακόλουθο κατασκευασθέν συμπληρωματικό DNA (cDNA) κωδικοποιεί ένα υβρίδιο μόριο 79-kd, με εισαγωγή μόνο δύο ξένων αμινοξέων μεταξύ των μείζονων μορίων, σε σειρά Phl p 6 – Phl p 2 – Phl p 5 – Phl p 1. Το ανασυνδυασμένο υβρίδιο μόριο εκφράστηκε στη συνέχεια με επιτυχία σε σημαντικές ποσότητες σε *Escherichia coli* και καθάρθηκε προς ομοιογένεια με χρωματογραφία Νικελίου υψηλής συγγένειας.



Το σχήμα 1,Α δείχνει τα αλλεργιογόνα μόρια Phl p1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p5 και το κεκαθαρισμένο ανασυνδυασμένο υβρίδιο μόριο σε σημασμένη με Coomassie blue ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. Με χρήση ανάλυσης φασματογραφίας δείχθηκε επίσης ότι το υβρίδιο μόριο έχει α/β αναδίπλωση δευτεροταγούς δομής σχεδόν ταυτόσημη με τη δομή ενός ισομοριακού μείγματος των επιμέρους συστατικών μορίων, από τα οποία τα Phl 5, Phl p 6 έχουν κυρίως α – έλικας δομές, ενώ τα Phl p 1, Phl p 2, κυρίως β – θέσης δομές πρωτεΐνης (σχήμα 1,Β) (217, 219, 228).

Επιπλέον μελέτη διέγερσης περιφερικών λεμφοκυττάρων (PBMCs) έγιναν σε αλλεργικούς και μη ασθενείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υβρίδιο μόριο προκαλεί ισχυρότερη διέγερση T – κυττάρων από το αντίστοιχο ισομοριακό μείγμα των συστατικών μορίων, σε αλλεργικούς σε αγρωστόδη ασθενείς (σχήμα 1,С) και σημαντικά μικρότερη σε μη αλλεργικά άτομα (σχήμα 1,Д). Επομένως το υβρίδιο μόριο

μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ειδική ανοσοθεραπεία σε αγρωστόδη.

Τέλος δείχθηκε ότι το υβρίδιο μόριο προκαλεί απελευθέρωση ισταμίνης από βασεόφιλα κύτταρα ασθενών αλλεργικών στα αγρωστόδη με τρόπο συγκρίσιμο με ισομοριακό μείγμα των συστατικών μορίων, δεικνύοντας έτσι ότι η ομοιοπολική σύνδεση των συστατικών αλλεργιογόνων μορίων δεν αυξάνει την αλλεργιογονικότητα του υβριδίου μορίου (παρακείμενο σχήμα).

Συμπερασματικά δείχθηκε με σειρά πειραμάτων όπως και τα περιγραφέντα ότι με διάχυση, βασισμένη σε τεχνική PCR γενετικού ανασυνδυασμού, των 4 μείζονων αλλεργιογόνων μορίων του αγρωστόδους κατέστη δυνατόν να κατασκευασθεί ένα υβρίδιο μόριο που περιέχει όλους τους σχετικούς B – κυτταρικούς και T – κυτταρικούς επιτόπους παρόντες στη γύρη του αγρωστόδους, υπεύθυνη για την πρόκληση αλλεργίας.

Υποαλλεργιογονικό ανασυνδυασμένο παράγωγο (mutant) rCyp c 1 του μείζονος αλλεργιογόνου των ψαριών και το άγριου τύπου (wild type) μόριο του.

Τα ψάρια και τα παράγωγά τους έχουν σημαντική θέση στη διαίτα του ανθρώπου. Ωστόσο αποτελούν επίσης μαζί με το γάλα, το αυγό, τα σιτηρά και τους ξηρούς καρπούς μία σημαντική αλλεργιογόνο πηγή (229). Ιδιαίτερα σε χώρες όπως η Ελλάδα, όπου η πλειοψηφία του πληθυσμού καταναλώνει ψάρια στη διαίτά του και σημαντικό μέρος του ασχολείται με την

αλειεία, η επίπτωση της αλλεργίας στο ψάρι φτάνει έως και το 1 προς 1000 άτομα (231, 232). Η αλλεργία στο ψάρι αναδεικνύεται επίσης σε πρότυπο μελέτης IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας, καθώς λόγω του τρόπου απελευθέρωσης της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, προκαλείται μετά από βρώση ψαριού, εισπνοή των ατμών κατά τη διαδικασία παρασκευής του και εξ' επαφής δια του δέρματος μαζί του (233). Η προκαλούμενη αλλεργία εκδηλώνεται με όλο το εύρος των συμπτωμάτων από οξεία κνίδωση – αγγειοίδημα, έξαρση ατοπικής δερματίτιδας, συμπτώματα αναπνευστικού (ρινοεπιπεφυκίτιδα, άσθμα), συμπτώματα γαστρεντερικού (στοματοφαρυγγικό σύνδρομο, κοιλιακό άλγος, έμετος, διάρροια) έως και σε ορισμένες περιπτώσεις συστηματικά συμπτώματα και αναφυλαξία (229, 233). Η αλλεργία στο ψάρι είναι επομένως μία τυπική νόσος ανοσολογικής υπερευαισθησίας, δυνάμενη να αποκαλύψει κατά τη μελέτη της τους παθολογικούς μηχανισμούς της υποκείμενης IgE μεσολαβούμενης αλλεργίας και τις προοπτικές θεραπευτικής αντιμετώπισης της (229).

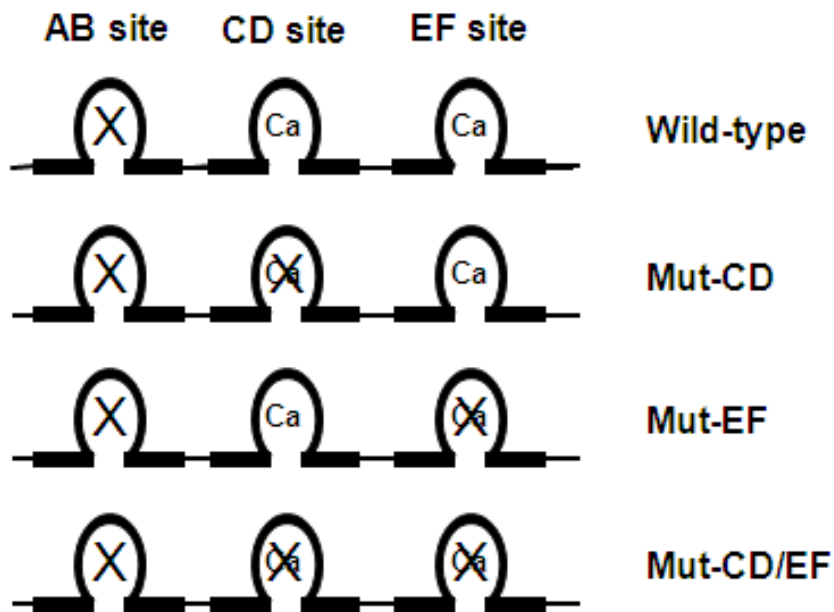
Αν και ο χαρακτηρισμός – ονοματολογία ψάρι, ιχθύς αναφέρεται σε μεγάλη ποικιλία υδρόβιων σπονδυλωτών και περιγράφει μάλλον ένα είδος ζωής παρά μια καλώς χαρακτηρισμένη, φυλογενετικά ταξινομημένη ομάδα, τα ευρείας διατροφικής κατανάλωσης ψάρια, ανήκουν σε περιορισμένες αριθμητικά, στενά συσχετιζόμενες φυλογενετικά μεταξύ τους, τάξεις. Η στενή φυλογενετική συσχέτιση αντικατοπτρίζεται και στην παρουσία αλλεργιογόνων μορίων διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ των συγκεκριμένων ειδών ψαριών (234, 235).

Οι παρβαλβουμίνες (parvalbumins) του ψαριού αποτελούν εν αφθονία ευρισκόμενες, σταθερές πρωτεΐνες των μυών τους και επομένως μεταξύ των κύριων αλλεργιογόνων των ψαριών (236-238). Είναι μικρές (12-kDa) πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου με εξαιρετική αντίσταση στη μετουσίωση μέσω θερμικής, χημικής επεξεργασίας και των πρωτεολυτικών ενζύμων (239, 240). Χαρακτηρίζονται από την παρουσία τριών τυπικών πρωτεϊνικών μοτίβων, βραχιόνων σύνδεσης ασβεστίου (calcium – binding EF hand motif) (AB, CD, και EF) (241, 242). Η πρωτεϊνική δομή, βραχίονας σύνδεσης ασβεστίου (EF hand), είναι ένα μοτίβο έλικα – βρόγχου – έλικα (helix – loop – helix) χαρακτηριστικό της οικογένειας των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών πολκαλσινών (polcalcins) (243, 244). Δύο από τους βραχίονες – μοτίβα συζεύγνυνται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μια σταθερή δομή ικανή να δεσμεύσει δύο κατιόντα Ca^{2+} ή Mg^{2+} ενώ η τρίτη λειτουργεί σχηματίζοντας ένα κάλυμα προστασίας των υδροφοβικών επιφανειών των δύο άλλων λειτουργικών δομών και επομένως δρά ως στοιχείο σταθερότητας (245, 246). Οι παρβαλβουμίνες είναι παρούσες σε αφθονία στους λευκούς μύες των κατώτερων σπονδυλωτών και σε μικρότερες ποσότητες στους μύες υπεύθυνους ταχείας κίνησης των ανώτερων σπονδυλωτών (247). Σύμφωνα με την αλληλουχία αμινοξέων τους οι παρβαλβουμίνες υποδιαιρούνται σε δύο διακριτές εξελικτικά γενεαλογίες. Η **α** – ομάδα αποτελούμενη από λιγότερο όξινες παρβαλβουμίνες και η **β** – ομάδα αποτελούμενη από τις κυρίως όξινες παρβαλβουμίνες που είναι και το κύριο αλλεργιογόνο του ψαριού (248). Η εκδηλούμενη αντίσταση στη θερμική επεξεργασία και τα πρωτεολυτικά ένζυμα του γαστρεντερικού των **β** – παρβαλβουμινών εξαιτίας των χαρακτηριστικών τους, ίσως αποτελεί και τον κύριο προδιαθεσικό παράγοντα δράσης τους ως πρωτεΐνες ευαισθητοποίησης σε περισσότερο του 95% των αλλεργικών στο ψάρι ασθενών (140, 240, 249). Δείχθηκε επίσης στη συνέχεια ότι η ειδική IgE των ασθενών αυτών εναντίον παρβαλβουμίνης ενός είδους ψαριού θα αντιδρά διασταυρούμενα με τις ομόλογες παρβαλβουμίνες άλλων ειδών ψαριών (140), γεγονός που αναδύκνυει τις παρβαλβουμίνες ως σημαντικά διασταυρούμενα αλλεργιογόνα των ψαριών και ερμηνεύει την κλινική εικόνα αντίδρασης των αλλεργικών στο

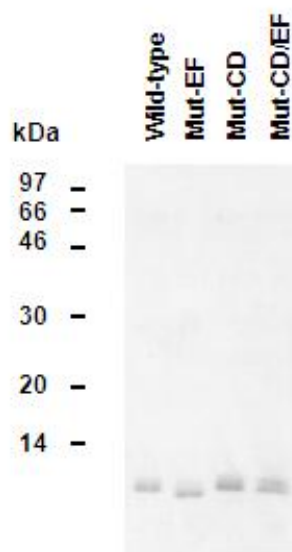
ψάρι ασθενών μετά από βρώση διαφορετικών ειδών. Η μεταβαλλόμενη βαρύτητα αλλεργικής αντίδρασης έναντι διαφορετικών ειδών ψαριών οδήγησε στο ποσοτικό προσδιορισμό παρβαλβουμίνης ανα είδος ψαριού. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε περιεκτικότητα για τα συνήθως καταναλούμενα είδη, τάξης, ανά γραμμάριο ιστού, < 0.05 mg στον τόνο, 0.3 – 0.7 mg στο σκουμπρί, 1 – 2.5 mg στο σολωμό, πέστροφα και βακαλάο, >2.5 mg στον κυπρίνο, ρέγγα, και κοκκινόψαρο (138). Πειράματα δέσμευσης ειδικής IgE ασθενών με αλλεργία σε ψάρι, σε κεκαθαρμένη παρβαλβουμίνη κυπρίνου, στη συνέχεια, κατέδειξαν ότι το συγκεκριμένο μόριο περιέχει τη μέγιστη αναλογία των επιτόπων δέσμευσης ειδικής IgE που ανευρίσκονται σε διαφορετικά είδη ψαριών του γλυκού νερού και της θάλασσας(250). Για τη δημιουργία γενετικά ανασυνδυασμένης παρβαλβουμίνης κυπρίνου, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση και πιθανόν τη θεραπεία της αλλεργίας στο ψάρι, κατασκευάστηκε και εκφράστηκε βιβλιοθήκη συμπληρωματικού DNA (cDNA) μύος κυπρίνου η οποία μελετήθηκε στη συνέχεια με ειδική αντιδρώσα IgE αλλεργικών στο ψάρι ασθενών για την ανίχνευση των cDNA κλώνων που κωδικοποιούν IgE αντιδρώντες μορφές παρβαλβουμίνης. Απομονώθηκαν δύο κλώνοι συμπληρωματικού DNA που κωδικοποιούν δύο αντίστοιχα ισομορφές παρβαλβουμίνης κυπρίνου τη Cyp c 1.01 και Cyp c 1.02 αντίστοιχα με ισοδύναμα συγκρίσιμη δεσμευτική ικανότητα της ειδικής IgE αλλεργικών στο ψάρι ασθενών και όμοια μοριακά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά. Επελέγη ο κλώνος Cyp c 1.01 ο οποίος απέδωσε, μετά έκφραση σε *E.coli*, σημαντική ποσότητα γενετικά ανασυνδυασμένης παρβαλβουμίνης κυπρίνου. Με χρήση ανάλυσης φασματογραφίας δείχθηκε ότι η κεκαθαρμένη ανασυνδυασμένη παρβαλβουμίνη rCyp c 1.01 έχει μια α – έλικας πλήρως αναδιπλωθήσα δευτεροταγή δομή πρωτεΐνης συγκρίσιμη με την αντίστοιχη φυσική παρβαλβουμίνη του κυπρίνου. Πειράματα στη συνέχεια με χρήση ELISA , ανοσοπροσρόφησης και του συστήματος immunoCAP FEIA κατέδειξαν ότι η ανασυνδυασμένη παρβαλβουμίνη rCyp c 1 περιέχει την πλειοψηφία (70%) των αντιγονικών επιτόπων, αλλεργιογόνων διαφόρων ειδών ψαριών και δεσμεύει την ειδική IgE όλων των αλλεργικών στο ψάρι ασθενών. Η γενετικά ανασυνδυασμένη παρβαλβουμίνη rCyp c 1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί και επελέγει να χρησιμοποιείται, ως ειδικό αλλεργιογόνο δείκτης της αλλεργίας στο ψάρι (139).

Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, που καταδεικνύουν ότι, δομικές μεταβολές της πρωτεΐνης των βραχιόνων σύνδεσης ασβεστίου που χαρακτηρίζονται από εξάντληση της ικανότητας σύνδεσης ασβεστίου, συνοδεύονται από απώλεια της ικανότητας σύνδεσης IgE και της αλλεργιογονικότητας των παρβαλβουμινών (140) κατασκευάστηκε υποαλλεργιογόνο παράγωγο παρβαλβουμίνης, mutant Cyp c 1 (mCyp c 1), που χαρακτηρίζεται από μειωμένη αλλεργιογονικότητα, διατηρούμενη ανοσογονικότητα και μειωμένη IgE αντιδραστικότητα σε σύγκριση με το αντίστοιχο του άγριου τύπου (rCyp c 1) αλλεργιογόνο μόριο, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί προοπτικά για την ειδική ανοσοθεραπεία απευαισθητοποίησης στην αλλεργία στο ψάρι (139, 141). Η παρούσα μελέτη αφορά τα αποτελέσματα σύγκρισης *in vivo* των δύο μορίων για την αξιολόγηση της αλλεργιογονικότητάς τους.

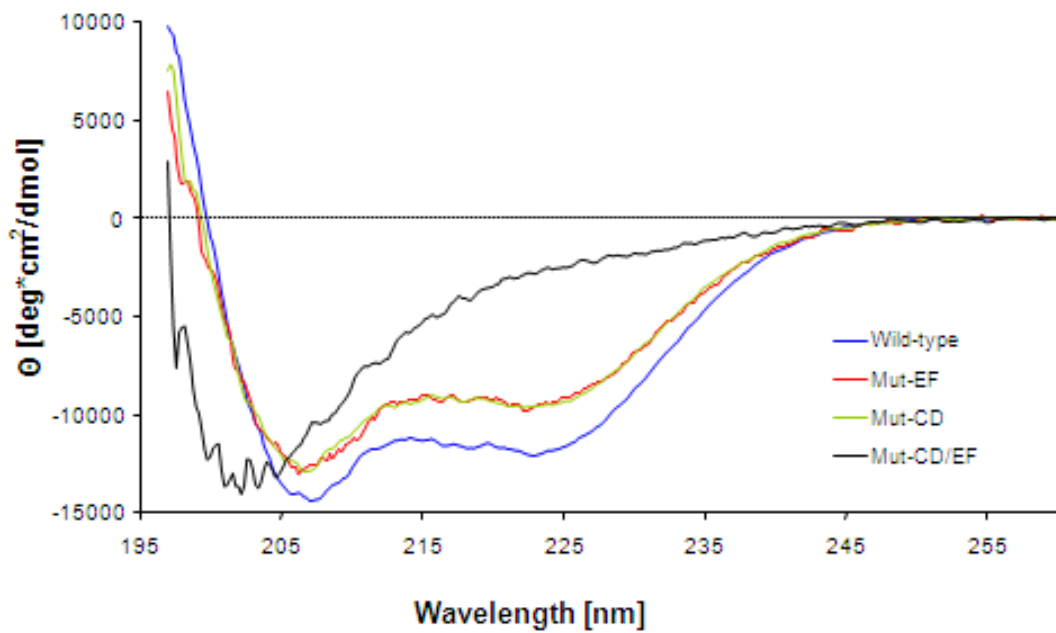
Για τη δημιουργία υποαλλεργιογόνων παραγώγων παρβαλβουμίνης ατελούς σύνδεσης ιόντων Ca²⁺, αντικαταστάθηκαν, τα υπεύθυνα σύνδεσης του ιόντος, υπολείμματα ασπαρτικού οξέος στις θέσεις ένα και τρία των βρόγχων σύνδεσης του ιόντος με υπολείμματα της μη πολικής αλανίνης. Αυτές οι σημειακές μεταλλάξεις εισήχθησαν είτε στην πρώτη (Mut-CD) είτε στη δεύτερη (Mut-EF) είτε και στις δύο (Mut-CD/EF) δομές σύνδεσης Ca²⁺ της παρβαλβουμίνης (όπως ακόλουθο σχήμα).



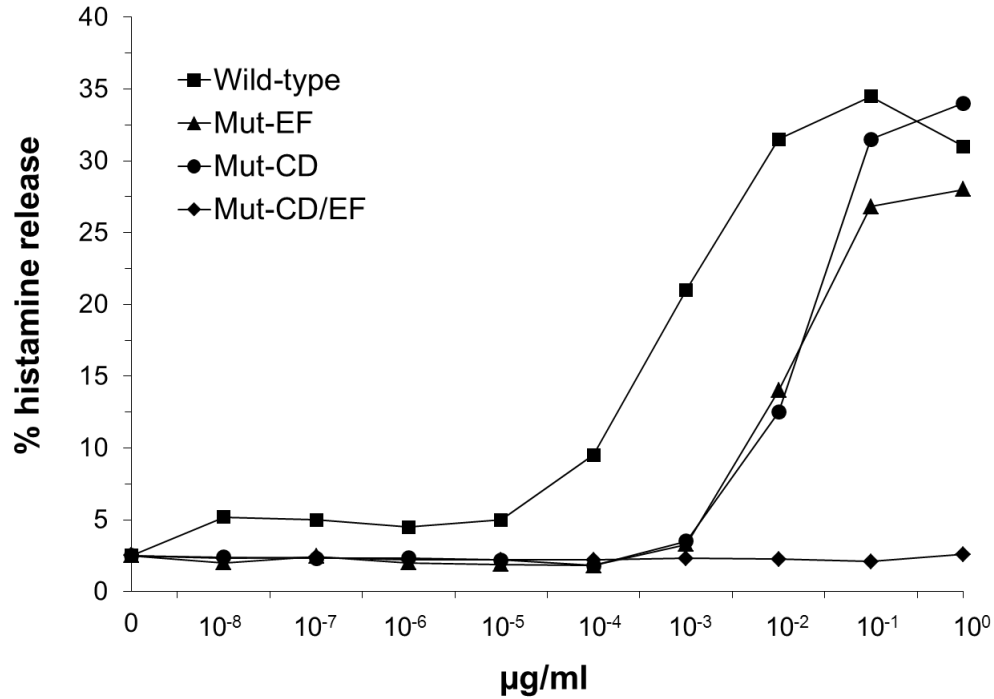
Τα ανασυνδύασμένα μόρια (*Mut-CD*, *Mut-EF*, *Mut-CD/EF*) εκφράστηκαν στη συνέχεια σε *E.coli* ως διαλυτές μη διαχεόμενες πρωτεΐνες και καθάρθηκαν με χρήση χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων. Η καθαρότητα και συμπεριφορά των υποαλλεργιογόνων παραγώγων σε σχέση με το άγριου τύπου αλλεργιογόνο μόριο αξιολογήθηκε σε σημασμένη με *Coomassie brilliant blue* ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (ακόλουθη εικόνα).



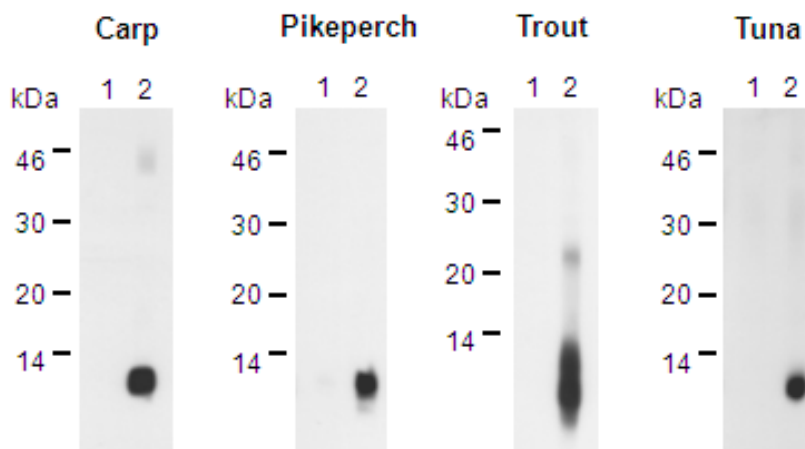
Η σύγκριση των υποαλλεργιογόνων παραγώγων και του αντίστοιχου άγριου τύπου μορίου με ανάλυση φασματογραφίας ανέδειξε ότι τα υποαλλεργιογόνα μόρια με την μία σημειακή μετάλλαξη (Mut-CD, Mut-EF) έδειχναν όμοια χαρακτηρισικά με το άγριου τύπου (wild type) μόριο ενώ η φασματογραφική ανάλυση του υποαλλεργιογόνου μορίου διπλής μετάλλαξης (Mut-CD/EF) ανέδειξε ένα διαφορετικό μόριο, ενδεικτικό σημαντικής εκδίπλωσης α – έλικας της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης προτύπου του άγριου τύπου αλλεργιογόνου μορίου. Η εκδίπλωση της τριτοταγούς δομής της παρβαλβουμίνης έχει συσχετισθεί με ατελή σύνδεση ιόντων Ca²⁺ και μειωμένη IgE αντιδραστικότητα (ακόλουθο γράφημα).



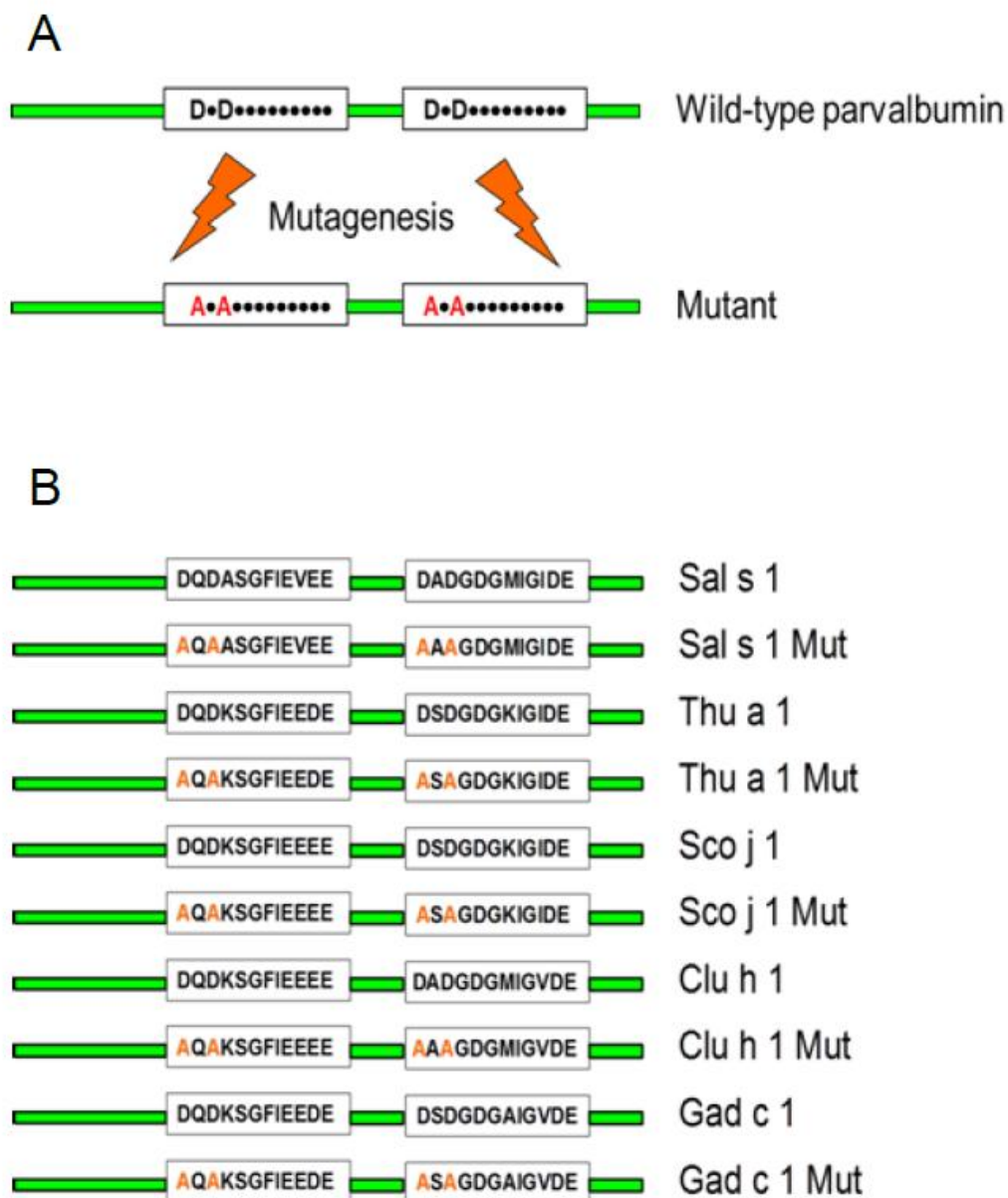
Η μελ... μίνης
 οπι... ός, τα
 (wi... τύπου
 απε... όμενη
 μετ... : μίας
 ... ρωση
 ισταμίνης. Το υποαλλεργιογόνο μόριο διπλής μετάλλαξης (Mut-CD/EF) δεν προκάλεσε απελευθέρωση ισταμίνης έως και τη συγκέντρωση του 1μg/ml αναδονώντας τη σαφώς μειωμένη αλλεργιογονικότητα του (ακόλουθο γράφημα).



Τέλος μελετήθηκε κατά πόσον η ανοσοποίηση πειραματόζωων (είδος BALB/c ποντικών) με το υποαλλεργιογόνο μόριο διπλής μετάλλαξης (Mut-CD/EF) προκαλεί παραγωγή ειδικών IgG αντισωμάτων που εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με παρβαλβουμίνες και άλλων ειδών ψαριών. Ανάλυση ανοσοπροσρόφησης κατέδειξε ότι τα ειδικά αντι-Mut-CD/EF αντισώματα IgG αντιδρούν επίσης και με τη φυσική Cyp c 1 παρβαλβουμίνη του κυπρίνου και με παρβαλβουμίνες άλλων ειδών κυπρίνου – carp, πέρκα - ricesperch, πέστροφα – trout, τόνου – tuna του γλυκού νερού και της θάλασσας (ακόλουθη εικόνα).



Επομένως το εκδιπλωμένης τριτοταγούς δομής πρωτεΐνης, διπλής σημειακής μετάλλαξης, γενετικά ανασυνδυασμένο *Mut-CD/EF* μόριο παρβαλβουμίνης κυπρίνου εκδηλώνει μία σταθερά μειωμένη IgE αντιδραστικότητα και ισχυρά μειωμένη αλλεργιογονικότητα. Τούτο υποδηλώνει ότι το μόριο *Cyp c 1* της παρβαλβουμίνης φέρει διαμορφωτικούς IgE επιτόπους, αν και ικανό πρόκλησης αναφυλακτικών αντιδράσεων. Δηλαδή αντίθετα από ότι γνωρίζουμε για τους γραμμικούς επιτόπους τροφικών αλλεργιογόνων (π.χ καζείνες), υπεύθυνους επίμονης και σοβαρής αλλεργίας. Η ιδιότητα του αυτή πιθανόν οφείλεται στη σταθεροποίηση του από το δεσμευμένο ιόν Ca^{2+} , χαρακτηριστικό των πολκαλσινών (250, 251). Ωστόσο το γενετικά ανασυνδυασμένο *Mut-CD/EF* μόριο παρβαλβουμίνης, όπως δείχθηκε, διατηρεί την ανοσογονικότητα του και τη δυνατότητα πρόκλησης προστατευτικών ειδικών IgG και έναντι παρβαλβουμίνης άλλων ειδών ψαριών, ιδιότητα που το καθιστά μαζί με την υποαλλεργιογονικότητα, υποψήφιο μόριο ειδικής ανοσοθεραπείας στην αλλεργία στο ψάρι. Υπάρχουν ωστόσο δημοσιευμένες αναφορές ότι ορισμένοι ασθενείς με αλλεργία στο ψάρι εκδηλώνουν εκλεκτική αντιδραστικότητα στην παρβαλβουμίνη συγκεκριμένων ειδών ψαριών (252-254). Διερευνήθηκε επομένως σε δεύτερη φάση κατά πόσον η πρόκληση μετάλλαξης στο μόριο παρβαλβουμίνης, ακριβώς στα ίδια αμινοξέα όπως και στην παρβαλβουμίνη του κυπρίνου *Cyp c 1*, μπορεί να αποτελεί μια ευρέως εφαρμόσιμη στρατηγική για τη μετατροπή των διαφορετικών αλλεργιογόνων μορίων παρβαλβουμίνης στα αντίστοιχα υποαλλεργιογόνα μόρια. Για το σκοπό αυτό επελέγησαν παρβαλβουμίνες από ευρέως καταναλούμενα αλλά απομακρυσμένα φυλογενετικά μεταξύ τους ψάρια, συγκεκριμένα οι (*Sal s 1* – Atlantic salmon) του σολωμού, (*Thu a 1* – tuna) του τόνου, (*Sco j 1* – chub macherel) του κολιού, (*Clu h 1* – herring) της ρέγγας και (*Gad c 1* – codfish) του βακαλάου. Στη συνέχεια αντικαταστάθηκαν στις αλληλουχίες αμινοξέων τους, σύμφωνα με την περιγραφείσα τεχνική σημειακής μετάλλαξης, τα ελέγχοντα τη σύνδεση ιόντων Ca^{2+} υπολλείματα ασπαρτικού οξέος με υπολλείματα αλανίνης (όπως στο ακόλουθο σχήμα).



Τα γενετικά ανασυνδυασμένα μόρια άγριου τύπου (*wild type*) και υποαλλεργιογόνα (*mutant*) των επιλεγθέντων παρβαλβουμινών, εκφράστηκαν στη συνέχεια σε *E.coli* ως διαλυτές μη διαχεόμενες πρωτεΐνες. Τέλος καθάρθηκαν με χρήση χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά τους έναντι των ορών των ασθενών μας με αλλεργία στο ψάρι.

9. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη διεξήχθη σε εκατόν δέκα τρείς (113) συνολικά ασθενείς, αλλεργικούς αντίστοιχα σε ακάρεα της οικιακής σκόνης, γύρη των αγρωστωδών και ψάρι ενώ τριάντα (30) συνολικά

ασθενείς εξετάστηκαν ως αντίστοιχοι μάρτυρες. Για κάθε ένα των προς εξέταση αλλεργιογόνων τηρήθηκαν οι απαιτούμενες προϋποθέσεις ώστε να επιδιώκεται η μέγιστη ευαισθησία και ειδικότητα.

Συγκεκριμένα για το άκαρι της οικιακής σκόνης, οι ασθενείς εξετάστηκαν εκτός της περιόδου αυξημένης ενδοοικιακής συγκέντρωσης ακάρεων λόγω χαμηλού αερισμού της οικίας, δηλαδή τους κρύους μήνες Οκτώβριο έως και Μάρτιο ώστε να αποφεύγεται η ενισχυτική δράση του αλλεργιογονικού φορτίου στα αποτελέσματα των δερματικών, δια νυγμού δοκιμασιών όπως επίσης και η αυξημένη ενεργότητα της νόσου, εν δυνάμει εκλυτικός παράγοντας αντίδρασης κατά την εκτέλεση των δοκιμασιών. Αντίστοιχα και για τους ίδιους λόγους, για τα αγρωστώδη οι ασθενείς εξετάστηκαν εκτός της περιόδου γυρεοφορίας δηλαδή τους μήνες Μάρτιο έως και Ιούλιο ώστε να αποφεύγεται και εδώ η ενισχυτική δράση του αυξημένου αλλεργιογονικού φορτίου των αγρωστωδών.

Κατά το χρόνο διεξαγωγής της μελέτης οι ανωτέρω ασθενείς απείχαν τουλάχιστον τριάντα (30) ημέρες από τυχόν προηγηθείσα κρίση άσθματος και είχαν σταθερή πνευμονική λειτουργία, ελεγχόμενη με σπιρομέτρηση, υπο την ελάχιστη δόση εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών ή καθόλου θεραπεία. Επίσης οι ασθενείς με αλλεργική ρινίτιδα απείχαν για τουλάχιστον επτά (7) ημέρες από λήψη συστηματικών ή τοπικών ενδορινικών αντισταμινικών. Όσοι εξ' αυτών είχαν επιπλέον και ατοπική δερματίτιδα απείχαν τουλάχιστον 72 ώρες από προηγηθείσα έξαρση και χορήγηση τοπικών κορτικοστεροειδών και τουλάχιστον επτά (7) ημέρες από λήψη συστηματικών αντισταμινικών.

Τέλος για το ψάρι οι ασθενείς εξετάστηκαν σε περίοδο που να απέχει χρονικά τουλάχιστον 30 ημέρες από την τελευταία αναφερόμενη αντίδραση μετά όποια επαφή με ψάρι ώστε να αποφεύγεται η μειωμένη αντιδραστικότητα στις δερματικές, δια νυγμού δοκιμασίες, εξαιτίας εξάντλησης των αποθεμάτων ειδικών IgE αντισωμάτων, κυτταροκινών και μεσολαβητών αντίδρασης, λόγω πρόσφατης προηγηθείσας αντίδρασης (φαινόμενο παροδικής ανοχής μετά την αντίδραση).

Κατά το χρόνο διεξαγωγής της μελέτης όσοι των ανωτέρω ασθενών με αλλεργία στο ψάρι είχαν συγχρόνως και άσθμα, απείχαν τουλάχιστον τριάντα (30) ημέρες από προηγηθείσα κρίση άσθματος και είχαν σταθερή πνευμονική λειτουργία, ελεγχόμενη με σπιρομέτρηση, υπο την ελάχιστη δόση εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών ή καθόλου θεραπεία. Επίσης όσοι των ασθενών είχαν αλλεργική ρινίτιδα απείχαν για τουλάχιστον επτά (7) ημέρες από λήψη συστηματικών ή τοπικών ενδορινικών αντισταμινικών. Τέλος όσοι εξ' αυτών είχαν επιπλέον και ατοπική δερματίτιδα απείχαν τουλάχιστον 72 ώρες από προηγηθείσα έξαρση και χορήγηση τοπικών κορτικοστεροειδών και τουλάχιστον επτά (7) ημέρες από λήψη συστηματικών αντισταμινικών.

