

**UNIVERZITA KARLOVA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Ústav klinické imunologie a alergologie**

Doktorský studijní program  
**Lékařská imunologie**

**ANALÝZA SENZIBILIZACE NA MOLEKULÁRNÍ KOMPONENTY  
STANOVENÉ MULTIPLEXNÍM SYSTÉMEM IMMUNOCAP ISAC  
U PACIENTŮ S ATOPICKOU DERMATITIDOU**

**ANALYSIS OF SENSITIZATION TO MOLECULAR COMPONENTS  
DETERMINED BY THE MULTIPLEX SYSTEM IMMUNOCAP ISAC  
IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS**

Mgr. Radka Vaňková

Školitel: doc. MUDr. Jarmila Čelakovská, Ph.D.

Školitel konzultant: prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

Hradec Králové, 2021

Obhajoba dne:

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

**Hradec Králové, 21. 6. 2021**

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podporovali při uskutečnění této práce a motivovali mě ve vědecké činnosti. Prvně bych ráda poděkovala vedoucí disertační práce doc. MUDr. Jarmile Čelakovské, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při vedení mé práce. Rovněž bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Ctiradovi Andrášovi, Ph.D. za jeho cenné rady, oporu a pomoc při získání potřebných informací. Děkuji prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc. za podporu a za pomoc při zajištění studie. Zároveň děkuji Ing. Josefovi Bukačovi, RNDr. Evě Čermákové a prof. RNDr. Haně Skalské, CSc. za spolupráci při statistické zpracování výsledků studie. Děkuji MUDr. Ireně Krčmové, CSc. za odborné rady v průběhu studia. Děkuji paní Haně Kotlandové za grafické zpracování obrázků a úpravu výstupů. Zároveň děkuji kolegům z ÚKIA FN HK za morální podporu a povzbuzení.

Děkuji i mé rodině a blízkým za jejich pochopení a podporu v průběhu studia.

Tato práce vznikla za podpory programu PROGRES Q40/10 a projektu MŠMT: Vznik Core Facilities pro zlepšení kvality výzkumu spojeného s výukou na LFHK UK v HK, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002515.

## OBSAH

ÚVOD.....	12
1 Atopická dermatitida .....	12
1.1 Epidemiologie .....	12
1.2 Imunopatogeneze .....	12
1.2.1 Genetická predispozice .....	13
1.2.2 Epigenetika.....	15
1.2.3 Abnormality v bariérové funkci kůže, lipidová dysbalance .....	16
1.2.4 Dysfunkce imunitního systému, polarizace do Th2 fenotypu .....	18
1.2.5 Význam Th17 a Th22 T lymfocytů u atopické dermatitidy .....	19
1.2.6 Vliv vnějších faktorů včetně mikrobioty .....	20
2 Diagnostický postup u pacientů s atopickou dermatitidou.....	21
2.1 Dermatologické vyšetření .....	21
2.2 Alergologické vyšetření .....	22
2.3 Nežádoucí reakce na potraviny .....	23
2.3.1 Potravinová intolerance.....	23
2.3.2 Potravinová alergie.....	25
2.4 Diagnostika potravinové alergie.....	25
2.5 Klinické reakce na potraviny u pacientů s atopickou dermatitidou .....	26
2.6 Laboratorní diagnostika alergických reakcí .....	28
2.6.1 Test aktivace basofilů.....	28
2.6.2 Stanovení eosinofilního kationického proteinu .....	29
2.6.3 Stanovení tryptázy .....	29
2.6.4 Stanovení specifických IgE protilátek proti extraktivním alergenům .....	30
2.6.5 Molekulární komponentová diagnostika (CRD) .....	31
2.6.6 Multiplexové metody molekulární komponentové diagnostiky .....	32
2.7 Molekulárně definované alergený .....	34
2.7.1 Názvosloví.....	34
2.7.2 Molekulárně definované potravinové alergený .....	35
2.7.3 PR-10 proteiny .....	36
2.7.4 Thaumatin-like proteiny .....	36
2.7.5 Lipid transfer proteiny.....	36
2.7.6 Profiliny.....	37
2.7.7 Polkalciny .....	37

2.7.8	Zásobní proteiny.....	37
2.7.9	Tropomyosiny .....	37
2.7.10	Parvalbuminy .....	38
2.7.11	Zkříženě reagující cukerné determinanty .....	38
2.8	Predikce rizika rozvoje systémové reakce na potravinové alergeny .....	39
2.9	Význam stanovení sIgE protilátek proti potravinovým molekulárním komponentám ....	40
2.9.1	Zdroj alergenu – Sója ( <i>Glycine max</i> ) .....	40
2.9.2	Zdroj alergenu – Kravské mléko ( <i>Bos domesticus</i> ).....	41
2.9.3	Zdroj alergenu – Vejce ( <i>Gallus domesticus</i> ).....	42
2.9.4	Zdroj alergenu – Lískový ořech ( <i>Corylus avellana</i> ) .....	43
2.9.5	Zdroj alergenu – Vlašský ořech ( <i>Juglans regia</i> ) .....	44
2.9.6	Zdroj alergenu – Podzemnice olejná ( <i>Arachis hypogaea</i> ).....	45
2.9.7	Zdroj alergenu – Ryby, měkkýši a korýši .....	47
2.9.8	Zdroj alergenu – Pšeničná mouka ( <i>Triticum aestivum</i> ).....	48
	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>51</b>
3	Cíle práce.....	51
4	Materiál a metody.....	51
4.1	Soubor pacientů.....	51
4.2	Charakteristika souboru pacientů .....	52
4.3	Anamnestická data .....	52
4.4	Diagnostika bronchiálního astmatu a alergické rýmy .....	53
4.5	Zhodnocení závažnosti atopické dermatitidy .....	53
4.6	Odběr krevních vzorků.....	53
4.7	Vyšetření sérových sIgE protilátek metodou ImmunoCAP ISAC .....	54
4.7.1	Princip analýzy .....	54
4.7.2	Pracovní postup .....	55
4.8	Diagnostika potravinové alergie u pacientů s atopickou dermatitidou .....	60
4.9	Diagnostická eliminační a diagnostická hypoalergenní dieta .....	62
4.10	Otevřený expoziční test.....	62
4.11	Statistické hodnocení.....	64
5	Výsledky.....	67
5.1	Práce č. I.....	68
5.2	Práce č. II a III.....	68
5.3	Práce č. IV.....	69
5.4	Práce č. V .....	70

5.5	Práce č. VI.....	71
5.6	Práce č. VII.....	71
5.7	Práce č. VIII .....	72
5.8	Práce č. IX.....	72
5.9	Práce č. X .....	73
5.10	Práce č. XI.....	74
5.11	Práce č. XII.....	75
6	Závěr.....	79
7	Použitá literatura .....	80
8	Přílohy .....	90
8.1	Formulář hodnocení indexu SCORAD .....	90
8.2	Doporučený jídelníček v průběhu eliminační diety .....	91
8.3	Práce č. IX: Sensitization to Molecular Components in 104 Atopic Dermatitis Patients in Relation to Subgroups of Patients Suffering from Bronchial Asthma and Allergic Rhinitis.....	92
8.4	Práce č. X: Cluster analysis of molecular components in 100 patients suffering from atopic dermatitis according to the ISAC Multiplex testing .....	105
8.5	Práce č. XI: Food allergy to shrimps and fish in patients suffering from atopic dermatitis, the results of ISAC Multiplex examination.....	128
8.6	Práce č. XII: Allergy to walnuts and hazelnuts in atopic dermatitis patients and analysis of sensitization to molecular components .....	147

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AB	Bronchial Asthma, bronchiální astma
AD	Atopic Dermatitis, atopická dermatitida
ALEX <sup>2</sup>	Allergy Explorer 2, multiplexní systém
AMPs	Antimicrobial Peptides, antimikrobiální peptidy
APT	Atopy Patch Test, atopické epikutánní testy
AR	Allergic Rhinitis, alergická rýma
ARIA	Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma, iniciativa Alergická rýma a její vliv na astma
BAT	Basophil Activation Test, test aktivace bazofilů
CLR	C-type lectin receptor, C-lektinový receptor
CCD	Cross-Reactive Carbohydrate Determinants, zkříženě reagující cukerné determinanty
CRD	Component-Resolved Diagnosis, molekulární komponentová diagnostika
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, cytotoxický T lymfocytární antigen
DAO	diaminooxidáza
DBPCFC	Double-blind, Placebo-controlled Food Challenge, dvojitě zaslepený placebem kontrovaný potravinový expoziční test
EASI	Eczema Area and Severity Index, index k hodnocení závažnosti atopické dermatitidy
ECP	Eosinophil Cationic Protein, eosinofilní kationický protein
EER	Extraesophageal Reflux, extraesofageální reflux
FA	Food Allergy, potravinová alergie
FDA	Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FEIA	Fluorescence Enzyme Immunoassay, fluorescenční enzymoimunoanalýza
FLG	Filaggrin, filament-aggregating protein
GA <sup>2</sup> LEN	Global Allergy and Asthma European Network
GER	Gastroesophageal reflux, gastroezofageální reflux
GINA	Global Initiative for Asthma, Globální iniciativa pro astma
HIT	Histamine intolerance, histaminová intolerance

IgE	Immunoglobulin E
IGA	Investigator Global Assessment, index k hodnocení závažnosti atopické dermatitidy
IL-	Interleukin
ILC-2	Innate Lymphoid Cells Type 2, přirozené lymfoidní buňky typu 2
ISAC	Immuno Solid-Phase Allergen Chip, multiplexní systém
ISU-E	ISAC Standardized Units for specific IgE, standardizované jednotky pro specifické IgE protilátky stanovené metodou ISAC
IUIS	International Union of Immunological Societies, mezinárodní unie imunologických společností
LEIA	Luminescence Enzyme Immunoassay, luminiscenční enzyimoimunoanalýza
LEKTI	Lymphoepithelial Kazal-Type-related Inhibitor
MADx	Macro-Array Diagnostics
microRNA	jednovláknová nekódující RNA (miRNA)
NCGS	Non-Celiac Gluten Sensitivity, neceliakální glutenová senzitivita
NLR	NOD-like receptor
NPC2	Neumman-Pick family 2, proteinová rodina Neumman-Pick typ 2
nsLTP	Non-specific lipid transfer protein
OAS	Oral Allergy Syndrome, orální alergický syndrom
OET	Open Exposure Test, otevřený expoziční test
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns, molekulární vzory asociované s patogenem
PAR	Protease-activated receptor, proteázou aktivovaný receptor
PFS	Pollen-Food Syndrom, pylově-potravinový syndrom
PRR	Pattern-Recognition Receptor
PR-10 protein	Pathogenesis-Related 10 protein
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (CCL5)
SCORAD	Scoring Index of Atopic Dermatitis, index k hodnocení závažnosti atopické dermatitidy
sIgE	Specific Immunoglobulin E, specifické IgE protilátky
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus
SPINK5	Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 5



SPT	Skin Prick Test, kožní prick test
STAT6	Signal Transducer and Activator of Transcription 6, transkripční faktor STAT6
TNFRSF6B	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 6b, Decoy
TLP	Thaumatococcus-like protein
TLR	Toll-like receptor
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin, thymický stromální lymfopoetin
TEWL	Transepidermal Water Loss, transepidermální ztráta vody
UVB	UVB radiation, UVB záření
WAO	World Allergy Organization, Světová alergologická organizace
WDEIA	Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis, anafylaxe na pšenici vyvolaná fyzickou aktivitou
WHO/IUIS	World Health Organization/International Union of Immunological Societies

## SOUHRN

**Úvod:** Atopická dermatitida (AD) je chronické zánětlivé kožní onemocnění s akutními exacerbacemi a charakteristickými klinickými projevy. Základním pilířem diagnostiky AD je důkladná anamnéza, zhodnocení klinického stavu, doplněné o kožní, případně expoziční testy. Nedílnou součástí je vyšetření specifických IgE protilátek (sIgE) proti extraktivním nebo molekulárním komponentám alergenů. U respiračních forem alergického zánětu a při podezření na potravinovou alergii jsou recentně využívány biočipové multiplexní techniky. Tyto analýzy by mohly najít své uplatnění také při diagnostice kožních projevů alergického zánětu, jako je AD. Cílem této práce byla přesnější identifikace vyvolávajícího zdroje potravinové a inhalační alergie u pacientů s AD. Hodnotili jsme senzibilizační profily u pacientů s mírnou, středně těžkou a těžkou formou AD a u podskupiny pacientů s atopickou dermatitidou komplikovanou bronchiálním astmatem a alergickou rýmou. Dále jsme se zabývali senzibilizací na molekulární komponenty v kontextu potravinové alergie u pacientů s AD.

**Metodika:** Vzorky krevního séra pocházely od dospělých pacientů s AD. Hladiny sIgE protilátek byly stanoveny multiplexním systémem ImmunoCAP ISAC. Disertační práce komentuje publikované výsledky vědeckého týmu.

**Výsledky:** Nejčastěji byla u pacientů s AD zaznamenána senzibilizace na alergen pylu trav (rPhl p 1) a alergen břízy (rBet v 1). U pacientů s těžkou formou AD byl prokázán významně častější výskyt senzibilizace na alergeny bojínku (rPhl p 1), roztočů (rDer f 2, rDer p 2), plísní (rAlt a 6, rAsp f 6) a na zvířecí alergeny (rFel d 1, rFel d 4, rCan f 1, rCan f 5, rEqu c 1, nMus m 1). Výsledky klastrové analýzy odpovídají asociaci molekulárních komponent do proteinových rodin dle jejich biochemických charakteristik. Výsledky analýzy molekulárních komponent byly také posuzovány v souvislosti s klinickým přínosem pro diagnostiku potravinové alergie u pacientů s AD.