Από κάθε ένα των συμμετεχόντων στη μελέτη ασθενών και μαρτύρων, κατά την ίδια ημέρα και πριν την εκτέλεση των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών γίνεται αιμοληψία και δείγματα ορού συλλέγονται και αποθηκεύονται για ανάλυση ειδικής IgE ορού σε δεύτερο χρόνο.

Τα φυσικά εκχυλίσματα αλλεργιογόνων που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκριτική μελέτη των γενετικά ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων ήταν αντίστοιχα, *Dermatophagoides pteronyssinus* και *Dermatophagoides farinae* για τα ακάρεα οικιακής σκόνης, *Phleum pratense* (Timothy grass) και *Cynodon Dactylon* (Bermuda grass) για τα αγρωστώδη ως τα κύρια αλλεργιογόνα αγρωστωδών σε πολυευαισθητοποιημένους πληθυσμούς όπως ο υπό μελέτη πληθυσμός μας, *Fish mixed*, *Sardine*, και *Cod* για το ψάρι. Χρησιμοποιήθηκαν στη

συγκέντρωση των 100IR/mL όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή (Stallergens Laboratories, France).

Τα προς μελέτη γενετικά ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα μόρια παρασκευάζονται, εκ πυκνού διαλύματος 1mg/ml αποθηκευμένου στους -4 C, στις αντίστοιχες του καθενός αραιώσεις, την ίδια ημέρα εκτέλεσης των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών. Τα γενετικά ανασυνδυασμένα μόρια ανασυντίθενται σε φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl και σε διαφορετικές αραιώσεις ως ακολούθως. Για τα μόρια των, υποαλλεργιογόνα παράγωγα και άγριου τύπου του μείζονος αλλεργιογόνου των ακάρεων Der p 2 και υποαλλεργιογόνο παράγωγο και άγριου τύπου του μείζονος των ψαριών, παρβαλβουμίνη κυπρίνου Cyp c 1, σε αραιώσεις των 1 mcg/ml, 4 mcg/ml, 16 mcg/ml και 32 mcg/ml. Για το μεγαλομόριο υβρίδιο του αγρωστώδους Timothy και των επιμέρους μείζονων αλλεργιογόνων μορίων Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, σε αραιώσεις των 5 mcg/ml, 10 mcg/ml, 20 mcg/ml και 30 mcg/ml.

Τα φυσικά εκχυλίσματα αλλεργιογόνων και τα προς μελέτη γενετικά ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα μόρια εφαρμόστηκαν στην εσωτερική πλευρά του αντιβράχιου των δύο βραχιόνων. Οι τέσσερις αυξανόμενες συγκεντρώσεις των αλλεργιογόνων μορίων εφαρμόστηκαν σε αυξανόμενο τίτλο με κατεύθυνση από τον αγκώνα προς την παλάμη. Εφαρμόστηκαν άπαξ και σε απόσταση μεταξύ 2 και 3 εκ. προς αποφυγή πιθανόν ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, λαμβάνοντας υπόψιν τους περιορισμούς διαθέσιμης επιφάνειας, λόγω συμμετοχής στη μελέτη και παιδιών προσχολικής ηλικίας. Ο σκαριφισμός του δέρματος στη συνέχεια έγινε άπαξ ανά αλλεργιογόνο και συγκέντρωση με χρήση ειδικής καρφίδας Prick-Lancets (Stallergens Laboratories). Ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός 0.9% NaCl και ως θετικός μάρτυρας διάλυμα ισταμίνης (10 mg/mL). Οι δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες εκτελούνταν πάντα από τον ίδιο ερευνητή. Η ανάγνωση του προκαλούμενου πομφού και συνοδού ερυθήματος γινόταν μετά πάροδο 15 λεπτών της ώρας και η καταγραφή του με χρήση κατάλληλου μαρκαδόρου λεπτής γραφής (PILOT – 0.4). Οι προκαλούμενες αντιδράσεις καταγράφονταν και μετεφέρονταν προς αρχειθέτηση και μέτρηση με τη βοήθεια κολλητικής ταινίας σε αντίστοιχα αντίγραφα λευκού χαρτιού.

Αξιολογήθηκε και καταγράφηκε η μέση διάμετρος του πομφού για κάθε εφαρμοσθείσα συγκέντρωση αλλεργιογόνου. Η τελευταία ορίστηκε ως το κλάσμα με αριθμητή το άθροισμα της μεγαλύτερης διαμέτρου του πομφού και της κάθετης ως προς αυτή, και παρανομαστή το (2) δύο. Μέση διάμετρος $\geq 3\text{mm}$ καταγράφηκε ως θετική ευαισθητοποίηση, ενώ $< 3\text{mm}$ ως μη αξιολογήσιμη (αρνητική).

Δηλαδή:

$\text{μέση διάμετρος} = \frac{\text{μέγιστη διάμετρος} + \text{κάθετη προς αυτή}}{2}$ (όπως ακόλουθη εικόνα)



Η ανωτέρω κλασική τεχνική ανάγνωσης των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών εφαρμόστηκε στα υποαλλεργιογόνα παράγωγα και άγριου τύπου του μείζονος αλλεργιογόνου των ακάρεων *Der p 2* και μεγαλομόριο υβρίδιο του αγρωστώδους *Timothy* και τα επιμέρους μείζονα αλλεργιογόνα μορία *Phl p 1*, *Phl p 2*, *Phl p 5*, *Phl p 6* και τα αντίστοιχα φυσικά εκχυλισματα τους, *Dermatophagoides pteronyssinus* και *Dermatophagoides farinae* για τα ακάρεα οικιακής σκόνης, *Phleum pratense* (*Timothy grass*) και *Cynodon Dactylon* (*Bermuda grass*) για τα αγρωστώδη.

Κατ' εξαίρεση για το υποαλλεργιογόνο παράγωγο και άγριου τύπου του μείζονος των ψαριών, παρβαλβουμίνη κυπρίνου *Cyp c 1* μόριο, τα αντίγραφα χαρτιού με τις καταγραφές μετατρέπονταν με ηλεκτρονική σάρωση σε ηλεκτρονικές εικόνες. Η ανάγνωση του μεγέθους των πομφών γινόταν εδώ μέσω ειδικού προγράμματος ηλεκτρονικού υπολογιστή (*Image J software, NIH, open source*). Μέσες τιμές τριών διαδοχικών σαρώσεων κάθε ενός πομφού χρησιμοποιούνταν για την τελική αξιολόγηση. Τιμές pixel μετατρέπονταν σε τετραγωνικά χιλιοστα (mm^2) σύμφωνα με τον τύπο $200\text{dpi}: (\text{pixel}) \times 0.01613 = (\text{mm}^2)$. Η ηλεκτρονική ανάγνωση επελέγει εδώ προς επίτευξη της μέγιστης αντικειμενικής ακρίβειας μέτρησης του πομφού, καθ' όσον αφορά μελέτη της κλινικής αντιδραστικότητας αλλεργιογόνων μορίων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν εν δυνάμει προοπτικά για τη χορήγηση ειδικής ανοσοθεραπείας τροφικής αλλεργίας.

Οι άμεσες και επιβραδυνόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες της εφαρμογής των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών για τα τρία υπο μελέτη αλλεργιογόνα μόρια και τα παράγωγά τους, καταγράφονταν και αξιολογούνταν από τους ερευνητές σε συνεχή έως και εβδομήντα δύο (72) ώρες μετά την εφαρμογή τους επικοινωνία με τους ασθενείς.

Ειδικά για τη μελέτη του υβριδίου μεγαλομορίου του αγρωστώδους *Timothy* και των επιμέρους μείζονων αλλεργιογόνων μορίων του *Phl p 1*, *Phl p 2*, *Phl p 5*, *Phl p 6*, δεν εκτελέστηκαν οι αντίστοιχες μετρήσεις των ειδικών τους *IgE* στο ορό του αίματος των ασθενών αλλά χρησιμοποιήθηκαν για τις απαιτούμενες συγκρίσεις οι δεδομένες τιμές ειδικής *IgE* ορού των φυσικών εκχυλισμάτων *Timothy* και *Bermuda*. Τούτο επελέγει διότι αν και έχουν δημοσιευθεί σημαντικές μελέτες αξιολόγησης αλλεργιογόνων μορίων βασισμένες στις ειδικές *IgE* ορού, λείπουν δεδομένα αξιολόγησης τους με βάση δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες, που αποτελούν τη συνήθη καθ' ημέρα πράξη, για αυτό και σκοπό της παρούσης

μελέτης. Προκειμένου να επιτευχθεί η αξιολόγηση των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών επελέγει η προτεινόμενη από ερευνητές και την κατασκευάστρια εταιρία, τεκμηριωμένη και αποδεκτή στην κλινική πράξη, ποσοτική κατηγοριοποίηση των ειδικών IgE ορού. Η μέτρηση ειδικής IgE ορού αίματος με το σύστημα ImmunoCAP (Thermo Fisher, Phadia) αποτελεί τεκμηριωμένη εργαστηριακή μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων αλλεργιογόνων στον ορό του αίματος. Πέρα από τον προσδιορισμό αυτό ο οποίος γίνεται σε μονάδες KU/mL (όρια : 0.00 - >100), υφίσταται η κατηγοριοποίηση της ευαισθητοποίησης με συγκεκριμένα όρια (cut-off) ανάλογα με την ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων που καταγράφεται. Τα όρια αυτά για τα αεροαλλεργιογόνα έχουν οριστεί με μελέτες από την ίδια την εταιρεία (Thermo Fisher Phadia) καθώς και άλλους ερευνητές(255, 256). Σύμφωνα με τα προσδιορισθέντα όρια διαμορφώνονται έξι επίπεδα ευαισθητοποίησης (I, II, III, IV, V, VI). Από το επίπεδο IV και πάνω το αποτέλεσμα είναι αναμφισβήτητα θετικό, ενώ κάτω από το επίπεδο II θεωρείται αρνητικό ή οριακά θετικό. Συνεπώς, τα τρία επίπεδα II, III & IV είναι εκείνα στα οποία, δεδομένης της αδιαμφισβήτητης θετικής συσχέτισης της τιμής ειδικής IgE ορού, μπορεί να αναπτυχθεί προβληματισμός για τα όποια αποτελέσματα άλλης προς σύγκριση μεθόδου για την οποιαδήποτε ευαισθητοποίηση σε αεροαλλεργιογόνα. Στη προκείμενη μελέτη στα αγρωστώδη όπου ως κύριοι αντιπρόσωποι έχουν επιλεγεί το Timothy και το Bermuda. Με στόχο να αξιολογηθούν οι δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες δια των αλλεργιογόνων μορίων όσον αφορά στη διαγνωστική τους ικανότητα και ερμηνεία, έγινε ταξινόμηση των ατόμων σε τρία επίπεδα ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη. Αυτά ορίστηκαν με βάση τη θετική δερματική δοκιμασία ($\geq 3\text{mm}$) σε ένα τουλάχιστον από τα δύο αντιπροσωπευτικά αγρωστώδη (Timothy ή/και Bermuda) με ταυτόχρονα αντίστοιχη θετική δια ImmunoCAP ειδική IgE ορού επιπέδων \geq τάξης II, \geq τάξης III και \geq τάξης IV. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει για τα αεροαλλεργιογόνα αντίστοιχη κατηγοριοποίηση της ευαισθησίας με βάση τη δερματική δοκιμασία, αυτή λήφθηκε υπόψη ως απλή δίτιμη μεταβλητή ($\geq 3\text{mm}$ / θετική & $<3\text{mm}$ / αρνητική), όπως ανάλογα ακολουθείται και στην κλινική πράξη. Έτσι, σε πραγματικά ευαισθητοποιημένα άτομα όσο αύξανε το επίπεδο ευαισθητοποίησης (από επίπεδο II σε επίπεδο IV) μελετήθηκε η συσχέτιση και συμφωνία της δερματικής δοκιμασίας με το υβρίδιο μεγαλομόριο του αγρωστώδους Timothy και των επιμέρους μείζονων αλλεργιογόνων μορίων του σε σύγκριση με τις υπάρχουσες, αποδεκτές στην κλινική διάγνωση, δερματικές δοκιμασίες των εκχυλισμάτων των Timothy και Bermuda αγρωστωδών (όπως ακόλουθο σχήμα).

Επίπεδα Ευαισθητοποίησης ανάλογα με SPTs και ImmunoCAP

| Specific IgE (K/L) | Level |
|--------------------|---------------------|
| <0.35 | Absent/Undetectable |
| 0.35-0.70 | Low |
| 0.71-3.50 | Moderate |
| 3.51-17.5 | High |
| 17.6-50 | Very High |
| 51-100 | Very High |
| >100 | Very High |

| Level | Skin Prick Test – SPT(mm) |
|----------|---------------------------|
| Negative | < 3 |
| Positive | ≥ 3 |

Η διενέργεια της παρούσας μελέτης έγινε έπειτα από την έγκριση που ελήφθη από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Γενικού Νοσοκομείου Παιδών «Παναγιώτη & Αγλαίας Κυριακού».

10. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

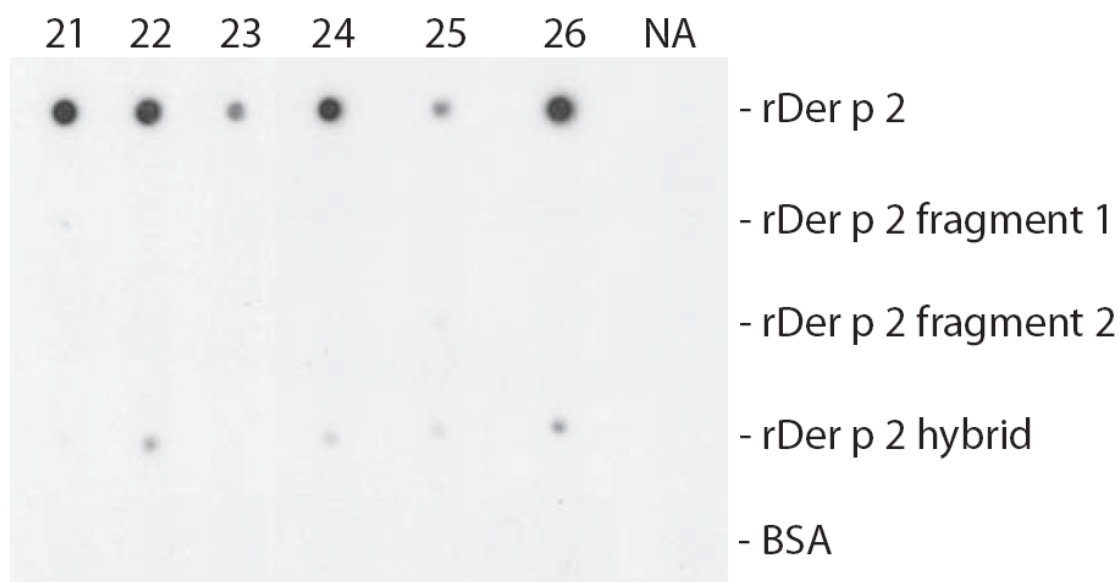
Εκ των τριών υπο μελέτη γενετικά ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων και των παραγώγων τους στατιστική ανάλυση έγινε για τα δεδομένα του αλλεργιογόνου μεγαλομόριου υβρίδιου (hybrid) του αγρωστώδους Timothy συνιστώμενο εκ των μείζονων αλλεργιογόνων μορίων Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 και τα ίδια μείζονα αλλεργιογόνα μόρια. Συγκεκριμένα η μέση διάμετρος του πομπού για κάθε δερματική δοκιμασία (Hybrid_30, Phl_p1, Phl_p2, Phl_p5, Phl_p6, Timothy και Bermuda) μετρήθηκε σε mm, ενώ τα αντίστοιχα ειδικά αντισώματα IgE ορού μετρήθηκαν σε K/L μόνο για τα εκχυλίσματα των Timothy και Bermuda. Για τις δερματικές δοκιμασίες θετικό θεωρήθηκε το αποτέλεσμα όταν η μέση διάμετρος ήταν $\geq 3\text{mm}$ (αρνητικό για $< 3\text{mm}$), ενώ για τα ειδικά αντισώματα IgE ορού ανάλογα με το επίπεδο της μέτρησης των αντισωμάτων τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν θετικά όταν $> 0.71\text{ K/L}$. Για τη μέτρηση των ειδικών IgE αντισωμάτων ορού χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα ευαισθητοποίησης που η ίδια η εργαστηριακή μεθοδολογία ορίζει (Phadia, ImmunoCAP, Upsala) έτσι ώστε από το συνολικό δείγμα (76 cases) των ευαισθητοποιημένων ατόμων στα αγρωστώδη (Timothy και Bermuda) να δημιουργηθούν στη συνέχεια οι υποκατηγορίες ευαισθητοποίησης σε αγρωστώδη γενικά (0.71-3.50 K/L : τάξης II, 3.51-17.5 K/L : τάξης III, $> 17.6\text{ K/L}$: τάξης IV ευαισθητοποίηση) θεωρώντας ως κύριους εκπροσώπους τα Timothy και Bermuda και αρκεί σε ένα τουλάχιστον από αυτά να είχαν και τις δύο δοκιμασίες (δερματική δοκιμασία, ImmunoCAP) θετικές. Υποκατηγοριοποίηση επίσης του συνολικού δείγματος (76) έγινε με βάση τη δερματική δοκιμασία (SPT) των Timothy και Bermuda σε άτομα με $SPT_{\text{Timothy}} > SPT_{\text{Bermuda}}$ προφίλ (44) και σε άτομα με $SPT_{\text{Timothy}} < SPT_{\text{Bermuda}}$ προφίλ (32).

Ο έλεγχος κανονικότητας στις μετρήσεις του συνολικού δείγματος (mm) και των υποκατηγοριών του έγινε γραφικά και με το στατιστικό έλεγχο Shapiro-Wilk. Οι συντελεστές συσχέτισης Spearman (ρ), Kendall (τ) και συμφωνίας Kappa (k) χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η εγκυρότητα των δερματικών δοκιμασιών των δομικών στοιχείων του καινούριου μορίου (επίτοποι Phl_p1, Phl_p5, Phl_p6, Phl_p2) ως προς τις δερματικές δοκιμασίες των Timothy και Bermuda αλλά και αυτού καθαυτού του μακρομορίου Giant_30. Πραγματοποιήθηκε εναλλάξ η επιλογή, κάθε φορά μίας εκ των τριών τελευταίων, ως μέθοδος αναφοράς (gold standard) και επανελέγχθηκαν η μία ως προς την άλλη με βάση τους προαναφερόμενους δείκτες. Η μη παραμετρική αυτή στατιστική μεθοδολογία εφαρμόστηκε για όλο το δείγμα και για τις προαναφερόμενες υποκατηγορίες του. Χρησιμοποιήθηκε επίσης η ευαισθησία και ειδικότητα των μεθόδων (SPTs), εναλλάσσοντας και πάλι κάθε φορά τη μέθοδο αναφοράς (gold standard: SPT_{Timothy} , SPT_{Bermuda} , SPT_{Giant_30}) και ελέγχοντας ως προς τη διαγνωστική εγγύτητα των δερματικών δοκιμασιών μεταξύ τους. Ο τρόπος με τον οποίο έγινε αυτό ήταν οι αντίστοιχες καμπύλες λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROC curves) με τα αντίστοιχα γραφήματα και τις κάτω από την καμπύλη περιοχές (AUC), καθώς και με τα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI). Κατά την τελευταία μεθοδολογία έγινε επιπλέον χρήση ως μεθόδου αναφοράς (gold standard) των δερματικών δοκιμασιών ταυτόχρονα θετικών σε Timothy και Bermuda, καθώς και σε Phl_p1 και Phl_p5.

11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υποαλλεργιογόνο παράγωγο υβρίδιο θραύσμα (hybrid - fragment) τα επιμέρους τμήματα (fragments) και το άγριου τύπου (wild) αλλεργιογόνο μόριο rDer p 2 του μείζονος αλλεργιογόνου των ακάρεων Der p 2.

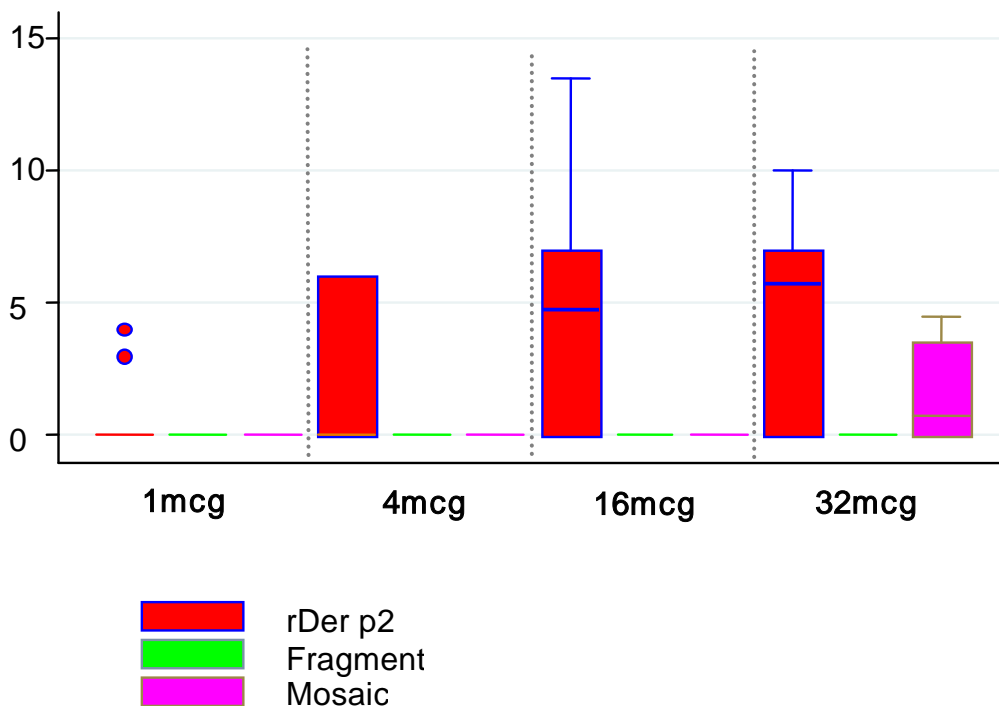
Η IgE αντιδραστικότητα του rDer p 2 άγριου τύπου αλλεργιογόνου μορίου και των δύο rDer p 2 θραυσμάτων καθώς και του rDer p 2 υβριδίου μορίου μελετήθηκαν αρχικώς in vitro με μελέτη ανοσοπροσρόφησης, μη μετουσίωσης, της μελετώμενης πρωτεΐνης και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Για τη μελέτη, 0.5 μg του rDer p 2 άγριου τύπου αλλεργιογόνου μορίου και των δύο rDer p 2 θραυσμάτων καθώς και του rDer p 2 υβριδίου μορίου προσροφήθηκαν σε μεμβράνη κυτταρίνης (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) και εκτέθηκαν στον ορό των αλλεργικών στα ακάρεια ασθενών. Οροί από έξι, τυχαία επιλεγμένα, εκ των δέκα παιδιών που συμμετείχαν στη μελέτη (σειρές 21 – 26) έδειξαν διαβαθμισμένη IgE αντιδραστικότητα στο προσροφημένο στη μεμβράνη κυτταρίνης άγριου τύπου rDer p 2 αλλεργιογόνο μόριο, ωστόσο δεν ανιχνεύθηκε σχεδόν καθόλου IgE αντιδραστικότητα στα δύο rDer p 2 παράγωγα θραύσματα. Κάποιοι από τους ορούς έδειξαν μερική IgE αντιδραστικότητα στο rDer p 2 υβρίδιο μόριο. Ορός ενός μη αλλεργικού παιδιού (μάρτυρας) ελέγχθηκε ως δείκτης μη ειδικής αντιδραστικότητας και δεν έδειξε IgE αντιδραστικότητα στο rDer p 2 άγριου τύπου αλλεργιογόνο μόριο όπως και στα rDer p 2 υποαλλεργιογόνα παράγωγα (σειρά NA). Επίσης IgE αντιδραστικότητα δεν έδειξε η πρωτεΐνη ελέγχου (BSA) της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε (όπως ακόλουθη εικόνα).



Η βιολογική δραστηριότητα του rDer p 2 άγριου τύπου αλλεργιογόνου μορίου και των δύο rDer p 2 θραυσμάτων καθώς και του rDer p 2 υβριδίου μορίου μελετήθηκαν στη συνέχεια με δοκιμασίες δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών στην έσω πλευρά των βραχιόνων δέκα παιδιών επιβεβαιωμένα αλλεργικών στα ακάρεια της οικιακής σκόνης. Τα αποτελέσματα των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν in

in vitro. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση δραστηριότητας του rDer p 2 άγριου τύπου αλλεργιογόνου μορίου. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μειωμένη, σχεδόν μηδενική, αλλεργιογονική δραστηριότητα των δύο rDer p 2 παραγώγων θραυσμάτων που παρατηρήθηκε *in vitro* (γράφημα). Τα rDer p 2 θραύσματα (fragment) δεν προκάλεσαν αντίδραση σχηματισμού πομφού για κάθε αυξανόμενη συγκέντρωση έως και τα 32mcg/ml αναδεικνύοντας τη μεταβολή αλλεργιογονικότητας που δημιουργήσε η στοχευμένη παρέμβαση στο μόριο. Τέλος το υβρίδιο (hybrid – mosaic) μόριο που δημιουργήθηκε με ανασύνθεση αντίστροφης αναδιάταξης των δύο επιμέρους θραυσμάτων προς διατήρηση των γραμμικών T – κυτταρικών επιτόπων με σύγχρονη καταστροφή των διαμορφωτικών B – κυτταρικών επιτόπων ώστε να επιτυγχάνεται μείωση της αλλεργιογονικότητας με διατήρηση της ανοσογονικότητας για εν δυνάμει χρήση σε ειδική ανοσοθεραπεία έδειξε ανάλογη συμπεριφορά.

Συγκεκριμένα προκάλεσε μειωμένη, σχεδόν μηδενική, αντίδραση σχηματισμού πομφού έως τη συγκέντρωση των 32mcg/ml. Στη συγκέντρωση των 32mcg/ml εκδηλώθηκε αντίδραση σχηματισμού πομφού εξαιτίας υπολειπόμενης αντιδραστικότητας του υβριδίου μορίου όπως έδειξε και η αντίστοιχη μελέτη *in vitro* ανοσοπροσρόφησης (όπως ακόλουθο γράφημα).



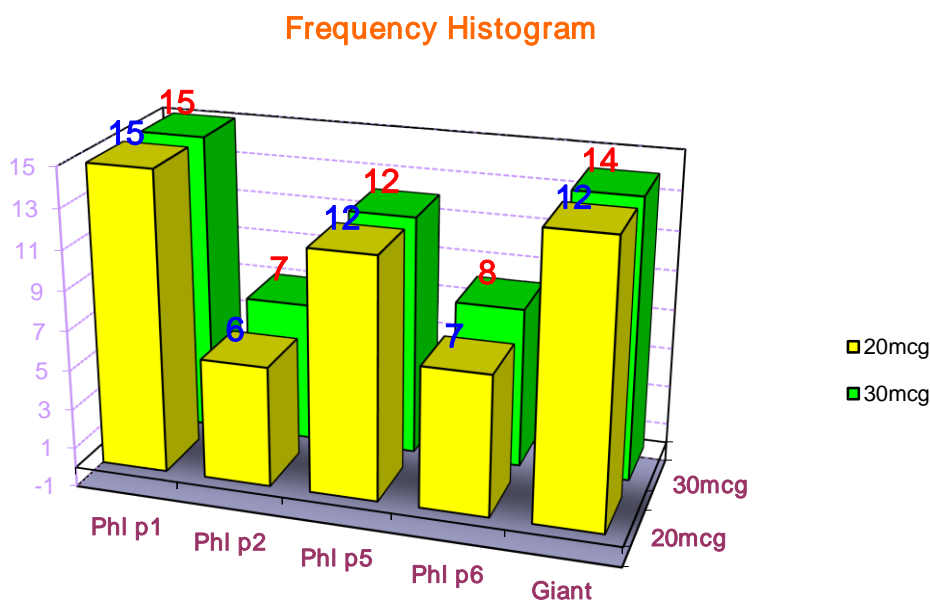
Αλλεργιογόνο μεγαλομόριο υβρίδιο (hybrid) του αγρωστώδους Timothy συνιστώμενο εκ των μείζονων αλλεργιογόνων μορίων Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 και τα ίδια μείζονα αλλεργιογόνα μόρια.

Η μελέτη της αντιδραστικότητας, δια δερματικών δια νυγμου δοκιμασιών, του υβριδίου μορίου και των συνιστωσών επιμέρους μείζονων αλλεργιογόνων μορίων Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, έγινε αρχικώς σε αυξανόμενες διαδοχικές συγκεντρώσεις 5mcg/ml, 10mcg/ml,

20mcg/ml και 30mcg/ml προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση ευαισθησίας και ειδικότητας για τη συνέχεια της μελέτης. Οι συγκεντρώσεις των 5mcg/ml και 10mcg/ml έδειξαν δια απλής παρατήρησης ότι βρισκόταν κάτω του εύρους αντιδραστικότητας. Συγκεκριμένα προκαλούσαν (ψευδώς) αρνητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με την αντιδραστικότητα του αλλεργιογόνου εκχυλίσματος των αγρωστωδών όσο και με τις συγκεντρώσεις των 20mcg/ml και 30mcg/ml των ίδιων μορίων. Επελέγει επομένως η μελέτη σύγκρισης μεταξύ των συγκεντρώσεων 20mcg/ml και 30mcg/ml για την επιλογή βέλτιστης συγκέντρωσης.

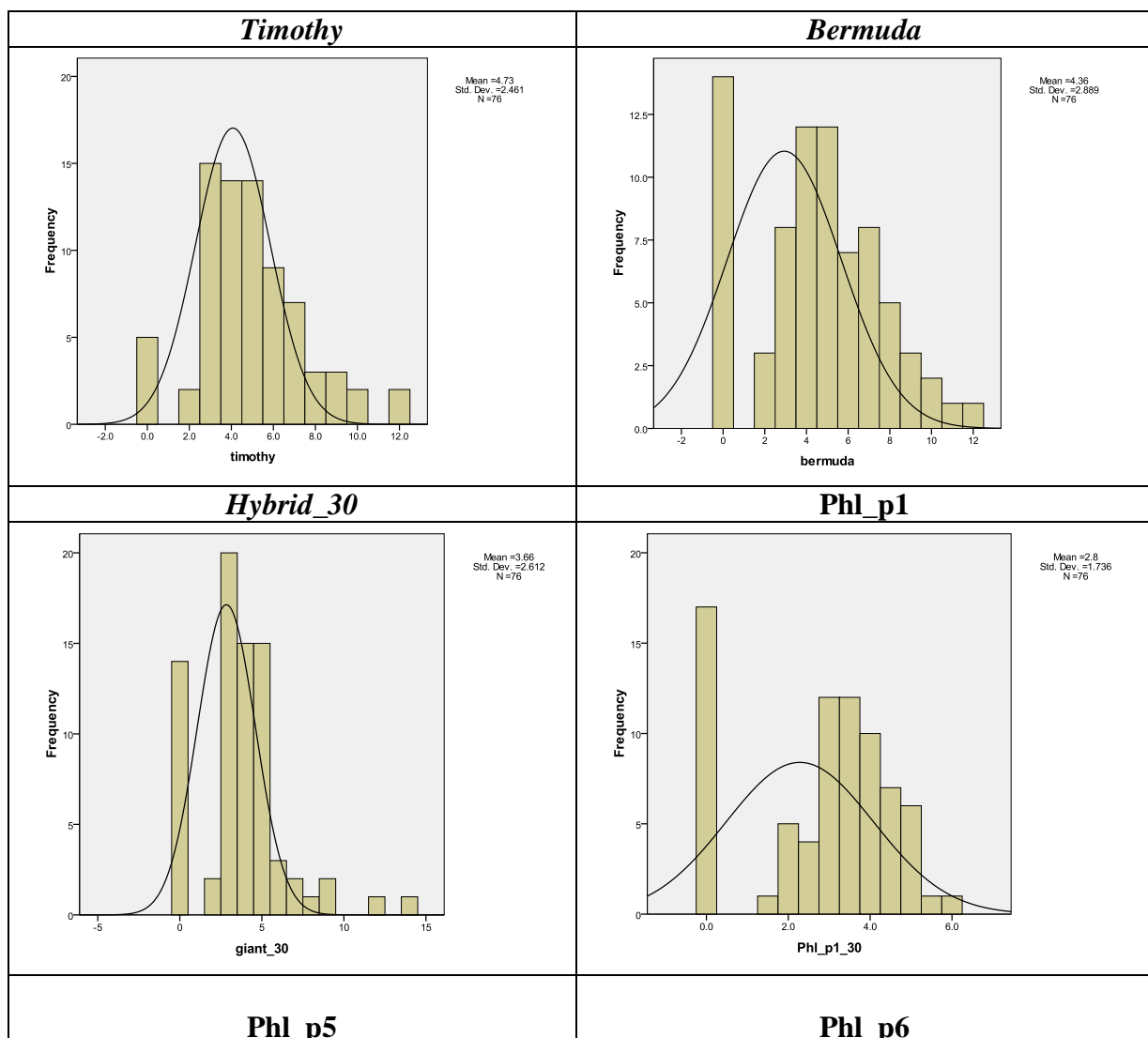
Δεκαπέντε παιδιά (12 αγόρια, 5 έως 15 ετών) με ευαισθητοποίηση στη γύρη των αγρωστωδών συμμετείχαν στο πρώτο στάδιο της μελέτης. Δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού εκτελέστηκαν με το υβρίδιο μόριο και τα συνιστώσα επιμέρους μείζονα αλλεργιογόνα μόρια Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, σε συγκεντρώσεις 20 και 30mcg/ml κάθε πρωτεΐνης.

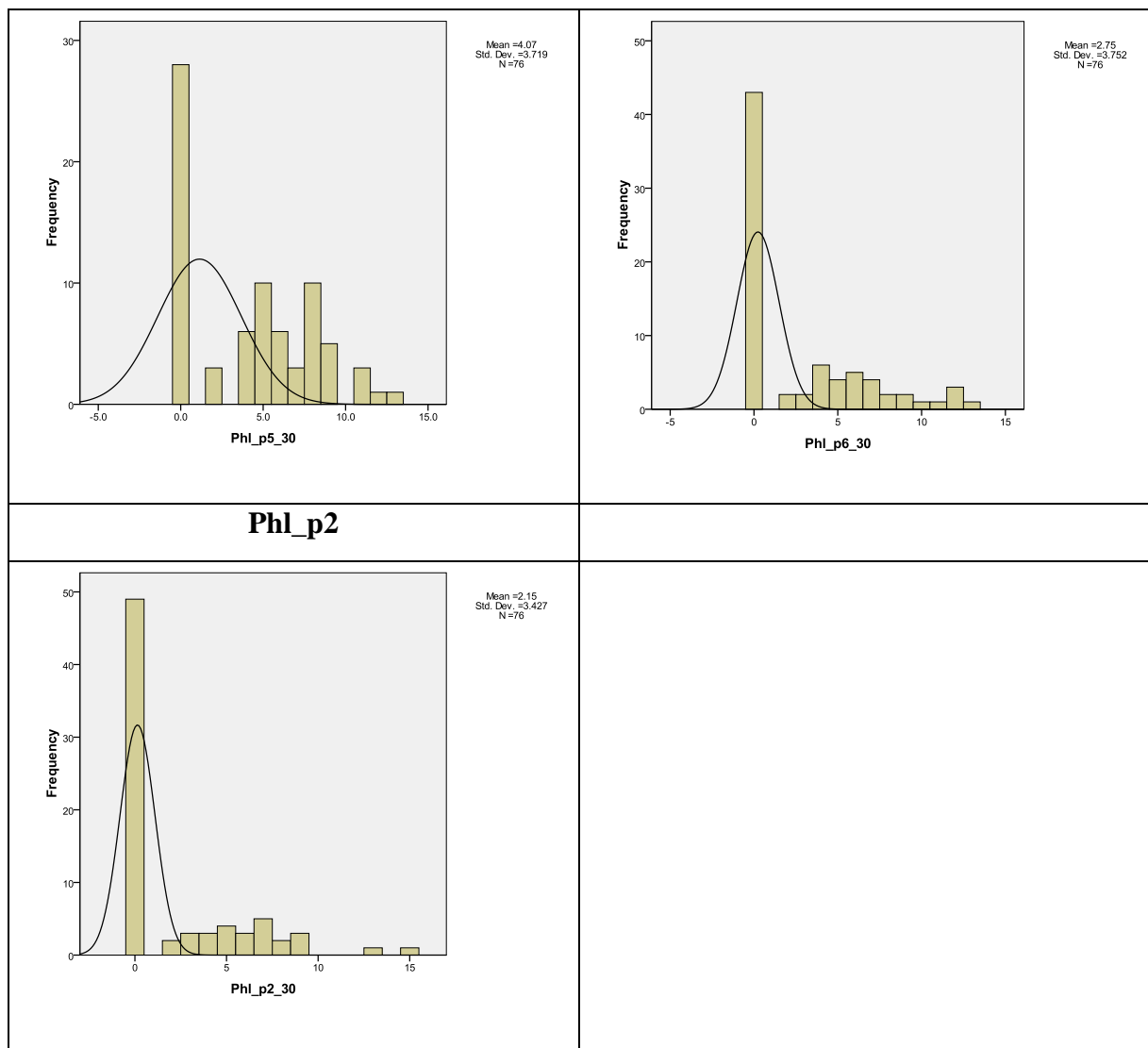
Θετικές αντιδράσεις μετρήθηκαν σε 15/15 για το Phl p 1, 6/15 για το Phl p 2, 12/15 για το Phl p 5, 7/15 για το Phl p 6, στη συγκέντρωση των 20mcg/ml και 15/15 για το Phl p 1, 7/15 για το Phl p 2, 12/15 για το Phl p 5, 8/15 για το Phl p 6 στη συγκέντρωση των 30mcg/ml αντίστοιχα. Το υβρίδιο μόριο ανίχνευσε 12/15 στη συγκέντρωση των 20mcg/ml και 14/15 στη συγκέντρωση των 30mcg/ml αντίστοιχα. Οι μη ανιχνευθείσες, από το υβρίδιο μόριο, περιπτώσεις ήταν παιδιά ευαισθητοποιημένα σε ένα μόνο των τεσσάρων συνιστωσών αλλεργιογόνων μορίων. Συμπερασματικά η συγκέντρωση των 30mcg/ml αποδουκνύεται, όπως έδειξαν και αντίστοιχες μελέτες σε ενήλικες ασθενείς, η βέλτιστη συγκέντρωση για τη μελέτη της αντιδραστικότητας του υβριδίου μορίου και των συνιστωσών επιμέρους αλλεργιογόνων μορίων σε παιδιατρικούς ασθενείς με αλλεργία στα αγρωστώδη (όπως ακόλουθο ιστόγραμμα).