**Závěr:** Výsledky práce znázorňují detailní senzibilizační profil pacientů s atopickou dermatitidou a zároveň poukazují na důležitost epidermální bariéry, jejíž narušení vede ke zvýšenému prostupu alergenů do organismu. Přítomnost sIgE protilátek metodou ISAC doporučujeme vyšetřovat u dospělých jedinců s těžkou formou atopické dermatitidy, kdy zásadní roli v senzibilizaci mohou hrát především hlavní alergeny pylů trav, stromů, roztočů a zvířecí alergeny. V tomto směru doporučujeme zaměřit vyšetření sIgE protilátek v rámci klinických postupů a léčby pacientů s AD se zvláštním ohledem na riziko vzniku závažných reakcí.

## SUMMARY

**Background:** Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease with acute exacerbations and characteristic clinical manifestations. The diagnosis of AD is based on the medical history, evaluation of clinical condition, supplemented by skin or exposure tests. An integral part is also the examination of specific IgE antibodies against extract allergen or single molecular component. Biochip multiplexing techniques have recently been used for respiratory forms of allergic inflammation and when food allergy is suspected. However, these analyses could find application in the diagnosis of cutaneous manifestations of allergic inflammation, such as AD. The aim of this work was to more accurately identify the source of food and inhalant allergy in patients with AD. We evaluated sensitization profiles in patients with mild, moderate, and severe forms of AD and in a subset of patients with AD complicated by bronchial asthma and allergic rhinitis. We also addressed the sensitization to molecular components in the context of food allergy in patients with AD.

**Methods:** Blood serum samples were taken from adult patients with AD. Levels of specific IgE antibodies were determined by the ImmunoCAP ISAC multiplex system. The dissertation thesis summarises already published results of our scientific team.

**Results:** Sensitization to grass pollen allergen (rPhl p 1) and birch pollen allergen (rBet v 1) was most frequently reported in the patients with AD. Sensitization to following molecular components of grasses (rPhl p 1), house dust mites (rDer f 2, rDer p 2), moulds (rAlt a 6, rAsp f 6), and animals (rFel d 1, rFel d 4, rCan f 1, rCan f 5, rEqu c 1, nMus m 1) was significantly more frequent in patients with severe form of AD. Results of cluster analysis correspond to the molecular components into protein families grouped according to their biochemical structure. The results of the molecular component analysis were also tested in relation to the benefit for the clinical diagnosis of food allergy in patients with AD.

**Conclusions:** Results of our work represent the detailed sensitization profile of patients with atopic dermatitis and simultaneously point out the importance of the epidermal barrier, the disruption of which leads to the increased penetration of allergens into the body. Allergen specific IgE antibodies detected by the ISAC method is recommended to be determined in adults with severe atopic dermatitis, where the main allergens of grass pollen grains, trees, mites and animal allergens may play a crucial role in the sensitization. We recommend the adoption of the assessment of the presence of specific IgE against these components into the routine clinical procedures and treatment of patients with AD with the special respect to the patients with the high risk of development of severe adverse reactions after exposure to these allergens.

## ÚVOD

### 1 Atopická dermatitida

Atopie je vrozená dispozice k přecitlivělosti a rozvoji alergického onemocnění. Senzibilizovaní jedinci reagují na běžnou expozici alergenům zvýšenou produkcí IgE protilátek v krevním séru a vznikem alergického zánětu s typickými znaky. Alergický zánět se obvykle manifestuje v podobě alergických onemocnění jako je bronchiální astma (AB), alergická rýma (AR), atopická dermatitida (AD) a potravinová alergie (FA) (1).

Atopická dermatitida je heterogenní chronické zánětlivé onemocnění kůže s akutními exacerbacemi charakteristické řadou klinických projevů s významným zapojením imunitních mechanismů (1,2). Atopickou dermatitidou často začíná alergický zánětlivý proces, který pokračuje alergickou rhinitidou a bronchiálním astmatem. Tento jev bývá označován jako alergický pochod (3,4).

#### 1.1 Epidemiologie

Onemocnění AD začíná typicky v dětském věku a může pokračovat do dospělosti. Spíše výjimečně v dospělosti začíná. V dětském věku je proto zaznamenána vyšší prevalence 10–20 % (5,6) než v dospělosti 2,1–4,9 % (7).

#### 1.2 Imunopatogeneze

Atopická dermatitida je heterogenní onemocnění diferencující se do řady fenotypů dle nástupu onemocnění, lokalizace kožních ložisek, patofyziologie onemocnění a dalších hledisek (2,8).

V rámci patofyziologie ji můžeme členit na akutní a chronickou formu AD se zapojením odlišných imunitních mechanismů. Akutní fenotyp je spojen spíše s alergickým zánětem, IgE protilátkami a Th2 profilem imunitní reakce. U chronického typu převažuje Th1 imunitní reaktivita se zapojením neutrofilních granulocytů a bez přítomnosti specifických IgE protilátek (2).

Dle klinických a imunologických znaků lze AD rozlišit na alergickou formu (extrinstitní), u které převládají charakteristiky IgE mediovaných reakcí a na nealergickou formu (intrinstitní), u které není patrná senzibilizace k inhalačním a potravinovým alergenům s fyziologickou produkcí IgE protilátek. Avšak někteří autoři uvádějí, že rozlišení AD na tyto formy není možné, protože intrinstitní forma může časem přejít

ve formu extrinzní. Dynamický vztah mezi těmito formami podporují údaje vyplývající z hodnocení atopické dermatitidy při rozvoji respiračních alergických onemocnění (9).

Příčiny onemocnění zatím nejsou zcela objasněny, ale v patogenezi byly prokázány určité genetické vlivy spojené s narušením bariérových funkcí kůže a deregulací imunitních mechanismů (10–12). V poslední době je pozornost upřena také k dysbióze postihující mikrobiotu kůže a také zažívacího traktu (13).

### 1.2.1 Genetická predispozice

Genetická predispozice onemocnění byla podrobně zkoumána s použitím nejmodernějších metod molekulární biologie a genetiky. Postupně byl identifikován velký počet genů a genových polymorfismů spojených s rizikem onemocnění. Nejvyšší asociace byly nalezeny u dvou skupin genů, jedna je spojena se strukturálními abnormalitami epidermis a druhá skupina souvisí s imunitní odpovědí (2). Stejně geny související s bariérovými funkcemi kůže jsou deregulovány u atopické dermatitidy i psoriázy (14). V obou případech hraje narušení epidermis spojené s imunitní reaktivitou klíčovou roli. Jedním z nejlépe prozkoumaných genů je *FLG* kódující profilaggrin, prekursor filaggrinu. Filaggrin je strukturální protein stratum corneum a interaguje s keratinovými vlákny (8). Profilaggrin se vyskytuje v polymerní formě a je proteolyticky štěpen a defosforylován na monomery filaggrinu, které agregují s keratinovými vlákny (15). Při degradaci filaggrinu přes jednotlivé aminokyseliny vzniká z histidinu urokánová kyselina zvyšující protektivitu kůže proti UVB záření. Metabolizace přes glutamin vede ke vzniku pyrrolidon-5-karboxylové kyseliny, která napomáhá hydrataci kůže a snižuje pH pokožky (8). Homozygotní mutace genu *FLG* výrazně zvyšuje riziko těžkých forem atopické dermatitidy. S onemocněním jsou spojeny i heterozygotní mutace, vyskytující se u cca 10 % evropské populace. Mutace mají za následek až 50% snížení obsahu filaggrinu v epidermis a zvýšení rizika atopické dermatitidy (16). Filaggrin je inkorporován do lipidových vrstev kůže. Jeho deficience je spojena se sníženou hydratací stratum corneum a s nadměrnou transepidermální ztrátou vody (TEWL, Transepidermal Water Loss) (16). I když je deficience filaggrinu těsně asociována se vznikem atopické dermatitidy, není možné toto onemocnění připsat pouze jedinému faktoru. Existují pacienti s těžkou formou choroby bez mutace *FLG* a deficience filaggrinu (2).

Silná asociace s atopickou dermatitidou byla popsána u genů pro proteiny involucrin a lorikrin, které jsou součástí korneocytů (16). Dalším genem propojeným

s atopickou dermatitidou je *SPINK5* (Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 5), který kóduje protein LEKTI (Lymphoepithelial Kazal-Type-related Inhibitor), což je inhibitor serinových proteáz. Serinové proteázy mají významný vliv na fyziologickou deskvamaci stratum corneum a na kožní homeostázu. Regulace proteolýzy se podílí na diferenciaci keratinocytů a na udržení fyziologické kožní permeability (2). Polymorfismy v genu *SPINK5* jsou spojeny se zvýšeným rizikem těžších forem atopické dermatitidy a mohou ovlivňovat i sekreci některých cytokinů, jako například TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) (17,18).

Další velkou skupinou deregulovaných genů u atopické dermatitidy jsou geny související s imunitní odpovědí. Asociace mezi výskytem onemocnění a změnami exprese byly popsány u genů vrozené i adaptivní imunitní odpovědi (2). Z oblasti vrozené imunity je třeba na prvním místě jmenovat geny pro antimikrobiální proteiny a peptidy (AMP). Tyto významné složky obrany jsou vylučovány na povrch kůže, kde mají silné mikrobicidní účinky. Byly popsány asociace mezi deficiencí AMP a zvýšeným rizikem kožních infekcí, což může vést ke ztrátě bariérových funkcí spojené se snazším průnikem alergenů do kůže a následně ke vzniku atopické dermatitidy (2). Modelovým příkladem je gen pro  $\beta$ -defensin 1, jehož SNP (Single Nucleotide Polymorphism) jsou asociovány s tíží onemocnění, zvýšením počtu eosinofilů v lézích a hladinou specifických IgE protilátek (19). Také polymorfismy genů pro dozorové receptory (PRR, Pattern-Recognition Receptor) mohou souviset se vznikem a rozvojem onemocnění. U pacientů s atopickou dermatitidou byly popsány změny v genech pro TLR (Toll-like receptory), zejména TLR2 (20), TLR4 (21) a TLR9 (22), dále v genech pro NLR (NOD-like receptory) (23). Tyto struktury vrozené imunity jsou určeny k identifikaci signálů nebezpečí spojených s patogeny (PAMP, Pathogen-associated molecular patterns). Rozpoznání PAMP struktur vede k aktivaci buněk a k přepisu genů pro prozánětlivé cytokiny ovlivňující mechanismy vrozené i adaptivní imunity. Je obecně přijímanou představou, že atopická dermatitida je onemocnění spojené s aktivací imunoregulačního subsetu pomocných induktorových T-lymfocytů Th2. Pro tento subset je typický cytokinový profil zahrnující zejména interleukiny IL-4, IL-5 a IL-13 (2,8,24). Nepřekvapí proto, že u pacientů s touto chorobou byly nalezeny polymorfismy v genech pro IL-4 a IL-13 a také v genech pro jejich receptory IL-4R $\alpha$  a IL-13R $\alpha$  (25,26). Asociaci s výskytem a tíží atopické dermatitidy vykazují i geny pro další cytokiny a chemokiny, zejména IL-2 (27), IL-6 (28), IL-12 (29), IL-18 (30), IL-31 (31), IL-33 (32), RANTES

(Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) (33,34) a TSLP (35). Dále byly popsány i s dermatitidou spojené polymorfismy v genech pro histaminový receptor H4 (HRH4) (36), vitamin D (37), TNFRSF6B (decoy receptor 3 z nadrodiny TNF receptorů) (38) a transkripční faktor STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) (39,40).

Genetická predispozice má na vznik atopické dermatitidy významný vliv, nicméně nevysvětluje sama o sobě nástup onemocnění. K dalším důležitým podmínkám patří stav a neporušenost bariérových funkcí kůže včetně optimálního složení kožní mikrobioty a také dysfunkce imunitního systému vedoucí k nepřiměřené reaktivitě na vnější stimuly typu alergenů (8).

### 1.2.2 Epigenetika

Epigenetické mechanismy se uplatňují na celé řadě úrovní od transkripce po translaci a mají zásadní roli při buněčné diferenciaci. Patří mezi ně tři hlavní procesy, jako je metylace DNA, modifikace histonových proteinů a RNA interference. Výsledkem procesu je změna, která vede ke snížení nebo zvýšení exprese určitého genu bez změny nukleotidové sekvence DNA (genomu). Recentní poznatky ukazují, že epigenom je dynamický a mění se s ohledem na životní prostředí, výživu a stárnutí organismu. Výrazná asociace s atopickou dermatitidou byla popsána u epigenetických změn týkajících se regulace imunitních odpovědí a strukturálních abnormalit kůže (35).

S atopickou dermatitidou jsou spojované demethylace a hypomethylace v oblasti promotoru *FCER1G* genu, které přispívají k nadměrné expresi vysokoafinního receptoru pro imunoglobulin E (FcεRI) na monocytech a dendritických buňkách (35). Demethylace specifické regulatorní oblasti *TSLP* genu vede ke zvýšené expresi TSLP v kožních lézích u pacientů s AD (41).