Κατανομή ευαισθητοποιήσεων όπως αυτή προέκυψε από τις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες για το σύνολο των 76 ευαισθητοποιημένων ατόμων.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι κανονικότητας για τις ευαισθητοποιήσεις στα αγρωστώδη *Timothy* και *Bermuda* και τα αλλεργιογόνα μόρια *Hybrid*, *Phl p 1*, *Phl p 2*, *Phl p 5*, *Phl p 6*, όπως αυτές προέκυψαν από τις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες. Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζονται τα ιστογράμματα των καταγεγραμμένων ευαισθητοποιήσεων όπως αυτές διαμορφώθηκαν για το σύνολο των 76 ευαισθητοποιημένων ατόμων. Παρατηρούμε ότι καμία από τις ευαισθητοποιήσεις δεν ακολουθεί κανονική κατανομή. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος *Shapiro-Wilk* για καθεμία ευαισθητοποίηση χωριστά. Τα αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις έδειξαν επίσης ότι καμία δεν ακολουθεί κανονική κατανομή (σε όλα $p < 0.001$). Ανάλογα αποτελέσματα μη κανονικής κατανομής έδωσε ο έλεγχος κανονικότητας και για τρία διαφορετικά επίπεδα ευαισθητοποίησης *II*, *III*, *IV*, όπως και για υποομάδες *Timothy > Bermuda* και *Timothy < Bermuda* ευαισθητοποίησης (χωρίς απεικόνιση).





Ανάλυση της εγκυρότητας των μελετώμενων δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών.

Ανάλυση της εγκυρότητας των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών στο σύνολο του πληθυσμού (n=76).

Στους ακόλουθους πίνακες παρουσιάζονται οι μετρήσεις των δεικτών συμφωνίας όπως αυτές αξιολογήθηκαν ανάλογα με την επιλογήσα κάθε φορά δερματική δοκιμασία ως μέθοδο αναφοράς. Τόσο οι δείκτες συμφωνίας του Spearman, όσο και του Kendal είναι στις περισσότερες περιπτώσεις αρκετά υψηλοί με αποτέλεσμα οι αρχικές τουλάχιστον ενδείξεις να οδηγούν στην ισχυρή συσχέτιση και εγκυρότητα των δερματικών δοκιμασιών Timothy, Bermuda και Hybrid_30 μεταξύ τους. Παράλληλα, κάθε φορά παρουσιάζεται η συσχέτιση και για τα επιμέρους αλλεργιογόνα μόρια Phl p1, Phl p5, Phl p6, Phl p2 τα οποία εφαρμόζονται επίσης στη μορφή των δερματικών δοκιμασιών. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα Spearman είναι $\rho > 0,4$ με $P < 0.001$, ενώ και τα αντίστοιχα Kendal είναι $\tau > 0.4$ με $P < 0.001$. Παράλληλα παρατίθενται οι μετρήσεις κατα Blant-Aldman (τα γραφήματα δεν παρατίθενται).

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία Timothy για το δείγμα n=76.

| | Διάμεση τιμή (1 ^ο , 3 ^ο τεταρτημόριο) | Spearman | | Kendall | | Bland –Altman | | |
|--------------------------------------|---|----------|--------|---------|--------|--------------------|-------------|----------------------------------|
| | | P | P | τ | P | Wilcoxon (P) | % συμφωνίας | Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
| Πρότυπη μέθοδος (Timothy) | 4.5 (3, 6) | | | | | | | |
| Bermuda | 4.5 (2.5, 6.5) | 0.403 | <0.001 | 0.300 | <0.001 | -1.502 (0.133) | 96% | 0.375 (-5.479, 6.229) |
| Giant_30 | 3.5 (3, 4.88) | 0.713 | <0.001 | 0.594 | <0.001 | -4.475 (<0.001) | 93% | 1.072 (-3.188, 5.333) |
| Phl_p1 | 3 (2, 4) | 0.530 | <0.001 | 0.411 | <0.001 | -5.982 (<0.001) | 93% | 1.934 (-2.542, 6.410) |
| Phl_p5 | 4.5 (0, 7.5) | 0.563 | <0.001 | 0.438 | <0.001 | -2.000 (0.046) | 97% | 0.664 (-5.321, 6.650) |
| Phl_p6 | 0 (0, 5.38) | 0.518 | <0.001 | 0.410 | <0.001 | -4.781 (<0.001) | 95% | 1.980 (-4.448, 8.408) |
| Phl_p2 | 0 (0, 4.38) | 0.414 | <0.001 | 0.335 | <0.001 | -5.592 (<0.001) | 96% | 2.579 (-3.689, 8.846) |

Πιο συγκεκριμένα στον ανωτέρω Πίνακα, με επιλογή ως μέθοδο αναφοράς τη δερματική δοκιμασία του Timothy, παρατηρούμε ότι πράγματι οι δείκτες Spearman και Kendal είναι υψηλοί (Spearman's $\rho > 0.4$ με $P < 0.001$ και Kendal's $\tau > 0.4$ με $P < 0.001$), οπότε ο βαθμός συσχέτισης των δερματικών δοκιμασιών είναι σημαντικός και αξιολογήσιμος ως προς το Timothy. Η μέση απόλυτη διαφορά σε σχέση με το Timothy είναι 0.3 έως 0.6 για τα Bermuda και Phl p 5, ενώ 2.0 έως 2.5 χιλιοστά για τα Giant_30, Phl p 1, Phl p 6 και Phl p 2. Επιπλέον τα όρια συμφωνίας σε απόλυτη τιμή εμφανίζονται διευρυμένα στο $\geq 100\%$ της διάμεσης διαμέτρου.

Στον ακόλουθο Πίνακα με επιλογή ως μέθοδο αναφοράς τη δερματική δοκιμασία του Bermuda παρατηρούμε ότι οι δείκτες Spearman και Kendal είναι υψηλοί, αλλά όχι στον ίδιο βαθμό και ποσοστό όπως προηγούμενα. Οπότε ο βαθμός συσχέτισης και συμφωνίας των δερματικών δοκιμασιών δεν είναι το ίδιο σημαντικός όσο αφορά ως προς το Bermuda σε σχέση με το Timothy. Πιο συγκεκριμένα, οι αναφερόμενοι δείκτες είναι υψηλοί για το Hybrid_30, το Phl p 2 και το Timothy (Spearman's $\rho > 0.4$ με $P < 0.001$ και Kendal's $\tau > 0.4$ με $P < 0.001$), αλλά σε μικρότερο βαθμό για τις υπόλοιπες δερματικές δοκιμασίες Phl p 1, Phl p 5, Phl p 6. Η μέση απόλυτη διαφορά σε σχέση με το Bermuda είναι 0.3 έως 0.6 περίπου για τα Timothy, Giant_30 και Phl p 5 ενώ από 1.5 έως 2.2 χιλιοστά για τα Phl p 1, Phl p 6 και Phl p 2. Επιπλέον τα όρια συμφωνίας σε απόλυτη τιμή εμφανίζονται διευρυμένα στο $\geq 100\%$ της διάμεσης διαμέτρου.

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας

σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία Bermuda για το δείγμα n=76.

| | Διάμεση τιμή (1 ^ο , 3 ^ο τεταρτημόριο) | Spearman | | Kendall | | Wilcoxon (P) | % συμφωνίας | Bland –Altman Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
|--------------------------------------|---|----------|--------|---------|--------|--------------------|-------------|---|
| | | ρ | P | T | P | | | |
| Πρότυπη μέθοδος (Bermuda) | 4.5 (2.5, 6.5) | | | | | | | |
| Timothy | 4.5 (3, 6) | 0.403 | <0.001 | 0.300 | <0.001 | -1.502 (0.133) | 96% | - 0.375 (-6.229, 5.479) |
| Giant_30 | 3.5 (3, 4.88) | 0.521 | <0.001 | 0.392 | <0.001 | -2.166 (0.030) | 95% | 0.697 (-4.978, 6.373) |
| Phl_p1 | 3 (2, 4) | 0.358 | <0.001 | 0.260 | <0.001 | -4.524 (<0.001) | 93% | 1.559 (-3.661, 6.780) |
| Phl_p5 | 4.5 (0, 7.5) | 0.354 | <0.001 | 0.276 | <0.001 | -0.474 (0.636) | 93% | 0.289 (-7.481, 8.060) |
| Phl_p6 | 0 (0, 5.38) | 0.396 | <0.001 | 0.313 | <0.001 | -3.433 (0.001) | 93% | 1.605 (-6.084, 9.295) |
| Phl_p2 | 0 (0, 4.38) | 0.560 | <0.001 | 0.440 | <0.001 | -5.093 (<0.001) | 96% | 2.204 (-4.188, 8.596) |

Στον ακόλουθο Πίνακα με επιλογή ως μέθοδο αναφοράς τη δερματική δοκιμασία του Hybrid παρατηρούμε υψηλούς δείκτες συσχέτισης (Spearman's $\rho > 0.4$ με $P < 0.001$ και Kendal's $\tau > 0.4$ με $P < 0.001$), γεγονός το οποίο αποτελεί σημαντική ένδειξη εγκυρότητας και συμφωνίας ανάμεσα στις δερματικές δοκιμασίες και στη μέθοδο αναφοράς, δηλαδή το Hybrid_30. Συγκεκριμένα η συσχέτιση με το Timothy είναι αρκετά υψηλή (Spearman's $\rho = 0.713$ και Kendal's $\tau = 0.594$ με $P < 0.001$), ενώ η αντίστοιχη συσχέτιση με το Bermuda παρουσιάζει συγκριτικά μειωμένους δείκτες (Spearman's $\rho = 0.521$ και Kendal's $\tau = 0.392$ με $P < 0.001$). Σε σειρά μειούμενης συσχέτισης οι επίτοποι ταξινομούνται με βάση τα δεδομένα ως Phl p6 ($\rho = 0.689$ & $\tau = 0.569$) > Phl p5 ($\rho = 0.666$ & $\tau = 0.520$) > Phl p1 ($\rho = 0.588$ & $\tau = 0.469$) > Phl p2 ($\rho = 0.480$ & $\tau = 0.392$) με $P < 0.001$. Η μέση απόλυτη διαφορά σε σχέση με το Giant_30 είναι περίπου 0.5 έως 1.0 χιλιοστό για τα Timothy, Bermuda, Phl p1, Phl p5, Phl p6, ενώ αυξάνει για το Phl p2 στο 1.5 χιλιοστό (1.507). Επιπλέον τα όρια συμφωνίας σε απόλυτη τιμή εμφανίζονται διευρυμένα στο $\geq 100\%$ της διάμεσης διαμέτρου.

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία Giant_30 για το δείγμα n=76.

| | Διάμεση τιμή | Spearman | | Kendall | | Wilcoxon (P) | % συμφωνίας | Bland –Altman Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
|---------------------------------------|--------------------------|----------|--------|---------|--------|--------------------|-------------|---|
| | | P | P | T | P | | | |
| Πρότυπη μέθοδος (Giant_30) | 3.5 (3, 4.88) | | | | | | | |
| Timothy | 4.5 (3, 6) | 0.713 | <0.001 | 0.594 | <0.001 | -4.475 (<0.001) | 93% | -1.072 (-5.333, 3.188) |
| Bermuda | 4.5 (2.5, 6.5) | 0.521 | <0.001 | 0.392 | <0.001 | -2.166 (0.030) | 95% | -0.697 (-6.373, 4.978) |
| Phl_p1 | 3 (2, 4) | 0.588 | <0.001 | 0.469 | <0.001 | -3.096 (0.002) | 95% | 0.862 (-3.606, 5.330) |
| Phl_p5 | 4.5 (0, 7.5) | 0.666 | <0.001 | 0.520 | <0.001 | -0.961 (0.336) | 95% | -0.408 (-6.256, 5.441) |
| Phl_p6 | 0 (0, 5.38) | 0.689 | <0.001 | 0.569 | <0.001 | -3.124 (0.002) | 93% | 0.908 (-4.943, 6.759) |
| Phl_p2 | 0 (0, 4.38) | 0.480 | <0.001 | 0.392 | <0.001 | -3.909 (<0.001) | 93% | 1.507 (-5.597, 8.611) |

Ανάλυση της εγκυρότητας των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών στα υποσύνολα των τριών επιπέδων ευαισθητοποίησης, II, III, IV αντίστοιχα, στα αγρωστώδη.

Μετά την εφαρμογή των δεικτών συσχέτισης στους ασθενείς σύμφωνα με τα τρία επίπεδα ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη προέκυψε ο ακόλουθος Πίνακας. Οι δείκτες Spearman και Kendall δείχνουν ότι και στα τρία προαναφερόμενα επίπεδα το Hybrid_30 υπερέρχει πάντα στη συσχέτισή του με το Timothy, ενώ υστερεί συγκριτικά στη συσχέτιση του με το Bermuda. Οι υψηλότεροι δείκτες παρουσιάζονται επίσης για το Hybrid_30 σε σχέση με τα Phl p6 και Phl p5 (Spearman's ρ : 0.706, 0.718, 0.670 και 0.603, 0.602, 0.538 αντίστοιχα για τα τρία επίπεδα). Διαφαίνεται πιθανή υπεροχή της συσχέτισης ανάμεσα στο Phl p2 και Bermuda (Spearman's ρ : 0.514, 0.415, 0.273) σε σχέση με το Timothy (Spearman's ρ : 0.391, 0.399, 0.383). Όπως είναι αναμενόμενο οι δείκτες Spearman και Kendall μεταβάλλονται με τον ίδιο τρόπο. (*italics bold*= $p < 0.01$, *italics*= $p < 0.05$)

| Πίνακας. Spearman's rho για τα τρία επίπεδα ευαισθητοποίησης (3 cut-offs) : | | | | | | | | | |
|--|----------------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|-----------|------------------------|--------------|--------------|
| Μέθοδος Αναφοράς (SPTs) | T i m o t h y | | | B e r m u d a | | | G i a n t _ 3 0 | | |
| | II | III | IV | II | III | IV | II | III | IV |
| Επίπεδο Ευαισθητοποίησης | | | | | | | | | |
| <i>Timothy</i> | | | | 0.184 | 0.152 | 0.089 | 0.598 | 0.603 | 0.555 |
| <i>Bermuda</i> | 0.184 | 0.152 | 0.089 | | | | 0.348 | 0.255 | 0.190 |
| <i>Giant_30</i> | 0.598 | 0.603 | 0.555 | 0.348 | 0.255 | 0.190 | | | |
| <i>Phl_p1</i> | 0.595 | 0.566 | 0.507 | 0.286 | 0.154 | -0.044 | 0.597 | 0.549 | 0.414 |
| <i>Phl_p5</i> | 0.471 | 0.508 | 0.484 | 0.223 | 0.205 | 0.083 | 0.603 | 0.602 | 0.538 |
| <i>Phl_p6</i> | 0.465 | 0.469 | 0.426 | 0.313 | 0.196 | 0.050 | 0.706 | 0.718 | 0.670 |
| <i>Phl_p2</i> | 0.391 | 0.399 | 0.383 | 0.514 | 0.415 | 0.273 | 0.438 | 0.403 | 0.344 |

Ανάλυση της εγκυρότητας των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών στα υποσύνολα Timothy>Bermuda (n=44) και Bermuda>Timothy (n=32).

Κατηγοριοποιώντας τα άτομα του συνόλου των ασθενών σε (n=76) σε αυτά όπου $SPT_{Timothy} > SPT_{Bermuda}$ (n=44) και $SPT_{Bermuda} > SPT_{Timothy}$ (n=32) πραγματοποιήθηκε ανάλυση εγκυρότητας – συσχέτισης σε κάθε υποσύνολο χωριστά. Τα αποτελέσματα του ακόλουθου Πίνακα και οι αντίστοιχοι συντελεστές συμφωνίας που παρουσιάζονται κάνουν άμεσα αντιληπτό το γεγονός ότι υπάρχει ισχυρού βαθμού συσχέτιση ανάμεσα στις δερματικές δοκιμασίες, στατιστικά σημαντική (πάντα Spearman's $\rho > 0.5$ με $p < 0.001$ και Kendall's $\tau > 0.4$ με $p < 0.001$) για την περίπτωση όπου σαν δερματική δοκιμασία αναφοράς θεωρούμε αυτή του Timothy για το υποσύνολο Timothy>Bermuda (n=44). Η μέθοδος των Blant-Aldman έδειξε ότι η μέση απόλυτη διαφορά των υπόλοιπων δερματικών δοκιμασιών σε σχέση με αυτή του Timothy κυμαίνεται από 2 έως και 3.5 cm, ενώ είναι <1 για τον επίτοπο Phl p 5. Τα όρια συμφωνίας για όλες τις δερματικές δοκιμασίες σε σχέση με τη διάμεση τιμή της μεθόδου αναφοράς προκύπτουν από 50 έως >100% .

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία Timothy για το υποσύνολο n=44. (Άτομα με εναισθητοποίηση Timothy > Bermuda)

| | Διάμεση τιμή (1 ^ο , 3 ^ο τεταρτημόριο) | Spearman | | Kendall | | Wilcoxon (P) | Bland –Altman | |
|----------------------------------|---|--------------|--------|--------------|--------|--------------------|---------------|-------------------------------|
| | | ρ | P | τ | P | | % συμφωνίας | Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
| Πρότυπη μέθοδος (Timothy) | 5.5 (3.625, 7) | | | | | | | |
| Bermuda | 3 (0, 5) | 0.814 | <0.001 | 0.659 | <0.001 | -5.589 (<0.001) | 95% | 2.307 (-0.745, 5.358) |
| Giant_30 | 4 (3, 5) | 0.840 | <0.001 | 0.693 | <0.001 | -4.324 (<0.001) | 95% | 1.568 (-2.886, 6.023) |
| Phl_p1 | 3.5 (0, 4.375) | 0.580 | <0.001 | 0.445 | <0.001 | -5.442 (<0.001) | 93% | 2.818 (-1.618, 7.254) |
| Phl_p5 | 5 (0, 8) | 0.591 | <0.001 | 0.449 | <0.001 | -1.837 (0.066) | 98% | 0.886 (-5.326, 7.099) |
| Phl_p6 | 0 (0, 5.88) | 0.705 | <0.001 | 0.572 | <0.001 | -4.614 (0.003) | 95% | 2.489 (-2.752, 7.729) |
| Phl_p2 | 0 (0, 3.63) | 0.580 | <0.001 | 0.483 | <0.001 | -5.043 (<0.001) | 91% | 3.523 (-2.668, 9.713) |

Κατ' αντιστοιχία προκύπτουν και τα αποτελέσματα του ακόλουθου Πίνακα και για την περίπτωση όπου ως δερματική δοκιμασία αναφοράς έχουμε αυτή του Bermuda (πάντα Spearman's $\rho > 0.5$ με $p < 0.001$ και Kendall's $\tau > 0.4$ με $p < 0.001$). Η μέση απόλυτη διαφορά κυμαίνεται από 1.2 έως 2.3 για Phl p 2, Phl p 5 και Timothy, ενώ είναι από 0.1 έως 0.7 για Phl p 1, Phl p 6 και Giant_30. Τα όρια συμφωνίας για όλες τις δερματικές δοκιμασίες σε σχέση με τη διάμεση τιμή της μεθόδου αναφοράς προκύπτουν από 50 έως >100%.

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία Bermuda για το υποσύνολο n=44. (Άτομα με εναισθητοποίηση Timothy > Bermuda)

| | Διάμεση τιμή (1 ^ο , 3 ^ο τεταρτημόριο) | Spearman | | Kendall | | Wilcoxon (P) | Bland –Altman | |
|----------------------------------|---|--------------|--------|--------------|--------|--------------------|---------------|-------------------------------|
| | | ρ | P | τ | P | | % συμφωνίας | Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
| Πρότυπη μέθοδος (Bermuda) | 3 (0, 5) | | | | | | | |
| Timothy | 5.5 (3.625, 7) | 0.814 | <0.001 | 0.659 | <0.001 | -5.589 (<0.001) | 95% | -2.307 (-5.358, 0.745) |
| Giant_30 | 4 (3, 5) | 0.765 | <0.001 | 0.615 | <0.001 | -2.084 (0.037) | 95% | -0.739 (-5.441, 3.964) |
| Phl_p1 | 3.5 (0, 4.375) | 0.484 | <0.001 | 0.388 | <0.001 | -1.208 (0.227) | 91% | -0.739 (-4.352, 5.375) |
| Phl_p5 | 5 (0, 8) | 0.642 | <0.001 | 0.499 | <0.001 | -2.853 (0.004) | 95% | -1.420 (-7.478, 4.637) |
| Phl_p6 | 0 (0, 5.88) | 0.786 | <0.001 | 0.645 | <0.001 | -0.579 (0.562) | 98% | 0.182 (-4.544, 4.907) |
| Phl_p2 | 0 (0, 3.63) | 0.679 | <0.001 | 0.567 | <0.001 | -2.966 (0.003) | 93% | 1.216 (-4.360, 6.792) |

Στον ακόλοθο Πίνακα για το ίδιο υποσύνολο οι τιμές αναδεικνύουν τον υψηλό βαθμό συσχέτισης και συμφωνίας του Giant_30 με όλες τις υπόλοιπες δερματικές δοκιμασίες (σχεδόν πάντα Spearman's $\rho > 0.6$ με $p < 0.001$ και Kendall's $\tau > 0.5$ με $p < 0.001$). Σε αυτή ειδικά την περίπτωση όπου το Giant_30 χρησιμοποιείται σα δοκιμασία αναφοράς οι δείκτες παρουσιάζονται υψηλότεροι σε σχέση με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις.

Η μέση απόλυτη διαφορά κυμαίνεται από 0.7 έως 0.9 για *Bermuda*, *Phl p 5* και *Phl p 6*, ενώ από 1.2 έως 1.9 για *Timothy*, *Phl p 1* και *Phl p 2*. Τα όρια συμφωνίας για όλες τις δερματικές δοκιμασίες σε σχέση με τη διάμεση τιμή της μεθόδου αναφοράς προκύπτουν από 50 έως 100%

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία Giant_30 για το υποσύνολο n=44. (Άτομα με ευαισθητοποίηση Timothy > Bermuda)

| | Διάμεση τιμή (1 ^ο , 3 ^ο τεταρτημόριο) | Spearman | | Kendall | | Wilcoxon (P) | % συμφωνίας | Bland-Altman Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
|---------------------------------------|---|--------------|--------|--------------|--------|--------------------|----------------|--|
| | | ρ | P | τ | P | | | |
| Πρότυπη μέθοδος (Giant_30) | 4 (3, 5) | | | | | | | |
| <i>Timothy</i> | 5.5 (3.625, 7) | 0.840 | <0.001 | 0.693 | <0.001 | -4.324 (<0.001) | 95% | -1.568 (-6.023, 2.886) |
| <i>Bermuda</i> | 4 (3, 5) | 0.765 | <0.001 | 0.615 | <0.001 | -2.084 (0.037) | 95% | 0.739 (-3.964, 5.441) |
| <i>Phl_p1</i> | 3.5 (0, 4.375) | 0.601 | 0.001 | 0.472 | 0.001 | -2.9 (0.004) | 93% | 1.250 (-3.838, 6.338) |
| <i>Phl_p5</i> | 5 (0, 8) | 0.713 | <0.001 | 0.540 | <0.001 | -1.250 (0.211) | 95% | -0.682 (-6.962, 5.599) |
| <i>Phl_p6</i> | 0 (0, 5.88) | 0.721 | <0.001 | 0.589 | <0.001 | -2.330 (0.020) | 95% | 0.920 (-4.653, 6.494) |
| <i>Phl_p2</i> | 0 (0, 3.63) | 0.480 | 0.001 | 0.396 | 0.001 | -3.331 (0.001) | 93% | 1.955 (-6.237, 10.146) |

Στους ακόλουθους Πίνακες η ίδια ανάλυση για το υποσύνολο όπου *Timothy* < *Bermuda* (n=32) έδωσε αποτελέσματα, όπου οι αντίστοιχοι δείκτες παρουσιάζονται συγκριτικά μειωμένοι όταν η μέθοδος αναφοράς ήταν *Timothy* και *Bermuda* (Spearman's $\rho \leq 0.5$ με $p > 0.001$ και Kendall's $\tau \leq 0.4$ με $p > 0.001$) με παράλληλα μειωμένη στατιστική σημαντικότητα. Η μέση απόλυτη διαφορά των υπόλοιπων δερματικών δοκιμασιών σε σχέση με αυτή του *Timothy* κυμαίνεται από 0.3 έως και 2.2 cm. Τα όρια συμφωνίας για όλες τις δερματικές δοκιμασίες σε σχέση με τη διάμεση τιμή της μεθόδου αναφοράς προκύπτουν στις περισσότερες περιπτώσεις >100%. Η μέση απόλυτη διαφορά των υπόλοιπων δερματικών δοκιμασιών σε σχέση με αυτή του *Bermuda* κυμαίνεται από 2.2 έως και 3.5 cm. Τα όρια συμφωνίας για όλες τις δερματικές δοκιμασίες σε σχέση με τη διάμεση τιμή της μεθόδου αναφοράς προκύπτουν από 50 έως >100%.

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία Timothy για το δείγμα n=32.

(Άτομα με ευαισθητοποίηση Timothy < Bermuda)

| | Διάμεση τιμή (1 ^ο , 3 ^ο τεταρτημόριο) | Spearman | | Kendall | | Wilcoxon (P) | % συμφωνίας | Bland –Altman Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
|--------------------------------------|---|--------------|-------|--------------|-------|--------------------|-------------|---|
| | | P | P | τ | P | | | |
| Πρότυπη μέθοδος (Timothy) | 4 (3, 4.5) | | | | | | | |
| Bermuda | 6 (4.5, 7.38) | 0.523 | 0.002 | 0.458 | 0.001 | -4.801 (<0.001) | 97% | -2.281 (-6.717, 2.154) |
| Giant_30 | 3 (3, 4.38) | 0.469 | 0.007 | 0.380 | 0.008 | -1.592 (0.111) | 94% | 0.391 (-3.226, 4.007) |
| Phl_p1 | 3 (2.5, 3.5) | 0.413 | 0.019 | 0.305 | 0.030 | -2.295 (0.022) | 94% | 0.719 (-2.543, 3.981) |
| Phl_p5 | 4 (0, 5.5) | 0.506 | 0.003 | 0.413 | 0.003 | -0.748 (0.454) | 97% | 0.359 (-5.339, 6.057) |
| Phl_p6 | 0 (0, 3.88) | 0.187 | 0.305 | 0.150 | 0.303 | -1.955 (0.051) | 90% | 1.281 (-6.360, 8.922) |
| Phl_p2 | 0 (0, 4.88) | 0.401 | 0.023 | 0.325 | 0.024 | -2.375 (0.018) | 100% | 1.281 (-4.184, 6.746) |

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία Bermuda για το δείγμα n=32.

(Άτομα με ευαισθητοποίηση Timothy < Bermuda)

| | Διάμεση τιμή (1 ^ο , 3 ^ο τεταρτημόριο) | Spearman | | Kendall | | Wilcoxon (P) | % συμφωνίας | Bland –Altman Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
|--------------------------------------|---|--------------|-------|--------------|-------|--------------------|-------------|---|
| | | P | P | τ | P | | | |
| Πρότυπη μέθοδος (Bermuda) | 6 (4.5, 7.38) | | | | | | | |
| Timothy | 4 (3, 4.5) | 0.523 | 0.002 | 0.458 | 0.001 | -4.801 (<0.001) | 97% | 2.281 (-2.154, 6.717) |
| Giant_30 | 3 (3, 4.38) | 0.487 | 0.005 | 0.368 | 0.008 | -4.440 (<0.001) | 97% | 2.672 (-1.739, 7.083) |
| Phl_p1 | 3 (2.5, 3.5) | 0.343 | 0.054 | 0.258 | 0.057 | -4.667 (<0.001) | 97% | 3.000 (-1.280, 7.280) |
| Phl_p5 | 4 (0, 5.5) | 0.199 | 0.275 | 0.170 | 0.212 | -3.312 (0.001) | 97% | 2.641 (-4.826, 10.108) |
| Phl_p6 | 0 (0, 3.88) | -0.017 | 0.925 | -0.016 | 0.910 | -3.366 (0.001) | 90% | 3.563 (-5.644, 12.769) |
| Phl_p2 | 0 (0, 4.88) | 0.346 | 0.053 | 0.267 | 0.056 | -4.276 (<0.001) | 90% | 3.563 (-2.962, 10.087) |

Όταν ως μέθοδος αναφοράς επιλέγεται το το Hybrid_30, ακόλουθος Πίνακας, οι δείκτες βαίνουν αυξανόμενοι, όπως επίσης και η στατιστική σημαντικότητά τους (Spearman's $\rho \geq 0.5$ με $p < 0.001$ και Kendall's $\tau > 0.5$ με $p < 0.001$). Η δε μέση απόλυτη διαφορά των υπολοίπων δερματικών δοκιμασιών σε σχέση με αυτή του Hybrid_30 κυμαίνεται από 0.3 έως

0.8, με μόνη εξαίρεση το *Bermuda* που είναι 2.6. Τα όρια συμφωνίας όλων των δερματικών δοκιμασιών σε σχέση με τη διάμεση τιμή της μεθόδου αυτής προκύπτουν από 50 έως >100%. Οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν ένδειξη ότι το καινούριο μόριο συσχετίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό με τις δερματικές δοκιμασίες ακόμα και σε αυτή την ομάδα όπου *Bermuda*>*Timothy* (n=32) με μικρότερες ωστόσο τιμές στους αντίστοιχους δείκτες.

Πίνακας. Δείκτες αξιολόγησης εγκυρότητας-συμφωνίας μεταξύ ΔΔ χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη μέθοδο τη Δερματική Δοκιμασία *Giant_30* για το δείγμα n=32.

(Άτομα με ευαισθητοποίηση *Timothy* < *Bermuda*)

| Διάμεση τιμή (1 ^ο , 3 ^ο τεταρτημόριο) | Spearman | | Kendall | | Wilcoxon (P) | % συμφωνίας | Bland –Altman Μέση διαφορά (όρια συμφωνίας) |
|---|-----------------------|--------------|----------|--------------|-----------------|------------------------|---|
| | ρ | P | τ | P | | | |
| Πρότυπη μέθοδος (<i>Giant_30</i>) | 3 (3, 4.38) | | | | | | |
| <i>Timothy</i> | 4 (3, 4.5) | 0.469 | 0.007 | 0.380 | 0.008 | -1.592 (0.111) | 94% -0.391 (-4.007, 3.226) |
| <i>Bermuda</i> | 6 (4.5, 7.38) | 0.487 | 0.005 | 0.368 | 0.008 | -4.440 (<0.001) | 97% -2.672 (-7.083, 1.739) |
| <i>Phl_p1</i> | 3 (2.5, 3.5) | 0.454 | 0.009 | 0.373 | 0.009 | -1.382 (0.167) | 90% 0.328 (-2.891, 3.547) |
| <i>Phl_p5</i> | 4 (0, 5.5) | 0.535 | 0.002 | 0.440 | 0.002 | -0.057 (0.954) | 97% -0.031 (-5.230, 5.168) |
| <i>Phl_p6</i> | 0 (0, 3.88) | 0.612 | <0.001 | 0.529 | <0.001 | -1.985 (0.047) | 90% 0.891 (-5.412, 7.193) |
| <i>Phl_p2</i> | 0 (0, 4.88) | 0.529 | 0.002 | 0.434 | 0.003 | -1.890 (0.059) | 97% 0.891 (-4.238, 6.020) |

Μελέτη της μεταξύ των συμφωνίας των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών με εφαρμογή του στατιστικού kappa (k).

Σύμφωνα με τον ορισμό της δερματικής δια νυγμού δοκιμασίας να είναι θετική >3mm, αρνητική <3mm μπορεί να μελετηθεί ως δίτιμος μεταβλητή. Το ίδιο επιχειρήθηκε και στην περίπτωση των δερματικών δοκιμασιών, οπότε πλέον η διερεύνηση της μεταξύ τους συμφωνίας έγινε σε όρους θετικού/αρνητικού αποτελέσματος και το αν ταυτιζόταν αυτό ανάμεσα στις δύο συγκρινόμενες κάθε φορά μεθόδους. Το στατιστικό Kappa επιλέχθηκε ως το κατάλληλο στατιστικό εργαλείο για τη διαδικασία, η οποία και εφαρμόστηκε διαδοχικά σε τρεις περιπτώσεις. Στην πρώτη σε όλο το δείγμα (n=76) των ευαισθητοποιημένων ατόμων στα γρασίδια, στη δεύτερη στα τρία επίπεδα ευαισθητοποίησης όπως ορίστηκαν εξ αρχής και τέλος στις δύο υποομάδες ευαισθητοποίησης ανάλογα με το *Timothy* (*SPT-Timothy*> *SPT-Bermuda*) ή *Bermuda* (*SPT-Bermuda*> *SPT-Timothy*) προφίλ των ασθενών.

Αξιολόγηση της συμφωνίας των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών για όλο το σύνολο των ασθενών.

Στον ακόλουθο Πίνακα η τιμή του του στατιστικού *Kappa* είναι στις περισσότερες περιπτώσεις στατιστικά σημαντική (σε όλες τις συγκρίσεις $p < 0.05$ και λιγότερες φορές $p < 0.001$). Παρατηρείται ότι ένα ποσοστό του δείκτη παρουσιάζει μέτρια συμφωνία ($k=0.4-0.6$), ενώ συχνά έχει τιμή < 0.4 . Καλή συμφωνία ($k=0.6-0.8$) καταγράφεται στις περιπτώσεις *Giant_30 / Timothy* ($k=0.633$, $p < 0.001$), και ανάμεσα στα *Phl_p1*, *Phl_p5 / Phl_p1 AND Phl_5* ($k=0.617$ και $k=0.716$ με $p < 0.001$). Πολύ καλή συμφωνία παρουσιάζουν τα *Giant_30 / Phl_p1 OR Phl_p5* ($k=0.842$, $p < 0.001$) και τα *Bermuda / TandB* ($k=0.936$, $p < 0.001$). Στην πρώτη περίπτωση είναι κάτι το αναμενόμενο λόγω δομής του καινούριου μορίου, ενώ στη δεύτερη διαφαίνεται η καλή αξιοπιστία του *Bermuda* σα μέθοδος να διαγιγνώσκει μόνο του την ευαισθητοποίηση στα γρασίδια γενικά, ειδικά στην περίπτωση που *Timothy* και *Bermuda* συνυπάρχουν. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σε συμφωνία με όλη την προηγούμενη ανάλυση και εξάγουν από τα δεδομένα το συμπέρασμα της αξιοπιστίας του καινούριου μορίου *Giant_30* στα πλαίσια της δερματικής δοκιμασίας ως προς τη συμφωνία του στη διάγνωση που κάνει και το *Timothy*. Παράλληλα αναδεικνύουν ένα άγνωστο ίσως ρόλο του *Bermuda* μέχρι στιγμής όσον αφορά στη χρήση του στις δερματικές δοκιμασίες και τη διάγνωση της ευαισθησίας στα γρασίδια γενικότερα. Ο δείκτης αναδεικνύει επίσης εξ' ορισμού ότι τα αποτελέσματα αυτά είναι πέραν του τυχαίου σε όλες τις προαναφερόμενες περιπτώσεις (όπου δεν αναφέρεται $p < 0.001$, μειούμενες τιμές δείκτη k κατά σταδιακό αποχρωματισμό).

Πίνακας. Δείκτης συμφωνίας k (kappa) ανάμεσα στις δερματικές δοκιμασίες σε όλο το δείγμα. (n=76)

| Kappa statistic (v=76) | <i>bin_Tan dB</i> | <i>bin_timo thy</i> | <i>bin_ber mud</i> | <i>bin_gia nt_30</i> | <i>bin_Ph_l p1</i> | <i>bin_Ph_l p5</i> | <i>bin_Ph_l p6</i> | <i>bin_Ph_l p2</i> | <i>bin_Ph_l p1-OR- Ph_l_p5</i> | <i>bin_Ph_l p1-AND- Ph_l_p5</i> |
|--|-----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--|---|
| <i>bin_Tan</i> <i>dB</i> | | 0.518 | 0.936 | 0.488 | 0.406 | 0.432 | 0.344 | 0.300 | 0.420 | 0.419 |
| <i>bin_timo</i> <i>thy</i> | | | 0.411 | 0.633 | 0.298 (0.002) | 0.361 | 0.180 (0.006) | 0.116 (0.030) | 0.541 | 0.219 (0.002) |
| <i>bin_ber</i> <i>mud</i> | | | | 0.467 | 0.456 | 0.369 (0.001) | 0.303 (0.001) | 0.269 (0.001) | 0.467 | 0.372 |
| <i>bin_giant_30</i> | | | | | 0.526 | 0.558 | 0.296 | 0.196 (0.004) | 0.842 | 0.355 |
| <i>bin_Ph_l</i> <i>p1</i> | | | | | | 0.277 (0.015) | 0.132 (0.192) | 0.179 (0.044) | 0.652 | 0.617 |
| <i>bin_Ph_l</i> <i>p5</i> | | | | | | | 0.569 | 0.341 | 0.558 | 0.716 |
| <i>bin_Ph_l</i> <i>p6</i> | | | | | | | | 0.422 | 0.296 | 0.408 |
| <i>bin_Ph_l</i> <i>p2</i> | | | | | | | | | 0.196 (0.004) | 0.339 (0.002) |
| <i>bin_Ph_l</i> <i>p1-OR-Ph_l_p5</i> | | | | | | | | | | 0.355 |
| <i>bin_Ph_l</i> <i>p1-AND-Ph_l_p5</i> | | | | | | | | | | |

Αξιολόγηση της συμφωνίας των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών ως προς τα τρία, II, III, IV αντίστοιχα, επίπεδα ευαισθητοποίησης.

Ο στατιστικός δείκτης k ελεγχόμενος για κάθε δερματική δοκιμασία έναντι κάθε επιπέδου ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη δίνει αποτελέσματα όπως στον Πίνακα ακολούθως. Για το επίπεδο ευαισθητοποίησης II τα k είναι 0.9, 0.4, 0.57 με $p < 0.001$ για τα Timothy, Bermuda και Giant_30 αντίστοιχα. Για το επίπεδο III και IV είναι $k = 0.4, 0.64, 0.64$ και $k = 0.25, 0.64, 0.5$ αντίστοιχα, με $p < 0.001$ σε όλες τις περιπτώσεις. Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα αυτά γίνεται αντιληπτό ότι και πάλι το Bermuda είναι πιο κατάλληλο σε μόριο για τις μεγαλύτερες ευαισθητοποιήσεις στα γρασίδια ($k = 0.399$ (II) · 0.643 (III) · 0.646 (IV)), ενώ το Timothy είναι πιο κατάλληλο σε μικρές ευαισθητοποιήσεις ($k = 0.900$ (II) · 0.417 (III) · 0.250(IV)). Το Giant_30 εξ αρχής έχει πιο ισορροπημένη διαγνωστική συμπεριφορά όσο αφορά στα επίπεδα ευαισθητοποίησης των αγρωστωδών ($k = 0.546$ (II) · 0.646 (III) · 0.501 (IV)). Με βάση αυτά τα δεδομένα το Bermuda θα μπορούσε ίσως μόνο του να υποκαταστήσει το Giant_30 για μεγάλες ευαισθητοποιήσεις (πιθανώς κλινικά σημαντικές). Παρ' όλα αυτά θα άφηνε διαγνωστικό κενό σε περιπτώσεις μικρότερων ευαισθητοποιήσεων στα γρασίδια σε αντίθεση με το Giant_30 που ανεξάρτητα του επιπέδου ευαισθητοποίησης μπορεί να πετυχαίνει το στόχο του.

Πίνακας. Δείκτης συμφωνίας k (kappa) ανάμεσα στις δερματικές δοκιμασίες και το επίπεδο ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη.

| | Επίπεδα ευαισθητοποίησης σε αγρωστώδη | | | | | | | | |
|---|---------------------------------------|----------------|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------|----------------|--------------|
| | II | | III | | | | IV | | |
| | % θετικά | % συμφωνίας | kappa | % θετικών | % συμφωνίας | kappa | % θετικών | % συμφωνίας | kappa |
| <i>Δερματικές Δοκιμασίες – (Κατηγορικές (δίτιμες) μεταβλητές)</i> | | | | | | | | | |
| <i>bin_TandB</i> | 71.2 | 79.7 | 0.372 | 71.2 | 84.7 | 0.608 | 70.7 | 82.7 | 0.611 |
| <i>bin_timothy</i> | 89.8 | 98.3 | 0.900 | 89.8 | 83.1 | 0.417 | 89.7 | 70.7 | 0.250 |
| <i>bin_bermuda</i> | 72.9 | 81.4 | 0.399 | 72.9 | 86.4 | 0.643 | 72.4 | 84.4 | 0.646 |
| <i>bin_giant_30</i> | 81.4 | 89.9 | 0.576 | 81.4 | 88.2 | 0.646 | 81 | 79.3 | 0.501 |
| <i>bin_Phl_p1</i> | 59.3 | 67.8 | 0.238 | 59.3 | 76.2 | 0.474 | 60.3 | 75.9 | 0.488 |
| <i>bin_Phl_p5</i> | 61 | 69.5 | 0.253 | 61 | 74.5 | 0.425 | 62.1 | 70.7 | 0.372 |
| <i>bin_Phl_p6</i> | 45.8 | 54.3 | 0.145 | 45.8 | 66.1 | 0.351 | 46.6 | 75.9 | 0.526 |
| <i>bin_Phl_p2</i> | 33.9 | 42.4 | 0.091 | 33.9 | 57.6 | 0.275 | 34.5 | 77.3 | 0.396 |
| <i>bin_Phl_p1-OR-Phl_p5</i> | 78 | 86.5 | 0.494 | 78 | 88.1 | 0.664 | 79.3 | 81.1 | 0.548 |
| <i>bin_Phl_p1-AND-Phl_p5</i> | 42.4 | 50.9 | 0.127 | 42.4 | 62.7 | 0.310 | 43.1 | 61.5 | 0.336 |

Αξιολόγηση της συμφωνίας των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών στα υποσύνολα Timothy>Bermuda (n=44) και Bermuda>Timothy (n=32).

Η συγκριτική αξιολόγηση των δεικτών συμφωνίας kappa (k) για τα υποσύνολα Timothy>Bermuda και Bermuda>Timothy ως προς τις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες αναπτύσσεται στο ακόλουθο Πίνακα. Ουσιαστικά η συμφωνία έχει να κάνει με τη διαγνωστική ικανότητα των μοριακών δομών (είτε πλήρεις, είτε μερικές) των δύο αγρωστωδών Timothy και Bermuda όπως και σε όλη την προηγούμενη ανάλυση. Στην ομάδα όπου $SPTs_Timothy > SPTs_Bermuda$ ο δείκτης k προκύπτει στις περισσότερες περιπτώσεις αυξημένος (>4 =μέτρια συμφωνία, >6 =καλή συμφωνία) και παράλληλα σε περισσότερο στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p<0.001$) σε σχέση με τα περιστατικά όπου $SPTs_Timothy < SPTs_Bermuda$. (μειούμενες τιμές δείκτη kappa k από ερυθρό προς υποκίτρινο).

Πίνακας. Δείκτης συμφωνίας k (kappa) των δερματικών δοκιμασιών, συγκριτικά ανάμεσα στην $T>B$ ($v=44$) και $B>T$ ($v=32$) ομάδα.

| Kappa statistic (v=44) | <i>bin_Tand B</i> | <i>bin_timot hy</i> | <i>bin_berm uda</i> | <i>bin_giant _30</i> | <i>bin_Phl_ p1</i> | <i>bin_Phl_ p5</i> | <i>bin_Phl_ p6</i> | <i>bin_Phl_ p2</i> | <i>bin_Phl_ p1-OR- Phl_p5</i> | <i>bin_Phl_ p1-AND- Phl_p5</i> |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------------|--|
| <i>bin_TandB</i> | | 0.344 | 1.000 | 0.460 | 0.487 | 0.575 | 0.596 | 0.404 | 0.415 | 0.639 |
| <i>bin_timothy</i> | 1.000 | | 0.344 | 0.699 | 0.371 | 0.433 | 0.233 | 0.116 | 0.643 | 0.252 |
| <i>bin_bermuda</i> | 0.636 | 0.636 | | 0.460 (0.001) | 0.487 (0.001) | 0.575 | 0.596 | 0.404 | 0.415 (0.003) | 0.639 |
| <i>bin_giant_30</i> | 0.529 (0.002) | 0.529 (0.002) | 0.448 (0.002) | | 0.596 | 0.680 | 0.394 | 0.179 (0.038) | 0.938 | 0.423 |
| <i>bin_Phl_p1</i> | 0.163 (0.298) | 0.163 (0.298) | 0.291 (0.020) | 0.398 (0.020) | | 0.426 (0.005) | 0.374 (0.010) | 0.292 (0.013) | 0.650 | 0.775 |
| <i>bin_Phl_p5</i> | 0.279 (0.023) | 0.279 (0.023) | 0.140 (0.120) | 0.415 (0.004) | 0.100 (0.538) | | 0.645 | 0.320 (0.004) | 0.737 | 0.686 |
| <i>bin_Phl_p6</i> | 0.122 (0.149) | 0.122 (0.149) | 0.059 (0.325) | 0.190 (0.067) | -0.128 (0.115) | 0.450 (0.005) | | 0.476 | 0.435 | 0.589 |
| <i>bin_Phl_p2</i> | 0.139 (0.122) | 0.139 (0.122) | 0.067 (0.290) | 0.216 (0.049) | 0.010 (0.938) | 0.387 (0.019) | 0.363 (0.040) | | 0.200 (0.027) | 0.442 |
| <i>bin_Phl_p1-OR-Phl_p5</i> | 0.355 (0.043) | 0.355 (0.043) | 0.529 | 0.671 | 0.642 | 0.347 (0.010) | 0.155 (0.101) | 0.177 (0.078) | | 0.467 |
| <i>bin_Phl_p1-AND-Phl_p5</i> | 0.178 (0.077) | 0.178 (0.077) | 0.087 (0.227) | 0.273 (0.025) | 0.422 (0.003) | 0.753 | 0.126 (0.467) | 0.203 (0.246) | 0.225 (0.044) | |

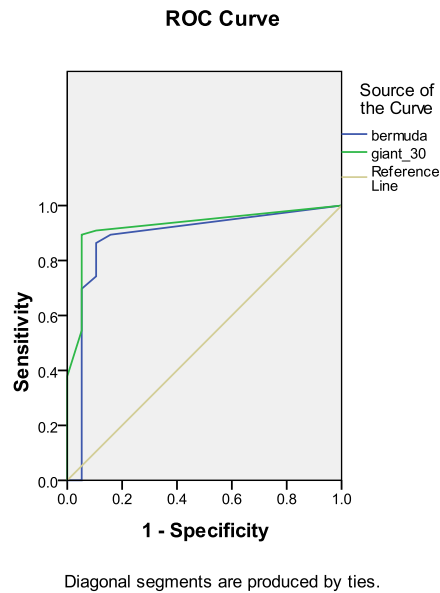
Μελέτη της διαγνωστικής ικανότητας των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών με εφαρμογή καμπύλης λειτουργικών χαρακτηριστικών – καμπύλη ROC

Σύμφωνα με τον ορισμό της δερματικής δια νυγμού δοκιμασίας είναι θετική $>3\text{mm}$, αρνητική $<3\text{mm}$ προκειμένου για την αξιολόγηση διαγνωστικών δια νυγμού δερματικών δοκιμασιών με εφαρμογή εκχυλισμάτων αλλεργιογόνων όπως τα Timothy και Bermuda. Ωστόσο, για το καινούριο αλλεργιογόνο μεγαλομόριο Hybrid_30 στα πλαίσια των δερματικών δοκιμασιών δεν έχει καθιερωθεί κάποιο αντίστοιχο όριο για την εκτίμηση των μετρήσεων. Για την ανάλυση και μελέτη αυτών των ορίων δημιουργήθηκαν οι καμπύλες ROC σε διαφορετικές περιπτώσεις ανάλογα και με την προηγούμενη επεξεργασία των στοιχείων. Εκτός όμως από την εύρεση του ιδανικού διαχωριστικού ορίου των δερματικών δοκιμασιών, πραγματοποιήθηκε παράλληλα και η σύγκριση της διαγνωστικής ικανότητας των δερματικών δοκιμασιών σε σχέση με τη μέθοδο αναφοράς που ορίστηκε σε κάθε περίπτωση. Ελέγχθηκαν έτσι και πάλι οι δερματικές δοκιμασίες, κατά πόσο μπορεί και προσεγγίζει η μία την άλλη στα πλαίσια όλου του δείγματος και των υποκατηγοριών του(257).

Αξιολόγηση των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών με επιλεγόμενη διαδοχικά ως μέθοδο αναφοράς τα Timothy, Bermuda και Hybrid

Όταν ως μέθοδος αναφοράς για το όλο σύνολο των 85 ατόμων (9 άτομα μάρτυρες) επιλέγεται η δερματική δια νυγμού δοκιμασία του Timothy τα αποτελέσματα της συνδυαστικής γραφικής απεικόνισης ευαισθησίας και ειδικότητας των δοκιμασιών παρουσιάζονται γραφικά στον ακόλουθο Πίνακα. Από την περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών η διάγνωση της Timothy ευαισθητοποίησης φαίνεται ότι προσεγγίζεται καλύτερα από το Giant_30 (AUC : 0.926) σε σχέση με το Bermuda (AUC : 0.882). Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) και αξιολογήσιμα - συγκρίσιμα. Ωστόσο, η δερματική δοκιμασία του Hybrid_30 από τον πίνακα ευαισθητοποιήσεων και ειδικοτήτων –όσον αφορά ως προς το Timothy- βελτιστοποιεί τη διαγνωστική ισχύ της με όρια αξιολόγησης κάτω από τα 3 mm (2 mm).

Πίνακας. Διαγνωστική ικανότητα ως προς Timothy.

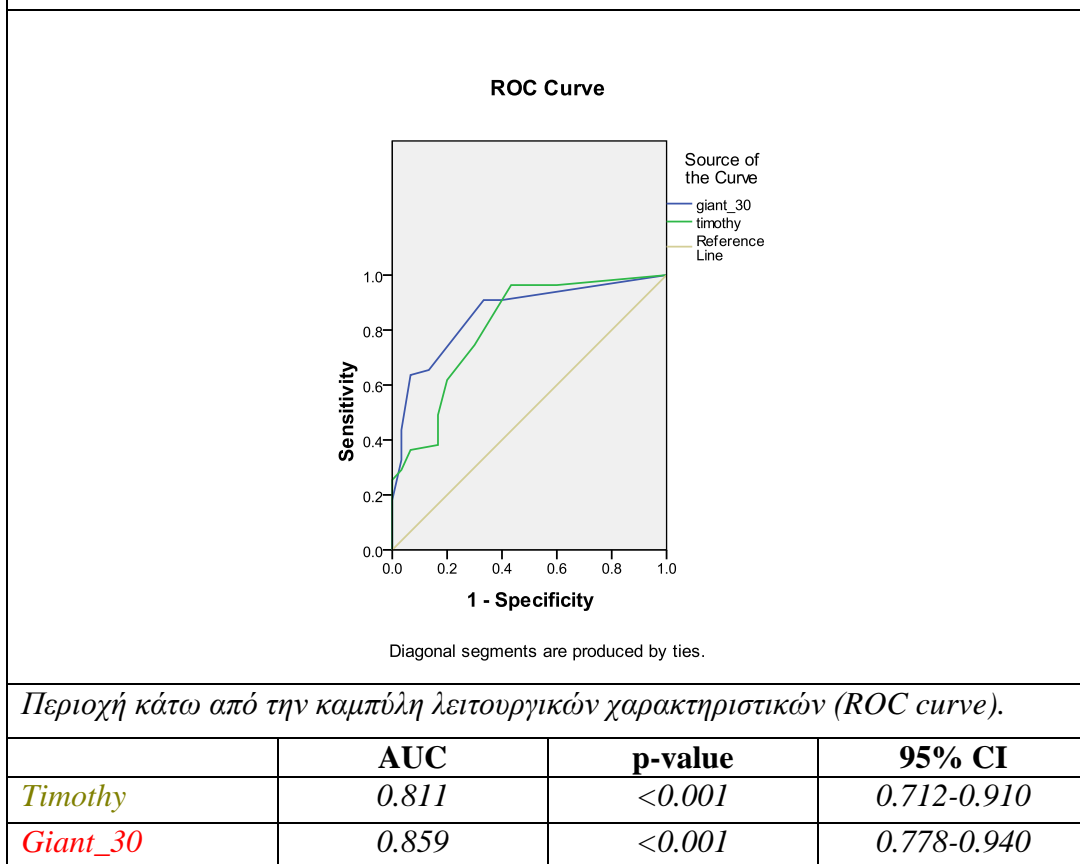


Περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROC curve).

| | <i>AUC</i> | <i>p-value</i> | <i>95% CI</i> |
|-----------------|------------|----------------|---------------|
| <i>Bermuda</i> | 0.882 | <0.001 | 0.775-0.988 |
| <i>Giant_30</i> | 0.926 | <0.001 | 0.860-0.992 |

Όταν ως μέθοδος αναφοράς για το όλο σύνολο των 85 ατόμων (9 άτομα μάρτυρες) επιλέγεται η δερματική δια νυγμου δοκιμασία του Bermuda τα αποτελέσματα της γραφικής απεικόνισης ευαισθησίας και ειδικότητας των δοκιμασιών παρουσιάζονται γραφικά στον ακόλουθο Πίνακα. Από την περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών η διάγνωση της Bermuda ευαισθητοποίησης φαίνεται ότι προσεγγίζεται καλύτερα από το Hybrid_30 (AUC : 0.859) σε σχέση με το Timothy (AUC : 0.811). Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) και αξιολογήσιμα – συγκρίσιμα. Η δερματική δοκιμασία του Hybrid_30 από τον πίνακα ευαισθητοποιήσεων και ειδικοτήτων φαίνεται να ισχυροποιεί τη διαγνωστική της ισχύ λίγο πάνω από το το όριο των 3mm, αφού εκεί βρίσκεται ο βέλτιστος συνδυασμός ευαισθησίας και ειδικότητάς της

*Πίνακας. Διαγνωστική ικανότητα ως προς **Bermuda**.*

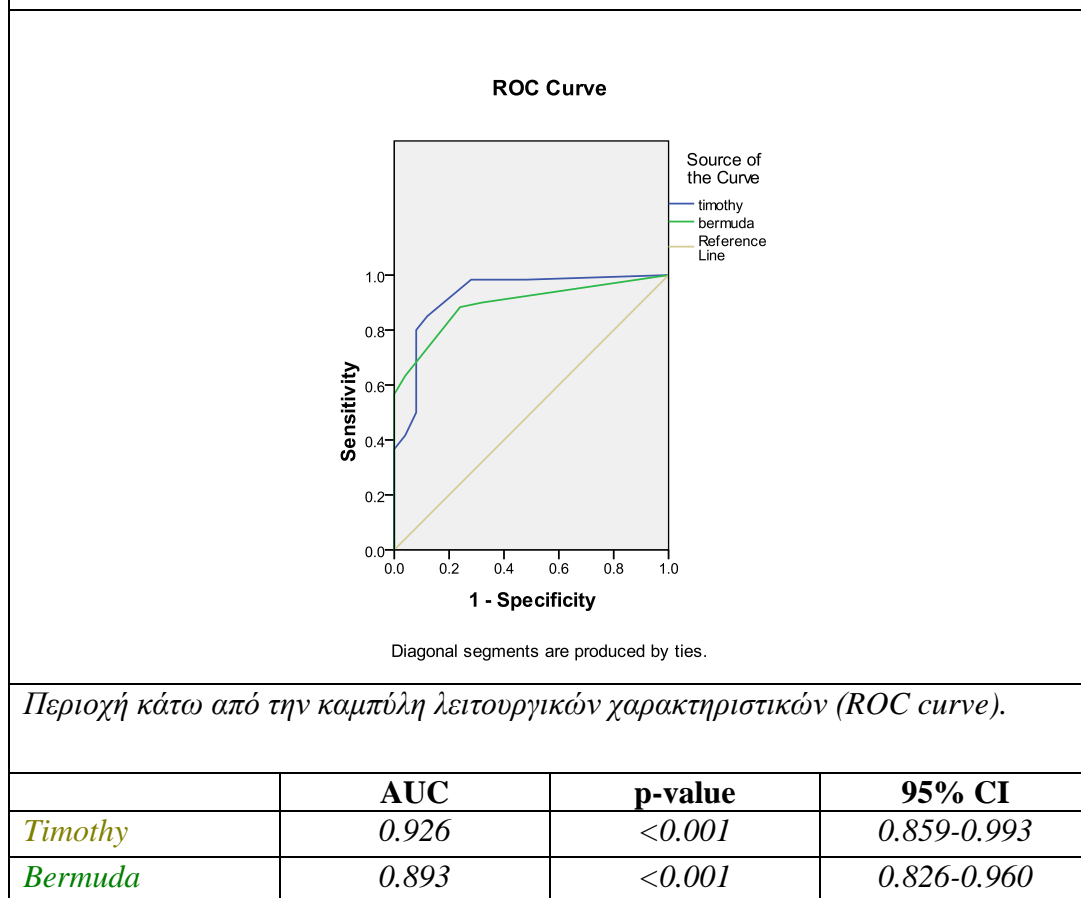


Περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROC curve).

| | AUC | p-value | 95% CI |
|-----------------|------------|----------------|---------------|
| <i>Timothy</i> | 0.811 | <0.001 | 0.712-0.910 |
| <i>Giant_30</i> | 0.859 | <0.001 | 0.778-0.940 |

Όταν ως μέθοδος αναφοράς για το όλο σύνολο των 85 ατόμων (9 άτομα μάρτυρες) επιλέγεται η δερματική δια νυγμου δοκιμασία του Hybrid_30 τα αποτελέσματά της γραφικά απεικόνισης ευαισθησίας και ειδικότητας των δοκιμασιών παρουσιάζονται γραφικά στον ακόλουθο Πίνακα. Από την περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών για ακόμα μια φορά γίνεται σαφές ότι το Giant_30 (AUC: 0.926) προσεγγίζει σαν μέθοδος καλύτερα το Timothy σε σχέση με το Bermuda (AUC:0.893). Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) και αξιολογήσιμα – συγκρίσιμα.

Πίνακας. Διαγνωστική ικανότητα ως προς *Giant_30*.

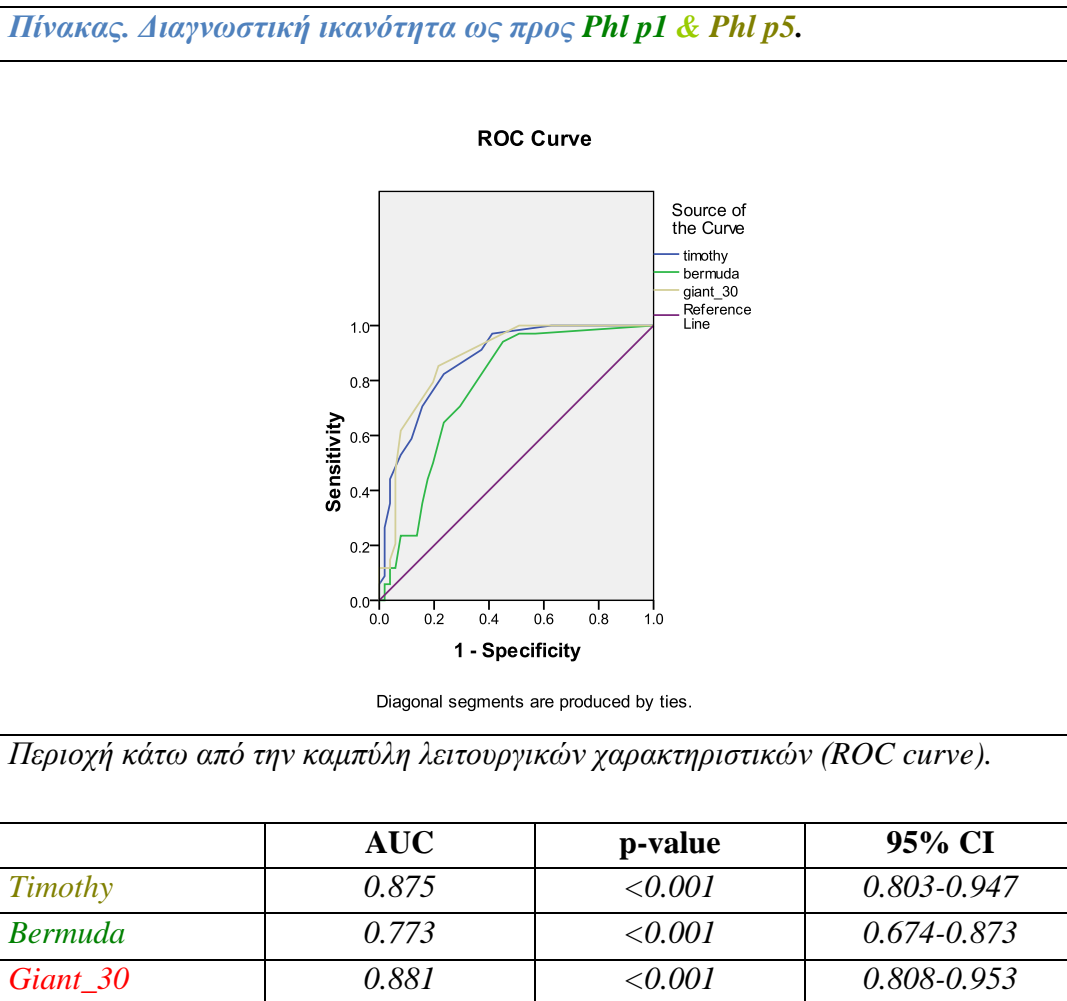


Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το *Hybrid_30* προσεγγίζει διαγνωστικά το *Timothy* καλύτερα σε σχέση με το *Bermuda*. Επίσης, ότι το *Hybrid_30* υπερτερεί στο να διαγνώσει το *Timothy* σε σχέση με το *Bermuda*, αλλά και στο να διαγνώσει το *Bermuda* σε σχέση με το *Timothy*.

Αξιολόγηση των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών με επιλεγείσα ως μέθοδο αναφοράς το *Phl p1* & *Phl p5* (*Phl p1* και *Phl p5* ταυτόχρονα θετικά) και *TandB* (*Timothy* και *Bermuda* ταυτόχρονα θετικά).

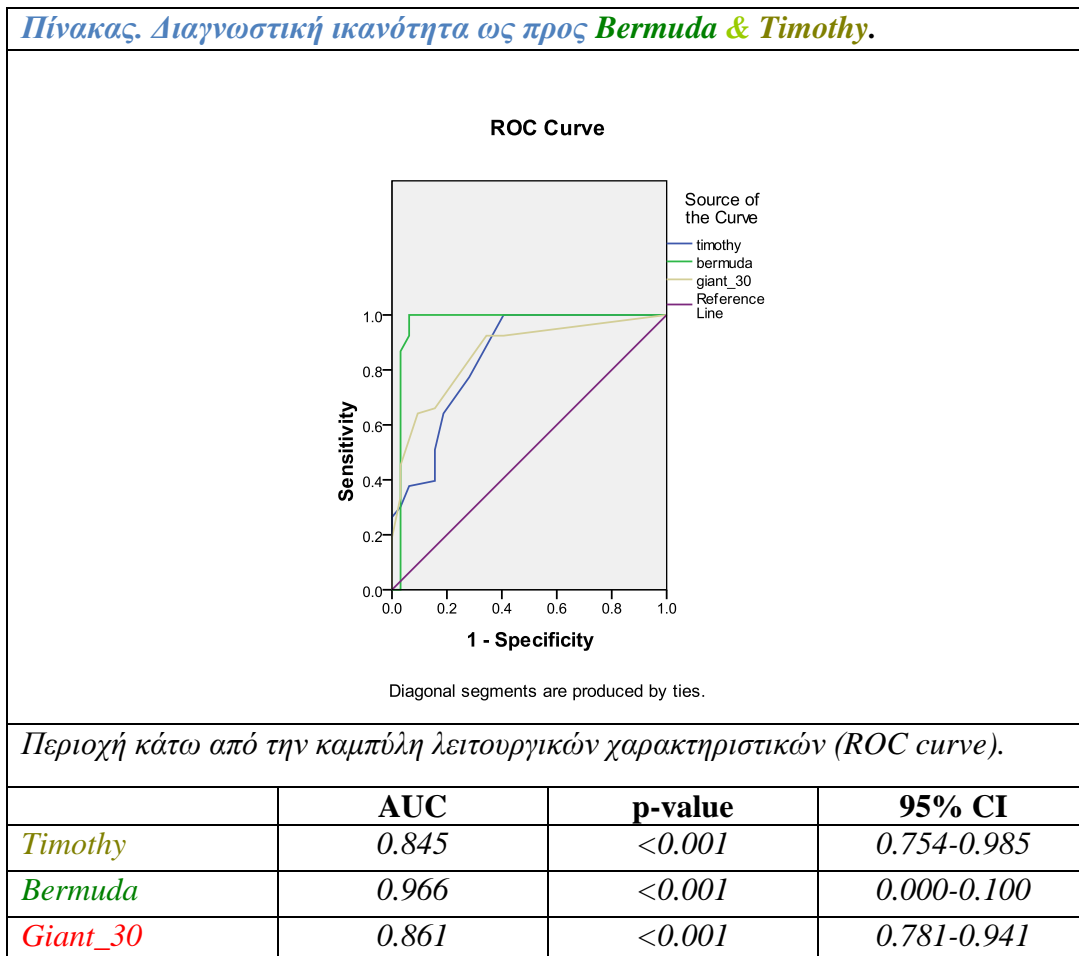
Όταν ως μέθοδος αναφοράς για το όλο σύνολο των 85 ατόμων (9 άτομα μάρτυρες) επιλέγεται ο συνδυασμός των *Phl p1* και *Phl p5* (ταυτόχρονα $\geq 3mm$: 1, διαφορετικά: 0) , τα αποτελέσματα της γραφικής απεικόνισης ευαισθησίας και ειδικότητας των δοκιμασιών παρουσιάζονται γραφικά στον ακόλουθο Πίνακα. Πρόκειται για τους δύο επιτόπους (*Phl p1* και *Phl p5*) που κατά βάση χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής στη διάγνωση της ευαισθητοποίησης στο *Timothy* (και γενικά στα γρασίδια), τουλάχιστον σε εργαστηριακό επίπεδο. Όταν και τα δύο είναι πάνω από 3mm είναι αναμενόμενο το *Timothy* να είναι πάντα θετικό. Από την περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών γίνεται σαφές ότι το *Giant_30* (AUC:0.881) προσεγγίζει σε μέθοδος καλύτερα την *Phl p1* & *Phl p5* μέθοδο

αναφοράς σε σχέση με το *Bermuda* (AUC:0.773) και το *Timothy* (AUC:0.875). Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) και αξιολογήσιμα – συγκρίσιμα, ωστόσο τα 95% όρια εμπιστοσύνης των *Giant_30* και *Timothy* βρίσκονται ιδιαίτερα κοντά (0.803-0.947 vs 0.808-0.953) από άποψη διαγνωστικής ικανότητας, ενώ απέχει το *Bermuda* (0.674-0.873). Με αυτό τον τρόπο φαίνεται ότι το *Giant_30* σαν μέθοδος δύναται να αντικαταστήσει την *Phl p1 & Phl p5* με αποτελεσματικό τρόπο σε σχέση με το πλήρες μόριο *Timothy* και ακόμα περισσότερο με το *Bermuda*.



Όταν ως μέθοδος αναφοράς για το όλο σύνολο των 85 ατόμων (9 άτομα μάρτυρες) επιλέγεται το *Timothy* και το *Bermuda* να είναι ταυτόχρονα θετικά ($TandB \geq 3mm$) όσο αφορά στις δερματικές τους δοκιμασίες τα αποτελέσματα των συνδυασμών ευαισθησίας και ειδικότητας των δοκιμασιών παρουσιάζονται γραφικά στον ακόλουθο Πίνακα. Κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών υπολογίζονται οι αντίστοιχες τιμές για κάθε δοκιμασία όπως και προηγούμενα. Το *Bermuda* (AUC=0.966) υπερέχει σα δερματική δοκιμασία όταν *Timothy* και *Bermuda* είναι παρόντα σαν ευαισθητοποιήσεις ταυτόχρονα στον πληθυσμό, ωστόσο απέχει από τα *Timothy* και *Giant_30* που όπως ήταν αναμενόμενο προσεγγίζει διαγνωστικά το ένα το άλλο (AUC = 0.845 και 0.861, αντίστοιχα). Καταδεικνύεται με τον τρόπο αυτό η

διαγνωστική ικανότητα του *Bermuda* στη διπλή ευαισθητοποίηση (*Timothy & Bermuda*) και και σε ευαισθητοποίηση υψηλού επιπέδου (επίπεδο $\geq III$) με βάση και προηγούμενο έλεγχο.



Αξιολόγηση των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών με επιλεγείσα ως μέθοδο αναφοράς τα τρία, II, III, IV αντίστοιχα, επίπεδα ευαισθητοποίησης.

Όταν ως μέθοδος αναφοράς για το όλο σύνολο των 85 ατόμων (9 άτομα μάρτυρες) επιλέγεται το επίπεδο ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη με τρόπο που το είδαμε και στην προηγούμενη ανάλυσή μας έχουμε τη δυνατότητα να ελέγξουμε τη συμπεριφορά των δερματικών δοκιμασιών από άποψη ευαισθησίας και ειδικότητας με βάση τις αντίστοιχες ROC καμπύλες. Τα επίπεδα είναι τρία (επίπεδο II, III και IV) και ορίζονται με βάση την ευαισθητοποίηση σε ένα τουλάχιστον από τα δύο γρασίδια, όπου και η δερματική ($\geq 3mm$), αλλά και η εργαστηριακή δοκιμασία ($\geq II$, $\geq III$, $\geq IV$) είναι θετικές, με την τελευταία να καθορίζει ουσιαστικά και το αντίστοιχο επίπεδο. Στόχος ήταν η διερεύνηση της συμπεριφοράς των διαγνωστικών μορίων (*Timothy*, *Bermuda*, *Giant_30*) μεταξύ τους και στα διάφορα επίπεδα ευαισθητοποίησης στα γρασίδια. Στα παρακάτω γραφήματα και Πίνακες παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Σε μικρό επίπεδο ευαισθητοποίησης (II) το *Timothy* φαίνεται να υπερέχει διαγνωστικά σε σχέση με το *Bermuda* (ROC: 0.989 vs 0.939) και με το *Giant_30* (0.989 vs 0.954). Όσο το επίπεδο ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη γενικά ανέρχεται (III, IV) το *Bermuda* φαίνεται να υπερέχει συνεχόμενα σε σχέση με τις υπόλοιπες δύο δερματικές

δοκιμασίες, ενώ γενικά παραμένει και πιο σταθερό διαγνωστικά ($AUC : 0.939, 0.935, 0.930$). Το *Giant_30* σε διαγνωστική δοκιμασία παραμένει πάντα ανάμεσα σε αυτές των *Timothy* και *Bermuda* με μία σχετική προτίμηση προς το *Timothy*.