Buněčná proliferace a diferenciaci může být regulována pomocí RNA interference, tzn. prostřednictvím microRNA (jednovláknová nekódující RNA, miRNA). MicroRNA se obvykle váže na základě komplementarity na mRNA v nepřekládané oblasti (3'UTR) čímž dochází k regulaci genové exprese na úrovni translace (24). Jsou známy již tisíce microRNA, avšak informace o nich související s konkrétními fyziologickými a patologickými stavy jsou prozatím neúplné. Zjistěte ale nepřekvapí, že zvýšená exprese microRNA byla popsána jak u atopické dermatitidy, tak u psoriázy. Jedná se například o miRNA-17-5p a miRNA-21 (2). Asociaci s výskytem atopické dermatitidy vykazují

i miRNA-146a, miRNA-155 a miRNA-223 (41). Zvýšená exprese miRNA-155 byla také popsána v souvislosti s expozicí některými antigenními stimuly (např. alergeny roztočů a superantigeny *S. aureus*) (42). Molekula miRNA-155 se za určitých okolností podílí na regulaci diferenciaci T lymfocytů do funkčních subtypů Th17 a Treg T lymfocytů. Zároveň je zvýšená exprese miRNA-155 spojována s inhibicí exprese molekuly CTLA-4 (cytotoxický T lymfocytární antigen), což vede ke zvýšení proliferace efektorových T lymfocytů až k chronickému zánětlivému stavu (2,35).

### 1.2.3 Abnormality v bariérové funkci kůže, lipidová dysbalance

Kůže není pouze pasivní mechanickou bariérou, která chrání organismus před okolním prostředím a udržuje jeho integritu, ale je považována za plnohodnotný imunitní orgán. Abnormality v bariérové funkci kůže asociované s atopickou dermatitidou jsou charakteristické především zvýšenou ztrátou transepidermální vody, změnou pH, zvýšenou permeabilitou kůže a změnou ve složení lipidů. Základním rysem atopické dermatitidy je suchá až xerotická kůže (43).

Kůže je z histologického hlediska tvořena několika základními vrstvami. Svrchní rohovatějící vrstvu epidermis (stratum corneum) tvoří korneocyty, které obsahují proteiny, jako je lorikrin, involucrin, filaggrin a silnou vrstvu lipidů, ceramidů s dlouhými řetězci, cholesterolem a volnými mastnými kyselinami, které tvoří tzv. lipidovou matrix. Udržení optimální hydratace kůže má za úkol vodu vázající systém, který je tvořený spojením ceramidových struktur s proteiny metabolizovaného filaggrinu. Bylo prokázáno, že změny ve složení ceramidů vedou k narušení integrity kůže a ke snadnějšímu průniku alergenů do hlubších vrstev kůže. Například zvýšená produkce Th2 cytokinů je spojována s redukcí volných mastných kyselin a ceramidů s dlouhými řetězci (44).

V hlubších vrstvách epidermis se nacházejí epitelové buňky, keratinocyty, které jako první přicházejí do kontaktu s infekčními agens a alergeny a výrazně se zapojují do obranné fáze zánětu. Kromě keratinocytů zde nacházíme také Langerhansovy buňky (dendritické kožní buňky), které rovněž přispívají k rozvoji zánětlivé reakce. Alergeny jsou pravděpodobně prostřednictvím synergické vazby se strukturami patogenních mikrobů nebo s polutanty okolního prostředí schopny tvořit komplexní struktury, které jsou rozpoznávány dozorovými PRR receptory na povrchu keratinocytů. Jedná se například o receptory TLR1, 2, 4, 5 a 6. Dále mohou být antigenní struktury rozpoznávány pomocí C lektinových CLR receptorů. Prostřednictvím cytoplazmatických NLR receptorů jsou keratinocyty schopni sestavit funkční inflammasomy a produkovat prozánětlivé cytokiny



IL-1 $\beta$  a IL-18. Alergeny, které mají proteázovou aktivitu (např. roztoči, spory plíní a další) se mohou vázat na PAR receptory (proteázou aktivované receptory). Keratinocyty se po kontaktu s infekčními nebo alergenními stimuly aktivují a tvoří antimikrobiální peptidy a proteiny (AMP) a zároveň jsou zdrojem řady cytokinů a chemokinů, zejména IL-6, TSLP, IL-31, IL-33, a IL-25, které aktivují další imunitní buňky v kůži (rezidentní mastocyty, eozinofily, přirozené lymfoidní buňky) a polarizují imunitní odpověď do Th2 fenotypu. Molekula IL-31 je asociovaná s pruritem a byla ve zvýšené míře detekována v kožních lézích v akutní fázi atopické dermatitidy. Některé studie dokládají korelaci IL-31 se závažností atopické dermatitidy (45). Nedávné studie poukazují na důležitost IL-33, který je asociován s akutní fází atopické dermatitidy a podílí se na aktivaci přirozených lymfoidních buněk. TSLP je cytokin příbuzný IL-7, který je exprimovaný především keratinocyty a v menší míře také žírnými buňkami, fibroblasty a dendritickými buňkami kůže. Je považován za jeden z hlavních faktorů podílejících se na polarizaci do Th2 odpovědi (2).

AMP jsou považovány za první linii humorální obranné bariéry kůže proti vnějším stimulům. Jsou schopny inaktivovat a poškodit patogenní agens, avšak do značné míry slouží jako alarminy, které aktivují dendritické buňky a následně i T lymfocyty. K nejdůležitějším zástupcům AMP řadíme lidské  $\beta$ -defenziny (HBD-2, HBD-3), katelicidin, jeho štěpný produkt LL-37, psoriazin, kalprotektin a ribonukleázu 7 (RNáza7) (4,44). U pacientů s atopickou dermatitidou často dochází k alteraci produkce katelicidinu LL-37 a  $\beta$ -defenzinu HBD-2 (8). Th2 cytokinové prostředí (např. IL-4 a IL-13) vede k inhibici exprese AMP a zároveň zvyšuje predispozici kolonizace kmeny *Staphylococcus aureus*, čímž dochází k dalšímu narušení bariérové funkce kůže a zvýšení její permeability.

Hlubší vrstva kůže dermis je tvořena především kolagenovými a elastickými vlákny a zároveň je prostoupena řadou krevních a lymfatických cév. Zároveň zde nalézáme další subtypy dendritických buněk, jako jsou například plazmacytoidní dendritické buňky (schopné odpovědět na virové podněty) a myeloidní dendritické buňky podílející se na zánětlivé odpovědi. Poměrně hojně zde nalézáme přirozené lymfoidní buňky (ILC). U pacientů s atopickou dermatitidou převládají ILC typu 2, které jsou po aktivaci schopné produkovat prozánětlivé cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13. V okolí nervových vláken nacházíme žírné buňky, které se po aktivaci okamžitě degranulují a podporují obranný zánět (44).

#### 1.2.4 Dysfunkce imunitního systému, polarizace do Th2 fenotypu

U vnímavých jedinců vede kontakt s alergenními stimuly k rozvoji imunopatologické reakce I. typu, která je mediovaná protilátkami třídy IgE. Zároveň dochází k nevratným změnám epitelových buněk a ztrátě integrity kůže. Jak už bylo zmíněno, poškozené epitelové buňky produkují řadu prozánětlivých mediátorů, které aktivují např. dermální dendritické buňky, mastocyty, ILC-2 buňky a následně polarizují imunitní odpověď do Th2 fenotypu. Dendritické buňky mohou svými výběžky prostupovat přes endotelové bariéry a zároveň identifikovat i alergenní determinanty, které pronikly poškozeným epitelem do subepitelového prostoru. Aktivované antigen prezentující buňky vystavují na svém povrchu antigenní peptidy (odvozené z daného alergenu) prostřednictvím molekul HLA II. třídy. Zároveň opouštějí epidermis a migrují cestou aferentních lymfatických cest do spádových lymfatických uzlin, kde prezentují alergenní peptidy společně s kostimulačními signály naivním Th0 T lymfocytům. Cytokinové prostředí, které vytvářejí vrozené imunitní buňky, polarizuje imunitní odpověď převážně do Th2 fenotypu, který dominuje u rozvíjejícího se alergického zánětu. Takto aktivované buňky se díky adhezním molekulám a chemokinovým receptorům dostávají zpět do místa, kde došlo ke vstupu alergenu do organismu. Kožní lymfocytární antigen (CLA) a chemokinové receptory CCR4 a CCR10 umožňují přestup T lymfocytů z krevního řečiště zpět do kůže. Nově diferencované Th2 T lymfocyty podporují zrání B lymfocytů a jejich přeměnu na plazmatické buňky, které produkují alergen specifické IgE protilátky. Izotypový přesmyk je řízen zejména interleukiny IL-4 a IL-13, které jsou produkovány Th2 T lymfocyty, ale i rezidentními ILC-2, mastocyty, basofily a eozinofily. Vytvořené alergen specifické IgE protilátky jsou uvolňovány do krevního řečiště, kde se navazují na membránové FcεRI receptory basofilů a mastocytů, čímž dochází k jejich senzibilizaci. Tímto se rozvíjí imunopatologická reakce. Základním znakem alergického zánětu je tvorba protilátek třídy IgE, které jsou specifické pro daný alergen (43,44).

Po opakovaném kontaktu s příčinným alergenem je reakce imunitního systému velmi rychlá. Antigenní struktury snáze pronikají přes porušenou epidermální bariéru a setkávají se s žírnými buňkami. Vazbou komplexního nativního alergenu na variabilní části specifických IgE protilátek navázaných na FcεRI receptory dochází k přemostění dvou a více sousedních receptorů, což vede k aktivaci kaskády signalizačních drah a k degranulaci mastocytů (uvolnění histaminu, heparinu a dalších preformovaných mediátorů), dále k aktivaci transkripčních faktorů a přepisu genů pro prozánětlivé cytokiny

a chemokiny. Preformované mediátory mohou vést k podráždění periferních nervů v kůži a k rozvoji pruritu. Sekrece cytokinů (např. IL-4, IL-9, IL-13 a IL-25) vyvolá lokální poškození tkáně, způsobí konstriktci hladkého svalstva, vasodilataci a zvýšení cévní permeability. Eosinofilní granulocyty jsou do postiženého místa přitahovány zejména IL-5 a eotaxiny, které jsou produkovány Th2 T lymfocyty a buňkami ILC-2. Systémová odpověď organismu na antigenní struktury alergenu může vyústit až v život ohrožující anafylaktickou reakci. Jedná se o akutní stav, který postihuje více orgánů (dýchací, kardiovaskulární a urogenitální systém, kůži a zažívací trakt). Uvolněné prozánětlivé mediátory způsobí zvýšenou permeabilitu cév, laryngeální edém, bronchokonstriktci, vazodilataci, hypotenzi s následným otokem plic a mohou vést až k multiorgánovému selhání (43,44).

### 1.2.5 Význam Th17 a Th22 T lymfocytů u atopické dermatitidy

Kromě Th2 T lymfocytů byly v kožních lézích pacientů s AD identifikovány i funkční subtypy Th1, Th17 a Th22 T lymfocytů a jejich odpovídající cytokiny, které přispívají k rozmanitosti klinických fenotypů AD (2). Funkční subtypy Th17 a Th22 T lymfocytů mají dominantní postavení v patogenezi poškozujícího zánětu u pacientů s psoriázou. Funkční polarizace těchto subtypů je zprostředkována především působením cytokinu IL-23, který je produkován hlavně dendritickými buňkami kůže (44).

Funkční subtyp Th17 T lymfocytů je charakteristický produkcí prozánětlivých cytokinů IL-17A, IL-17F a v menší míře i IL-22. Th17 T lymfocyty podporují Th2 imunitní odpověď a podílejí se na obraně reakci proti bakteriálním a fungálním stimulům. Zvýšené zastoupení Th17 lymfocytů je spojováno s akutní fází atopické dermatitidy, naopak v chronické fázi AD je jejich zastoupení minoritní. Některé studie popisují zvýšený podíl Th17 T lymfocytů u atopické dermatitidy ve spojitosti s kolonizací *S. aureus*, který produkuje celou řadu exotoxinů (např. stafylokokový enterotoxin B) (2). Přítomnost Th17 T lymfocytů negativně koreluje s výskytem eozinofilů a hladinou specifických IgE protilátek. Existují také důkazy, že IL-17 může negativně regulovat expresi *FLG* genu a tím vstupovat do bariérových funkcí kůže (45).

Funkční subtyp Th22 T lymfocytů je charakteristický produkcí cytokinu IL-22 bez současné sekrece IL-17 a je asociován s chronickou fází atopické dermatitidy. Hlavním producentem molekuly IL-22 jsou T lymfocyty subtypu Th22, ale může být produkován

i Th17 T lymfocyty lokalizovanými v kůži. Cytokin IL-22 se podílí především na integritě epitelových buněk a zesiluje bariérové funkce kůže (2).

U chronické fáze atopické dermatitidy dochází ke změně patologického mechanismu, kde převládá polarizace do Th1 odpovědi s dominantními cytokiny INF- $\gamma$ , IL-12, IL-2. Dlouhodobé dráždění poškozených epitelových buněk (keratinocyty, dermální dendritické buňky, Langerhansovy buňky) bývá příčinou přechodu do chronické fáze onemocnění spojené s migrací neutrofilních granulocytů do kůže vedoucí k remodelaci a fibrotizaci kožní tkáně. Výsledkem bývá lichenifikace a abnormální proliferace keratinocytů (44).

### 1.2.6 Vliv vnějších faktorů včetně mikrobioty

Na vyšší prevalenci atopické dermatitidy se podílejí i vlivy zevního prostředí. Mezi významné patří životní styl (dietní opatření, západní způsob stravování, hygienická hypotéza), faktory týkající se životního prostředí (cigaretový kouř, znečištěné ovzduší), dlouhodobý stres, hormonální vlivy a v neposlední řadě proměnné faktory v průběhu těhotenství a po porodu (porod císařským řezem, délka kojení, umělá výživa, kouření matky a další) (35).

Etiopatogeneze AD je do značné míry ovlivněna expozicí patogenními agens (PAMP) a složením střevního a kožního mikrobiomu. V několika studiích bylo dokázáno, že nevyváženost stravy a s ní úzce související složení střevního mikrobiomu přispívá k rozvoji alergického zánětu. Rizikovým faktorem bývá osídlení gastrointestinálního traktu bakteriemi kmene *Bacteroidetes* (*E. coli*) a *Proteobacteria* (*C. difficile*), které je spojováno se sníženou indukcí T regulačních lymfocytů a zvýšenou střevní permeabilitou. Naopak protektivní vliv na trávicí trakt má převládající zastoupení bakterií kmene *Firmicutes* (r. *Lactobacillus*) (8,44).

Druhově pestré a vyvážené složení kožního mikrobiomu je zcela zásadní pro správnou funkci kožní bariéry. Fyziologický mikrobiom kůže brání kolonizaci patogenními agens a má vliv na vývoj imunitního systému. Důležité je zmínit, že většina interakcí, které probíhají mezi našimi buňkami a mikrobiotou je v rovnováze. Řada těchto interakcí vede k modulaci nespecifické i specifické imunitní odpovědi. Mikrobiota se podílí na metabolismu kožních složek, které vedou ke snížení pH kůže, které výrazně přispívá k udržení kožní homeostázy. Naopak zvýšené pH kůže usnadňuje rozvoj mikrobiálních kožních infekcí a prohlubuje defekty kožní bariéry (8).

Fyziologická mikrobiota vytváří spektrum působků, např. bakteriociny, kterými poškozují patogenní mikroorganismy. Dysbalance ve složení kožní mikrobioty usnadňuje vznik a průběh řady kožních onemocnění. U pacientů trpících atopickou dermatitidou je tato rovnováha narušena především kolonizací kmeny *S. aureus*, které mají silný prozánětlivý potenciál a podílejí se na exacerbaci AD (13). Míra kolonizace koreluje se závažností onemocnění, tzn. častěji jsou kolonizováni pacienti s těžkou formou AD. *S. aureus* vstupuje do řady imunologických procesů. Může například vyvolat expenzi B lymfocytů nezávisle na podpoře T lymfocyty, aktivaci epitelálních buněk a buněk vrozené imunity a tím zvýšit produkci prozánětlivých cytokinů (TSLP, IL-4, IL-12 a IL-22) a podpořit funkční polarizaci směrem k Th2 odpovědi (8,13). Součástí kožní mikrobioty jsou i kvasinky rodu *Malassezia*, které také ovlivňují průběh atopické dermatitidy. Ve zdravé kůži většinou působí jako komenzálové, avšak u vnímavých jedinců se podílejí na zánětlivé odpovědi (46). Naopak kolonizace komenzálními kmeny *S. epidermidis* a *S. cohnii* napomáhá udržet kožní homeostázu a zejména v dětském věku chrání před rozvojem atopické dermatitidy (13).

## **2 Diagnostický postup u pacientů s atopickou dermatitidou**

Při určení diagnózy atopické dermatitidy (AD) vycházíme z důkladné rodinné a osobní anamnézy, dále z dermatologického vyšetření, kde se v diagnostice AD uplatňují Hanifin-Rajkova kritéria (47). V rámci alergologického vyšetření se ambulantně provádějí kožní prick testy (SPT, skin prick test) k vyšetření reaktivity na vyvolávající alergen zejména v případě časných IgE mediováných reakcí. Při podezření na opožděný typ imunopatologické reakce lze v dermatologické ambulanci provést kožní náplast'ové testy tzv. atopické epikutánní testy (APT, atopy patch test), které slouží k detekci senzibilizovaných T lymfocytů. Nedílnou součástí diagnostiky AD je laboratorní stanovení celkových a specifických IgE protilátek proti potravinovým a inhalačním alergenům (48).

### **2.1 Dermatologické vyšetření**

Klinické projevy atopické dermatitidy jsou obecně velmi pestré. Může se jednat o mírné formy jako je pityriasis alba (suché, hypopigmentované skvrny), o typické projevy AD v oblasti predilekčních míst až po rozsáhlé formy charakteru erythrodermie. Při diagnostice AD postupujeme dle Hanifin-Rajkových kritérií, které pro stanovení diagnózy AD vyžadují přítomnost alespoň tří ze čtyř hlavních a tří z dvaceti čtyř vedlejších kritérií (47).

Hlavními kritérii jsou: pruritus, atopická osobní nebo rodinná anamnéza, typická morfa v určitém místě, chronický nebo chronicko-recidivující zánět kůže.

Mezi vedlejší kritéria patří: časná onemocnění, pozitivní kožní prick testy, zvýšená sérová hladina IgE protilátek, bílý dermatografismus, xerosa, ichthyosis vulgaris, pityriasis alba, perifolikulární akcentace, folikulární keratosy, cheilitis, erytém na obličeji a krku, infraorbitální vráska (Dennie-Morganův příznak), keratokonus, recidivující keratokonjunktivitidy, intenzivnější svědění kůže při pocení, specifická lokalizace dermatitidy, dále exogenní provokační faktory nebo emoční faktory, které ovlivňují průběh onemocnění či infekce bakteriemi *Staphylococcus aureus* nebo viry *Herpes simplex*, které mohou způsobit komplikace projevů atopické dermatitidy.

Závažnost atopické dermatitidy lze hodnotit různými skórovacími systémy, například IGA (Investigator Global Assessment), EASI (Eczema Area and Severity Index), SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) aj. (49).

Pro běžnou praxi je často využíván index SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis), který hodnotí jak subjektivní, tak objektivní symptomy atopické dermatitidy a byl navržen již v roce 1993 (50,51). Hodnocení se skládá ze tří částí, a to rozsahu postižené plochy, intenzity onemocnění a subjektivních parametrů. Index SCORAD je hodnocen 0 až 25 bodů jako mírná forma AD, nad 25 bodů do 50 bodů jako středně těžká forma AD a nad 50 bodů jako těžká forma AD (50).

Skórovací systém EASI je v dnešní době využíván jak ke zhodnocení závažnosti AD, tak je považován za validní ukazatel účinnosti biologické léčby atopické dermatitidy (např. dupilumabem, humánní monoklonální protilátkou proti alfa podjednotce receptorů pro IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) a pro IL-13 (IL-13 $\alpha$ )). V klinické praxi se uplatňují hodnoty EASI-50 (absolutní zlepšení EASI skóre  $\geq 50$  % oproti výchozímu stavu) a EASI-75 (absolutní zlepšení EASI skóre  $\geq 75$  % oproti výchozímu stavu) (49,52).

Použitím skórovacích systémů jsou výsledky různých studií v běžné praxi, jakož i v observačních nebo dvojité slepých randomizovaných klinických studiích, lépe porovnatelné (53).

## 2.2 Alergologické vyšetření

K základním alergologickým vyšetřením IgE mediované alergické reakce patří vedle podrobné anamnézy kožní prick testy (SPT, Skin Prick Test) se standardizovanými inhalačními alergeny (pyly stromů, trav, plevele, zvířecí alergeny, roztoči domácího prachu

a spory plísní). Test spočívá v intradermální aplikaci alergenu na kůži předloktí s následným odečtením indurace (velikost o průměru 3 mm a více je považována za pozitivní reakci) (54). S ohledem na omezenou dostupnost komerčně vyráběných diagnostických extraktů pro SPT jsou používány také prick-to-prick testy s nativními potravinami, díky kterým můžeme testovat téměř jakoukoli potravinu, ale s určitou opatrností u potravin s histaminoliberačním účinkem (48).

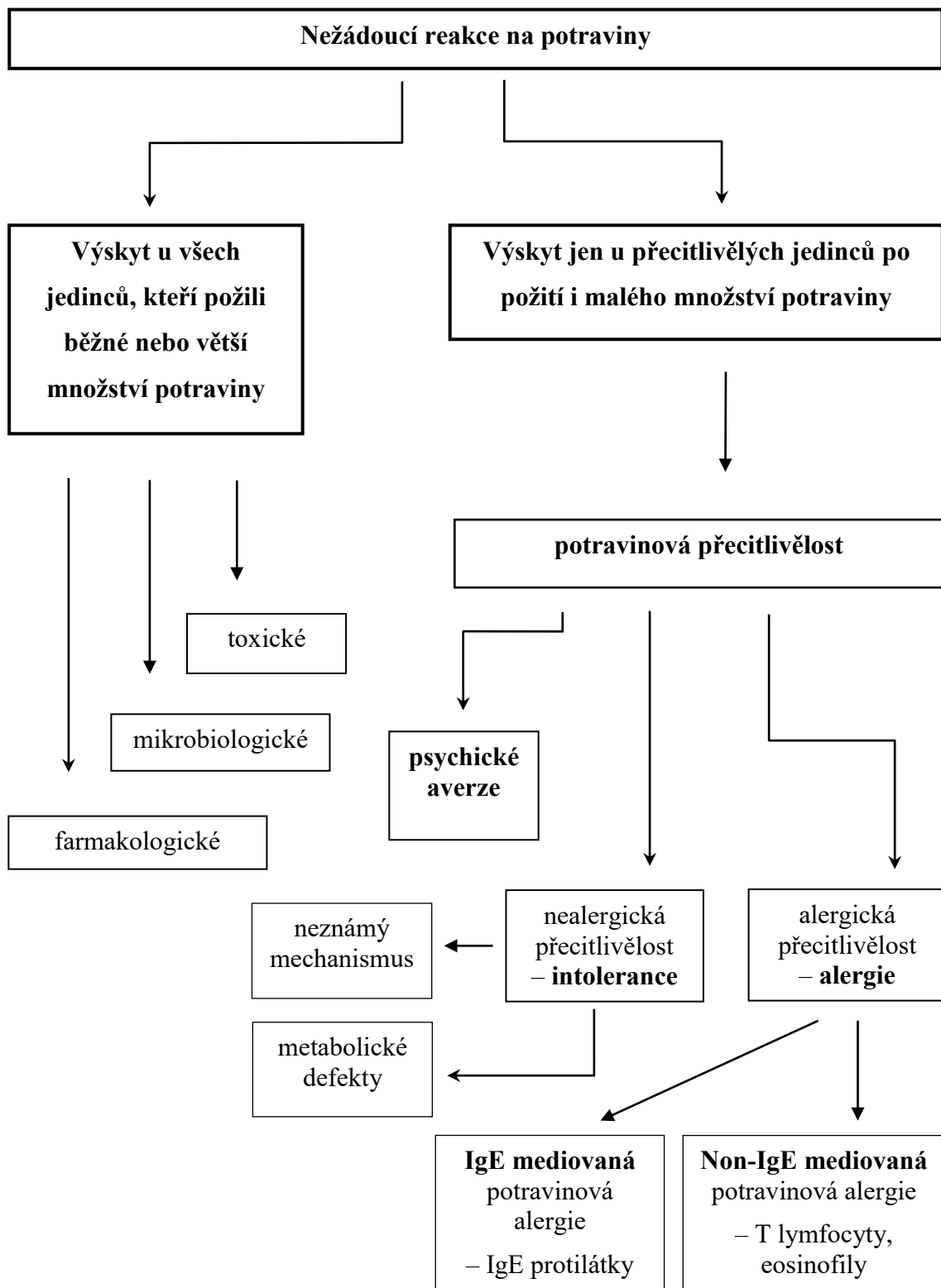
### 2.3 Nežádoucí reakce na potraviny

Potravinové alergeny jsou vedle inhalačních nejvýznamnějšími faktory vyvolávajícími alergický zánět v patogenezi atopické dermatitidy. Určení příčinných spouštěčů nežádoucích reakcí na potraviny je klíčové při diagnostice alergických stavů i z hlediska dietních opatření (55).

Nežádoucí reakce na potraviny u disponovaných jedinců můžeme rozdělit na dvě základní skupiny, které se nejčastěji projevují jako potravinová alergie (FA) a potravinová intolerance, které mají zcela odlišnou patofyziologii, **Obrázek 1**. Alergická (imunologická) přecitlivělost, tzv. potravinová alergie je nepřiměřená reakce imunitního systému na určitou složku potravy (zpravidla glykoprotein). Nealergická (neimunologická) přecitlivělost, tzv. potravinová intolerance není zprostředkovaná imunitním mechanismem (56,57).

#### 2.3.1 Potravinová intolerance

V případě potravinové intolerance se jedná o nežádoucí reakce na potraviny enzymové nebo farmakologické příčiny, resp. o neimunologicky podmíněné reakce. Typickým příkladem je laktózová intolerance, která je způsobená poklesem aktivity enzymu laktázy v mikrovilech tenkého střeva (44,56). Dále sem patří histaminoliberační účinky některých potravin bohatých na biogenní aminy (např. uzeniny, sýry, kyselé zelí, víno, pivo a další), které mohou vyvolat tzv. histaminovou intoleranci (HIT). Klinickými příznaky HIT připomíná alergickou reakci, avšak spouštěčem není imunopatologická reakce, ale metabolicky podmíněná neschopnost organismu inaktivovat exogenní histamin (přijímaný perorálně) nebo další biogenní aminy endogenního původu. Jedním z enzymů, které se podílejí na degradaci exogenního histaminu deaminací je diaminooxidáza (DAO). Snížená aktivita nebo deficience DAO patří mezi časté příčiny vzniku HIT. Laboratorně lze spolehlivě stanovit sérovou hladinu (nebo aktivitu) DAO (56).



**Obrázek 1: Klasifikace nežádoucích reakcí na potraviny**

Upraveno dle revidované alergologické nomenklatury hypersensitivních reakcí na potraviny vycházející z doporučení EAACI (1,58).