Πίνακας. Διαγνωστική ικανότητα ως προς τα τρία επίπεδα εναισθητοποίησης.

| Επίπεδο II | Επίπεδο III | Επίπεδο IV | |
|---|---|---|--------------------|
| <p>ROC Curve</p> <p>Source of the Curve</p> <ul style="list-style-type: none"> timothy bermuda giant_30 Reference Line <p>Sensitivity</p> <p>1 - Specificity</p> <p>Diagonal segments are produced by ties.</p> | <p>ROC Curve</p> <p>Source of the Curve</p> <ul style="list-style-type: none"> timothy bermuda giant_30 Reference Line <p>Sensitivity</p> <p>1 - Specificity</p> <p>Diagonal segments are produced by ties.</p> | <p>ROC Curve</p> <p>Source of the Curve</p> <ul style="list-style-type: none"> timothy bermuda giant_30 Reference Line <p>Sensitivity</p> <p>1 - Specificity</p> <p>Diagonal segments are produced by ties.</p> | |
| <i>Περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROC curve).</i> | | | |
| | AUC | p-value | 95% CI |
| Επίπεδο II | | | |
| <i>Timothy</i> | <i>0.989</i> | <i><0.001</i> | <i>0.000-1.000</i> |
| <i>Bermuda</i> | <i>0.939</i> | <i><0.001</i> | <i>0.884-0.994</i> |
| <i>Giant_30</i> | <i>0.954</i> | <i><0.001</i> | <i>0.903-1.000</i> |
| Επίπεδο III | | | |
| <i>Timothy</i> | <i>0.871</i> | <i><0.001</i> | <i>0.781-0.962</i> |
| <i>Bermuda</i> | <i>0.935</i> | <i><0.001</i> | <i>0.878-0.993</i> |
| <i>Giant_30</i> | <i>0.900</i> | <i><0.001</i> | <i>0.817-0.983</i> |
| Επίπεδο IV | | | |
| <i>Timothy</i> | <i>0.811</i> | <i><0.001</i> | <i>0.710-0.912</i> |
| <i>Bermuda</i> | <i>0.930</i> | <i><0.001</i> | <i>0.860-1.000</i> |
| <i>Giant_30</i> | <i>0.871</i> | <i><0.001</i> | <i>0.783-0.960</i> |

Αξιολόγηση των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών με επιλεγείσα ως μέθοδο αναφοράς τα υποσύνολα Timothy>Bermuda (n=44) και Bermuda>Timothy (n=32)

Όταν ως μέθοδος αναφοράς για το όλο σύνολο των 85 ατόμων (9 άτομα μάρτυρες) επιλέγεται ένα των υποσυνόλων Timothy>Bermuda, Bermuda>Timothy μελετάται ως διαγνωστικός στόχος του Hybrid_30 η δυνατότητα να προσδιορίζει το Timothy ή Bermuda προφίλ των ασθενών. Τούτο καθώς το αρχικό σκεπτικό κατασκευής του καινούριου μορίου είναι και η ανίχνευση των αληθώς Timothy ευαισθητοποιημένων ασθενών. Τα γραφήματα και οι αντίστοιχοι πίνακες δείχνουν ότι κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό από την πλευρά του καινούριου μορίου (εκτός από Bermuda τα υπόλοιπα $p>0.1$). Το τελευταίο δεν είναι σε θέση να διαφοροδιαγνώσει το προφίλ ευαισθητοποίησης. Μοναδικό κριτήριο για αυτό μπορεί να είναι το μόριο του Bermuda, το οποίο όταν είναι πάνω από 3.5 mm μπορεί να αποκλείσει το Timothy-προφίλ (AUC:0.147 με $p<0.001$), ενώ όταν είναι κάτω από 3 mm απλά δεν μπορεί να το διαγνώσει. Όλα τα ανωτέρω υπό τον περιορισμό της συνευαισθητοποίησης στα δύο αγρωστώδη, το οποίο ισχύει σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας. Διαγνωστική ικανότητα ως προς το προφίλ ευαισθητοποίησης (T>B ή B>T).

| T > B | | B > Tα | |
|---|--------------|---|--------------------|
| <p>ROC Curve</p> <p>Source of the Curve</p> <ul style="list-style-type: none"> timothy bermuda giant_30 Reference Line <p>Diagonal segments are produced by ties.</p> | | <p>ROC Curve</p> <p>Source of the Curve</p> <ul style="list-style-type: none"> timothy bermuda giant_30 Reference Line <p>Diagonal segments are produced by ties.</p> | |
| <i>Περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROC curve).</i> | | | |
| | AUC | p-value | 95% CI |
| T > B | | | |
| <i>Timothy</i> | <i>0.568</i> | <i>0.299</i> | <i>0.448-0.689</i> |
| <i>Bermuda</i> | <i>0.147</i> | <i><0.001</i> | <i>0.068-0.225</i> |
| <i>Giant_30</i> | <i>0.461</i> | <i>0.55</i> | <i>0.339-0.583</i> |
| B > T | | | |
| <i>Timothy</i> | <i>0.432</i> | <i>0.299</i> | <i>0.311-0.552</i> |
| <i>Bermuda</i> | <i>0.853</i> | <i><0.001</i> | <i>0.775-0.932</i> |
| <i>Giant_30</i> | <i>0.539</i> | <i>0.55</i> | <i>0.417-0.661</i> |

Υποαλλεργιογονικό ανασυνδυασμένο παράγωγο (mutant) rCyp c 1 του μείζονος αλλεργιογόνου των ψαριών και το άγριου τύπου (wild type) μόριο του.

Εκ των είκοσι επτά παιδιών με βεβαιωμένη και καλώς χαρακτηρισμένη, από το ιστορικό αντίδραση στο ψάρι, με εύρος από κνίδωση έως και αναφυλαξία έγιναν οι δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες με το άγριου τύπου (wild) και το υποαλλεργιογονικό (mutant) αλλεργιογόνο μόριο rCyp c 1, ως ακολούθως.

Σε όλα τα είκοσι επτά εξ αυτών έγιναν οι δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού με το άγριου τύπου (wild) μόριο σε διαδοχικά αυξανόμενη τιτλοποίηση συγκεντρώσεων 1mcg/ml, 4mcg/ml, 16mcg/ml, 32mcg/ml.

Σε 12 εξ αυτών με καλώς χαρακτηρισμένη και σταδιοποιημένη αναφυλαξία(258) στο ψάρι (ακόλουθος πίνακας) έγιναν επιπλέον οι δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού με το υποαλλεργιογονικό (mutant) μόριο mCyp c 1, σε αυξανόμενη τιτλοποίηση συγκεντρώσεων 1mcg/ml, 4mcg/ml, 16mcg/ml, 32mcg/ml προκειμένου να μελετηθεί ειδικά η συμπεριφορά του συγκεκριμένου μορίου.

| Αρ. Ασθενούς | Ηλικία (έτη) | Φύλο Α/Θ | Οικογενειακό ιστορικό αλλεργίας Ν/Ο | Άλλες Αλλεργίες (διαγνωσμένες από ιατρό) | sIgE σε εισπνεόμενα αλλεργιογόνα Θ/Α | SPTs σε εισπνεόμενα αλλεργιογόνα Θ/Α | Άλλες IgE-διαμεσοαβούμενες τροφικές αλλεργίες (διαγνωσμένες από ιατρό) | Συμπτώματα Αλλεργίας στο ψάρι Δ, Α, Γ, Κ | Συστηματική αλλεργική αντίδραση στο ψάρι (αναφυλαξία) βαθμός (258) |
|--------------|--------------|----------|-------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|--|
| 1 | 5 | Α | Ν | ΑΔ, Ρ, Κ | Θ | Θ | Σ, Ο | Δ, Α, Γ | 2 |
| 2 | 14 | Α | Ν | ΑΔ, Ρ, Α | Θ | Θ | Φ, Ξ | Δ, Γ | 2 |
| 3 | 6 | Α | Ν | ΑΔ, Ρ, Α | Θ | Θ | Φ, Ξ | Δ, Α | 2 |
| 4 | 10 | Α | Ο | ΑΔ, Ρ, Α | Θ | Θ | Καμία | Δ, Α | 2 |
| 5 | 7 | Θ | Ν | ΑΔ, Ρ, Α | Θ | Θ | Φ, Κ, Φρ | Δ, Α, Γ | 3 |
| 6 | 6 | Θ | Ν | ΑΔ, Ρ, Α | Θ | Θ | Φ, Ξ | Δ, Α, Γ | 3 |
| 7 | 12 | Α | Ο | ΑΔ, Ρ | Θ | Θ | Α | Δ, Γ | 2 |
| 8 | 12 | Θ | Ο | Καμία | Θ | ΔΕ | Καμία | Δ, Γ | 2 |
| 9 | 3.5 | Α | Ν | ΑΔ, Ρ, Α | Θ | Θ | Φ, Ξ | Δ, Α | 4 |
| 10 | 5 | Θ | Ο | ΑΔ | Α | Α | Α, Φ, Ξ | Δ, Α | 4 |
| 11 | 10 | Α | Ο | ΑΔ | Θ | ΔΕ | Α, Σ | Δ, Γ | 4 |
| 12 | 13 | Α | Ν | ΑΔ, Ρ, Α | Θ | Θ | Α | Δ, Α, Γ | 2 |

Για τη μελέτη του ανωτέρω πίνακα χαρακτηρίζουμε ως:

Α (άρρεν) /Θ (θήλυ), Ν (Ναι) /Ο (Όχι)

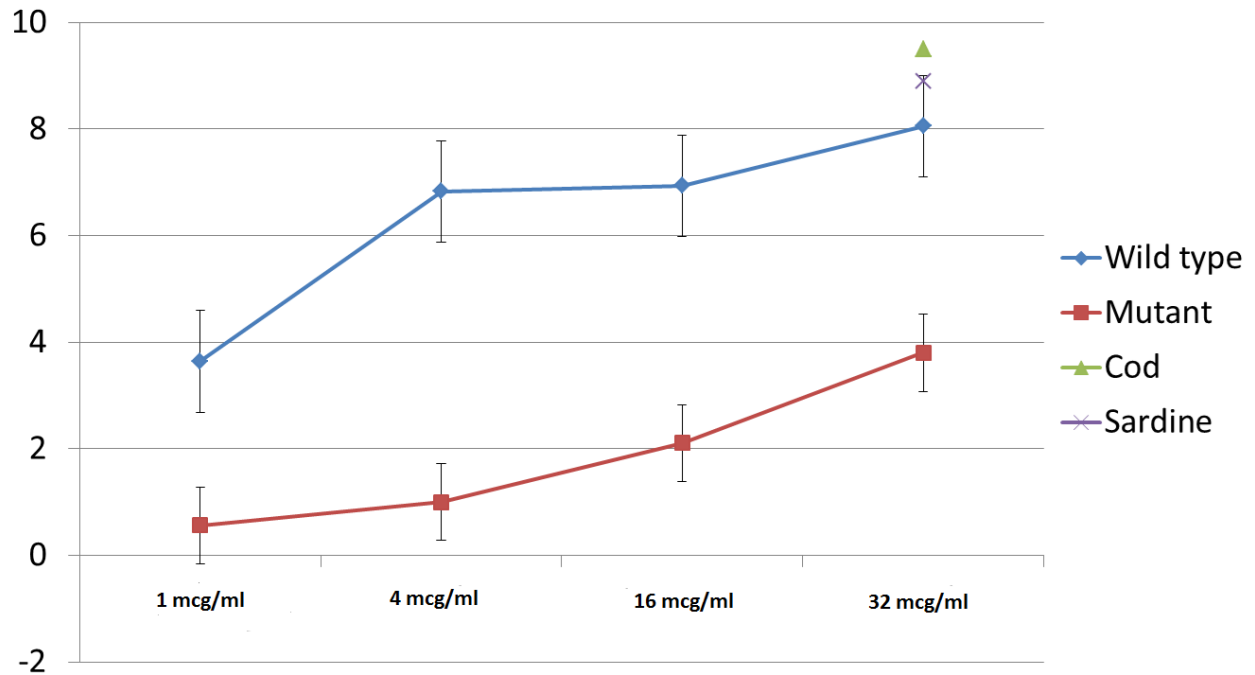
Άλλες αλλεργίες: ΑΔ (Ατοπική Δερματίτιδα), Ρ (Ρινίτιδα), Α (Ασθμα), Κ (Κνίδωση)

Έλεγχος με ειδική IgE ορού (sIgE), δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες (SPTs), σε συνήθη εισπνεόμενα αλλεργιογόνα (d1,d2,g2,g6,m2,m3,m6,t9,w19): θετικό τουλάχιστον ένα, θετικό (Θ) / αρνητικό (Α), δεν έγινε (ΔΕ)

Τροφικές αλλεργίες (εκτός αλλεργίας στο ψάρι): Αυγό (Α), Σιτηρά (Σ), Οστρακοειδή (Ο), Φυσιόκι (Φ), Ξηροί καρποί δέντρων (Ξ), Φρούτα (Φρ)

Συμπτωματολογία τροφικής αλλεργίας στο ψάρι: Δέρμα (κνίδωση, flushing, AO), Αναπνευστικό (πταρμός, ρινόρροια-ρινική συμφόρηση, βήχας, συριγμός, δύσπνοια), Γαστρεντερολογικό (κνησμός φάρυγγα, ναυτία, έμετος, διάρροια), Καρδιαγγειακό (ζάλη, υπόταση). Δέρμα (Δ), Αναπνευστικό (Α), Γαστρεντερικό (Γ), Καρδιαγγειακό (Κ).

Η συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων του συνόλου των ασθενών με αλλεργία, κνίδωση έως αναφυλαξία, στο ψάρι κατέδειξε τα πλεονεκτήματα των αλλεργιογόνων μορίων στη διαγνωστική προσέγγιση των ασθενών με αλλεργία στο ψάρι (ακόλουθο γράφημα).



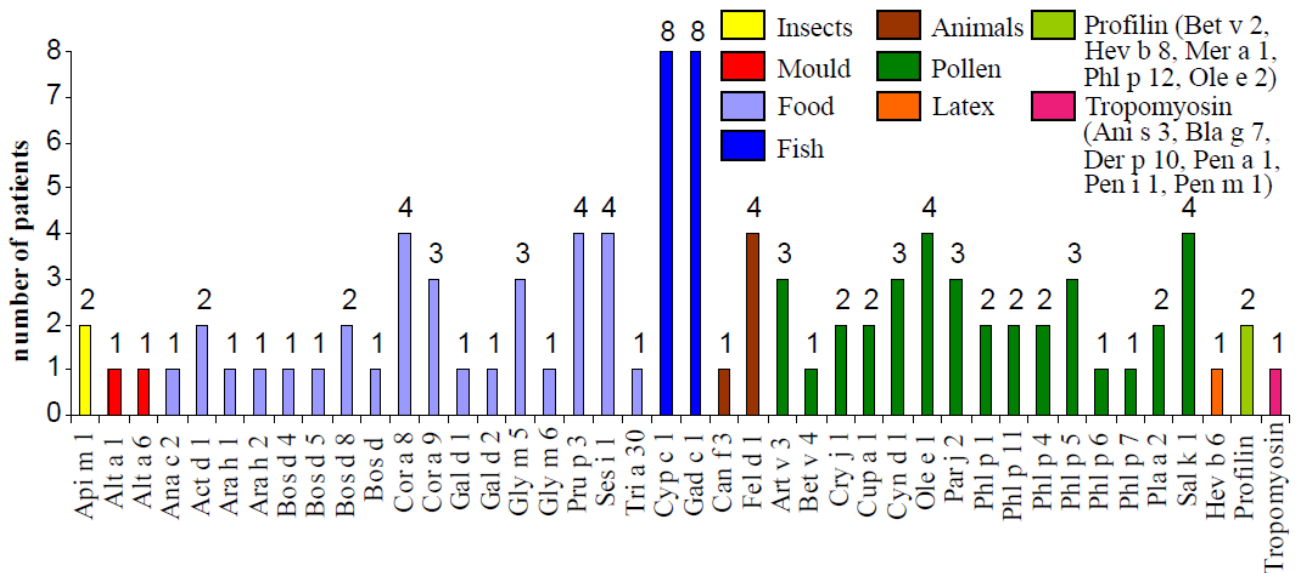
Το άγριου τύπου (wild) αλλεργιογόνο μόριο εμφανίζει μια ανάλογη της τιτλοποίησης αυξανόμενη αντιδραστικότητα στην πρόκληση σχηματισμού πομφού, με σχετική επιπέδωση μεταξύ των συγκεντρώσεων 4mcg/ml και 16mcg/ml, καταδεικνύοντας τη συγκέντρωση των 32mcg/ml ως τη βέλτιστη για την εκτέλεση των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών σύμφωνα και με τη σύμπτωση μέγιστης αντιδραστικότητας των αντίστοιχων φυσικών εκχυλισμάτων.

Το υποαλλεργιογονικό (mutant) αλλεργιογόνο μόριο εμφανίζει μια ανάλογη της τιτλοποίησης αυξανόμενη αντιδραστικότητα στο σχηματισμό πομφού με γραμμική σχεδόν συμπεριφορά, παραμένοντας όμως κάτω του ορίου των 3mm μέχρι και τη συγκέντρωση των 16mg/ml.

Επίσης το υποαλλεργιογόνο (mutant) αλλεργιογόνο μόριο εμφανίζει σαφή σημαντική μείωση της αντιδραστικότητας του σε σχέση με το αντίστοιχο του άγριου τύπου, ιδιότητα κατ' εξοχήν σημαντική για την εν δυνάμει χρήση του ως μόριο εφαρμογής ειδικής ανοσοθεραπείας.

Στα δώδεκα παιδιά με την καλώς χαρακτηρισμένη και βαθμονομημένη αναφυλαξία στο ψάρι έγινε πλήρης μελέτη του αλλεργικού τους προφίλ και της αντιδραστικότητάς τους στα δύο μελετώμενα μόρια. Συγκεκριμένα έγινε πλήρης ορολογικός χαρακτηρισμός της ευαισθητοποίησης τους και λεπτομερής μελέτη της αντιδραστικότητάς τους στις δερματικές διανογμού δοκιμασίες.

Το προφίλ ευαισθητοποίησης τους προσδιορίστηκε μετά ορολογικό έλεγχο με τη χρήση του biochip ImmunoCAP ISAC 103 (Thermo Fisher, Vienna, Austria). Η διαδικασία ελέγχου ολοκληρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του biochip από τον κατασκευαστή του. Οι τιμές ειδικών IgE εκφράστηκαν ως ISAC Standardised Units (ISU) με αντιπαραβολή της μέσης τιμής φθορισμού με προηγούμενα εγκατεστημένη καμπύλη τιμών αναφοράς. Αποτελέσματα μικρότερα του ορίου των 0.3 ISU θεωρήθηκαν αρνητικά (ακόλουθο γράφημα).

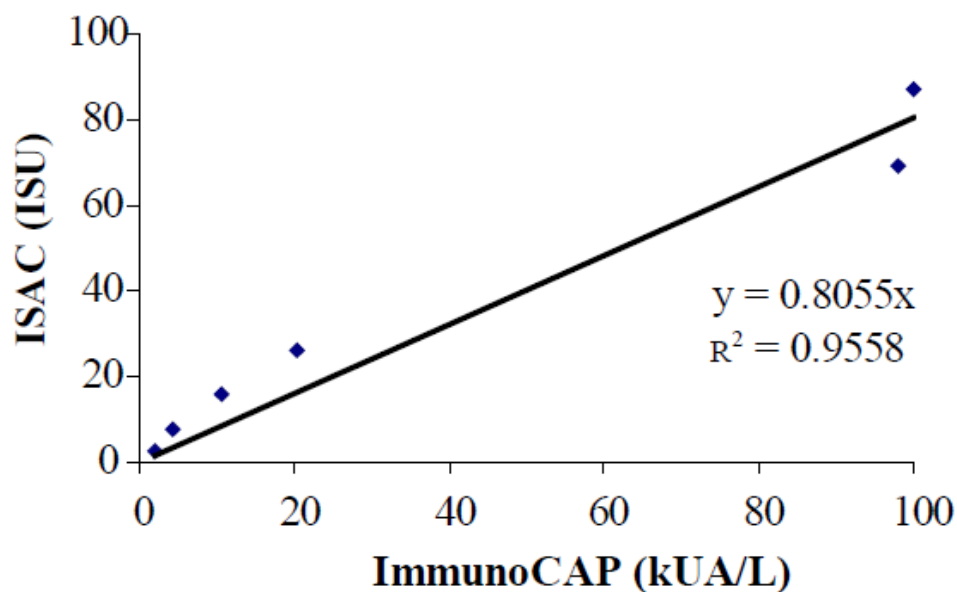


Ευαισθητοποιήσεις σε αλλεργιογόνα μόρια, αναπνευστικής ή και τροφικής αλλεργίας, άλλα από το ψάρι ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ασθενείς. Ειδική IgE για την παρβαλουμίνη του κυπρίνου (Carp – Cyp c 1) και του ομολόγου του αλλεργιογόνου (Codfish – Gad c 1) του βακαλαίου ανιχνεύθηκε σε όλους τους ορούς των ασθενών. Επιπρόσθετα η ειδική IgE για το Cyp c 1 μετρήθηκε ποσοτικά με χρήση του ειδικού, για το σύστημα ImmunoCAP, αντίστοιχου αλλεργιογόνου αντιδραστηρίου f355 (Thermo Fisher, Vienna, Austria) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του από τον κατασκευαστή του. Οι τιμές ειδικής IgE εκφράστηκαν σε kUA/L σε αντιπαραβολή με προηγούμενα εγκατεστημένη καμπύλη αναφοράς. Εκ νέου οι οροί των ασθενών με αναφυλαξία στο ψάρι ελέγχθηκαν, με τις τιμές της ειδικής IgE για το Cyp c 1 να κυμαίνονται από 2 έως > 100 kUA/L. Αποτελέσματα των μετρήσεων της ειδικής IgE εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

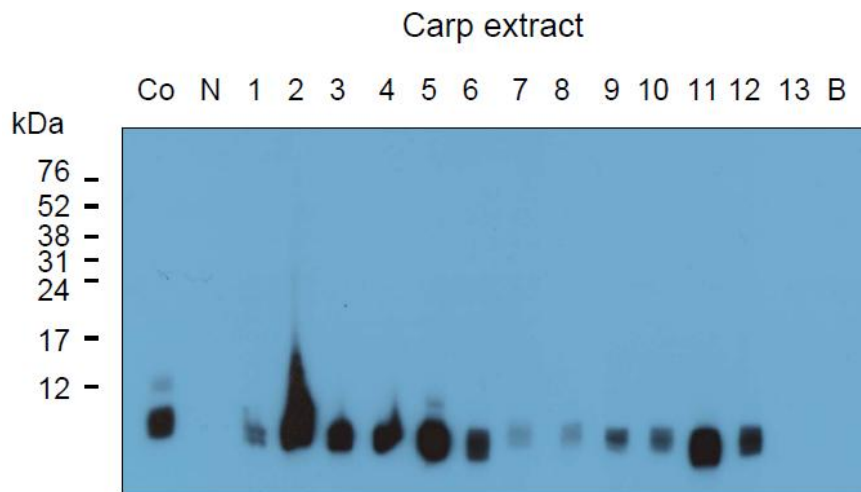
Ειδικές για το αλλεργιογόνο ανοσιακές αποκρίσεις

| Ασθενείς no. | Αριθμός ευαισθητοποιήσεων σε άλλα αλλεργιογόνα | ImmunoCAP kUA/L | ISAC ISU | SPT βακαλάος πομφός mm2 |
|-----------------|--|--------------------|-------------|-------------------------------|
| 1 | 8 | 4,21 | 7,78 | 25,27 |
| 2 | 27 | 100,00 | 87,08 | 88,57 |
| 3 | n.d. | n.d. | n.d. | 50,84 |
| 4 | 30 | 20,30 | 26,01 | 70,38 |
| 5 | n.d. | n.d. | n.d. | 48,93 |
| 6 | 5 | 10,50 | 15,73 | 114,28 |
| 7 | 1 | 2,08 | 2,76 | 47,05 |
| 8 | 10 | 2,16 | 2,87 | 33,05 |
| 9 | 9 | 25,40 | 21,54 | 60,64 |
| 10 | n.d. | n.d. | n.d. | 7,22 |
| 11 | 14 | 98,00 | 68,99 | 27,03 |
| 12 | n.d. | n.d. | n.d. | 30,13 |
| NA | | | | |

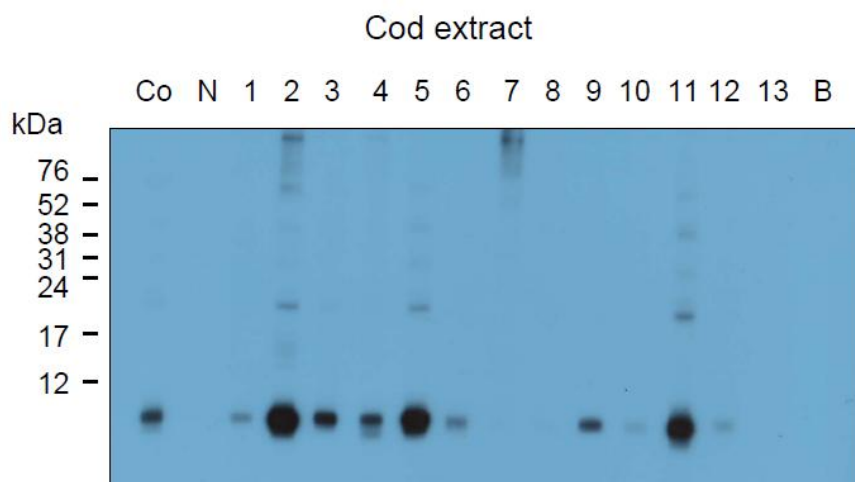
Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε καλή συσχέτιση μεταξύ των, με ImmunoCAP και ISAC μέθοδο, μετρήσεων της ειδικής IgE για το Cyp c 1, με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.9558$. Συνεπώς με χρήση του Cyp c 1, ως αντιδραστηρίου μέτρησης ειδικής IgE, το αποτέλεσμα της μίας μεθόδου προβλέπεται / ερμηνεύεται από την άλλη κατ' 95% και πλέον (ακόλουθο γράφημα).



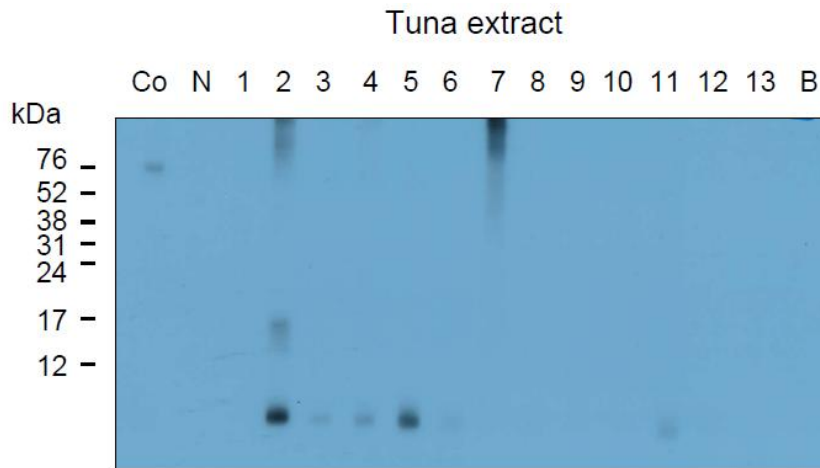
Μελετήθηκε επιπλέον η ειδική IgE αντιδραστικότητα των ορών των ασθενών με αναφυλαξία στο ψάρι έναντι εκχυλισμάτων βακαλάου, τόνου και κυπρίνου σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Εκχυλίσματα πρωτεΐνης των αναφερθέντων ψαριών διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και προσροφήθηκαν σε σημεία σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μετά τη σταθεροποίηση τους σε PBST (PBS (pH 7.5) περιέχον 0.5% v/v Tween 20) τα φύλλα νιτροκυτταρίνης επώασθησαν με τους ορούς των ασθενών και τους προηγούμενα χρησιμοποιηθέντες μάρτυρες. Τα δεσμευμένα ειδικά IgE αντισώματα ανιχνεύθηκαν με αραιωμένο 1/15 ιωδιο125 – σημασμένο, εναντι ανθρώπινου IgE αντίσωμα κονίκλου (IBL, Hamburg, Germany) και οπτικοποιήθηκαν με χρήση αυτοακτινογραφίας ραδιοσημασμένων μορίων (ακόλουθες εικόνες).



Μελέτη IgE αντιδραστικότητας των ορών ασθενών αλλεργικών σε ψάρι έναντι εκχυλίσματος πρωτεΐνης κυπρίνου.



Μελέτη IgE αντιδραστικότητας των ορών ασθενών αλλεργικών σε ψάρι έναντι εκχυλίσματος πρωτεΐνης βακαλάου.



Μελέτη IgE αντιδραστικότητας των ορών ασθενών αλλεργικών σε ψάρι έναντι εκχυλίσματος πρωτεΐνης τόνου.

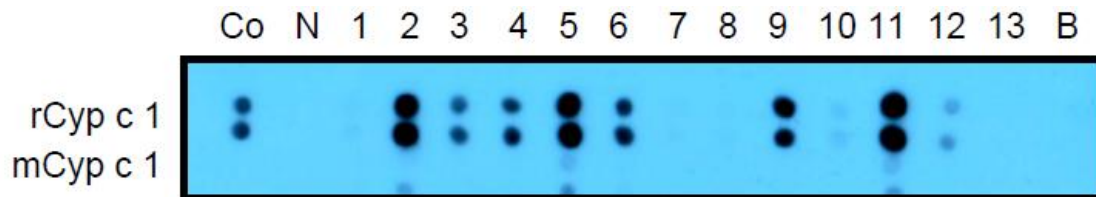
Τα περιγραφέντα πειράματα ανοσοαποτύπωσης της ειδικής IgE αντιδραστικότητας των ορών ασθενών με αλλεργία σε ψάρι έναντι των εκχυλισμάτων πρωτεϊνών, κυπρίνου, βακαλάου και τόνου κατέδειξαν τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ διαφορετικών ειδών ψαριών. Η όμοια έκφραση αντιδραστικότητας έναντι του εκχυλίσματος κυπρίνου και βακαλάου στη μπάντα των 12 kDa ανέδειξαν την παρβαλβουμίνη ως το μείζον αλλεργιογόνο του ψαριού, κοινό σε διαφορετικά είδη και υπεύθυνο της διασταυρούμενης αλλεργίας.

Η όμοια αλλά μειωμένη αντιδραστικότητα έναντι του εκχυλίσματος τόνου στη μπάντα των 12 kDa ανέδειξε την μειωμένη αλλεργιογονικότητα του συγκεκριμένου είδους ψαριού εξαιτίας της μειωμένης περιεκτικότητας του σε πρωτεΐνη, παρβαλβουμίνη. Τούτο είναι γνωστό από μελέτες προσδιορισμού παρβαλβουμίνης ανα γραμμάριο ιστού που βρίσκεται στα, < 0.05 mg στον τόνο, 1 – 2.5 mg στον βακαλάο, >2.5 mg στον κυπρίνο(138). Επίσης στην κλινική πράξη, από τη φυσική ιστορία της αλλεργίας σε ψάρι καθώς συχνά οι ασθενείς με αλλεργία σε ψάρι αναφέρουν ότι βρώση τόνου ανέχονται χωρίς πρόβλημα. Επιπλέον από την καθημερινή πρακτική χειρισμού της αλλεργίας σε ψάρι καθώς ο τόνος αποτελεί μία από τις πρώτες επιλογές, χορήγησης ψαριού σε αυτούς τους ασθενείς μετά από πρόκληση, στην προσπάθεια επανεισαγωγής των ψαριών στη διατροφή τους.

Μελέτη της αντιδραστικότητας της υποομάδας των ασθενών, με καλώς χαρακτηρισμένη αναφυλαξία σε διαφορετικά είδη ψαριών, έγινε στη συνέχεια έναντι του άγριου τύπου (wild – rCyp c 1) και του υποαλλεργιογόνου (mutant – mCyp c 1) μορίου παρβαλβουμίνης κυπρίνου στο επίπεδο αντιδραστικότητας του ορού των ασθενών και στο επίπεδο αντιδραστικότητας δια νυγμού εφαρμοζόμενων δερματικών δοκιμασιών.

Ο χαρακτηρισμός της αντιδραστικότητας του ορού των ασθενών προσδιορίστηκε έναντι του άγριου τύπου (wild – rCyp c 1) και του υποαλλεργιογόνου (mutant – mCyp c 1) αλλεργιογόνου μορίου με πειράματα ανοσοπροσρόφησης σημείου. Για τα συγκεκριμένα πειράματα της μελέτης, 0.5 μg του rCyp c 1 και του mCyp c 1 προσροφήθηκαν εις διπλούν σε σημεία σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Οι ανα σημεία προσροφηθήσες πρωτεΐνες εκτέθηκαν στους ορούς ορισμένων των ασθενών (εκτός των 1, 7, 8), με αναφυλαξία σε ψάρι. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι οροί ενός ενήλικα

ασθενούς με αλλεργία στο ψάρι, ενός ενήλικα χωρίς αλλεργία στο ψάρι, ενός παιδιού (ασθενής 13) με κυτταρικά μεσολαβούμενη νόσο, εντεροκολίτιδας από πρωτεΐνες σε ψάρι (Food Protein Enterocolitis Syndrome – FPIES) και ο ρυθμιστής του διαλύματος (buffer). Όλοι οι οροί εφαρμόστηκαν μετά αραιώση 1/10 σε PBST (PBS (pH 7.5) περιέχον 0.5% v/v Tween 20). Τα δεσμευμένα ειδικά IgE αντισώματα ανιχνεύθηκαν με αραιωμένο 1/15 ιωδιο125 – σημασμένο, εναντι ανθρώπινου IgE, αντίσωμα κονίκλου (IBL, Hamburg, Germany) και οπτικοποιήθηκαν με αυτοακτινογραφία ραδιο-σημασμένων μορίων (ακόλουθη εικόνα).



Όπως καταδεικνύεται από την οπτικοποιημένη ένταση ανοσοπροσρόφησης στα διαφορετικά σημεία, εκδηλώνεται σαφώς μειωμένη έως μηδενιζόμενη αντιδραστικότητα των ορών των ασθενών έναντι του υποαλλεργιογονικού μορίου (mCyp c 1) σε σύγκριση με το άγριου τύπου (rCyp c 1) αλλεργιογόνο μόριο για όλους τους ασθενείς. Ίδια αντιδραστικότητα εκδηλώνεται για το θετικό μάρτυρα (Co), ενώ δεν εκδηλώνεται αντιδραστικότητα για τον αρνητικό μάρτυρα (N), τον ασθενή (ασθενής 13) με κυτταρικά μεσολαβούμενη νόσο, εντεροκολίτιδας από πρωτεΐνες σε ψάρι (Food Protein Enterocolitis Syndrome – FPIES) και τον ρυθμιστή (B) διαλύματος. Τούτο καταδεικνύει επιπλέον την καθαρότητα πρωτεΐνης των γενετικά ανασυνδυασμένων μοριακών αλλεργιογόνων και την με ακρίβεια αντιδραστικότητα τους στις ειδικές IgE των ασθενών με αλλεργία στο ψάρι.

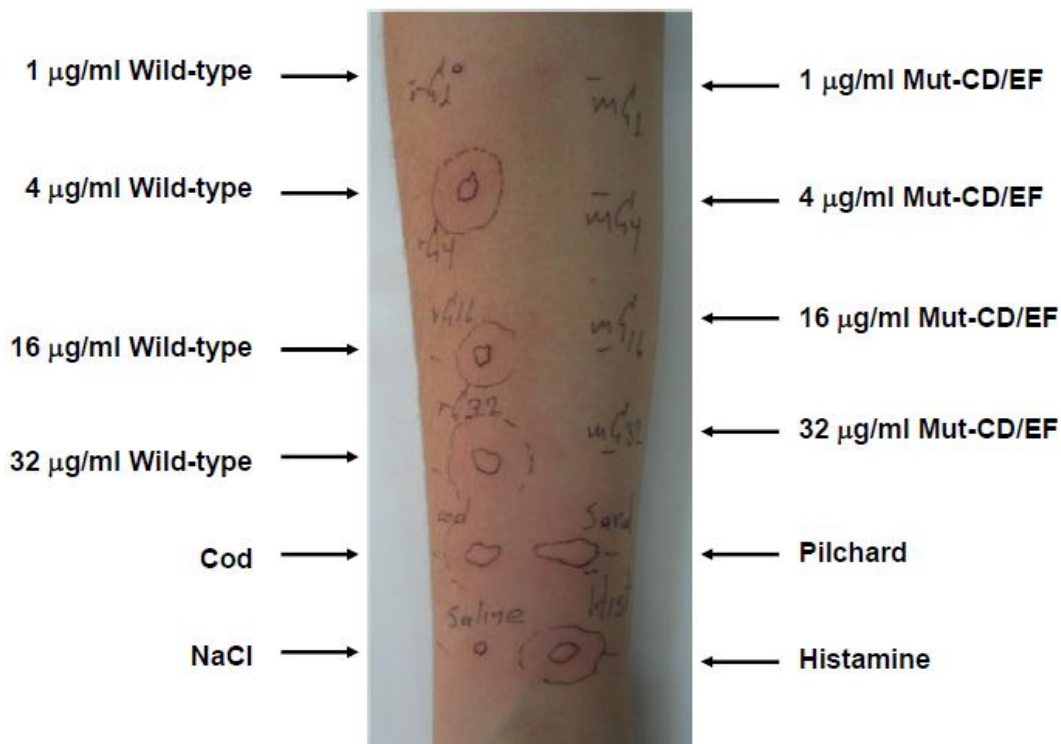
Ο χαρακτηρισμός της αντιδραστικότητας δια δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών, εκτελέστηκε επίσης στους δώδεκα ασθενείς με αναφυλαξία σε ψάρι. Διάλυμα ισταμίνης (10mg/mL), διάλυμα φυσιολογικού ορού 0.9% NaCl, τυποποιημένα εκχυλίσματα πρωτεΐνης βακαλάου (cod – Stallergens-Laboratories) και πρωτεΐνης σαρδέλας (Sardine – Stallergens-Laboratories) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα αλλεργιογόνα μόρια άγριου τύπου (wild – rCyp c 1) και υποαλλεργιογόνο (mutant – mCyp c 1) εφαρμόστηκαν στις επιλεγμένες αναφερθείσες αραιώσεις 1mcg/ml, 4mcg/ml, 16mcg/ml και 32mcg/ml.