### **2.3.2 Potravinová alergie**

Potravinovou alergii řadíme mezi imunologicky podmíněné reakce. Členění imunopatologických reakcí vychází z dopadů poškozujícího zánětu na lidský organismus a částečně zahrnuje i klinické projevy vycházející z těchto dopadů (44). Potravinová alergie nejčastěji vzniká na podkladě imunopatologické (hypersenzitivní) reakce I. typu zprostředkované IgE protilátkami, jejíž mechanismus je popsán výše v kapitole o imunopatogenezi atopické dermatitidy (57,59). Prevalence IgE zprostředkované potravinové alergie se v Evropě i USA pohybuje kolem 3–6% populace (48). Podíl na potravinové alergii mohou mít také imunopatologické reakce IV. typu opožděné buněčné přecitlivělosti. Imunopatologickou reakci IV. typu můžeme rozdělit do 4 podtypů, které mají nejméně dva společné rysy. Prvním znakem je opožděná reaktivita, která se rozvíjí s odstupem hodin (dny) po kontaktu se spouštěcím antigenem. Druhým rysem je zprostředkování reakce buňkami imunitního systému, kde klíčové postavení hrají T lymfocyty, buňky monocyto-makrofágového původu a dendritické buňky (44). Současný koncept hypersenzitivních reakcí ukazuje, že I. typ hypersenzitivní reaktivity je spojen s podtypem IVb, který je zprostředkován aktivitou subsetu Th2 T lymfocytů. Tento subset T lymfocytů je potřebný pro izotypové přepnutí B lymfocytů s výslednou tvorbou protilátek IgE. Rozsáhlejší imunopatologická aktivita Th2 subsetu T lymfocytů vede k akumulaci dalších buněk alergického zánětu, především eosinofilních granulocytů (44).

Na exacerbaci ekzémových projevů se mohou podílet různé alergeny. V kojeneckém a batolecím věku bývají za časté projevy atopické dermatitidy mediované IgE odpovědné především potravinové alergeny, zejména kravské mléko, vejce, pšenice a sója. S přibývajícím věkem se spektrum spouštěcích alergenů mění a význam potravin postupně klesá. U dospělých pacientů jsou častými spouštěči potravinové alergie ořechy, semena, luštěniny, ryby, aditiva, zelenina a ovoce včetně potravin rostlinného původu ve spojitosti s pylovou senzibilizací (56,60).

### **2.4 Diagnostika potravinové alergie**

Cílem diagnostického postupu potravinové alergie je identifikovat spouštěcí potravinu, odlišit skutečnou alergii od senzibilizace, vyloučit potravinovou intoleranci a sestavit účinnou a z nutričního hlediska plnohodnotnou eliminační dietu (48,56). Při diagnostice FA vycházíme z důkladných anamnestických údajů včetně posouzení rizikových potravin a kofaktorů ovlivňujících alergickou reakci (fyzická námaha,

farmakologická anamnéza, potraviny bohaté na biogenní aminy a další) a zároveň ze zhodnocení klinických příznaků možné potravinové alergie. V rámci stanovení diagnózy časně IgE mediované reakce se používají SPT, prick-to-prick testy a laboratorní stanovení sérových sIgE protilátek. Při podezření na opožděný typ imunopatologické reakce se provádí APT test. Vyšetření specifických protilátek izotypu IgG a IgG<sub>4</sub> není pro diagnostiku potravinové alergie nebo tolerance doporučováno (61,62). Výsledky recentních studií ukazují, že zvýšené hladiny specifických IgG protilátek proti potravinám byly detekovány i u zdravých jedinců bez klinické relevance. Na mechanismu zvýšení IgG protilátek se může podílet řada faktorů, avšak vzestup bývá přechodný. Naopak, může svědčit o navození imunologické tolerance související s činností regulačních T lymfocytů (56,63,64). Součástí diagnostického postupu potravinové alergie je také eliminační dieta, která je indikována především u mírné formy AD a slouží k vyloučení podezřelé potraviny z jídelníčku. U středně těžké až těžké formy AD jsou dodržovány přísnější dietní opatření tzv. diagnostická hypoalergenní dieta, při které jsou minimálně po dobu 4-6 týdnů vyloučeny ze stravy podezřelé a alergizující potraviny. Dietní opatření v diagnostice FA jsou podrobněji popsána v praktické části práce. Za jednoznačný diagnostický test FA je považován dvojitě zaslepený placebem kontrolovaný potravinový expoziční test (DBPCFC, Double Blind, Placebo Controlled Food Challenge), který je téměř výhradně používán při klinických studiích. Test se nejčastěji provádí pomocí sérií kapslí, přičemž jedna série obsahuje testovanou potravinu a v druhé sérii je tzv. placebo (jedná se většinou o glukózu). Význam dvojitě zaslepeného testu je takový, že ani ošetřující lékař ani nemocný nevědí, kdy je podávána testovaná potravina a kdy placebo (48). Příprava i provedení DBPCFC testů je obvykle velmi časově náročné, proto se pro klinickou praxi používají snáze proveditelné otevřené expoziční testy s podezřelou potravinou (OET, Open Exposure Test) (56,57,65,66), jejichž postup je podrobněji popsán v praktické části práce.

Pro potvrzení klinické diagnózy potravinové alergie na podezřelou potravinu hraje zásadní roli korelace výsledku kožního testu (SPT nebo prick-to-prick) a sIgE protilátek s anamnestickými údaji, optimálně i s výsledkem expozičního testu. Pouhý průkaz pozitivita sIgE protilátek proti testovanému potravinovému alergenu či pozitivita kožních testů není dostatečný důkaz pro správné stanovení diagnózy FA (67).

## **2.5 Klinické reakce na potraviny u pacientů s atopickou dermatitidou**

Alergické reakce na potraviny můžeme z imunopatologického hlediska rozdělit na časně (IgE mediované), pozdní (non-IgE mediované) a mediované kombinací IgE

a non-IgE mechanismů. U pacientů s AD jsou v průběhu expozičního testu popisovány následující 3 typy klinických reakcí (48,68):

Alergická reakce časného typu (zprostředkovaná IgE) se běžně vyskytuje do několika minut (do 2 hodin) po požití testované potraviny. Projevuje se okamžitým nástupem urtikarie, erytému a angioedému (rty, ústa, krk aj.), dále se mohou vyskytovat dechové obtíže, kardiovaskulární příznaky a postižení gastrointestinálního systému. Izolovaná, ekzematózní reakce pozdního typu (non-IgE mediovaná) se projevuje po 6 až 48 hodinách od požití testované potraviny a manifestuje se v podobě exacerbací kožních ložisek a dále subakutními až chronickými obtížemi. Posledním typem jsou kombinované reakce mediované IgE a non-IgE mechanismy, které se projevují po požití testované potraviny (66).

Klinické příznaky časné a pozdní alergické reakce, které se obvykle manifestují v průběhu expozičního testu po podání podezřelé potraviny jsou shrnuty v **Tabulka 1**. Avšak absencí uvedených příznaků nelze zcela vyloučit možnou potravinovou alergii (56,69).

**Tabulka 1 Příznaky možné potravinové alergie dle typu alergické reakce**

	IgE mediované reakce (časný typ) – <b>do 2 hodin</b>	Non-IgE mediované reakce (pozdní typ) – <b>6 až 48 hodin</b>
kůže	erytém, pruritus akutní urtikarie akutní angioedém (rty, obličej, kolem očí aj.)	erytém, pruritus atopická dermatitida
gastrointestinální systém	OAS břišní diskomfort akutní bolesti břicha nauzea a vomitus akutní průjem	příznaky podobné GER (EER) průjem nebo zácpa stolice s příměsí krve a/nebo hlenu nechutenství břišní diskomfort a bolesti břicha perianální erytém bledost, únava, neprospívání

	IgE mediované reakce (časný typ) – <b>do 2 hodin</b>	Non-IgE mediované reakce (pozdní typ) – <b>6 až 48 hodin</b>
respirační systém	horní cesty dýchací: kýčání, otok hlasivek, svědění a kongesce nazální sliznice dolní cesty dýchací: kašel, dušnost, pískoty	kongesce nazální sliznice kašel
jiné	systémová alergická reakce, anafylaktická reakce	

OAS – orální alergický syndrom, GER – gastroezofageální reflux, EER – extraezofageální reflux, upraveno dle (56,69).

## 2.6 Laboratorní diagnostika alergických reakcí

Laboratorně diagnostické testy jsou nedílnou součástí alergologického vyšetření. Můžeme je rozdělit do dvou skupin dle typu imunopatologické reakce, a to na časně (IgE mediované) a pozdní (non-IgE mediované). Mezi testy zaměřené na časný typ reakce řadíme stanovení eosinofilního kationického proteinu, tryptázy, funkční test aktivace basofilů a vyšetření sérových hladin sIgE proti extraktivým nebo molekulárně definovaným alergenům. Funkční test aktivace lymfocytů a test blastické transformace lze využít při diagnostice pozdního typu reakce.

*In-vitro* testy však nelze použít jako náhradu za klinické vyšetření pacienta, které je stěžejní při diagnostice alergických stavů.

### 2.6.1 Test aktivace basofilů

Test aktivace basofilů (BAT, Basophil Activation Test) patří do skupiny funkčních buněčných testů, které jsou prováděny v den odběru nesrážlivé periferní krve. Principem testu je detekce exprese aktivačních povrchových molekul basofilních granulocytů po kontaktu s alergenem pomocí průtokové cytometrie. Basofily jsou efektorové buňky, které mají na svém povrchu vysokoafinní IgE receptory (FcεRI). Senzibilizovaní jedinci mají na těchto receptorech navázány antigen specifické IgE protilátky. Podmínkou jejich aktivace je vazba alergenu na variabilní část imunoglobulinu E a následné přemostění

minimálně dvou sousedních receptorů, které vede k předání signálu do buňky. Dále mohou být buňky aktivovány protilátkami anti-IgE nebo anti-FcεRI (70).

Pro detekci basofilů z plné krve lze využít povrchové značení aktivačních molekul CD203c a CD63 pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek. Znak CD203c je membránová molekula s enzymatickou aktivitou nacházející se v malém množství na povrchu klidových basofilů. Exprese CD203c se při aktivaci basofilů také zvyšuje, ale je spojována spíše s postupnou aktivací buněk. Dalším aktivačním znakem je molekula CD63 exprimovaná na povrchu intracelulárních granulích basofilů v klidovém stavu. Při aktivaci se cytoplazmatická granula spojují s povrchovou membránou a dochází tak k expresi znaku CD63 na povrchu basofilu. Na rozdíl od exprese znaku CD203c je aktivační znak CD63 asociován s rychlou degranulací buňky, resp. s uvolněním sekrečních granul obsahujících histamin a další prozánětlivé mediátory (44,56).

### **2.6.2 Stanovení eosinofilního kationického proteinu**

Eosinofilní kationický protein (Eosinophile cationic protein, ECP) je jedním z hlavních kationických proteinových mediátorů, který je produkován aktivovanými eosinofilními granulocyty. ECP se nalézá v matrix eosinofilních granul, má vysoce cytotoxické účinky a patří do skupiny ribonukleáz A. V případě, že jsou eosinofilní granulocyty aktivovány, dochází k jejich degranulaci a následně k poškození a deskvamaci epitelových buněk. Tímto je zároveň zvyšována hyperreaktivita dýchacích cest a postupně se rozvíjí chronický alergický zánět. ECP je vylučován aktivovanými eosinofily do krevního oběhu a v rámci laboratorního vyšetření jeho koncentraci můžeme stanovit z různých tělních tekutin. Běžně dostupné je vyšetření z krevního séra, kde je nutné zdůraznit, že hemolýza vzorku znehodnocuje výsledek analýzy.

V současné době můžeme stanovení ECP využít především ke sledování zánětlivé aktivity u pacientů s bronchiálním astmatem a dále také ke sledování průběhu a tíže chronického alergického zánětu (71).

### **2.6.3 Stanovení tryptázy**

Tryptáza je enzym ze skupiny serinových proteáz, který je spolu s histaminem a s dalšími působky uvolňován ze žírných buněk po jejich aktivaci. Stanovení tryptázy je indikováno zejména při diagnostice anafylaktické reakce, a to i post mortem, případně při podezření na mastocytózu. Tryptáza se vyskytuje ve dvou hlavních formách alfa a beta. Alfa forma je uvolňována kontinuálně, zatímco beta forma je součástí cytoplazmatických

granulí a je vylučována až po aktivaci žírných buněk. K jejímu uvolnění může dojít působením různých stimulů, především alergenů, a v menší míře i působením fyzikálních (teplo) a chemických vlivů (léky). Laboratorně je stanovována celková tryptáza (alfa i beta forma). Krátkodobě zvýšená hladina sérové tryptázy je považována za klinický marker potvrzující závažnou systémovou alergickou reakci až anafylaktický stav. Dle metodických pokynů ČSAKI je pro stanovení tryptázy při anafylaktické reakci doporučováno odebrat vzorek krevního séra co nejdříve (15 min – 3 hodiny) po reakci a následně odběr opakovat s odstupem 24 hodin nebo později po odeznění příznaků (72,73).

#### **2.6.4 Stanovení specifických IgE protilátek proti extraktivním alergenům**

Vyšetření sérových hladin specifických IgE protilátek je nedílnou součástí diagnostiky IgE mediovaných reakcí. Je snadno dostupné a krevní odběr lze provést v jakémkoli věku bez vysazení medikace. Vyšetření je zejména výhodné u pacientů, u kterých nelze provést SPT (např. při rozsáhlém kožním postižení u AD) nebo pokud nelze vysadit potenciálně interferující léčbu. Pro stanovení sIgE jsou dostupné směsi alergenů, které se používají v rámci screeningového alergologického vyšetření, dále jednotlivé extraktivní alergeny a molekulárně definované alergeny (molekulární komponenty), které jsou podrobněji popsány v kapitole o molekulární komponentové diagnostice.

Vzhledem k celé řadě komerčně dostupných laboratorních souprav stanovení sIgE je standardizace metodiky a následné srovnání výsledků často velmi obtížné. Proto je pro sledování dynamiky sIgE v čase vhodné provádět vyšetření stejnou analytickou metodou ideálně v jedné laboratoři. Základním, dříve hojně používaným principem stanovení, je reakce sIgE v séru pacienta s alergenem (antigenem) navázaným na nosič s následnou detekcí tohoto imunokomplexu na principu enzymoimunoanalýzy s měřením barevné změny. Přesnějších výsledků lze dosáhnout použitím polo/automatických technik s fluorescenční nebo chemiluminiscenční detekcí enzymem přeměněného substrátu a využitím technik s vysokou vazebnou kapacitou nosičů alergenů v pevné fázi nebo v kapalně podobě (56).

V současné době jsou v rutinní analýze pro stanovení sIgE protilátek proti extraktivním alergenům běžně dostupné dvě metody: systém ImmunoCAP a systém Immulite. V případě systému ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Phadia) jsou alergeny kovalentně navázány na hydrofilní derivát celulózy, jehož trojrozměrná struktura poskytuje vysokou vazebnou kapacitu pro alergen. Detekce vzniklého

imunokomplexu po přidání patientského séra probíhá na principu fluorescenční enzymoimunoanalýzy (FEIA, Fluorescence Enzyme Immunoassay). Druhým postupem je IMMULITE™ 2000 (Siemens), který je plně automatizovaný. Nejprve je do reakční nádoby přidána polystyrenová kulička pokrytá streptavidinem, ke které je přidán testovaný biotinovaný kapalný alergen. Vlastní analýza probíhá na povrchu kuličky. Po přidání patientského séra dojde k vyčtyání specifického IgE na alergen a detekce vzniklého imunokomplexu je uskutečněna pomocí další protilátky proti IgE značené enzymem na principu luminiscenční enzymoimunoanalýzy (LEIA, Luminescence Enzyme Immunoassay) (74,75).

Hladina specifických IgE protilátek je pro rutinně používané laboratorní techniky udávána ve specifických jednotkách U/ml (kU/l), které jsou blízké mezinárodním jednotkám IU/ml (kIU/l), používaným pro vyjádření koncentrace celkových IgE protilátek. Za zvýšené hladiny sIgE jsou považovány hodnoty vyšší než 0,35 U/ml. Další doporučovanou možností vyjádření hladin sIgE jsou semikvantitativní třídy pozitivita, které zjednodušují interpretaci výsledků a částečně stírají rozdíly mezi jednotlivými metodikami stanovení sIgE. Z důvodu možné falešné negativita výsledků by vyšetření sIgE nemělo být prováděno bezprostředně po alergické reakci, ale měl by být zachován odstup 3–6 týdnů (56).

### **2.6.5 Molekulární komponentová diagnostika (CRD)**

Dosavadní laboratorní testy jsou většinou založené na alergenech získaných z přirozených zdrojů. Tyto alergeny představují velmi komplexní směs alergenních i nealergenních bílkovin. Některé složky jsou druhově specifické, jiné zkříženě reagující, některé vyvolávají závažné klinické komplikace, jiné ne. Diagnostika založená na směsných extraktech na tyto otázky není schopna odpovědět (44,76). Zásadní přínos pro diagnostiku IgE mediovaných alergických stavů přinesl pokrok v biotechnologiích a ve výzkumu alergenů na molekulární úrovni. Pro vyšetření alergen specifických IgE protilátek proti molekulárně definovaným alergenům, tzv. komponentám se vžil termín molekulární komponentová diagnostika (CRD, Component Resolved Diagnostics) (77,78). Vyšetření se zaměřuje na stanovení alergen specifických IgE protilátek v séru proti molekulárním komponentám připraveným rekombinantní technologií (jsou označeny „r“, rekombinantní) nebo purifikovaným z přírodních zdrojů (označeny „n“, nativní) (79). Tyto molekuly představují alergenní proteiny, na které je zaměřena specifická a klinicky

relevantní IgE imunitní odpověď (77). V současnosti je k dispozici mnoho desítek molekulárních komponent využitelných v *in-vitro* testech.

Alergenové komponenty by mohly přispět k přesnější diagnostice alergických onemocnění. S jejich pomocí lze s přihlédnutím k dalším okolnostem (anamnestické údaje a další faktory podílející se na zhoršení onemocnění) odlišit reaktivitu proti zkříženě reagujícím alergenům od reaktivity na převážně druhově specifické alergenní komponenty, které by mohly odhalit primární zdroj senzibilizace. U řady molekulárně definovaných alergenů je známo, že navozují závažné projevy alergických chorob. Nález zvýšené hladiny specifických IgE protilátek proti těmto alergenům umožňuje predikovat riziko závažných klinických projevů včetně anafylaxe. Ve skupině potravinových alergenů je možno odlišit reaktivitu na termostabilní molekulární komponenty s obecně vyšším rizikem od termolabilních, odstranitelných tepelnou úpravou potravin. Dále může vyšetření specifických IgE protilátek lékaři usnadnit identifikaci příčinného alergenu k indikaci specifické alergenové imunoterapie.

Molekulární komponenty jsou využívány jak v jednoparametrových, tak multiplexních analýzách. V případě pacientů se závažnými klinickými projevy nebo nejasnými nálezy vyšetření je vhodné použít multiplexovou metodu. Dále ji můžeme uplatnit u neshod mezi výsledky získanými základními přístupy, pro možné zachycení neočekávaných alergenních specifit a také pro zhodnocení senzibilizačního profilu pacienta. Použitím této metody lze v jednom kroku získat podrobný profil pacienta vyjádřený pomocí molekulárně definovaných cílů, což při hodnocení vyžaduje na straně lékaře nemalou míru erudice a detailních znalostí o jednotlivých alergenech.

Vyšetření pomocí multiplexních metod molekulární komponentové diagnostiky je běžně používané u respiračních forem alergického onemocnění (80–82), ale nikoli u pacientů s atopickou dermatitidou. Rozšíření zkušeností s multiplexovou CRD analýzou u této diagnózy je jedním z cílů naší práce.

#### **2.6.6 Multiplexové metody molekulární komponentové diagnostiky**

V současné době jsou pro klinické využití dostupné dvě multiplexní metody. V oboru klinické imunologie je jedním z nejčastěji používaných multiplexních systémů ISAC (Immuno Solid-Phase Allergen Chip) od firmy Phadia, Thermo Fisher Scientific, využívající technologii biočipu (microarray), na kterém jsou na skleněné podložce ukotveny molekulární komponenty (83,84). Oproti tomu druhý systém ALEX (Allergy



Explorer) od firmy Macro-Array Diagnostics využívá molekulárních komponent navázaných přes nanočástice na pevnou fázi, membránu (85).

ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup> sIgE 112 (Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Švédsko) je semi-kvantitativní multiplexová metoda zaměřená na stanovení specifického IgE proti molekulárně definovaným alergenům z více než 50 zdrojů alergenů (83). Reakce probíhá na skleněné destičce (biočipu), na které je ukotveno 112 komponent v triplicátech (70 rekombinantních, 42 nativních) (86,87). Biočip je inkubován s vyšetřovaným krevním sérem nebo plazmou a po promytí jsou navázané specifické IgE protilátky detekovány přidáním fluorescenčně značené sekundární protilátky proti lidskému IgE. Intenzita fluorescence je snímána mikročipovým laserovým skenerem a analyzována speciálním počítačovým softwarem, který kvantifikuje fluorescenční signál jednotlivých molekulárních komponent (79,82). Výsledky jsou vyjádřeny v arbitrárních jednotkách zvaných standardizované jednotky ISAC pro specifické IgE (ISU-E). Měřicí rozsah metody je udáván od 0,3 do 100 ISU-E. Výsledky větší než 0,3 ISU-E jsou považovány za pozitivní. Naměřené hladiny sIgE lze vyjádřit čtyřmi semi-kvantitativními třídami: <0,3 ISU-E jako negativní, 0,3> 0,9 ISU-E odpovídá nízké pozitivitě, 0,9> 15 ISU-E střední pozitivitě a hodnoty  $\geq 15$  ISU-E signalizují vysokou pozitivitu (84).

Alternativou k metodě ISAC je systém ALEX<sup>®</sup> (Macro-Array Diagnostics, Vídeň, Rakousko), multiplexní test určený pro imunoanalýzu na pevné fázi. Metoda umožňuje simultánní stanovení celkového IgE (semi-kvantitativně) a specifického IgE (kvantitativně) ve verzi ALEX<sup>2</sup><sup>®</sup> proti 295 alergenům, z toho 178 molekulárním komponentám a 117 extraktivním alergenům, v lidském séru nebo plazmě (88). Extrakty alergenů a molekulární komponenty jsou navázány na nanočástice, které jsou systematicky naneseny v podobě spotů na pevnou fázi membrány testovací kazety. Před zahájením reakce jsou vzorky ředěny inhibičním roztokem, který blokuje vazbu IgE na zkříženě reagující cukerné determinanty (CCD). V prvním kroku reakce dochází k vytvoření vazby mezi alergenem imobilizovaným na nanočásticích a specifickým IgE z vyšetřovaného vzorku. Následně dojde k vymytí nespecifického IgE a přidání enzymaticky značené detekční protilátky proti lidskému IgE a vytvoření imunokomplexu. Po druhém promytí je přidán substrát, který je enzymem přeměněn na barevný nerozpustný precipitát. Následná reakce je zastavena blokovacím činidlem. Množství precipitátu je úměrné koncentraci specifického IgE ve vzorku pacienta. Po provedené analýze následuje vyhodnocení pomocí zařízení MADx ImageExplorer. Výsledky jsou analyzovány specifickým softwarem Raptor

MADx (89,90). Měřící rozsah metody je udáván pro specifické IgE 0,3–50 kU<sub>A</sub>/l (kvantitativně) a pro celkové IgE 20–2 500 kU/l (semi-kvantitativně). Výsledky sIgE větší než 0,3 kU<sub>A</sub>/l jsou považovány za pozitivní. Naměřené hladiny sIgE lze rovněž vyjádřit pomocí semi-kvantitativních tříd: <0,3 kU<sub>A</sub>/l jako negativní, 0,3–1 kU<sub>A</sub>/l odpovídá nízké pozitivitě, 1–5 kU<sub>A</sub>/l střední pozitivitě, 5–15 kU<sub>A</sub>/l vysoké pozitivitě a hodnoty ≥ 15 kU<sub>A</sub>/l signalizují výrazně vysokou pozitivitu (88). Výhodou této metody je použití inhibičního pufru, který eliminuje IgE protilátky namířené proti cukerným determinantám (podrobněji popsáno v kapitole 2.7.11) a tím je dosaženo vyšší specifity vyšetření (91).

V rámci této práce jsme se na pracovišti Ústavu klinické imunologie a alergologie ve spolupráci s Klinikou nemocí kožních a pohlavních FN Hradec Králové zabývali analýzou senzibilizace na molekulárně definované alergeny u pacientů s atopickou dermatitidou. Specifické IgE protilátky byly stanoveny multiplexní metodou ImmunoCAP ISAC, která je v klinické praxi dostupná od roku 2011 (92).

## **2.7 Molekulárně definované alergeny**

Hlavními zdroji alergenů bývají potraviny, trávy, plevele, stromy, plísně, roztoči a zvířata (93). Exacerbaci kožních lézí mohou u atopické dermatitidy způsobit různé alergeny. Specifická IgE senzibilizace je u dospělých pacientů s AD popisována u potravinových a inhalačních alergenů, zejména na roztoče domácího prachu, pyl a potraviny rostlinného původu (55). V současnosti můžeme alergeny definovat jako proteiny, glykoproteiny, lipoproteiny nebo protein-konjugované hapteny, které mají jedinečné molekulární a strukturní vlastnosti (84).

### **2.7.1 Názvosloví**

Logickým důsledkem rychlého rozmachu alergologie ve druhé polovině minulého století byly pokusy zavést do nomenklatury alergenů systém využitelný při vědecké práci i v běžné klinické praxi. Po několika neúspěšných pokusech byla v 80. letech 20. století sestavena komise zabývající se touto problematikou při Mezinárodní unii imunologických společností (IUIS). Tato komise navrhla názvosloví založené na prvních třech písmenech rodu a prvním písmenu druhu živočicha nebo rostliny, ze kterého alergen pochází. Tento název byl doplněn římským číslem odpovídajícím chronologickému pořadí izolace konkrétního alergenu. V 90. letech byly římské číslice nahrazeny arabskými. Nejvýznamnější alergen břízy tedy nese označení Bet v 1 od *Betula verrucosa*. Další pokrok v poznání biochemické i funkční struktury alergenů spolu s možnostmi přípravy

rekombinantních forem vedl k obohacení názvů alergenů o isoalergeny a jejich varianty (94). Isoalergeny jsou vysoce homologní alergeny s podobnými biologickými i biochemickými vlastnostmi, které sdílejí alespoň 67 % aminokyselinové sekvence. Jejich varianty (isoformy) se odlišují zpravidla v několika málo aminokyselinách a jsou homologní na více než 90 %. Isoalergeny se zapisují dvojicí čísel po oddělovači v podobě tečky. Dalšími dvěma číslicemi je možné označit variantu. Jako příklad může sloužit pyl lísky, kde lze zapsat dvě varianty téhož isoalergenu: Cor a 1.0101 a Cor a 1.0102. Zařazení nového alergenu do nomenklatury WHO/IUIS je několikastupňový proces, kdy musí být splněno několik podmínek, mezi nimi identifikace zdroje, aminokyselinová a genetická sekvence, existence purifikovaného alergenu a průkaz vazby lidských IgE protilátek od pacientů s tímto alergenem (95).