Όλοι οι ασθενείς με αλλεργία σε ψάρι είχαν θετική αντίδραση στα εκχυλίσματα πρωτεΐνης βακαλάου και σαρδέλας. Το ανασυνδυασμένο άγριου τύπου (wild – rCyp c 1) αλλεργιογόνο μόριο εμφάνισε μια ανάλογη της τιτλοποίησης αυξανόμενη αντιδραστικότητα στην πρόκληση σχηματισμού πομφού σε όλους τους ασθενείς. Το ανασυνδυασμένο υποαλλεργιογόνο (mutant – mCyp c 1) μόριο εμφάνισε μια ανάλογη της τιτλοποίησης αυξανόμενη αντιδραστικότητα στο σχηματισμό πομφού σε όλους τους ασθενείς. Η αντιδραστικότητα του χαρακτηρίστηκε από σαφή μείωση της σε σύγκριση με το άγριου τύπου (wild – rCyp c 1) αλλεργιογόνο μόριο. Επιβεβαιώνεται συνεπώς και με τις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες, που εφαρμόζονται για

πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη, η μειωμένη αλλεργιογονικότητα του κατά τον άμεσο έλεγχο σε ασθενείς με αναφυλαξία στο ψάρι. Τούτο του προσδίδει ιδιότητα κατ' εξοχήν σημαντική στο επίπεδο της ασφάλειας για την εν δυνάμει χρήση του ως μόριο εφαρμογής ειδικής ανοσοθεραπείας (ακόλουθες εικόνες, γραφήματα).

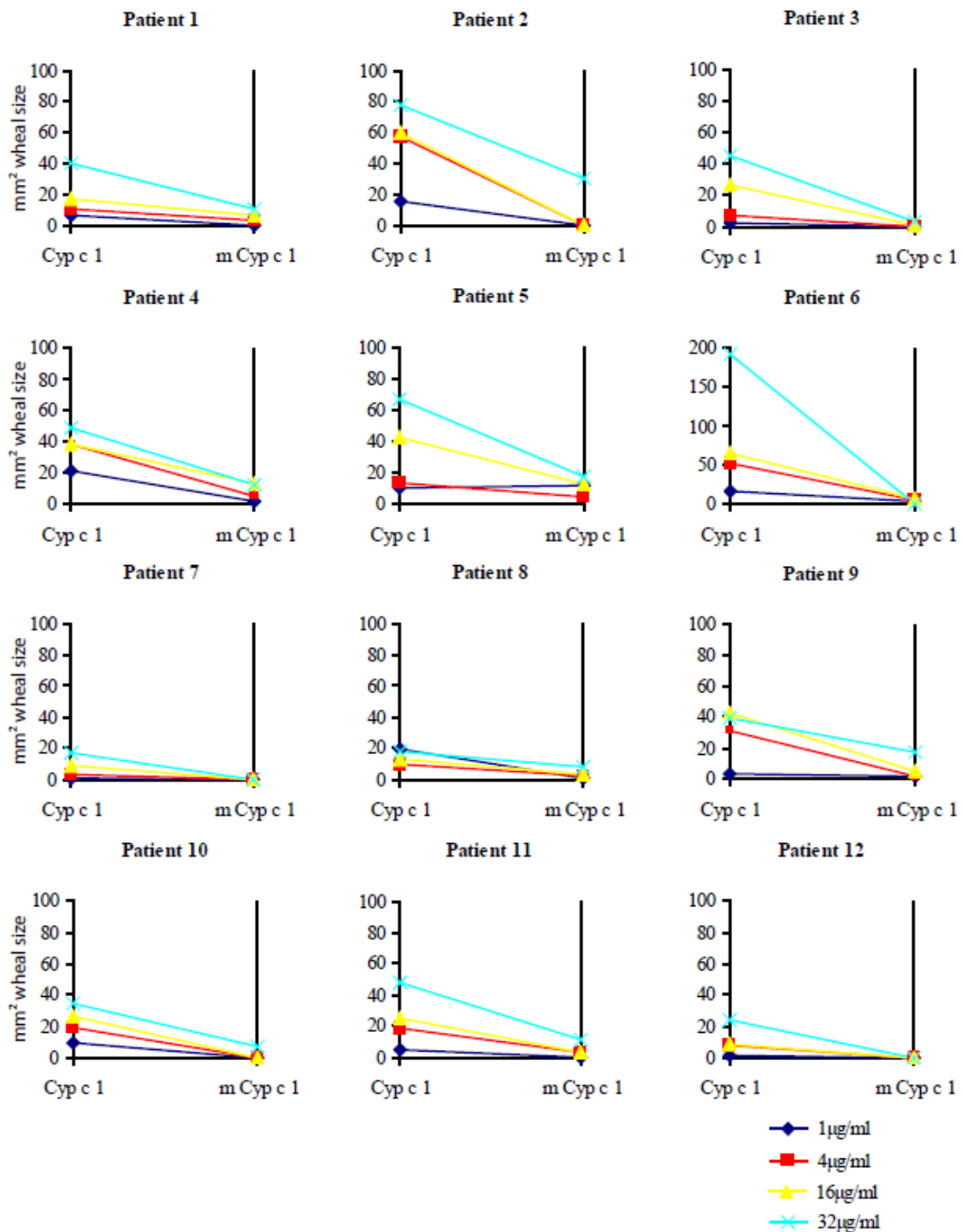


Ειδική IgE αντιδραστικότητα, δια δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών, στα υπο μελέτη ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα μόρια rCyp c 1 και mCyp c 1 σε ασθενή 4 ετών.



Ειδική IgE αντιδραστικότητα, δια δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών, στα υπο μελέτη ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα μόρια rCyp c 1 και mCyp c 1 σε ασθενή ηλικίας 14 ετών.

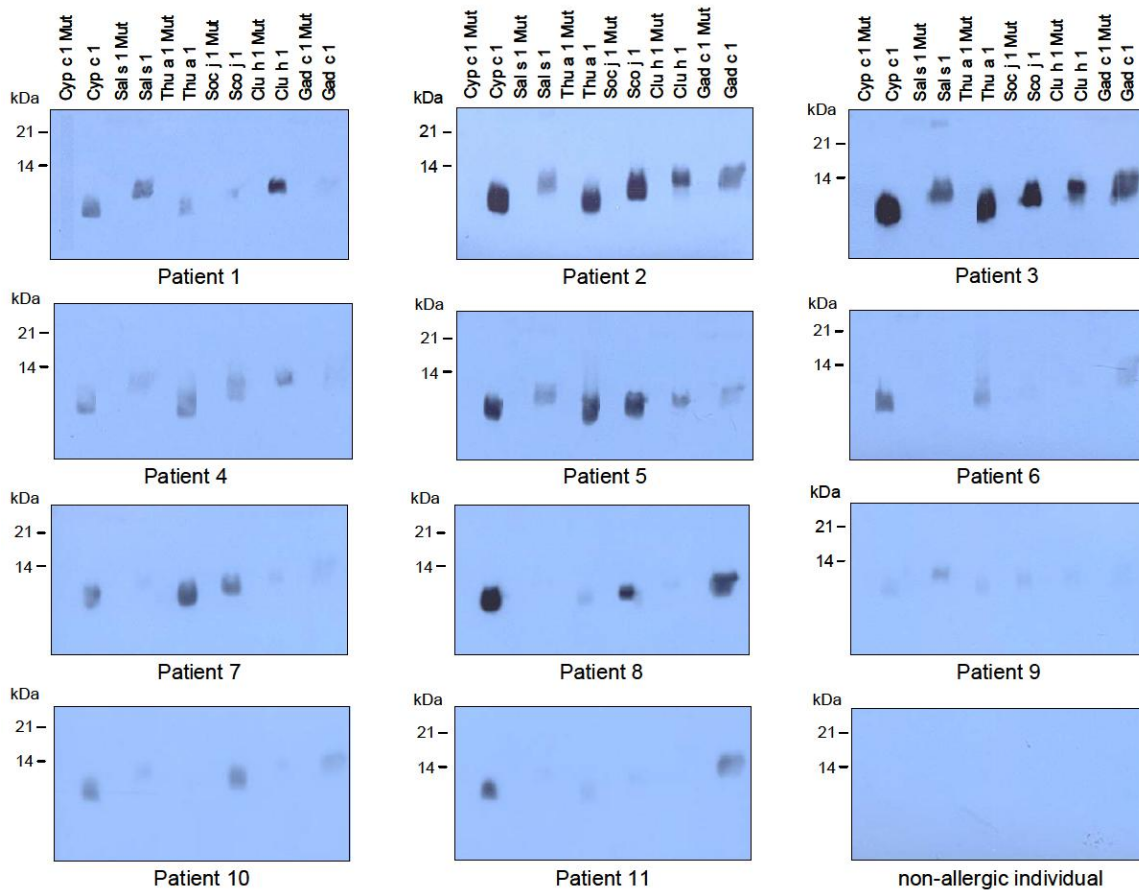
Οι παρατηρούμενες διαφορές της ειδικής IgE αντιδραστικότητας, μεταξύ των ασθενών όπως εκφράστηκαν στις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες είναι σύμφωνες με το εύρος έκφρασης της ατοπίας τους και τα επίπεδα ειδικής IgE ορού. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με αυξημένη βαρύτητα συστηματικής αλλεργικής νόσου με εκδηλώσεις ατοπικής δερματίτιδας και αλλεργικής ρινίτιδας και άσθματος και επιπρόσθετα τροφική αλλεργία σε αλλεργιογόνα άλλα από το ψάρι, κυρίως σε φυσίκι και άλλους ξηρούς καρπούς, εμφάνισαν τη μεγαλύτερη IgE αντιδραστικότητα (ασθενείς 2, 3, 4, 5, 6, 9, γράφημα). Αντιθέτως οι ασθενείς με μερική έκφραση συστηματικής αλλεργικής νόσου με εκδηλώσεις ατοπικής δερματίτιδας, χωρίς ή με ήπια αλλεργική ρινίτιδα, χωρίς ή με ήπιο άσθμα, χωρίς ή με τροφική αλλεργία σε λιγότερα αλλεργιογόνα άλλα από το ψάρι, εμφάνισαν μικρότερη αντιδραστικότητα και στα δύο υπό μελέτη ανασυνδυασμένα μόρια (ασθενείς 1, 7, 8, 10, 11, 12, γράφημα).



Η διαβάθμιση βαρύτητας της συστηματικής αντίδρασης – αναφυλαξίας στο ψάρι ωστόσο, όπως αξιολογήθηκε για τους συγκεκριμένους ασθενείς, δεν παρακολούθει επ'ακριβώς την εκδηλούμενη τάση αντιδραστικότητας όπως εκφραστηκε στις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες, τα επίπεδα ειδικής IgE ορού και τη συνολική αλλεργική νόσο. Κατά τη βαθμονόμηση της συστηματικής αντίδρασης – αναφυλαξίας των συγκεκριμένων ασθενών, βαρύτητας δευτέρου βαθμού ήταν οι συστηματικές αντιδράσεις των ασθενών 1, 2, 3, 4, 7, 8, 12, τρίτου βαθμού οι αντιδράσεις των ασθενών 5, 6, και τετάρτου βαθμού οι αντιδράσεις για τους 9, 10 και 11 ασθενείς. Κατά πόσον τούτο αποτελεί ένδειξη ότι η αλλεργία στο ψάρι στην πλήρη έκφραση της ως συστηματική αντίδραση – αναφυλαξία διέπεται από ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την φυσική ιστορία της νόσου ή άλλους παράγοντες μένει να αποδειχθεί σε νεώτερες μελέτες.

Η ειδική IgE αντιδραστικότητα των δια νυγμού δοκιμασιών, παρέμεινε με σημαντική ακρίβεια για όλους τους ασθενείς, εξαρτώμενη της τιτλοποίησης του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και για τα δύο υπο μελέτη μόρια για τον ίδιο κάθε ένα ασθενή. Τούτο αποτελεί ένδειξη δυνατότητας εξατομικευμένης τιτλοποίησης, για το άγριου τύπου (wild – rCyp c 1) αλλεργιογόνο μόριο στη μελέτη της φυσικής πορείας της νόσου. Για δε το υποαλλεργιογόνο μόριο (mutant – mCyp c 1) ένδειξη δυνατότητας εξατομικευμένης τιτλοποίησης, κατ' εξοχήν σημαντική στη μελλοντική δημιουργία πρωτοκόλλων χορήγησης, για τον εξατομικευμένο προγραμματισμό εν δυναμει ειδικής ανοσοθεραπείας απευαισθητοποίησης στη αλλεργία στο ψάρι.

Μελετήθηκε στη συνέχεια η ειδική IgE αντιδραστικότητα του ορού των ασθενών με καλώς χαρακτηρισμένη αλλεργία σε κοινής κατανάλωσης αλλά διαφορετικά, φυλογενετικά απομακρυσμένα μεταξύ τους, είδη ψαριών, έναντι των νέων δημιουργηθέντων άγριου τύπου (wild) και υποαλλεργιογόνου (mutant), αλλεργιογόνων μορίων των (Sal s 1 – Atlantic salmon) του σολωμού, (Thu a 1 – tuna) του τόνου, (Sco j 1 – chub macherel) του κολιού, (Clu h 1 – herring) της ρέγγας και (Gad c 1 – codfish) του βακαλάου. Η μελέτη έγινε σε σύγκριση με τη γνωστή αντιδραστικότητα έναντι των άγριου τύπου (wild – rCyp c 1) και υποαλλεργιογόνου (mutant – mCyp c 1) του κυπρίνου σε πειράματα ανοσοαποτόπωσης. Τα γενετικά ανασυνδυασμένα μόρια των επιλεγμένων ψαριών διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και προσροφήθηκαν σε σημεία σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο πείραμα των εκχυλισμάτων. Μετά τη σταθεροποίηση τους σε PBST (PBS (pH 7.5) περιέχον 0.5% v/v Tween 20) τα φύλλα νιτροκυτταρίνης επωάσθησαν με τους ορούς των ασθενών και του μη αλλεργικού σε ψάρι μάρτυρα. Τα δεσμευμένα ειδικά IgE αντισώματα ανιχνεύθηκαν με αραιωμένο 1/15 ιωδιο125 – σημασμένο, έναντι ανθρώπινου IgE αντίσωμα κονίκλου (IBL, Hamburg, Germany) και οπτικοποιήθηκαν με χρήση αυτοακτινογραφίας ραδιοσημασμένων μορίων (ακόλουθη εικόνα).



Όπως εμφανίζεται στην εικόνα οι οροί των ασθενών ένα έως και πέντε εκδηλώνουν ειδική IgE διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ποικίλης έντασης στα μόρια παρβαλβουμίνης άγριου τύπου (*wild type*) των διαφορετικών ειδών ψαριών. Οι ασθενείς έξι έως έντεκα εκδηλώνουν μια εκλεκτική σχετικά ειδική IgE αντιδραστικότητα έναντι μορίων παρβαλβουμίνης άγριου τύπου (*wild type*) συγκεκριμένων ειδών ψαριών επιβεβαιώνοντας τις αναφορές εκλεκτικής αντιδραστικότητας. Ο ορός του μη αλλεργικού στο ψάρι μάρτυρα δεν εκδηλώνει αντιδραστικότητα έναντι όλων των μελετώμενων μορίων. Το σημαντικό εύρημα ωστόσο του πειράματος είναι ότι όλοι οι ασθενείς εκδηλώνουν μηδενική αντιδραστικότητα έναντι των γενετικά ανασυνδυασμένων υποαλλεργιογόνων (*mutant*) μορίων όλων των επιλεγμένων διαφορετικών ειδών ψαριών. Τούτο αποδεικνύει ότι η πρόκληση μετάλλαξης με την περιγραφείσα τεχνική σημειακής μετάλλαξης, στο μόριο παρβαλβουμίνης όποιου είδους ψαριού, ακριβώς στα ίδια αμινοξέα τα ελέγχοντα την σύνδεση ιόντων Ca^{2+} υπολείμματα ασπαρτικού οξέος με υπολείμματα αλανίνης όπως και στην παρβαλβουμίνη του κυπρίνου *Cyp c 1*, μπορεί να αποτελεί μία ευρέως εφαρμόσιμη στρατηγική για τη μετατροπή των διαφορετικών αλλεργιογόνων μορίων παρβαλβουμίνης στα αντίστοιχα υποαλλεργιογόνα μόρια. Επιβεβαιώνεται συνεπώς ακόμη και στους ασθενείς με εκλεκτική αντιδραστικότητα έναντι συγκεκριμένης παρβαλβουμίνης άλλης του κυπρίνου (*Cyp c 1*) η δυνατότητα εξατομικευμένης κατασκευής και τιτλοποίησης του αντίστοιχου αλλεργιογόνου άγριου τύπου (*wild type*) και υποαλλεργιογόνου (*mutant*) μορίου. Ολοκληρώνεται έτσι η συνολική στρατηγική στη μελλοντική προοπτική παρακολούθησης της φυσικής πορείας της νόσου και δημιουργίας πρωτοκόλλων χορήγησης για τον εξατομικευμένο προγραμματισμό εν δυναμει ειδικής ανοσοθεραπείας απευαισθητοποίησης της αλλεργίας στα ψάρια.

12.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διάγνωση της τύπου I ή ειδικής IgE μεσολαβούμενης αλλεργίας βασίζεται στην ανίχνευση του ειδικού IgE αντισώματος για το αλλεργιογόνο στον ορό του αίματος ή στην άμεση εκδήλωση των συμπτωμάτων με τη δοκιμασία πρόκλησης στο υπεύθυνο αλλεργιογόνο (δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού, ρινική, βρογχική, επιπεφυκότα πρόκληση). Η ειδική για το αλλεργιογόνο ανοσοθεραπεία αποτελεί τη μόνη αιτιολογική και δυνάμενη να οδηγήσει σε αποδρομή της νόσου ή πρόληψη εξέλιξής της, θεραπεία. Καθίσταται επομένως προφανής η ανάγκη για ακριβή ανίχνευση της προκαλούσας τη νόσο υπεύθυνης αλλεργιογόνου μοριακής οντότητας κατά τη διάγνωση όπως και η βέβαιη γνώση ότι η συγκεκριμένη μοριακή οντότητα εμπεριέχεται στην αναγκαία ποσότητα στη χορηγούμενη ανοσοθεραπεία. Τέτοιοι προβληματισμοί αναδεικνύονται ακόμη περισσότερο στη Νότια Ευρώπη, συμπεριλαμβανόμενης της Ελλάδας, όπου οι αλληλοεπικαλυπτόμενες περίοδοι γυρεοφορίας των φυτών και η κατανάλωση αρκετών τροφών φυτικής προέλευσης όπως και κατανάλωση αφθονίας ψαριών και θαλασσινών συσκοτίζουν την τελική ακριβή διάγνωση.

Ως αλλεργιογόνος πηγή ή πρότυπο ορίζεται το βιολογικό υλικό προέλευσης του αλλεργιογόνου ενώ ως αλλεργιογόνο εκχύλισμα χαρακτηρίζεται το μείγμα αλλεργιογόνων και μη αλλεργιογόνων τμημάτων που λαμβάνουμε, με τη βέλτιστη μεθοδολογία εκχύλισης συνήθως υδατικής, από την αλλεργιογόνο πηγή. Αποτελεί ωστόσο κοινή συνήθεια να ονομάζουμε και χαρακτηρίζουμε τελικά «αλλεργιογόνο» την αλλεργιογόνο πηγή ή το εκχύλισμα αλλεργιογόνου, γεγονός που προκαλεί σύγχυση δεδομένου ότι, τουλάχιστον στην επιστημονική κοινότητα και τη μεταξύ των επιστημόνων επικοινωνία, αλλεργιογόνο ορίζεται εκείνη η μοριακή οντότητα που δύναται να δεσμεύει με ικανή ακρίβεια σε ορισμένους αλλεργιογονικούς επιτόπους, τα ειδικά IgE αντισώματα και να προκαλεί αλλεργική αντίδραση. Τα τελευταία χρόνια η μοριακή αλλεργιολογία επέτρεψε την ακριβέστερη ταυτοποίηση της υπεύθυνης αλλεργιογόνου μοριακής οντότητας, δηλαδή αλλεργιογόνου μορίου, ξεπερνώντας τα μειονεκτήματα των φυσικών εκχυλισμάτων, συχνά μειγμάτων αλλεργιογόνων μορίων, με κάποια εξ' αυτών ειδικά της αλλεργιογόνου πηγής και άλλα διασταυρούμενης ή άγνωστης ακόμη αλλεργιογονικότητας.

Η διάγνωση με χρήση αλλεργιογόνων εκχυλισμάτων ταυτοποιεί την ευαισθητοποίηση σε συγκεκριμένη αλλεργιογόνο πηγή, αλλά αδυνατεί να προσδιορίσει την μοριακή οντότητα του προκαλούντος τη νόσο αλλεργιογόνου, όπως και τους λειτουργούντες υποκείμενους ανοσολογικούς μηχανισμούς. Αντίθετα η διάγνωση με τη χρήση προτυποποιημένων αλλεργιογόνων μορίων μπορεί να προσδιορίσει με ακρίβεια και στοιχειακά τις αντισωματικές, κυτταρικές και βιολογικές αντιδράσεις έναντι σαφώς καθορισμένης μοριακής οντότητας. Οι νέες τεχνικές γενετικού ανασυνδυασμού και παρέμβασης στο επίπεδο του συμπληρωματικού DNA (cDNA) στην παραγωγή γενετικά ανασυνδυασμένων, προτύπων αλλεργιογόνων μορίων προσφέρουν τη δυνατότητα για ακριβή αναπαραγωγή των υπεύθυνων φυσικών αλλεργιογόνων μορίων για χρήση στην ειδική μοριακή, στοιχειακή πλέον, διάγνωση ιδιαίτερα σε πολυευαισθητοποιημένους αλλεργικούς ασθενείς και ασθενείς με διασταυρούμενη αλλεργία.

Η συγκεκριμένη αρχή, της χρήσης καθορισμένων προτυποποιημένων αλλεργιογόνων μορίων για την διάγνωση της τύπου I ή IgE μεσολαβούμενης αλλεργίας, ορίζεται και καλείται ειδική στοιχειακή διάγνωση αλλεργίας. Η ακριβής διάγνωση βελτιστοποιεί το λεπτομερή προσδιορισμό και κατανόηση του προφίλ ευαισθητοποίησης του αλλεργικού ασθενούς και παρέχει συνεπώς τα μέσα για τη βελτιστοποίηση μιας επιτυχούς αντιμετώπισης της αλλεργικής

νόσου. Η ειδική στοιχειακή διάγνωση καθιστά δυνατή τη βέλτιστη αντιμετώπιση της αλλεργικής νόσου, δηλαδή μια ειδική στοιχειακή αντιμετώπιση δυνάμενη να εξατομικεύεται στο συγκεκριμένο ασθενή.

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής είχε ως σκοπό τη διαγνωστική διερεύνηση αλλεργικών ασθενών, για πρώτη φορά σε παιδιατρικό πληθυσμό, για τρία μείζονα αλλεργιογόνα, τα ακάρεα της οικιακής σκόνης, το μείζον των αγρωστωδών, γρασίδι είδους Timothy και το ψάρι, με συγκριτική εφαρμογή των γνωστών χρησιμοποιούμενων εκχυλίσμάτων τους και των αντίστοιχων γενετικά ανασυνδυασμένων μορίων τους. Το προσδοκώμενο όφελος είναι η βελτίωση, με τη χρήση των γενετικά ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων μορίων, της διάγνωσης της IgE μεσολαβούμενης αλλεργικής νόσου, κυρίως στις περιπτώσεις διασταυρούμενης αλλεργικής αντίδρασης και η εν δυνάμει προοπτική χρήση των υποαλλεργιογόνων παραγώγων τους στην εφαρμογή περισσότερο ασφαλούς και αποτελεσματικής ειδικής ανοσοθεραπείας στην αντιμετώπισή της.

Συγκεκριμένα για το γρασίδι είδους Timothy επελέγει ένα ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο με χαρακτηριστικά ανασυνδυασμένου άγριου τύπου (**wild type**) υβριδικού μεγαλομορίου (**hybrid-giant**) που περιέχει τα τέσσερα σημαντικά μείζονα αλλεργιογόνα μόρια **Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6**, ταυτόχρονα με τα επιμέρους μείζονα αλλεργιογόνα μόρια **Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6** του γρασιδιού σε σύγκριση με τα χρησιμοποιούμενα στην κλινική πράξη εκχυλίσματα των Timothy και Bermuda ως κύριους εκπροσώπους των αγρωστωδών. Σκοπός ήταν η διερεύνηση της εγκυρότητας, συσχέτισης και συμφωνίας στη διάγνωση, με εφαρμογή δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών, του υβριδικού μεγαλομορίου, καθώς και των επιμέρους μείζονων μοριακών αλλεργιογόνων που το αποτελούν (**Phl p1, Phl p5, Phl p6, Phl p2,**) με τα εκχυλίσματα των κύριων αντιπροσώπων (Timothy και Bermuda) των αγρωστωδών. Η κατασκευή του Giant_30 είχε εξαρχής σα στόχο τη διάγνωση της ευαισθητοποίησης ειδικά στο Timothy και γενικότερα στα αγρωστώδη. Από το μελετώμενο πληθυσμό προκύπτουν ισχυρές ενδείξεις ότι σε πολυευαισθητοποιημένους ασθενείς σε αεροαλλεργιογόνα της Μεσογείου το υβριδικό μεγαλομόριο ανίχνευει την ευαισθητοποίηση στο Timothy, ενώ παράλληλα λειτουργεί ικανοποιητικά στη διάγνωση της ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη, όταν ως εκπρόσωποι θεωρούνται τα Timothy και Bermuda. Οι δείκτες συσχέτισης Spearman και Kendal, όπως επίσης και ο δείκτης συμφωνίας kappa (k), βρέθηκαν αυξημένοι μεταξύ του νέου υβριδικού μορίου και του Timothy κυρίως, καθώς επίσης και στην περίπτωση συνευαισθητοποίησης στα δύο αγρωστώδη (μέση διάμετρος πομφού $\geq 3\text{mm}$). Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα στη συσχέτιση των μεθόδων και με χρήση των ROC καμπυλών. Τα ευρήματα συμφωνούν με μελέτη σε πληθυσμό ενηλίκων ασθενών(171) και επιβεβαιώνονται στη μελέτη μας σε παιδιατρικό πληθυσμό πολυευαισθητοποιημένων ασθενών. Για τους ασθενείς μας, όπου υπερείχε η Timothy ευαισθητοποίηση ($SPTs\text{-}Timothy > SPTs\text{-}Bermuda$) οι ανωτέρω δείκτες συσχέτισης ήταν αισθητά αυξημένοι, σε σχέση με τους ασθενείς όπου υπερείχε η Bermuda ($SPTs\text{-}Bermuda > SPTs\text{-}Timothy$) ευαισθητοποίηση. Η υπεροχή του Bermuda καθίστατο εμφανής καθώς τα επίπεδα ευαισθητοποίησης (τάξεις II, III, IV ImmunoCAP) στα αγρωστώδη ανέρχονταν, οπότε και οι δείκτες συσχέτισης παρουσίαζαν σταδιακά μείωση. Συνεπώς το υβριδικό μεγαλομόριο είναι κυρίως διαγνωστικό για το Timothy σε σχέση με το Bermuda αγρωστώδες. Διατηρεί ωστόσο ισόρροπη διαγνωστική ισχύ ως προς τα δύο ακόμα και όταν η ευαισθητοποίηση γενικά στα αγρωστώδη αυξάνει. Τούτο δείχνει να αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα του υβριδικού μεγαλομορίου, για χρήση του με μόνη τη δερματική δια νυγμού

δοκιμασία, σε έλεγχο ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη σε πολυευαισθητοποιημένους πληθυσμούς της Νοτίου Ευρώπης.

Συγχρόνως τα επιμέρους μείζονα αλλεργιογόνα μόρια σύμφωνα με τους ίδιους δείκτες συσχέτισης ανέδειξαν το βαθμό αντιπροσώπευσης τους στα πλήρη εκχύλισματα των δύο αγρωστωδών. Τα Phl p 1 και Phl p 2 δείχνουν να αντιπροσωπεύονται περισσότερο στο μόριο της γύρης του *Bermuda*, ενώ τα Phl p 5 και Phl p 6 περισσότερο σε αυτό του *Timothy*. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες όπου τα Phl p 1 και Phl p 2 εκδηλώνουν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των *Timothy* και *Bermuda*, με μόνο το Phl p 1 να συνοδεύεται από κλινική ενεργότητα (221). Αντίθετα τα Phl p 5 και Phl p 6 αντιπροσωπεύονται μόνο στο *Timothy* και την οικογένεια των *Pooideae* αγρωστωδών με συνοδό κλινική ενεργότητα (259).

Η ευαισθησία και η ειδικότητα του υβριδικού μεγαλομορίου βελτιστοποιούνται στη διάγνωση του *Timothy* στο όριο των 2 mm πομπού σύμφωνα με τις ROC καμπύλες ενώ αντίθετα ως προς το *Bermuda* στο όριο των 3.5 mm. Με δεδομένο όριο των 3mm πομπού ως θετικό στις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες, το υβριδικό μόριο διαγιγνώσκει την *Timothy* ευαισθητοποίηση σε μικρότερα επίπεδα, δυνατότητα που του προσδίδει μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια σε σχέση με τα υπόλοιπα αγρωστώδη και ειδικότερα το *Bermuda*. Συνεπώς και οι περιοχές κάτω από την καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών (AUC) συνηγορούν υπέρ του *Timothy* διαγνωστικού προφίλ του καινούριου μορίου. Το νέο υβριδικό μεγαλομόριο περιέχει εξειδικευμένη αλλά μερική μοριακή πληροφορία σχετικά με την ευαισθητοποίηση στο *Timothy* (και τα αγρωστώδη) και ως τέτοιο δεν είναι εύκολο να αντικαταστήσει το αλλεργιογονικό εκχύλισμα του *Timothy*, λόγω διευρυμένων ορίων συμφωνίας (>100%) ανάμεσα στα δύο όπως προκύπτει μέσω της μεθοδολογίας *Blant-Aldman*. Μετρούν δηλαδή το ίδιο μέγεθος με διαφορετικό εύρος, με συνέπεια για το ίδιο τελικό αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικές τιμές. Το γεγονός πιθανώς υποδεικνύει την ανάγκη επανεξέτασης των διαγνωστικών ορίων για τη νέο μόριο. Με όριο θετικότητας τα 3mm πομπού το υβριδικό μεγαλομόριο έχει αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με το εκχύλισμα του *Timothy* και λόγω της μοριακής του εξειδίκευσης διατηρεί αυξημένη ειδικότητα. Τούτο αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα του υβριδικού μεγαλομορίου για την πρώιμη διάγνωση της *Timothy* ευαισθητοποίησης ιδιαίτερα σε παιδιατρικό πληθυσμό.

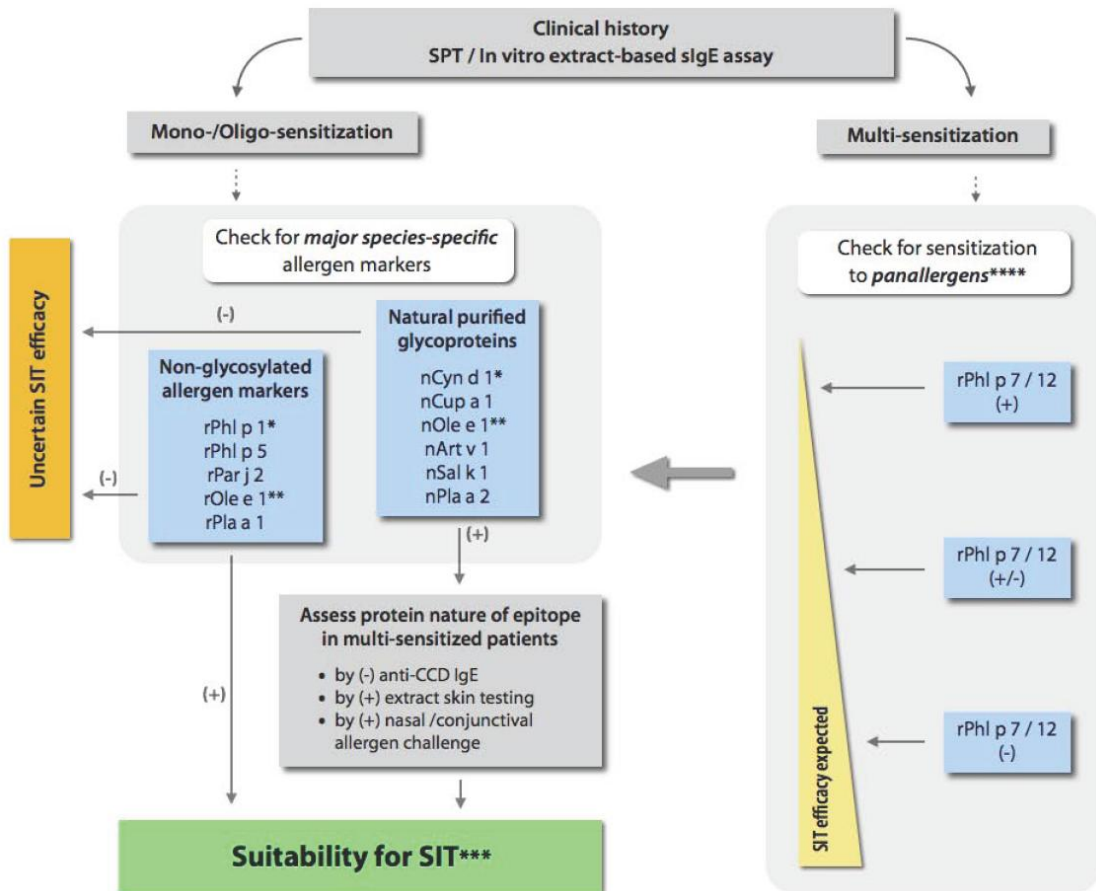
Όταν ο διαγνωστικός στόχος είναι η ευαισθητοποίηση στο *Timothy*, ο συνδυασμός Phl p1 και Phl p5 παραμένει ικανός διάγνωσης όπως έχει επιλεγεί και χρησιμοποιείται κατά τον ορολογικό έλεγχο στην κλινική πράξη. Ωστόσο με βάση τους δείκτες συσχέτισης και συμφωνίας διαφαίνεται διαγνωστική ανωτερότητα του υβριδικού μεγαλομορίου, περιέχοντος επιπλέον μείζονα αλλεργιογόνα (Phl p 2, Phl p 6) μεγαλύτερης στο σύνολό τους αντιπροσώπευσης του *Timothy*. Διαγνωστικά, τα Phl p1 και Phl p 5 είναι αναγκαία θετικά προκειμένου η ευαισθητοποίηση στο *Timothy* να είναι αληθής. Ασθενείς ωστόσο με θετικές δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες και στους δύο επιτόπους (Phl p1 και Phl p5 \geq 3mm) είχαν αρνητική δοκιμασία στο εκχύλισμα *Timothy* < 3mm, ενώ το υβρίδιο μεγαλομόριο στις ίδιες περιπτώσεις έδωσε θετικά αποτελέσματα (\geq 3mm). Το γεγονός υποδεικνύει ότι το καινούριο μόριο μπορεί να ανιχνεύει την *Timothy* ευαισθησία που κάποιες φορές δεν εντοπίζεται ακόμα και με αυτό καθαυτό το εκχύλισμα του *Timothy*.

Η γνώση των ανωτέρω δεδομένων διάγνωσης της αλλεργίας στα αγρωστώδη με χρήση των μείζονων, ειδικών του είδους και παναλλεργιογόνων αλλεργιογόνων μορίων σε συνδυασμό με

αντίστοιχα δεδομένα άλλων ερευνητών που αφορούν στα σημαντικά κοινά αλλεργιογόνα είδη της Μεσογείου επέτρεψε τον προβληματισμό και την προσπάθεια δημιουργίας ενός κλινικού αλγορίθμου για την επιλογή της βέλτιστης ειδικής ανοσοθεραπείας στους ασθενείς με αναπνευστική αλλεργία (όπως ακόλουθη εικόνα).

Η χρήση μιας βασικής ομάδας των ειδικών του είδους αλλεργιογόνων μορίων, εκπροσώπων των σημαντικών κοινών αλλεργιογόνων ειδών της Μεσογείου, ταυτόχρονα με τα βασικά επιτρέποντα τη διαλογή παναλλεργιογόνα μόρια, πολκαλσίνη (rPhl p 7) και προφιλίνη (rPhl p 12), διευκολύνει την επιλογή εκείνων των υποψήφιων προς ειδική ανοσοθεραπεία ασθενών που θα έχουν αυξημένη πιθανότητα να επωθεληθούν από αυτή. Προτείνουμε συνεπώς έναν κλινικό αλγόριθμο, όπως απεικονίζεται στην εικόνα, για την επιλογή των κατάλληλων για ειδική ανοσοθεραπεία αλλεργικών στις γύρεις ασθενών για την περιοχή της Νότιας Ευρώπης. Αρχικώς ο διαγνωστικός διαχωρισμός μεταξύ μόνο/όλιγο και πολυευαισθητοποιημένων ασθενών γίνεται με εκτέλεση των δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών ή/και μέτρηση των ειδικών IgE αντισωμάτων ορού με χρήση των αλλεργιογόνων εκχυλισμάτων. Στην περίπτωση μιας μόνο ή όλιγο ευαισθητοποίησης, η εξατομικευμένη αξιολόγηση του κατάλληλου για ειδική ανοσοθεραπεία ασθενούς εξελίσσεται βασισμένη στα υπεύθυνα μείζονα ειδικά του είδους αλλεργιογόνα μόρια προς επιλογή εκείνων των θεραπευτικά διαθέσιμων εκχυλισμάτων που τα περιέχουν στη μέγιστη δόση χορήγησης.

Οπτικοποιημένη η πρόταση για την ειδική στοιχειακή διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με αλλεργία στις γύρεις στη Νότια Ευρώπη



Σε πολυευαισθητοποιημένο αλλεργικό ασθενή απαιτείται επιπρόσθετη αξιολόγηση συνευαισθητοποίησης σε παναλλεργιογόνα, καθώς ανίχνευση ειδικών IgE αντισωμάτων

έναντι προφιλινών ή/και πολκαλσινών θα σήμαινε πιθανόν πτωχή απάντηση στην ειδική ανοσοθεραπεία. Βασισμένοι συνεπώς στα μείζονα ειδικά του είδους αλλεργιογόνα μόρια, όταν δε συμπεριλαμβάνονται γλυκοσυλιωμένες μορφές στον *in vitro* έλεγχο, στην περίπτωση θετικών ειδικών IgE έναντι των μείζονων για τα αγρωστώδη rPhl p 5/rPhl p 1, το περδικάκι rPar j 2 και την ελιά rOle e 1 αιτιολογείται η χορήγηση ειδικής ανοσοθεραπείας με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα αλλεργιογόνων. Στην περίπτωση θετικών *in vitro* ειδικών IgE έναντι των μείζονων για τα αγρωστώδες είδος *Bermuda*, κυπαρίσι, ελιά, αρτεμισία, αλλεργιογόνων (nCyn d 1, nCup a 1, nOle e 1, nSal k 1, and nArt v 1 αντίστοιχα) σε πολυευσθητοποιημένους ασθενείς, πιθανή ευαισθητοποίηση αφορούσα το στοιχείο του υδατανθρακικό καθοριστή (CCD) θα πρέπει να αποκλειστεί με επιπρόσθετο έλεγχο, καθώς τα ανωτέρω μείζονα αλλεργιογόνα είναι κεκαθαυμένες, γλυκοσυλιωμένες ισομορφές. Τούτο καθώς οι υδατανθρακικοί καθοριστές διασταυρούμενης αντιδραστικότητας (Cross-reactive carbohydrate determinants – CCDs) ανευρίσκονται στις γλυκοπρωτεΐνες σχεδόν όλων των γύρεων και αποτελούν τους συχνότερους επιτόπους στόχους των ειδικών IgE αντισωμάτων. Ωστόσο αμφισβητούνται ως δυνάμενοι να προκαλέσουν κλινική νόσο και επομένως μόνο στην περίπτωση συνευαισθητοποίησης σε αλλεργιογόνο πρωτεΐνη αιτιολογείται η χορήγηση ειδικής ανοσοθεραπείας με το αντίστοιχο εκχύλισμα αλλεργιογόνου.

Προτείνουμε επομένως έναν άρτιο κλινικό αλγόριθμο ειδικής στοιχειακής διάγνωσης και αντιμετώπισης της αναπνευστικής αλλεργίας στη Νότια Ευρώπη, βασισμένο σε πρότυπα μοριακής αλλεργικής ευαισθητοποίησης στις κοινές νοσογόνες γύρεις της περιοχής. Αν και δεν υπάρχουν αρκετές προοπτικές μελέτες αξιολόγησης της προστιθέμενης αξίας από την εφαρμογή της ειδικής στοιχειακής διάγνωσης στην αποτελεσματικότητα της ειδικής ανοσοθεραπείας, δείχθηκε πρόσφατα σε προοπτική μελέτη ότι η ενσωμάτωση των δεδομένων της ειδικής στοιχειακής διάγνωσης κατέστη ικανή να μεταβάλλει βελτιώνοντας τις αρχικές ενδείξεις ειδικής ανοσοθεραπείας σε περισσότερους των μισών ασθενών (260). Επιλέον τα δεδομένα αναδρομικής ανάλυσης της αποτελεσματικότητας της ειδικής ανοσοθεραπείας σύμφωνα με πρότυπα μοριακής ευαισθητοποίησης έδειξαν να ευνοούν μια τέτοια προσέγγιση και ήταν συμβατά με την προτεινόμενη αιτιολόγησή τους (261).

Συγχρόνως επελέγησαν, με σκοπό τη συγκριτική μελέτη της δυνατότητας δημιουργίας μετά γενετική παρέμβαση, υποαλλεργιογόνων παραγώγων για ασφαλέστερη και αποτελεσματικότερη ειδική ανοσοθεραπεία, δύο άλλα σημαντικά αλλεργιογόνα. Πρώτον για το άκαρι και το μείζον αλλεργιογόνο του *Dermatophagoides Pteronissimus* επελέγησαν το **άγριου τύπου γενετικά ανασυνδυασμένο (wild type) rDer p 2** και ένα ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο με χαρακτηριστικά **αναδιατεταγμένου υποαλλεργιογόνου υβριδίου θραύσματος (hybrid – fragment) rDer p 2**.

Για το άκαρι δείχθηκε μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση δραστηριότητας του rDer p 2 άγριου τύπου αλλεργιογόνου μορίου. Ταυτόχρονα δείχθηκε μειωμένη, σχεδόν μηδενική, αλλεργιογονική δραστηριότητα για το υβρίδιο (hybrid – mosaic) μόριο που δημιουργήθηκε με τη γενετική τεχνική ανασύνθεσης αντίστροφης αναδιάταξης των δύο επιμέρους θραυσμάτων προς διατήρηση των γραμμικών T – κυτταρικών επιτόπων με σύγχρονη καταστροφή των διαμορφωτικών B – κυτταρικών επιτόπων ώστε να επιτυγχάνεται μείωση της αλλεργιογονικότητας με διατήρηση της ανοσογονικότητας για εν δυνάμει χρήση σε ειδική ανοσοθεραπεία. Συγκεκριμένα προκάλεσε μειωμένη, σχεδόν μηδενική, αντίδραση σχηματισμού πομπού έως και τη συγκέντρωση των 32mcg/ml όπου εκδηλώθηκε αντίδραση

σχηματισμού πομπού εξαιτίας υπολειπόμενης αντιδραστικότητας του υβριδίου μορίου όπως έδειξε και η αντίστοιχη μελέτη *in vitro* ανοσοπροσρόφησης. Συνεπώς η ειδική IgE αντιδραστικότητα παρέμεινε με σημαντική ακρίβεια για όλους τους ασθενείς, εξαρτώμενη της τιτλοποίησης του εφαρμοζόμενου αλλεργιογόνου και για τα δύο υπο μελέτη μόρια. Τούτο αποτελεί ένδειξη δυνατότητας εξατομικευμένης τιτλοποίησης σημαντικής ακρίβειας, για το άγριου τύπου (*wild – rDer p 2*) αλλεργιογόνο μόριο σε σύγκριση με το αντίστοιχο του φυσικό εκχύλισμα, στην μελέτη της φυσικής πορείας της αναπνευστικής αλλεργίας. Για δε το υποαλλεργιογόνο μόριο (*mosaic – mDer p 2*) ένδειξη δυνατότητας εξατομικευμένης τιτλοποίησης με σημαντικό αρχικό εύρος τίτλοποιήσεων μηδενικής IgE αντιδραστικότητας. Η δυνατότητα αυτή είναι κατ' εξοχήν σημαντική στη μελλοντική δημιουργία πρωτοκόλλων χορήγησης ειδικής ανοσοθεραπείας απευαισθητοποίησης στη αλλεργία στα ακάρεα. Αυτό διότι επιτρέπει, με σαφώς μειωμένη την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών που δυσκολεύουν τη μέχρι σήμερα κλινική πράξη ιδιαίτερα στην φάση έναρξης ή ανόδου των χορηγούμενων δόσεων έως την επίτευξη της δόσης συντήρησης, τη χορήγηση ασφαλέστερης και εξίσου αποτελεσματικής ειδικής ανοσοθεραπείας, ιδιαίτερα στους ασθενείς με αλλεργικό άσθμα.

Δεύτερον για το ψάρι και το μείζον αλλεργιογόνο του, παρβαλβουμίνη, επελέγησαν το **άγριου τύπου γενετικά ανασυνδυασμένο (*wild type*) rCypc 1** μόριο και ένα ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο με χαρακτηριστικά **υποαλλεργιογόνου γενετικά μεταλλαγμένου (*mutant*) mCyp c 1** μορίου της παρβαλβουμίνης του κυπρίνου. Για την αλλεργία στο ψάρι αποδείχθηκε αρχικώς και με την παρούσα μελέτη, με χρήση του άγριου τύπου (*wild type*) γενετικά ανασυνδυασμένου μορίου rCyp c 1 του κυπρίνου, ότι η πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη αποτελεί το μείζον αλλεργιογόνο, υπεύθυνο για τη μέσω IgE μεσολαβούμενη αλλεργία, μετά μελέτη για πρώτη φορά με δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες και αντίστοιχο ορολογικό έλεγχο ειδικής IgE αντιδραστικότητας, σε παιδιατρικό πληθυσμό της Μεσογείου. Δείχθηκε επίσης ότι αν και η παρβαλβουμίνη είναι αλλεργιογόνο φέρων διαμορφωτικό επίτοπο δύναται να προκαλεί όλο το εύρος βαρύτητας αλλεργικής αντίδρασης έως και αναφυλαξία, αντίθετα από ότι γνωστά τροφικά αλλεργιογόνα γραμμικών επιτόπων, υπεύθυνα πρόκλησης επίμονων αναφυλακτικών αντιδράσεων (π.χ. καζείνες). Η παρβαλβουμίνη αποδείχθηκε επιπλέον με χρήση των αντίστοιχων, άγριου τύπου (*wild type*) γενετικά ανασυνδυασμένων μορίων παρβαλβουμινών ότι είναι το μείζον υπεύθυνο αλλεργιογόνο ακόμη και σε είδη ψαριών κοινής κατανάλωσης αλλά απομακρυσμένα φυλογενετικά μεταξύ τους όπως (*Sal s 1 – Atlantic salmon*) του σολωμού, (*Thu a 1 – tuna*) του τόνου, (*Sco j 1 – chub macherel*) του κολιού, (*Clu h 1 – herring*) της ρέγγας και (*Gad c 1 – codfish*) του βακαλάου, ακόμη και όταν αναφέρεται εκλεκτική αντιδραστικότητα ή / και ανοχή έναντι διαφορετικών ειδών. Επίσης δείχθηκε ότι η μεταβαλλόμενη βαρύτητα αλλεργικής αντίδρασης έναντι διαφορετικών ειδών ψαριών αντιστοιχεί με σημαντική ακρίβεια στην μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα παρβαλβουμίνης για τα συνήθως καταναλούμενα είδη, ανα γραμμάριο ιστού, < 0.05 mg στον τόνο, 0.3 – 0.7 mg στο σκουμπρί, 1 – 2.5 mg στο σολωμό, πέστροφα και βακαλάο, >2.5 mg στον κυπρίνο, ρέγγα, και κοκκινόψαρο. Τούτο επιβεβαιώνει με τεκμηριωμένη πλέον ασφάλεια τη γνώση στην κλινική πράξη, από τη φυσική ιστορία της αλλεργίας σε ψάρι, ότι συχνά ασθενείς με αλλεργία σε ψάρι αναφέρουν ότι ανέχονται βρώση ειδών μειωμένης περιεκτικότητας παρβαλβουμίνης, όπως ο τόνος, χωρίς πρόβλημα. Επίσης την καθημερινή πρακτική χειρισμού της αλλεργίας σε ψάρι καθώς ο τόνος αποτελεί μία από τις πρώτες επιλογές, χορήγησης ψαριού σε αυτούς τους ασθενείς μετά από πρόκληση, στην προσπάθεια επανεισαγωγής των ψαριών στην διατροφή

τους. Τέλος η ειδική IgE αντιδραστικότητα του άγριου τύπου (*wild – rCyp c 1*) αλλεργιογόνου μορίου κατά τη μελέτη των δια νυγμού δερματικών δοκιμασιών και του αντίστοιχου ορολογικού ελέγχου ειδικής IgE αντιδραστικότητας, αν και διαφοροποιήθηκε ως προς το αλλεργικό προφίλ και την βαρύτητα αντίδρασης μεταξύ των ασθενών, παρέμεινε με σημαντική ακρίβεια εξαρτώμενη της τιτλοποίησης για τον ίδιο κάθε ένα ασθενή. Τούτο αποτελεί ένδειξη σημαντικής δυνατότητας για εξατομικευμένη τιτλοποίηση, στις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες και τον ειδικό IgE έλεγχο ορού με το άγριου τύπου (*wild – rCyp c 1*) αλλεργιογόνο μόριο, στη μελέτη της φυσικής πορείας της νόσου.

Ταυτόχρονα δείχθηκε για το υποαλλεργιογόνο γενετικά μεταλλαγμένο (*mutant*) *mCyp c 1* μόριο, που δημιουργήθηκε μετά από αντικατάσταση των υπεύθυνων σύνδεσης του ιόντος Ca^{2+} υπολειμάτων ασπαρτικού οξέος με υπολλείματα της μη πολικής αλανίνης, ότι η εκδίπλωση της τριτοταγούς δομής της παρβαλβουμίνης που έχει συσχετισθεί με ατελή σύνδεση ιόντων Ca^{2+} , συνεπάγεται μειωμένη IgE αντιδραστικότητα και αλλεργιογονικότητα με διατήρηση της ανοσογονικότητας για εν δυνάμει χρήση σε ειδική ανοσοθεραπεία απευαισθητοποίησης. Ειδικότερα στην παρούσα μελέτη δείχθηκε για πρώτη φορά σε παιδιατρικό πληθυσμό, της Μεσογείου αλλά και συνολικά πληθυσμό με αλλεργία στο ψάρι ότι το υποαλλεργιογόνο γενετικά μεταλλαγμένο (*mutant*) *mCyp c 1* μόριο προκαλεί σημαντικά μειωμένη έως μηδενιζόμενη ειδική IgE αντιδραστικότητα. Συγκεκριμένα σε επιλεγμένη ομάδα ασθενών με κλινικά σαφώς χαρακτηρισμένη και βαθμονομημένη αντίδραση αναφυλαξίας σε ψάρι, μετά μελέτη τιτλοποιημένων δερματικών δια νυγμού δοκιμασιών και ανοσοαποτύπωσης της ειδικής IgE αντιδραστικότητας του ορού, δείχθηκε ότι το υποαλλεργιογόνο *mCyp c 1* μόριο προκαλεί μια αυξανόμενη ειδική IgE αντιδραστικότητα ανάλογη των αυξανόμενων τίτλων συγκέντρωσης του, σταθερά σημαντικά μικρότερη συγκριτικά των αντίστοιχων τίτλων συγκέντρωσης του άγριου τύπου *rCyp c 1* αλλεργιογόνου μορίου. Επιπλέον η ειδική IgE αντιδραστικότητα του υποαλλεργιογονικού *mCyp c 1* μορίου κατά τη μελέτη αν και διαφοροποιήθηκε ως προς το αλλεργικό προφίλ και τη βαρύτητα αντίδρασης μεταξύ των ασθενών, παρέμεινε με σημαντική ακρίβεια εξαρτώμενη της τιτλοποίησης του για τον ίδιο κάθε ένα ασθενή. Τούτο αποτελεί ένδειξη δυνατότητας εξατομικευμένης τιτλοποίησης, κατ' εξοχήν σημαντική στη μελλοντική δημιουργία πρωτοκόλλων για χορήγηση με ασφάλεια του υποαλλεργιογονικού *mCyp c 1* μορίου σε ειδική ανοσοθεραπεία απευαισθητοποίησης στην αλλεργία στο ψάρι. Δείχθηκε επίσης ότι όλοι οι ασθενείς εκδηλώνουν μηδενική αντιδραστικότητα έναντι των γενετικά ανασυνδυασμένων υποαλλεργιογόνων (*mutant*) μορίων όλων των επιλεγμένων διαφορετικών ειδών ψαριών κοινής κατανάλωσης αλλά απομακρυσμένων φυλογενετικά μεταξύ τους όπως (*Sal s 1 – Atlantic salmon*) του σολομού, (*Thu a 1 – tuna*) του τόνου, (*Sco j 1 – chub macherel*) του κολιού, (*Clu h 1 – herring*) της ρέγγας και (*Gad c 1 – codfish*) του βακαλάου. Τούτο αποδεικνύει ότι η πρόκληση μετάλλαξης με την περιγραφείσα τεχνική σημειακής μετάλλαξης, στο μόριο παρβαλβουμίνης όποιου είδους ψαριού, όπως και στου κυπρίνου *Cyp c 1*, μπορεί να αποτελεί μια ευρέως εφαρμόσιμη στρατηγική για τη μετατροπή των διαφορετικών αλλεργιογόνων μορίων παρβαλβουμίνης στα αντίστοιχα υποαλλεργιογόνα μόρια. Επιβεβαιώνεται συνεπώς ακόμη και στους ασθενείς με εκλεκτική αντιδραστικότητα έναντι συγκεκριμένης παρβαλβουμίνης άλλης του κυπρίνου (*Cyp c 1*) η δυνατότητα κατασκευής και τιτλοποίησης του αντίστοιχου αλλεργιογόνου άγριου τύπου (*wild type*) και υποαλλεργιογόνου (*mutant*) μορίου. Ολοκληρώνεται έτσι η συνολική στρατηγική στη μελλοντική προοπτική παρακολούθησης της φυσικής πορείας της νόσου και

δημιουργίας πρωτοκόλλων χορήγησης με ασφάλεια μετά εξατομικευμένο προγραμματισμό με το ακριβές αντίστοιχο υποαλλεργιογόνο (*mutant*) μόριο ειδικής ανοσοθεραπείας απευαισθητοποίησης της αλλεργίας στα ψάρια.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω αποτελέσματα και βασισμένο εν μέρει και σε αυτά, καθώς συμπεριλαμβάνονται στα δεδομένα, συστάθηκε και λειτουργεί το Ευρωπαϊκό Ερευνητικό Πρόγραμμα **FAST – Food Allergen Specific Immunotherapy**, με συμμετοχή 18 Ερευνητικών Κέντρων και Πανεπιστημίων, συμπεριλαμβανομένου του Αλλεργιολογικού Ερευνητικού Κέντρου της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (262). Στόχος του προγράμματος η ανάπτυξη ασφαλούς και αποτελεσματικής ειδικής ανοσοθεραπείας των τροφικών αλλεργιών με πρώτη επιλογή την αλλεργία στο ψάρι και το ροδάκινο. Προς επίτευξη του μελετάται η αντικατάσταση των κλασσικών εκχυλισμάτων με τα αντίστοιχα υποαλλεργιογόνα γενετικά ανασυνδυασμένα μείζονα αλλεργιογόνα μόρια.

Στην αλλεργία στο ψάρι μελετάται η επιλογή του **υποαλλεργιογόνου γενετικά μεταλλαγμένου (*mutant*) mCyp c 1** μορίου της παρβαλβουμίνης του κυπρίνου.

13.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διάγνωση και αντιμετώπιση της τύπου I ή ειδικής IgE μεσολαβούμενης αλλεργικής νόσου βασίζεται στον ακριβή προσδιορισμό της προκαλούσας τη νόσο υπεύθυνης μοριακής οντότητας.

Η υπεύθυνη μοριακή οντότητα ορίζεται ως αλλεργιογόνο μόριο.

Η διάγνωση με τη χρήση προτυποποιημένων αλλεργιογόνων μορίων μπορεί να προσδιορίσει με ακρίβεια και στοιχειακά τις αντισωματικές, κυτταρικές και βιολογικές αντιδράσεις έναντι μιας σαφώς καθορισμένης μοριακής οντότητας.

Η συγκεκριμένη αρχή, της χρήσης καθορισμένων προτυποποιημένων αλλεργιογόνων μορίων για τη διάγνωση της τύπου I ή IgE μεσολαβούμενης αλλεργίας, ορίζεται και καλείται ειδική στοιχειακή διάγνωση αλλεργίας.

Η ειδική στοιχειακή διάγνωση καθιστά δυνατή τη βέλτιστη αντιμετώπιση της αλλεργικής νόσου, δηλαδή την ειδική στοιχειακή αντιμετώπιση της αλλεργίας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε διαγνωστική διερεύνηση αλλεργικών ασθενών, σε παιδιατρικό πληθυσμό, για τα ακάρεα της οικιακής σκόνης, το μείζον των αγρωστώδων, γρασίδι είδους Timothy και το ψάρι, με εφαρμογή των γενετικά ανασυνδυασμένων προτυποποιημένων αλλεργιογόνων μορίων τους.

Για το γρασίδι είδους Timothy επελέγει το ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο **άγριου τύπου (wild type) υβριδικό μεγαλομόριο (hybrid-giant)** που περιέχει τα τέσσερα σημαντικά μείζονα αλλεργιογόνα μόρια **Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6**.

Σε πολυευαισθητοποιημένους ασθενείς σε αεροαλλεργιογόνα της Μεσογείου το υβριδικό μεγαλομόριο ανίχνευει την ευαισθητοποίηση στο Timothy, ενώ παράλληλα λειτουργεί ικανοποιητικά στην διάγνωση της ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη.

Η ευαισθησία και η ειδικότητα του υβριδικού μεγαλομορίου βελτιστοποιούνται για τη διάγνωση του Timothy στο όριο των 2 nm πομπού και με όριο θετικότητας τα 3nm έχει αυξημένη ευαισθησία ως προς το εκχύλισμα του Timothy, σημαντικό πλεονέκτημα του για την πρόωμη διάγνωση της Timothy ευαισθητοποίησης ιδιαίτερα σε παιδιατρικό πληθυσμό και για χρήση του με μόνη τη δερματική δια νυγμού δοκιμασία, σε έλεγχο ευαισθητοποίησης στα αγρωστώδη σε πολυευαισθητοποιημένους πληθυσμούς της Νοτίου Ευρώπης.

Για το άκαρι και το μείζον αλλεργιογόνο του *Dermatophagoides Pteronissimus* επελέγησαν το **άγριου τύπου γενετικά ανασυνδυασμένο (wild type) rDer p 2** και ένα ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο με χαρακτηριστικά **αναδιατεταγμένου υποαλλεργιογόνου υβριδίου θραύσματος (hybrid – fragment) rDer p 2**.

Δείχθηκε δοσοεξαρτώμενη αύξηση δραστηριότητας του rDer p 2 άγριου τύπου αλλεργιογόνου μορίου ένδειξη δυνατότητας εξατομικευμένης τιτλοποίησης σημαντικής ακρίβειας, στη μελέτη της φυσικής πορείας της αναπνευστικής αλλεργίας.

Δείχθηκε μειωμένη, σχεδόν μηδενική, αλλεργιογονική δραστηριότητα για το υποαλλεργιογόνο μόριο, *mosaic – mDer p 2*, ένδειξη δυνατότητας τιτλοποίησης με σημαντικό αρχικό εύρος τιτλοποιήσεων μηδενικής IgE αντιδραστικότητας, κατ' εξοχήν σημαντική στη μελλοντική δημιουργία πρωτοκόλλων χορήγησης ειδικής ανοσοθεραπείας απευαισθητοποίησης με το υποαλλεργιογόνο μόριο, στην αλλεργία στα ακάρεα.

Για το ψάρι και το μείζον αλλεργιογόνο του, παρβαλβουμίνη, επελέγησαν το **άγριου τύπου γενετικά ανασυνδυασμένο (wild type) rCyp c 1** μόριο και ένα ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο με χαρακτηριστικά **υποαλλεργιογόνου γενετικά μεταλλαγμένου (mutant) mCyp c 1** μορίου της παρβαλβουμίνης του κυπρίνου.

Αποδείχτηκε με χρήση του άγριου τύπου (wild type) γενετικά ανασυνδυασμένου μορίου rCyp c 1 του κυπρίνου, ότι η πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη αποτελεί το μείζον αλλεργιογόνο, υπεύθυνο για την μέσω IgE μεσολαβούμενη αλλεργία στο ψάρι και ότι αν και είναι αλλεργιογόνο φέρων διαμορφωτικό επίτοπο δύναται να προκαλεί όλο το εύρος βαρύτητας αλλεργικής αντίδρασης έως και αναφυλαξία.

Η παρβαλβουμίνη είναι το μείζον υπεύθυνο αλλεργιογόνο ακόμη και σε είδη ψαριών κοινής κατανάλωσης αλλά απομακρυσμένα φυλογενετικά μεταξύ τους.

Η μεταβαλλόμενη βαρύτητα αλλεργικής αντίδρασης έναντι διαφορετικών ειδών ψαριών αντιστοιχεί με σημαντική ακρίβεια στην μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα παρβαλβουμίνης στα διαφορετικά είδη.

Η ειδική IgE αντιδραστικότητα του άγριου τύπου, wild – rCyp c 1, αλλεργιογόνου μορίου παρέμεινε με σημαντική ακρίβεια εξαρτώμενη της τιτλοποίησης για τον ίδιο κάθε ένα ασθενή ένδειξη σημαντικής δυνατότητας για εξατομικευμένη τιτλοποίηση, στις δερματικές δια νυγμού δοκιμασίες και τον ειδικό IgE έλεγχο ορού, στη μελέτη της φυσικής πορείας της νόσου.

Δείχθηκε για το υποαλλεργιογόνο γενετικά μεταλλαγμένο (mutant) mCyp c 1 μόριο ότι προκαλεί ειδική IgE αντιδραστικότητα ανάλογη των τίτλων συγκέντρωσης του, σταθερά σημαντικά μικρότερη συγκριτικά των αντίστοιχων τίτλων του άγριου τύπου rCyp c 1 αλλεργιογόνου μορίου.

Η ειδική IgE αντιδραστικότητα του υποαλλεργιογονικού mCyp c 1 μορίου παρέμεινε με σημαντική ακρίβεια εξαρτώμενη της τιτλοποίησης του για τον ίδιο κάθε ένα ασθενή, ένδειξη δυνατότητας εξατομικευμένης τιτλοποίησης, κατ' εξοχήν σημαντική στη μελλοντική δημιουργία πρωτοκόλλων για χορήγηση με ασφάλεια του υποαλλεργιογονικού mCyp c 1 μορίου σε ειδική ανοσοθεραπεία απευαισθητοποίησης στη αλλεργία στο ψάρι.

Δείχθηκε ότι όλοι οι ασθενείς εκδηλώνουν μηδενική αντιδραστικότητα έναντι των γενετικά ανασυνδυασμένων υποαλλεργιογόνων (mutant) μορίων όλων των επιλεγμένων διαφορετικών ειδών ψαριών κοινής κατανάλωσης αλλά απομακρυσμένων φυλογενετικά μεταξύ τους το οποίο αποδεικνύει ότι η πρόκληση σημειακής μετάλλαξης, στο μόριο παρβαλβουμίνης όποιου είδους ψαριού, μπορεί να αποτελεί μια ευρέως εφαρμόσιμη στρατηγική για τη μετατροπή των διαφορετικών αλλεργιογόνων μορίων παρβαλβουμίνης στα αντίστοιχα υποαλλεργιογόνα μόρια.

Επιβεβαιώθηκε και σε ασθενείς με εκλεκτική αντιδραστικότητα έναντι συγκεκριμένης παρβαλβουμίνης άλλης του κυπρίνου (Cyp c 1) η δυνατότητα κατασκευής και τιτλοποίησης του αντίστοιχου αλλεργιογόνου άγριου τύπου (wild type) και υποαλλεργιογόνου (mutant) μορίου.

Ολοκληρώνεται έτσι η συνολική στρατηγική στη μελλοντική προοπτική παρακολούθησης της φυσικής πορείας της νόσου και δημιουργίας πρωτοκόλλων χορήγησης με ασφάλεια μετά εξατομικευμένο προγραμματισμό με το ακριβές αντίστοιχο υποαλλεργιογόνο (mutant) μόριο ειδικής ανοσοθεραπείας απευαισθητοποίησης της αλλεργίας στα ψάρια.

14. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διάγνωση και αντιμετώπιση της τύπου I ή ειδικής IgE μεσολαβούμενης αλλεργικής νόσου βασίζεται στον ακριβή προσδιορισμό της προκαλούσας τη νόσο υπεύθυνης μοριακής οντότητας που ορίζεται ως αλλεργιογόνο μόριο. Η διάγνωση με χρήση προτυποποιημένων αλλεργιογόνων μορίων που προσδιορίζει με ακρίβεια και στοιχειακά τις αντισωματικές, κυτταρικές και βιολογικές αντιδράσεις ορίζεται και καλείται ειδική στοιχειακή διάγνωση αλλεργίας.

Η ειδική στοιχειακή διάγνωση καθιστά δυνατή τη βέλτιστη αντιμετώπιση της αλλεργικής νόσου, δηλαδή την ειδική στοιχειακή αντιμετώπιση της αλλεργίας. Η διαγνωστική διερεύνηση αλλεργικών ασθενών, για πρώτη φορά σε παιδιατρικό πληθυσμό, με χρήση γενετικά ανασυνδυασμένων προτυποποιημένων αλλεργιογόνων μορίων ανέδειξε τις νέες δυνατότητες τους. Συγκεκριμένα τη δυνατότητα ανίχνευσης με ακρίβεια ειδικής ευαισθητοποίησης, με χρήση υβριδίων μεγαλομορίων περιεχόντα τους μείζονες ειδικούς επιτόπους, σε πολυευαισθητοποιημένους ασθενείς. Επίσης τη δυνατότητα εξατομικεύμενης τιτλοποίησης της ειδικής IgE αντιδραστικότητας, με κατασκευή και χρήση των αντίστοιχων μείζονων, ειδικών του είδους, αλλεργιογόνων άγριου τύπου (wild type) και υποαλλεργιογόνου (mutant) μορίου, σε ασθενείς με αναπνευστική ή τροφική αλλεργία. Ολοκληρώνεται έτσι η συνολική στρατηγική στη μελλοντική προοπτική παρακολούθησης της φυσικής πορείας της νόσου και δημιουργίας πρωτοκόλλων χορήγησης, με ασφάλεια μετά εξατομικευμένο προγραμματισμό, με το ακριβές αντίστοιχο υποαλλεργιογόνο (mutant) μόριο ειδικής ανοσοθεραπείας απευαισθητοποίησης, ιδιαίτερα της τροφικής αλλεργίας.

15. ABSTRACT

Diagnosis and treatment of type I or specific IgE-mediated allergic disease is based on the accurate determination of the culprit molecular entity defined as allergen molecule. Diagnosis using standardized allergen molecules that precisely identify the antibody, cellular and biological reactions is defined and called component resolved diagnosis (CRD) of allergy. Component resolved diagnosis enables optimal management of allergic disease, namely component resolved management (CRM) of allergy. The diagnostic investigation of allergic patients, for the first time in a pediatric population, using standardized recombinant allergen molecules demonstrated these new capabilities. Namely, the ability to detect with precision specific grass sensitization, using a hybrid macromolecule containing major species-specific epitopes, in polysensitized patients. Also the possibility of individualized titration of specific IgE reactivity, to assist construction and use of the respective major, specific-species, wild type and hypoallergenic (mutant) molecules, in patients with respiratory or food allergy. It is concluded that developing strategies should include monitoring of the natural history of the disease and protocols for specific desensitization using safe, personalized immunotherapy with such hypoallergenic (mutant) molecules, particularly in food allergy.

16. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 'Ομηρος. *ΙΛΙΑΔΑ. Αρχαία Ελλάδαδος αιώνας πΧ.*
2. Waltari M. *The Romans: The Memoirs of Minutus Lausus.* New York: Putnam; 1963.
3. De Weck A. *A short history of allergological disease and concepts.* In: Kay B, editor. *Allergy.* Oxford: Blackwell; 1997. p. 3-22.
4. Shakespeare W. *King Richard The Third* 1591.
5. Blackley C. *Experimental researches on the cause and nature of hay fever.* London: Balliere, Tindall & Cox; 1873.
6. Richet C. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1913.* 1913 [18/12/2008]; Available from: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1913/richet-lecture.html.
7. Coca AF, Cooke R. *On the classification of the phenomena of hypersensitiveness.* *J Immunol.* 1923;8:163-82.
8. Coombs R, Gell P. *The classification of allergic reactions underlying disease. Clinical aspects of immunology.* Philadelphia: Davis; 1963. p. 317.
9. Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SG, Rowe DS, Stanworth DR, Terry WD. *Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin.* *Immunology.* 1968 Sep;15(3):323-4.
10. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahntela T, et al. *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.* *Allergy.* 2001 Sep;56(9):813-24.
11. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. *Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003.* *J Allergy Clin Immunol.* 2004 May;113(5):832-6.
12. Gots RE, Hamosh TD, Flamm WG, Carr CJ. *Multiple chemical sensitivities: a symposium on the state of the science.* *Regul Toxicol Pharmacol.* 1993 Aug;18(1):61-78.
13. Szczeklik A. *Mechanism of aspirin-induced asthma.* *Allergy.* 1997 Jun;52(6):613-9.
14. Hedin H, Richter W, Ring J. *Dextran-induced anaphylactoid reactions in man: role of dextran reactive antibodies.* *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1976;52(1-4):145-59.
15. Pepys J, Jenkins PA, Festenstein GN, Gregory PH, Lacey ME, Skinner FA. *Farmer's Lung. Thermophilic Actinomycetes as a Source of "Farmer's Lung Hay" Antigen.* *Lancet.* 1963 Sep 21;2(7308):607-11.
16. Gross NJ. *What is this thing called love? --or, defining asthma.* *Am Rev Respir Dis.* 1980 Feb;121(2):203-4.
17. *From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2007.* Available from: <http://www.ginasthma.org>.
18. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Gotz M, et al. *Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report.* *Allergy.* 2008 Jan;63(1):5-34.
19. Warner JO, Gotz M, Landau LI, Levison H, Milner AD, Pedersen S, et al. *Management of asthma: a consensus statement.* *Arch Dis Child.* 1989 Jul;64(7):1065-79.
20. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Lemanske R, et al. *International consensus on (ICON) pediatric asthma.* *Allergy.* 2012 Aug;67(8):976-97.
21. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen).* *Allergy.* 2008 Apr;63 Suppl 86:8-160.

22. Bousquet J, Fokkens W, Burney P, Durham SR, Bachert C, Akdis CA, et al. Important research questions in allergy and related diseases: nonallergic rhinitis: a GA2LEN paper. *Allergy*. 2008 Jul;63(7):842-53.
23. Jun J, Bielory L, Raizman MB. Vernal conjunctivitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2008 Feb;28(1):59-82, vi.
24. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2008 Apr 3;358(14):1483-94.
25. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1980;92:44-7.
26. Novembre E, Cianferoni A, Lombardi E, Bernardini R, Pucci N, Vierucci A. Natural history of "intrinsic" atopic dermatitis. *Allergy*. 2001 May;56(5):452-3.
27. Mortz CG, Andersen KE. New aspects in allergic contact dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 Oct;8(5):428-32.
28. Jacob SE, Zapolanski T. Systemic contact dermatitis. *Dermatitis*. 2008 Jan-Feb;19(1):9-15.
29. Ortolani C, Bruijnzeel-Koomen C, Bengtsson U, Bindeslev-Jensen C, Bjorksten B, Host A, et al. Controversial aspects of adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) Reactions to Food Subcommittee. *Allergy*. 1999 Jan;54(1):27-45.
30. Demoly P, Pichler W, Pirmohamed M, Romano A. Important questions in Allergy: 1-drug allergy/hypersensitivity. *Allergy*. 2008 May;63(5):616-9.
31. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Jr., Bock SA, Branum A, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2):391-7.
32. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov;108(5 Suppl):S147-334.
33. Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Sep;126(3):466-76.
34. Linneberg A, Henrik Nielsen N, Frolund L, Madsen F, Dirksen A, Jorgensen T. The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population-based study. The Copenhagen Allergy Study. *Allergy*. 2002 Nov;57(11):1048-52.
35. Compalati E, Ridolo E, Passalacqua G, Braidò F, Villa E, Canonica GW. The link between allergic rhinitis and asthma: the united airways disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010 May;6(3):413-23.
36. Grossman J. One airway, one disease. *Chest*. 1997 Feb;111(2 Suppl):11S-6S.
37. Bachert C, Vignola AM, Gevaert P, Leynaert B, Van Cauwenberge P, Bousquet J. Allergic rhinitis, rhinosinusitis, and asthma: one airway disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004 Feb;24(1):19-43.
38. Ait-Khaled N, Pearce N, Anderson HR, Ellwood P, Montefort S, Shah J. Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three. *Allergy*. 2009 Jan;64(1):123-48.
39. Wahn U, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bauer CP. The natural course of sensitisation and atopic disease in infancy and childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 1997;8(10 Suppl):16-20.
40. Kulig M, Bergmann R, Klettke U, Wahn V, Tacke U, Wahn U. Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Jun;103(6):1173-9.