### **2.7.2 Molekulárně definované potravinové alergeny**

Každý zdroj potravy může být považován za potenciálně alergenní směs bílkovinných molekul, které mohou mít odlišné biologické vlastnosti, strukturu a funkci. Tyto molekulární komponenty mají přesně definované chemické složení a vyvolávají IgE mediovanou odpověď.

Alergeny, které u více než 50 % pacientů způsobují senzibilizaci na konkrétní potravinu, jsou považovány za hlavní alergeny. Často bývají druhově specifické a jejich identifikaci lze určit primární senzibilizaci na daný alergenový zdroj tzv. příčinný alergen (84). Například hlavním alergenem vaječného bílku je ovomucoid (Gal d 1), který je vysoce alergenní a stabilní vůči tepelnému a enzymatickému působení (96). Vedlejší potravinové alergeny bývají zastoupené u nižšího počtu alergiků (pod 50 %) a často se projevují méně závažnými příznaky (56).

Dle biologické aktivity lze molekulární komponenty zařadit do proteinových rodin, které se vyznačují úzkou chemickou a biologickou podobností (homologií). Molekuly v rámci jedné proteinové skupiny (homologní rodiny) sdílejí společné epitopy, a tím se stejné specifické IgE protilátky mohou vázat na podobné struktury přítomné v alergenech z různých zdrojů vyskytujících se napříč rostlinnou či živočišnou říší. Tento jev je popisován jako zkřížená reaktivita (84).

Ke zkřížené reakci dojde, pokud strukturální podobnost (v sekvenci aminokyselin) mezi dvěma molekulárními komponentami dosáhne 70 %, vzácně i při shodě z 50 % (97). Tyto vysoce homologní bílkovinné rodiny nazýváme panalergeny.

Mezi hlavní proteinové rodiny rostlinných potravin patří PR-10 proteiny (Bet v 1 homologie, Pathogenesis-Related Protein 10), thaumatin-like proteiny (Pathogenesis-Related Protein 5), profiliny (Bet v 2 homologie), nsLTP (lipid transfer proteiny) a zásobní proteiny rostlin (7S globuliny, 11 S globuliny a 2S albuminy). Podobně do proteinových rodin živočišných potravin řadíme tropomyosiny, parvalbuminy, kaseiny a další (56).

### 2.7.3 PR-10 proteiny

Do rodiny PR-10 proteinů (homology alergenu břízy Bet v 1) patří alergeny, které jsou termolabilní, inaktivují se působením proteáz a způsobují zkříženou reaktivitu mezi pyly stromů a potravinami rostlinného původu. Rostliny tyto proteiny využívají k obraně proti vlivům vnějšího prostředí a zejména patogenním mikroorganismům. Jsou významně zastoupeny ve dřevu ovoce a zeleniny, např.: *Rosaceae*: jablko (Mal d 1), třešeň (Pru av 1), broskev (Pru p 1), *Apiaceae*: mrkev (Dau c 1), celer (Api g 1), *Betulaceae*: bříza (Bet v 1), lískový ořech (Cor a 1), *Fabaceae*: arašíd (Ara h 8), sója (Gly m 4) a fazole mungo (Vig r 1). Většinou jsou asociované s lokálními projevy („Pollen-Food Syndrom“, PFS, orální alergický syndrom, OAS), ale lískový ořech, celer, arašíd a sója jsou částečně tepelně stabilní a mohou vzácně vyvolat systémovou odpověď (98).

### 2.7.4 Thaumatin-like proteiny

Mezi další obranné proteiny, které chrání rostlinu před patogeny patří rodina thaumatin-like proteinů (PR-5 proteiny). K senzibilizaci dochází patrně inhalační cestou. Vyskytují se především v ovoci, například v broskvi (Pru p 2), kiwi (Act d 2), jablku (Mal d 2) a banánu (Mus a 4). Vzhledem k vyšší termostabilitě a odolnosti vůči enzymatickému trávení jsou spojovány s rizikem rozvoje závažných alergických reakcí, až anafylaxe (56).

### 2.7.5 Lipid transfer proteiny

Termostabilní a odolné vůči enzymatické denaturaci jsou i lipid transfer proteiny. Nalézáme je především ve slupkách ovoce a zeleniny, např.: *Rosaceae*: jablko (Mal d 3), třešeň (Pru av 3), broskev (Pru p 3) a citron (Cit l 3) a *Betulaceae*: lískový ořech (Cor a 8).

Spektrum klinických projevů je velmi široké, od lokálních projevů (OAS) až po závažné systémové reakce (99).

### **2.7.6 Profiliny**

Profiliny (homology alergenu břízy Bet v 2) je rodina proteinů, které jsou termolabilní a enzymatickým štěpením se degradují. K senzibilizaci dochází patrně inhalační cestou. Můžeme je nalézt například v citrusovém ovoci (Cit s 2), melounu (Citr l 2), banánu (Mus a 1) a rajčeti (Sola l 1). Projevují se především OAS příznaky, ale i systémově. Jsou považovány za klinicky méně významné alergeny (100).

### **2.7.7 Polkalciny**

Polkalciny patří do skupiny proteinů vázajících vápník. Vyskytují se převážně v pylu kvetoucích rostlin. Podílejí se významně na zkřížené reaktivitě s různou klinickou závažností alergických projevů. Vyskytují se například v bojínku (Phl p 7) a bříze (Bet v 4) (101).

### **2.7.8 Zásobní proteiny**

Zásobní proteiny patří mezi vysoce stabilní alergeny odolné vůči teplu a proteázám. Nacházejí se často v semenech, jádrech a ořechách. Můžeme je rozdělit na tři hlavní proteinové rodiny. Jedná se o rodinu vicilinů (7S globuliny), které jsou obsaženy například v arašídě (Ara h 1), v kešu (Ana o 1), ve vlašském ořechu (Jug r 2) a v sóje (Gly m 5). Dále sem řadíme rodinu leguminů (11S globuliny), které můžeme najít v arašídě (Ara h3), v lískovém ořechu (Cor a 9) a v sóje (Gly m 6). Rodina 2S albuminů je zastoupena například v arašídě (Ara h 6), v kešu (Ana o 3), v paraořechu (Ber e 1), ve vlašském ořechu (Jug r 1) a v sezamu (Ses i 1). Tyto alergenní molekuly mají vysokou alergenicitu a často vyvolávají závažné systémové reakce, patří mezi proanafylaktické alergeny (56,101).

### **2.7.9 Tropomyosiny**

Tropomyosiny jsou vysoce termostabilní a riziko vyvolání anafylaktické reakce je u nich taktéž velmi vysoké. Jsou lokalizované v oblasti myofibril, kde se podílejí na regulaci svalové kontrakce (101). Vyskytují se především ve svalech korýšů a měkkýšů, u kterých vykazují zkříženou reaktivitu mezi korýši (např. Pen m 1 – kreveta, Cha f 1 – krab, Pro c 1

- rak) i mezi měkkýši (např. Cra g 1 – ústřice a další). Tropomyosiny můžeme nalézt i u členovců (Der p 10 – roztoč domácího prachu, Per a 7 – šváb, Bla g 7 – rus domácí) (102).

### **2.7.10 Parvalbuminy**

Parvalbuminy patří také mezi vysoce stabilní proteiny odolné tepelnému i enzymatickému trávení. Podílejí se na regulaci koncentrace intracelulárního vápníku. Jsou přítomny ve světlé svalovině jak sladkovodních, tak mořských ryb (např. Cyp c 1 – kapr, Gad c 1 – treska) (103). Závažná alergická reakce může být u vnímavého jedince vyvolána i pouhým kontaktem s rybím aerosolem, který vzniká například při zpracování rybích pokrmů (104). Ryby s vyšším obsahem tmavé svaloviny jsou méně alergenní (např. Thu a 1 – tuňák, Sco s 1 – makrela) (103).

### **2.7.11 Zkříženě reagující cukerné determinanty**

Zvláštní skupinu nebílkovinných alergenů tvoří oligosacharidové složky glykoproteinů, tzv. zkříženě reagující cukerné determinanty (CCD, „Cross-reactive Carbohydrate Determinants“). Bývají součástí struktury rostlinných glykoproteinů. Laboratorní techniky založené na extrahovaných alergenech nejsou schopny odlišit IgE protilátky proti CCD od ostatních alergenů. Vzhledem k vysoké míře homologie mohou být příčinou falešných pozitivit laboratorního stanovení specifických IgE protilátek proti nativním alergenům (pylů, potravin rostlinného původu a hmyzích jedů) na rozdíl od rekombinantně připravených komponent, které ve své struktuře neobsahují CCD. Obecně je přijímán názor, že CCD struktury nezpůsobují závažné alergické reakce (91).

Oligosacharidové složky, které jsou součástí struktury alergenů rostlin a hmyzích jedů (včela, vosa) jsou převážně ze skupiny N-glykanů jejichž základní struktura je tvořena dvěma jednotkami N-acetyl-glukózaminu se dvěma nebo třemi manózovými zbytky. Na tuto strukturu bývají navázány další monosacharidy, nejčastěji to bývá xylóza nebo fukóza (105). Indikátorem CCD reaktivity systému ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup> sIgE 112 je molekulární komponenta s názvem nMUXF3. Jedná se o sacharidový epitop MUXF3, který je purifikován z bromelainu (glykoprotein obsažený v ananasu). Prostřednictvím nMUXF3 je testována přítomnost anti-CCD protilátek v patientských sérech (106).

## 2.8 Predikce rizika rozvoje systémové reakce na potravinové alergen

U řady molekulárně definovaných alergenů je známo, že způsobují závažné projevy alergického zánětu. Nález zvýšené hladiny sIgE protilátek proti těmto alergenům umožňuje predikovat riziko závažných klinických symptomů včetně anafylaxe. Potravinové alergen

můžeme na základě jejich fyzikálních vlastností rozdělit na dvě skupiny (třídy). Významnou roli zde hraje jejich stabilita či labilita vůči tepelné úpravě a enzymatickému trávení (56).

První třída zahrnuje potravinové alergen

y, které jsou schopny vyvolat primární senzibilizaci cestou gastrointestinálního traktu. Tyto alergen

y vykazují vysokou míru stability a obvykle vyvolávají závažné až systémové reakce. Nejčastějšími zástupci jsou zásobní proteiny ořechů, semen a luštěnin, lipid transfer proteiny potravin rostlinného původu, parvalbuminy ryb a tropomyosiny korýšů a měkkýšů a zároveň potravinové alergen

y živočišného původu, jako je alergen vaječného bílku ovomukoid (Gal d 1) a alergen kravského mléka kasein (Bos d 8) (56,101).

Naopak pokud dochází k primární senzibilizaci inhalační cestou, jedná se o alergen

y druhé třídy, které jsou rozpoznávány sIgE protilátkami v důsledku zkřížené reaktivity v rámci proteinových rodin. Obecně lze uvést, že se jedná o nestabilní a termolabilní alergen

y, které působením vysoké teploty nebo důsledkem enzymatického trávení ztrácejí svoji alergenicitu a po kontaktu s dutinou ústní vyvolávají spíše mírné a lokální obtíže (OAS), výjimečně jsou spojovány se systémovými projevy. Obvykle se jedná o inhalační alergen

y zkříženě reagující s potravinovými alergen

y rostlinného původu, které vyvolávají alergické syndromy typu „pollen-food syndrom“ např. syndrom bříza-ovoce-zelenina, syndrom pelyněk-celer-koření, syndrom bříza-jablko-třešeň a další (56).

Kromě fyzikálních vlastností alergenů je důležitá i vazba sIgE protilátek na epitopy glykoproteinů. Jedná-li se o vazbu sIgE na lineární epitopy (konkrétní sekvence aminokyselin) je pravděpodobné, že budou projevy FA přetrvávat celoživotně, například perzistující alergie na ořechy, arašídy, ryby a mořské plody. Lineární epitopy jsou termostabilní až proanafylaktické. Naopak vazba sIgE protilátek na konformační epitopy (prostorové uspořádání aminokyselin) je spojována s přechodnou formou FA. Konformační epitopy jsou termolabilní a jejich alergen

icita působením vysoké teploty, změnou pH nebo působením enzymů klesá. Je uváděno, že až 80 % dětí s alergií na kravské mléko a vejce

toleruje vařenou nebo pečenou formu těchto potravin právě díky denaturaci konformačních epitopů (56,67).