41. La Rosa M, Lionetti E, Leonardi S, Salpietro A, Bianchi L, Salpietro C, et al. Specific immunotherapy in children: the evidence. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Oct;24(4 Suppl):69-78.
42. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006 Aug 26;368(9537):733-43.
43. Mallol J, Crane J, von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewart A. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: A global synthesis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2013 March - April;41(2):73-85.
44. Papadopoulou A, Hatziaiorou E, Matziou VN, Grigoropoulou DD, Panagiotakos DB, Tsanakas JN, et al. Comparison in asthma and allergy prevalence in the two major cities in Greece: the ISAAC phase II survey. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2011 Nov-Dec;39(6):347-55.
45. Asher MI, Stewart AW, Wong G, Strachan DP, Garcia-Marcos L, Anderson HR. Changes over time in the relationship between symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis and eczema: a global perspective from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012 Sep-Oct;40(5):267-74.
46. Bibi H, Shoseyov D, Feigenbaum D, Nir P, Shiachi R, Scharff S, et al. Comparison of positive allergy skin tests among asthmatic children from rural and urban areas living within small geographic area. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002 Apr;88(4):416-20.
47. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 May;113(5):805-19; quiz 20.
48. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Sep;120(3):638-46.
49. Ben-Shoshan M, Harrington DW, Soller L, Fragapane J, Joseph L, St Pierre Y, et al. A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jun;125(6):1327-35.
50. Hill DJ, Hosking CS, Zhie CY, Leung R, Baratwidjaja K, Iikura Y, et al. The frequency of food allergy in Australia and Asia. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1997 Nov;4(1-2):101-10.
51. Traidl-Hoffmann C, Jakob T, Behrendt H. Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Mar;123(3):558-66.
52. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Feb;130(2):87-107.
53. Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):14-23; quiz 4.
54. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy*. 2004 Sep;34(9):1336-41.
55. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Brenna O, Farioli L, Trambaioli C, et al. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy*. 2001;56 Suppl 67:45-7.
56. Bugajska-Schretter A, Pastore A, Vangelista L, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer S. Molecular and immunological characterization of carp parvalbumin, a major fish allergen. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999 Feb-Apr;118(2-4):306-8.
57. Webber CM, England RW. Oral allergy syndrome: a clinical, diagnostic, and therapeutic challenge. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010 Feb;104(2):101-8; quiz 9-10, 17.

58. Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P, Stewart GA, Alkan S, Tonnel AB, et al. *Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response.* *J Leukoc Biol.* 2003 Jan;73(1):91-9.
59. Akdis M, Trautmann A, Klunker S, Daigle I, Kucuksezer UC, Deglmann W, et al. *T helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector Th1 cells.* *FASEB J.* 2003 Jun;17(9):1026-35.
60. Hammad H, Charbonnier AS, Duez C, Jacquet A, Stewart GA, Tonnel AB, et al. *Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors.* *Blood.* 2001 Aug 15;98(4):1135-41.
61. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. *Allergen nomenclature.* WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994 Nov;105(3):224-33.
62. van Ree R, Vieths S, Poulsen LK. *Allergen-specific IgE testing in the diagnosis of food allergy and the event of a positive match in the bioinformatics search.* *Mol Nutr Food Res.* 2006 Jul;50(7):645-54.
63. Moreno FJ. *Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity.* *Biomed Pharmacother.* 2007 Jan;61(1):50-60.
64. Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. *Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy.* *Clin Exp Allergy.* 2001 Oct;31(10):1599-606.
65. Blaser K. *Allergen dose dependent cytokine production regulates specific IgE and IgG antibody production.* *Adv Exp Med Biol.* 1996;409:295-303.
66. Riedl MA, Landaw EM, Saxon A, Diaz-Sanchez D. *Initial high-dose nasal allergen exposure prevents allergic sensitization to a neoantigen.* *J Immunol.* 2005 Jun 1;174(11):7440-5.
67. Antens CJ, Oldenwening M, Wolse A, Gehring U, Smit HA, Aalberse RC, et al. *Repeated measurements of mite and pet allergen levels in house dust over a time period of 8 years.* *Clin Exp Allergy.* 2006 Dec;36(12):1525-31.
68. Custis NJ, Woodfolk JA, Vaughan JW, Platts-Mills TA. *Quantitative measurement of airborne allergens from dust mites, dogs, and cats using an ion-charging device.* *Clin Exp Allergy.* 2003 Jul;33(7):986-91.
69. Behrendt H, Tomczok J, Sliwa-Tomczok W, Kasche A, Ebner von Eschenbach C, Becker WM, et al. *Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response.* *Int Arch Allergy Immunol.* 1999 Feb-Apr;118(2-4):414-8.
70. Blaser K, Carballido J, Faith A, Cramer R, Akdis C. *Determinants and mechanisms of human immune responses to bee venom phospholipase A2.* *Int Arch Allergy Immunol.* 1998 Sep;117(1):1-10.
71. Radauer C, Breiteneder H. *Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution.* *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jan;117(1):141-7.
72. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. *Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions.* *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Apr;121(4):847-52 e7.
73. Chapman MD, Pomes A, Breiteneder H, Ferreira F. *Nomenclature and structural biology of allergens.* *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Feb;119(2):414-20.
74. Sen M, Kopper R, Pons L, Abraham EC, Burks AW, Bannon GA. *Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes.* *J Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):882-7.
75. de Groot J, Kusters HA, de Jongh HH. *Deglycosylation of ovalbumin prohibits formation of a heat-stable conformer.* *Biotechnol Bioeng.* 2007 Jul 1;97(4):735-41.

76. Emanuelsson C, Spangfort MD. Allergens as eukaryotic proteins lacking bacterial homologues. *Mol Immunol.* 2007 May;44(12):3256-60.
77. Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA, et al. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest.* 1993 Sep;92(3):1374-80.
78. Ide F, Matsubara T, Kaneko M, Ichiyama T, Mukouyama T, Furukawa S. Staphylococcal enterotoxin-specific IgE antibodies in atopic dermatitis. *Pediatr Int.* 2004 Jun;46(3):337-41.
79. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Aug;106(2):228-38.
80. Zeller S, Glaser AG, Vilhelmsson M, Rhyner C, Cramer R. Immunoglobulin-E-mediated reactivity to self antigens: a controversial issue. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;145(2):87-93.
81. Furmonaviciene R, Sutton BJ, Glaser F, Laughton CA, Jones N, Sewell HF, et al. An attempt to define allergen-specific molecular surface features: a bioinformatic approach. *Bioinformatics.* 2005 Dec 1;21(23):4201-4.
82. Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, et al. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J Immunol.* 2000 Jun 1;164(11):5844-9.
83. Aalberse RC, Stadler BM. In silico predictability of allergenicity: from amino acid sequence via 3-D structure to allergenicity. *Mol Nutr Food Res.* 2006 Jul;50(7):625-7.
84. Silvanovich A, Nemeth MA, Song P, Herman R, Tagliani L, Bannon GA. The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity. *Toxicol Sci.* 2006 Mar;90(1):252-8.
85. Bousquet PJ, Chinn S, Janson C, Kogevinas M, Burney P, Jarvis D. Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy.* 2007 Mar;62(3):301-9.
86. Hoffman DR, El-Choufani SE, Smith MM, de Groot H. Occupational allergy to bumblebees: allergens of *Bombus terrestris*. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Nov;108(5):855-60.
87. Vandenplas O, Binard-Van Cangh F, Brumagne A, Caroyer JM, Thimpont J, Sohy C, et al. Occupational asthma in symptomatic workers exposed to natural rubber latex: evaluation of diagnostic procedures. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Mar;107(3):542-7.
88. Bousquet J, Flahault A, Vandenplas O, Ameille J, Duron JJ, Pecquet C, et al. Natural rubber latex allergy among health care workers: a systematic review of the evidence. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Aug;118(2):447-54.
89. Hoffmann-Sommergruber K. The SAFE project: 'plant food allergies: field to table strategies for reducing their incidence in Europe' an EC-funded study. *Allergy.* 2005 Apr;60(4):436-42.
90. Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, et al. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Mar;109(3):563-70.
91. Schocker F, Luttkopf D, Scheurer S, Petersen A, Cistero-Bahima A, Enrique E, et al. Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: a new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Jan;113(1):141-7.
92. Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Sastre J, Lidholm J, Andersson K, Oberhofer H, et al. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 May;123(5):1134-41, 41 e1-3.

93. Mari A. Importance of databases in experimental and clinical allergology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005 Sep;138(1):88-96.
94. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue):D138-41.
95. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;964:47-68.
96. Jenkins JA, Breiteneder H, Mills EN. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Dec;120(6):1399-405.
97. Kreis M, Forde BG, Rahman S, Mifflin BJ, Shewry PR. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J Mol Biol.* 1985 Jun 5;183(3):499-502.
98. Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ, Shewry PR. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(5):379-407.
99. Breiteneder H, Clare Mills EN. Plant food allergens--structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnol Adv.* 2005 Sep;23(6):395-9.
100. Teuber SS, Dandekar AM, Peterson WR, Sellers CL. Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Jun;101(6 Pt 1):807-14.
101. Robotham JM, Wang F, Seamon V, Teuber SS, Sathe SK, Sampson HA, et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Jun;115(6):1284-90.
102. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2010 Jan;6(1):1.
103. Silverstein KA, Moskal WA, Jr., Wu HC, Underwood BA, Graham MA, Town CD, et al. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* 2007 Jul;51(2):262-80.
104. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jun;1771(6):781-91.
105. Sancho AI, van Ree R, van Leeuwen A, Meulenbroek BJ, van de Weg EW, Gilissen LJ, et al. Measurement of lipid transfer protein in 88 apple cultivars. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;146(1):19-26.
106. Fernandez-Rivas M, Benito C, Gonzalez-Mancebo E, de Durana DA. Allergies to fruits and vegetables. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008 Dec;19(8):675-81.
107. Egger M, Hauser M, Mari A, Ferreira F, Gadermaier G. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2010 Sep;10(5):326-35.
108. Dunwell JM. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1998;15:1-32.
109. Dunwell JM, Purvis A, Khuri S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry.* 2004 Jan;65(1):7-17.
110. Burks AW, Williams LW, Helm RM, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien T. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol.* 1991 Aug;88(2):172-9.
111. Teuber SS, Jarvis KC, Dandekar AM, Peterson WR, Ansari AA. Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, jug r 2, from english walnut kernel (*Juglans regia*), a major food allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Dec;104(6):1311-20.

112. Wang F, Robotham JM, Teuber SS, Sathe SK, Roux KH. Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Sep;132(1):27-39.
113. Beyer K, Bardina L, Grishina G, Sampson HA. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Jul;110(1):154-9.
114. Lopez-Torrejon G, Salcedo G, Martin-Esteban M, Diaz-Perales A, Pascual CY, Sanchez-Monge R. Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds: protein isolation and cDNA cloning. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec;112(6):1208-15.
115. Sanchez-Monge R, Lopez-Torrejon G, Pascual CY, Varela J, Martin-Esteban M, Salcedo G. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clin Exp Allergy*. 2004 Nov;34(11):1747-53.
116. Lauer I, Foetisch K, Kolarich D, Ballmer-Weber BK, Conti A, Altmann F, et al. Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. *Biochem J*. 2004 Oct 15;383(Pt 2):327-34.
117. Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(4):535-42.
118. Bartolome B, Mendez JD, Armentia A, Vallverdu A, Palacios R. Allergens from Brazil nut: immunochemical characterization. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1997 May-Jun;25(3):135-44.
119. Tai SS, Wu LS, Chen EC, Tzen JT. Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage proteins in sesame. *J Agric Food Chem*. 1999 Dec;47(12):4932-8.
120. Sampedro J, Cosgrove DJ. The expansin superfamily. *Genome Biol*. 2005;6(12):242.
121. Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol*. 2003 Jan 3;325(1):123-33.
122. Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, et al. The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J*. 1989 Jul;8(7):1935-8.
123. Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D, et al. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Sep 14;214(2):538-51.
124. Scheurer S, Metzner K, Hausteiner D, Vieths S. Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol Immunol*. 1997 Jun;34(8-9):619-29.
125. Karamloo F, Scheurer S, Wangorsch A, May S, Hausteiner D, Vieths S. Pyr c 1, the major allergen from pear (*Pyrus communis*), is a new member of the Bet v 1 allergen family. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001 May 25;756(1-2):281-93.
126. Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Susani M, Ahorn H, Ebner C, et al. Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur J Biochem*. 1995 Oct 15;233(2):484-9.
127. Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Laimer Da Camara Machado M, Puhlinger H, et al. Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin Exp Allergy*. 1999 Jun;29(6):840-7.

128. Witke W. *The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes.* *Trends Cell Biol.* 2004 Aug;14(8):461-9.
129. Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, et al. *Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis.* *Clin Exp Allergy.* 2006 Jul;36(7):920-9.
130. Mari A. *Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis.* *Int Arch Allergy Immunol.* 2001 May;125(1):57-65.
131. Grabarek Z. *Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins.* *J Mol Biol.* 2006 Jun 9;359(3):509-25.
132. Okada T, Sasaki Y, Ohta R, Onozuka N, Toriyama K. *Expression of Bra r 1 gene in transgenic tobacco and Bra r 1 promoter activity in pollen of various plant species.* *Plant Cell Physiol.* 2000 Jun;41(6):757-66.
133. Ledesma A, Barderas R, Westritschnig K, Quiralte J, Pascual CY, Valenta R, et al. *A comparative analysis of the cross-reactivity in the polcalcin family including Syr v 3, a new member from lilac pollen.* *Allergy.* 2006 Apr;61(4):477-84.
134. Tinghino R, Twardosz A, Barletta B, Puggioni EM, Iacovacci P, Butteroni C, et al. *Molecular, structural, and immunologic relationships between different families of recombinant calcium-binding pollen allergens.* *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Feb;109(2):314-20.
135. Ayuso R, Lehrer SB, Tanaka L, Ibanez MD, Pascual C, Burks AW, et al. *IgE antibody response to vertebrate meat proteins including tropomyosin.* *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999 Nov;83(5):399-405.
136. Wild LG, Lehrer SB. *Fish and shellfish allergy.* *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005 Jan;5(1):74-9.
137. Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. *Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews.* *Clin Exp Allergy.* 2003 Jul;33(7):956-61.
138. Kuehn A, Scheuermann T, Hilger C, Hentges F. *Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity.* *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;153(4):359-66.
139. Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, Keller W, Sperr WR, Valent P, et al. *Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy.* *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4576-84.
140. Bugajska-Schretter A, Elfman L, Fuchs T, Kapiotis S, Rumpold H, Valenta R, et al. *Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion.* *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Jan;101(1 Pt 1):67-74.
141. Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Linhart B, Verdino P, Keller W, Schulmeister U, et al. *A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy.* *J Immunol.* 2007 May 15;178(10):6290-6.
142. Bernard H, Creminon C, Yvon M, Wal JM. *Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins.* *Int Arch Allergy Immunol.* 1998 Mar;115(3):235-44.
143. Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Cavagni G, Fiocchi A, et al. *Cross-reactivity between milk proteins from different animal species.* *Clin Exp Allergy.* 1999 Jul;29(7):997-1004.
144. Ah-Leung S, Bernard H, Bidat E, Paty E, Rance F, Scheinmann P, et al. *Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk.* *Allergy.* 2006 Nov;61(11):1358-65.

145. Langeland T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. VI. Occurrence of proteins cross-reacting with allergens in hen's egg white as studied in egg white from turkey, duck, goose, seagull, and in hen egg yolk, and hen and chicken sera and flesh. *Allergy*. 1983 Aug;38(6):399-412.
146. Mantyljarvi R, Rautiainen J, Virtanen T. Lipocalins as allergens. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 18;1482(1-2):308-17.
147. Pauli G, Oster JP, Deviller P, Heiss S, Bessot JC, Susani M, et al. Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2: diagnostic value for birch pollen and associated allergies. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 May;97(5):1100-9.
148. Maleki SJ, Hurlburt BK. Structural and functional alterations in major peanut allergens caused by thermal processing. *J AOAC Int*. 2004 Nov-Dec;87(6):1475-9.
149. Thomas WR. The advent of recombinant allergens and allergen cloning. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Apr;127(4):855-9.
150. King TP. Immunochemical properties of some atopic allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1979 Sep;64(3):159-63.
151. Fersht AR. From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: delights and scepticisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Aug;9(8):650-4.
152. Hackett CJ, Hurwitz JL, Dietzschold B, Gerhard W. A synthetic decapeptide of influenza virus hemagglutinin elicits helper T cells with the same fine recognition specificities as occur in response to whole virus. *J Immunol*. 1985 Aug;135(2):1391-4.
153. Lamb JR, Skidmore BJ, Green N, Chiller JM, Feldmann M. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med*. 1983 May 1;157(5):1434-47.
154. Russo E. The birth of biotechnology. *Nature*. 2003 Jan 23;421(6921):456-7.
155. Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, Chua KY, Plozza TM, Dilworth RJ, et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1988;85(1):127-9.
156. Tovey ER, Johnson MC, Roche AL, Cobon GS, Baldo BA. Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. *J Exp Med*. 1989 Oct 1;170(4):1457-62.
157. Tovey ER, Ford SA, Baldo BA. Enhanced immunodetection of blotted house dust mite protein allergens on nitrocellulose following blocking with Tween 20. *Electrophoresis*. 1989 Apr;10(4):243-9.
158. Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, Linhart B, Niederberger V, Swoboda I, et al. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:211-41.
159. Yuuki T, Okumura Y, Ando T, Yamakawa H, Suko M, Haida M, et al. Synthesis of biologically active recombinant Der f II. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1991;94(1-4):354-6.
160. Kaiser L, Velickovic TC, Badia-Martinez D, Adedoyin J, Thunberg S, Hallen D, et al. Structural characterization of the tetrameric form of the major cat allergen Fel d 1. *J Mol Biol*. 2007 Jul 20;370(4):714-27.
161. Monsalve RI, Lu G, King TP. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Expr Purif*. 1999 Aug;16(3):410-6.
162. Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. House dust mite allergens in asthma and allergy. *Trends Mol Med*. 2010 Jul;16(7):321-8.
163. Valenta R, Vrtala S, Laffer S, Spitzauer S, Kraft D. Recombinant allergens. *Allergy*. 1998 Jun;53(6):552-61.

164. Vrtala S, Focke-Tejkl M, Swoboda I, Kraft D, Valenta R. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods*. 2004 Mar;32(3):313-20.
165. Valenta R, Twardosz A, Vrtala S, Kraft D. Large scale production and quality criteria of recombinant allergens. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*. 1999(93):211-24; discussion 24-5.
166. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens: from production and characterization to diagnosis, treatment, and prevention of allergy. *Methods*. 2004 Mar;32(3):207-8.
167. Gronlund H, Saarne T, Gafvelin G, van Hage M. The major cat allergen, Fel d 1, in diagnosis and therapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(4):265-74.
168. Purohit A, Niederberger V, Kronqvist M, Horak F, Gronneberg R, Suck R, et al. Clinical effects of immunotherapy with genetically modified recombinant birch pollen Bet v 1 derivatives. *Clin Exp Allergy*. 2008 Sep;38(9):1514-25.
169. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Sep;116(3):608-13.
170. Linhart B, Hartl A, Jahn-Schmid B, Verdino P, Keller W, Krauth MT, et al. A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 May;115(5):1010-6.
171. Metz-Favre C, Linhart B, Focke-Tejkl M, Purohit A, de Blay F, Valenta R, et al. Skin test diagnosis of grass pollen allergy with a recombinant hybrid molecule. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Aug;120(2):315-21.
172. Linhart B, Jahn-Schmid B, Verdino P, Keller W, Ebner C, Kraft D, et al. Combination vaccines for the treatment of grass pollen allergy consisting of genetically engineered hybrid molecules with increased immunogenicity. *FASEB J*. 2002 Aug;16(10):1301-3.
173. Linhart B, Mothes-Luksch N, Vrtala S, Kneidinger M, Valent P, Valenta R. A hypoallergenic hybrid molecule with increased immunogenicity consisting of derivatives of the major grass pollen allergens, Phl p 2 and Phl p 6. *Biol Chem*. 2008 Jul;389(7):925-33.
174. Vrtala S, Hirtenlehner K, Vangelista L, Pastore A, Eichler HG, Sperr WR, et al. Division of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two non-anaphylactic fragments. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 May-Jul;113(1-3):246-8.
175. Zeiler T, Taivainen A, Rytkonen M, Rautiainen J, Karjalainen H, Mantylarvi R, et al. Recombinant allergen fragments as candidate preparations for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Dec;100(6 Pt 1):721-7.
176. Chen KW, Fuchs G, Sonneck K, Gieras A, Swoboda I, Douladiris N, et al. Reduction of the in vivo allergenicity of Der p 2, the major house-dust mite allergen, by genetic engineering. *Mol Immunol*. 2008 May;45(9):2486-98.
177. Takai T, Yokota T, Yasue M, Nishiyama C, Yuuki T, Mori A, et al. Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. *Nat Biotechnol*. 1997 Aug;15(8):754-8.
178. Swoboda I, De Weerd N, Bhalla PL, Niederberger V, Sperr WR, Valent P, et al. Mutants of the major ryegrass pollen allergen, Lol p 5, with reduced IgE-binding capacity: candidates for grass pollen-specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2002 Jan;32(1):270-80.
179. Focke M, Mahler V, Ball T, Kraft D, Valenta R. Nonallergenic peptides from surface-exposed areas or B-cell epitopes of allergens for specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 Jan-Mar;124(1-3):398-9.
180. Marsh DG, Norman PS, Roebber M, Lichtenstein LM. Studies on allergoids from naturally occurring allergens. III. Preparation of ragweed pollen allergoids by aldehyde modification in two steps. *J Allergy Clin Immunol*. 1981 Dec;68(6):449-59.

181. Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*. 1996 Jul 19;273(5273):352-4.
182. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med*. 1997 Aug;3(8):849-54.
183. Horner AA, Takabayashi K, Beck L, Sharma B, Zubeldia J, Baird S, et al. Optimized conjugation ratios lead to allergen immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugates with retained immunogenicity and minimal anaphylactogenicity. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Sep;110(3):413-20.
184. Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Van Nest G, Tuck S, Eiden JJ, et al. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul;106(1 Pt 1):124-34.
185. Skamstrup Hansen K, Poulsen LK. Component resolved testing for allergic sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010 Sep;10(5):340-8.
186. Gadermaier E, Staikuniene J, Scheiblhofer S, Thalhamer J, Kundi M, Westritschnig K, et al. Recombinant allergen-based monitoring of antibody responses during injection grass pollen immunotherapy and after 5 years of discontinuation. *Allergy*. 2011 Sep;66(9):1174-82.
187. Canonica GW, Bousquet J, Casale T, Lockey RF, Baena-Cagnani CE, Pawankar R, et al. Sub-lingual immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper 2009. *Allergy*. 2009 Dec;64 Suppl 91:1-59.
188. Larenas-Linnemann D. Oralair Birch, a recombinant major birch pollen allergen tablet for sublingual immunotherapy of allergic rhinitis caused by birch pollen. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010 May;11(5):586-96.
189. Oseroff C, Sidney J, Kotturi MF, Kolla R, Alam R, Broide DH, et al. Molecular determinants of T cell epitope recognition to the common Timothy grass allergen. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):943-55.
190. Barbee RA, Brown WG, Kaltenborn W, Halonen M. Allergen skin-test reactivity in a community population sample: correlation with age, histamine skin reactions and total serum immunoglobulin E. *J Allergy Clin Immunol*. 1981 Jul;68(1):15-9.
191. Barbee RA, Halonen M, Lebowitz M, Burrows B. Distribution of IgE in a community population sample: correlations with age, sex, and allergen skin test reactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1981 Aug;68(2):106-11.
192. Shearer WT, Leung DY. Preface to the 2010 primer on allergic and immunologic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S1-2.
193. Bousquet J, Anto JM, Bachert C, Bousquet PJ, Colombo P, Cramer R, et al. Factors responsible for differences between asymptomatic subjects and patients presenting an IgE sensitization to allergens. A GA2LEN project. *Allergy*. 2006 Jun;61(6):671-80.
194. Ishizaka K, Ishizaka T. Human reaginic antibodies and immunoglobulin E. *J Allergy*. 1968 Dec;42(6):330-63.
195. Ishizaka K, Ishizaka T. Reversed type allergic skin reactions by anti-gamma-E-globulin antibodies in humans and monkeys. *J Immunol*. 1968 Mar;100(3):554-62.
196. Konstantinou GN, Bousquet PJ, Zuberbier T, Papadopoulos NG. The longest wheal diameter is the optimal measurement for the evaluation of skin prick tests. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(4):343-5.
197. Heine RG, Verstege A, Mehl A, Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Niggemann B. Proposal for a standardized interpretation of the atopy patch test in children with atopic dermatitis and suspected food allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006 May;17(3):213-7.

198. Heinemann C, Schliemann-Willers S, Kelterer D, Metzner U, Kluge K, Wigger-Alberti W, et al. The atopy patch test -- reproducibility and comparison of different evaluation methods. *Allergy*. 2002 Jul;57(7):641-5.
199. Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Mar;100(3 Suppl 3):S1-148.
200. Cox L, Williams B, Sicherer S, Oppenheimer J, Sher L, Hamilton R, et al. Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Dec;101(6):580-92.
201. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J*. 2002 Mar;16(3):414-6.
202. Levy DA, Osler AG. Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena. XIV. Passive sensitization in vitro of human leukocytes to ragweed pollen antigen. *J Immunol*. 1966 Aug;97(2):203-12.
203. Togias A, Naclerio RM, Proud D, Pipkorn U, Bascom R, Iliopoulos O, et al. Studies on the allergic and nonallergic nasal inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 1988 May;81(5 Pt 1):782-90.
204. Togias A, Naclerio RM, Proud D, Baumgarten C, Peters S, Creticos PS, et al. Mediator release during nasal provocation. A model to investigate the pathophysiology of rhinitis. *Am J Med*. 1985 Dec 20;79(6A):26-33.
205. Togias A. Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun;111(6):1171-83; quiz 84.
206. Calderon MA, Demoly P, Gerth van Wijk R, Bousquet J, Sheikh A, Frew A, et al. EAACI: A European Declaration on Immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2012;2(1):20.
207. Calderon MA, Gerth van Wijk R, Eichler I, Matricardi PM, Varga EM, Kopp MV, et al. Perspectives on allergen-specific immunotherapy in childhood: an EAACI position statement. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Jun;23(4):300-6.
208. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy*. 1999 Jul;29(7):896-904.
209. van der Veen MJ, Mulder M, Witteman AM, van Ree R, Aalberse RC, Jansen HM, et al. False-positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Dec;98(6 Pt 1):1028-34.
210. Mittermann I, Swoboda I, Pierson E, Eller N, Kraft D, Valenta R, et al. Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (*Nicotiana tabacum*): increased profilin expression during pollen maturation. *Plant Mol Biol*. 1995 Jan;27(1):137-46.
211. Perez-Gordo M, Cuesta-Herranz J, Maroto AS, Cases B, Ibanez MD, Vivanco F, et al. Identification of sole parvalbumin as a major allergen: study of cross-reactivity between parvalbumins in a Spanish fish-allergic population. *Clin Exp Allergy*. 2011 May;41(5):750-8.
212. Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998 Feb;115(2):99-114.
213. Esch RE. Grass pollen allergens. *Clin Allergy Immunol*. 2004;18:185-205.
214. Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, et al. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet*. 1992 Mar 7;339(8793):569-72.

215. Taylor PE, Flagan RC, Valenta R, Glovsky MM. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Jan;109(1):51-6.
216. Ball T, Edstrom W, Mauch L, Schmitt J, Leistler B, Fiebig H, et al. Gain of structure and IgE epitopes by eukaryotic expression of the major Timothy grass pollen allergen, Phl p 1. *FEBS J.* 2005 Jan;272(1):217-27.
217. De Marino S, Morelli MA, Fraternali F, Tamborini E, Musco G, Vrtala S, et al. An immunoglobulin-like fold in a major plant allergen: the solution structure of Phl p 2 from timothy grass pollen. *Structure.* 1999 Aug 15;7(8):943-52.
218. Rajashankar K, Bufe A, Weber W, Eschenburg S, Lindner B, Betzel C. Structure of the functional domain of the major grass-pollen allergen Phlp 5b. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2002 Jul;58(Pt 7):1175-81.
219. Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, et al. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5489-96.
220. Vrtala S, Sperr WR, Reimitzer I, van Ree R, Laffer S, Muller WD, et al. cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; characterization of the recombinant Phl pV allergen. *J Immunol.* 1993 Nov 1;151(9):4773-81.
221. Niederberger V, Laffer S, Froschl R, Kraft D, Rumpold H, Kapiotis S, et al. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Feb;101(2 Pt 1):258-64.
222. Ichikawa S, Takai T, Inoue T, Yuuki T, Okumura Y, Ogura K, et al. NMR study on the major mite allergen Der f 2: its refined tertiary structure, epitopes for monoclonal antibodies and characteristics shared by ML protein group members. *J Biochem.* 2005 Mar;137(3):255-63.
223. Valenta R, Vrtala S, Ebner C, Kraft D, Scheiner O. Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992;97(4):287-94.
224. Laffer S, Spitzauer S, Susani M, Pairleitner H, Schweiger C, Gronlund H, et al. Comparison of recombinant timothy grass pollen allergens with natural extract for diagnosis of grass pollen allergy in different populations. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Sep;98(3):652-8.
225. Heiss S, Mahler V, Steiner R, Spitzauer S, Schweiger C, Kraft D, et al. Component-resolved diagnosis (CRD) of type I allergy with recombinant grass and tree pollen allergens by skin testing. *J Invest Dermatol.* 1999 Nov;113(5):830-7.
226. Niederberger V, Stubner P, Spitzauer S, Kraft D, Valenta R, Ehrenberger K, et al. Skin test results but not serology reflect immediate type respiratory sensitivity: a study performed with recombinant allergen molecules. *J Invest Dermatol.* 2001 Oct;117(4):848-51.
227. Marth K, Focke M, Flicker S, Valenta R. Human monoclonal antibody-based quantification of group 2 grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Mar;113(3):470-4.
228. Maglio O, Saldanha JW, Vrtala S, Spitzauer S, Valenta R, Pastore A. A major IgE epitope-containing grass pollen allergen domain from Phl p 5 folds as a four-helix bundle. *Protein Eng.* 2002 Aug;15(8):635-42.
229. Bernhisel-Broadbent J, Scanlon SM, Sampson HA. Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1992 Mar;89(3):730-7.

230. Smith AM, Chapman MD. Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen Der p 2. *Mol Immunol.* 1996 Mar-Apr;33(4-5):399-405.
231. Vierk KA, Koehler KM, Fein SB, Street DA. Prevalence of self-reported food allergy in American adults and use of food labels. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jun;119(6):1504-10.
232. Asero R, Antonicelli L, Arena A, Bommarito L, Caruso B, Colombo G, et al. Causes of food-induced anaphylaxis in Italian adults: a multi-centre study. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;150(3):271-7.
233. Pascual C, Martin Esteban M, Crespo JF. Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity. *J Pediatr.* 1992 Nov;121(5 Pt 2):S29-34.
234. Aas K. Studies of hypersensitivity to fish. Studies of different fractions of extracts from cod muscle tissue. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1967;31(3):239-60.
235. Van Do T, Elsayed S, Florvaag E, Hordvik I, Endresen C. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Dec;116(6):1314-20.
236. Aas K, Jebsen JW. Studies of hypersensitivity to fish. Partial purification and crystallization of a major allergenic component of cod. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1967;32(1):1-20.
237. Coffee CJ, Bradshaw RA. Carp muscle calcium-binding protein. I. Characterization of the tryptic peptides and the complete amino acid sequence of component B. *J Biol Chem.* 1973 May 10;248(9):3305-12.
238. Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand J Immunol.* 1975;4(2):203-8.
239. Elsayed S, Aas K. Characterization of a major allergen (cod). Observations on effect of denaturation on the allergenic activity. *J Allergy.* 1971 May;47(5):283-91.
240. Aas K, Elsayed SM. Characterization of a major allergen (cod). Effect of enzymic hydrolysis on the allergenic activity. *J Allergy.* 1969 Dec;44(6):333-43.
241. Berchtold MW. Structure and expression of genes encoding the three-domain Ca²⁺-binding proteins parvalbumin and oncomodulin. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Dec 22;1009(3):201-15.
242. Kretsinger RH, Nockolds CE. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem.* 1973 May 10;248(9):3313-26.
243. Heizmann CW, Hunziker W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem Sci.* 1991 Mar;16(3):98-103.
244. Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci.* 1996 Jan;21(1):14-7.
245. Declercq JP, Tinant B, Parello J, Rambaud J. Ionic interactions with parvalbumins. Crystal structure determination of pike 4.10 parvalbumin in four different ionic environments. *J Mol Biol.* 1991 Aug 20;220(4):1017-39.
246. Permyakov EA, Medvedkin VN, Mitin YV, Kretsinger RH. Noncovalent complex between domain AB and domains CD*EF of parvalbumin. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Jan 8;1076(1):67-70.
247. Lehky P, Blum HE, Stein EA, Fischer EH. Isolation and characterization of parvalbumins from the skeletal muscle of higher vertebrates. *J Biol Chem.* 1974 Jul 10;249(13):4332-4.
248. Goodman M, Pechere JF. The evolution of muscular parvalbumins investigated by the maximum parsimony method. *J Mol Evol.* 1977 Apr 29;9(2):131-58.

249. de Martino M, Novembre E, Galli L, de Marco A, Botarelli P, Marano E, et al. Allergy to different fish species in cod-allergic children: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Dec;86(6 Pt 1):909-14.
250. Bugajska-Schretter A, Grote M, Vangelista L, Valent P, Sperr WR, Rumpold H, et al. Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut*. 2000 May;46(5):661-9.
251. Niederberger V, Hayek B, Vrtala S, Laffer S, Twardosz A, Vangelista L, et al. Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7. *FASEB J*. 1999 May;13(8):843-56.
252. Kuehn A, Hutt-Kempf E, Hilger C, Hentges F. Clinical monosensitivity to salmonid fish linked to specific IgE-epitopes on salmon and trout beta-parvalbumins. *Allergy*. 2011 Feb;66(2):299-301.
253. Vazquez-Cortes S, Nunez-Acevedo B, Jimeno-Nogales L, Ledesma A, Fernandez-Rivas M. Selective allergy to the Salmonidae fish family: a selective parvalbumin epitope? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012 Jan;108(1):62-3.
254. Ebo DG, Kuehn A, Bridts CH, Hilger C, Hentges F, Stevens WJ. Monosensitivity to pangasius and tilapia caused by allergens other than parvalbumin. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2010;20(1):84-8.
255. Kerkhof M, Dubois AE, Postma DS, Schouten JP, de Monchy JG. Role and interpretation of total serum IgE measurements in the diagnosis of allergic airway disease in adults. *Allergy*. 2003 Sep;58(9):905-11.
256. Current issues relating to *in vitro* testing for allergen-specific IgE: a workshop report. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999 May;82(5):407-12.
257. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988 Sep;44(3):837-45.
258. Sampson HA. Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 3):1601-8.
259. Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Apr;127(4):259-68.
260. Sastre J, Landivar ME, Ruiz-Garcia M, Andregnette-Rosigno MV, Mahillo I. How molecular diagnosis can change allergen-specific immunotherapy prescription in a complex pollen area. *Allergy*. 2012 May;67(5):709-11.
261. Schmid-Grendelmeier P. [Recombinant allergens. For routine use or still only science?]. *Hautarzt*. 2010 Nov;61(11):946-53.
262. Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Poulsen LK, Neubauer A, Asturias J, Blom L, et al. FAST: Towards safe and effective subcutaneous immunotherapy of persistent life-threatening food allergies. *Clin Transl Allergy*. 2012 Mar 9;2(1):5.