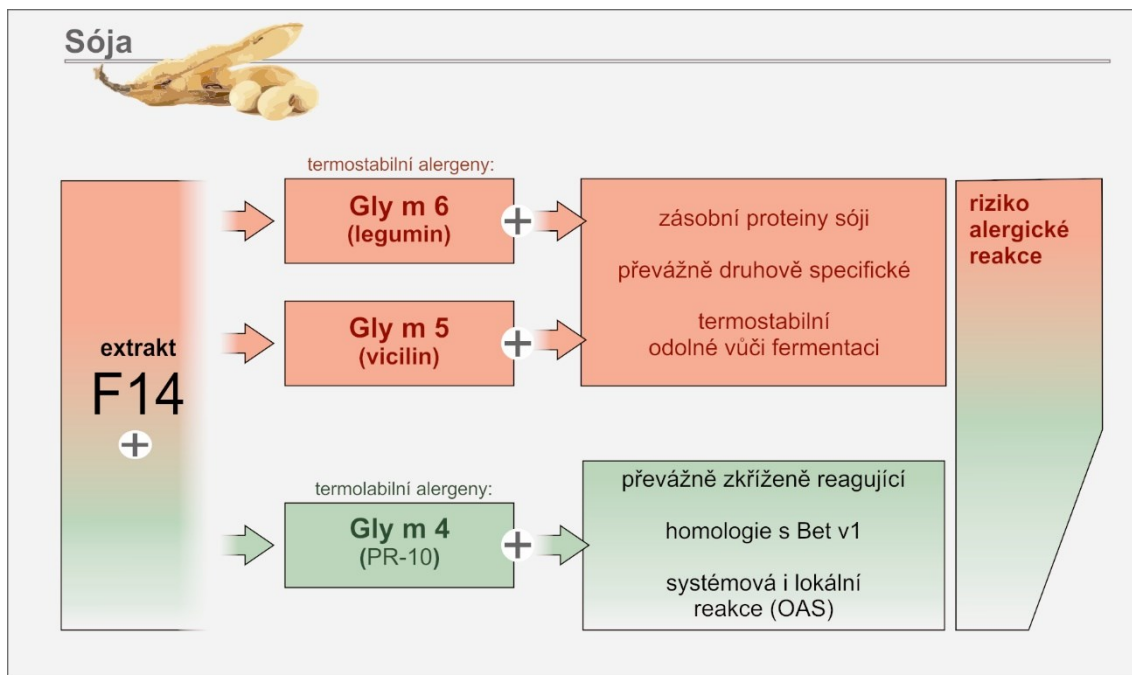
## 2.9 Význam stanovení sIgE protilátek proti potravinovým molekulárním komponentám

Většina potravinových alergií je vyvolána 8 nejrizikovějšími druhy potravin („big eight food“). Jedná se o sóju, kravské mléko, vejce, arašidy, stromové ořechy, pšenici, ryby a korýše (107). Určení příčinných spouštěčů v diagnostice alergických stavů je z hlediska dietních opatření pro pacienta klíčové.

### 2.9.1 Zdroj alergenu – Sója (*Glycine max*)

Sója patří mezi nejvýznamnější luštěniny používané v zemích celého světa. Sójové boby se konzumují přímo nebo zpracované v podobě mouky, vloček, sójového mléka, sójového jogurtu, tofu apod. Do celé řady potravin se sójové bílkoviny přidávají z technologických, finančních i nutričních důvodů. Seznam potravin obsahujících v nějaké podobě sójové bílkoviny stále roste. Sója má unikátní nutriční vlastnosti, na druhé straně je však i zdrojem významných alergenů. Hlavní alergeny jsou Gly m 4, Gly m 5 a Gly m 6, **Obrázek 2.** Klíčový je Gly m 4, který patří do skupiny PR-10 proteinů. Jedná se o panalergen vykazující vysokou homologii s alergenem Bet v 1 břízy. Uvádí se, že minimálně 80–85 % pacientů reagujících na pyl břízy vykazuje kombinovanou reaktivitu s Gly m 4 (108,109). U takovýchto pacientů primárně senzibilizovaných na břízu může dojít, byť velmi vzácně, k závažné klinické reakci po prvním kontaktu se sójou (110). Senzibilizace panalergenem Gly m 4 je v populaci výrazně častěji zastoupená než primární senzibilizace na další sójové alergeny, která je charakteristická přítomností IgE proti druhově specifickým alergenům Gly m 5 a Gly m 6 (109). Oba jsou poměrně termostabilní a odolné vůči fermentaci. Vyskytují se v sójových omáčkách a sójovém mase, kde je Gly m 4 výrazně méně zastoupen (111,112).



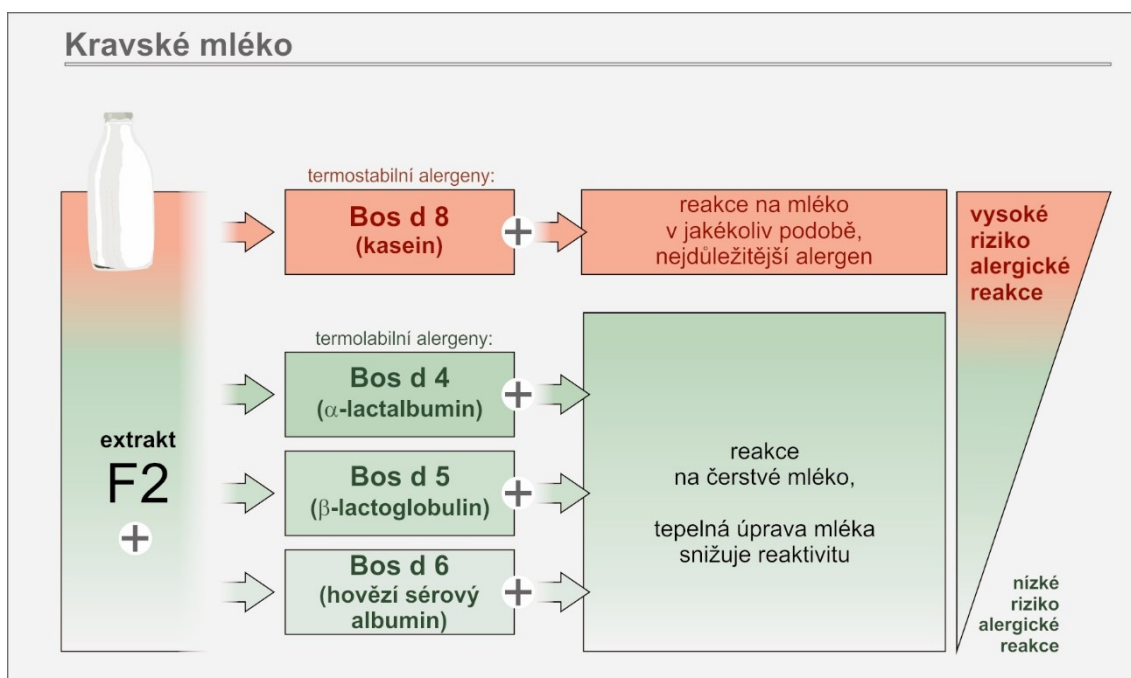


**Obrázek 2: Vyšetření sIgE protilátek proti vybraným molekulárním komponentám sóji.**  
 Predikce rizika alergické reakce (113).

### 2.9.2 Zdroj alergenu – Kravské mléko (*Bos domesticus*)

Přínos vyšetření specifického IgE proti molekulárně definovaným alergenům je možno demonstrovat také na přecitlivělosti na složky kravského mléka, která patří k významným alergiím zvláště v dětském věku. Její prevalence se v dospělé evropské populaci pohybuje mezi 2–5 % (56). Stanovení sIgE protilátek proti směsnému alergenů kravského mléka je používáno v diagnostice tohoto onemocnění již celou řadu let. Je užitečným nástrojem, ale nedokáže odpovědět na některé principiální otázky, které můžeme vyřešit pomocí vyšetření sIgE proti komponentám kravského mléka, **Obrázek 3**. Nejvýznamnější alergenní složkou je kasein, v nomenklatuře alergenů označený jako Bos d 8. Jedná se o směs alergenů tvořenou čtyřmi frakcemi,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  a  $\kappa$  kaseiny. Je rovněž významným alergenem sýrů. Je termostabilní a můžeme se s ním setkat i v tepelně zpracovaných mléčných produktech. Převaření nebo pasterizace mléka pouze redukuje množství kaseinu na cca 50 % původního obsahu. Je zodpovědný za závažné projevy alergie na mléčné výrobky. Vysoké hladiny specifického IgE proti Bos d 8 jsou typické pro alergii na kravské mléko (114). Další tři molekulární komponenty kravského mléka (Bos d 4, Bos d 5 a Bos d 6) patří mezi termolabilní bílkoviny, i když snížení jejich alergenicity tepelnou úpravou může záviset kromě teploty a délky tepelné úpravy i na interakcích mezi jednotlivými bílkovinami mléka (115). Bos d 4 ( $\alpha$ -lactalbumin)

je monomerní globulin vázající vápník a zinek, jehož fyziologickou funkcí je regulovat enzym laktóza syntázu v mléčné žláze. Obdobné riziko alergických komplikací je spojené se senzibilizací na  $\beta$ -lactoglobulin (Bos d 5), který tvoří až 50 % proteinů syrovátky. Patří mezi lipokaliny, proteiny transportující malé hydrofobní molekuly, např. tuky a  $\beta$ -karoten. Bos d 5 je částečně termolabilní, ale vykazuje vysokou odolnost vůči hydrolýze a vůči působení proteáz při trávení mléčných bílkovin. To zvyšuje jeho nebezpečnost. Dále je možné zmínit Bos d 6 (BSA, hovězí sérový albumin), který je hlavním proteinem krevní plasmy skotu. Je přítomen v hovězím masu i v kravském mléce. Jedná se o termolabilní bílkovinu, tepelně upravené mléko a maso je pro pacienty reagující na tento alergen poměrně bezpečné. Je také citlivý k proteázám během trávení. Bos d 6 je méně významný alergen kravského mléka, nicméně pacienti senzibilizovaní na alergeny hovězího masa mohou reagovat i na mléčné produkty (116).



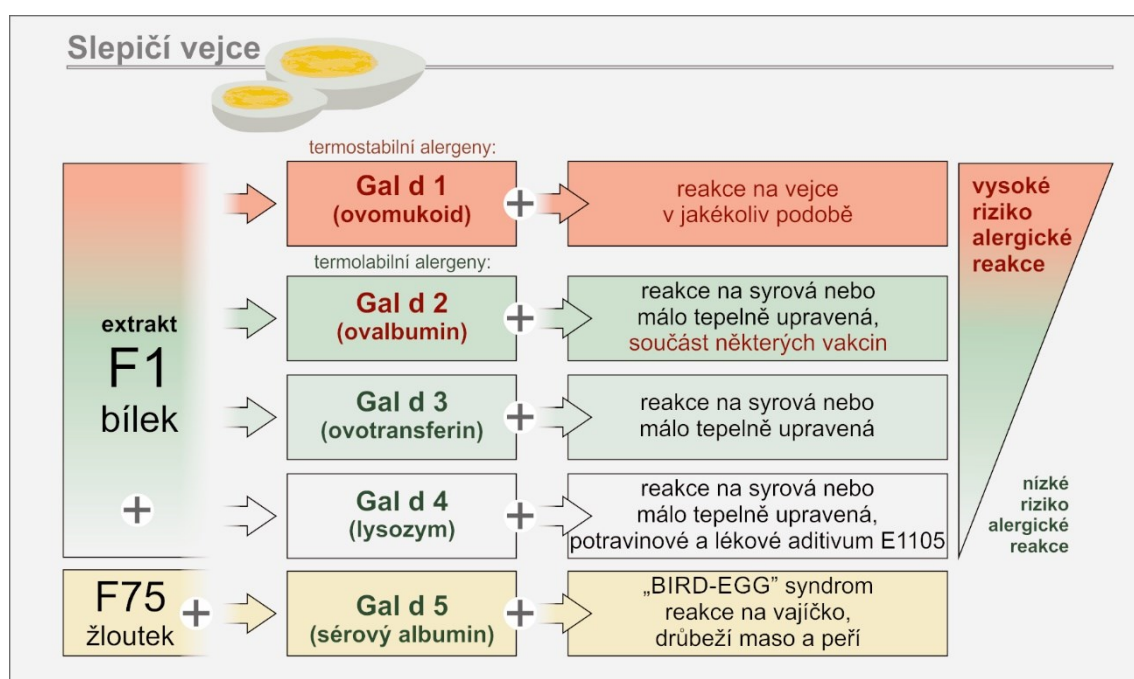
Obrázek 3: Vyšetření sIgE protilátek proti vybraným molekulárním komponentám kravského mléka. Predikce rizika alergické reakce (113).

### 2.9.3 Zdroj alergenu – Vejce (*Gallus domesticus*)

Slepičí vejce, především bílek, je považován za jeden z nejvýznamnějších zdrojů alergenů pro člověka. Alergie na složky slepičího vejce je velmi častá, zvláště u dětí, **Obrázek 4.** Dominantním alergenem vaječného bílku je ovomukoid (Gal d 1), jeho obsah je přes 10 %. Je vysoce alergenní a může vyvolat anafylaktické reakce. Jeho nebezpečnost zvyšuje i velká odolnost vůči zahřátí (je stabilní při 100 °C po dobu 1 hodiny), změnám pH

a působení proteáz. Vysoké hladiny specifického IgE proti Gal d 1 jsou považovány za rizikový faktor perzistence alergie na vaječný bílek i po tepelné úpravě potraviny (117). Gal d 2 (ovalbumin) je nejvíce zastoupený protein vaječného bílku. Jeho obsah dosahuje 50 %. Je méně termostabilní než ovomukoid a také méně odolný vůči změnám pH a proteázám při trávení. Je výrazně alergenní a může být obsažen ve stopovém množství v mateřském mléce kojících žen po konzumaci slepičích vajec. Může být také stopově přítomen v některých vakcínách připravených na slepičích embryích. Gal d 4 (lysozym) je poslední z významnějších alergenů vaječného bílku. Závažné reakce na vaječný lysozym jsou spíše výjimkou. Používá se jako aditivum a konzervant (E1105) do některých farmaceutických a potravinářských výrobků, po jejichž požití může vyvolat alergické reakce (96,118).

Žloutek slepičího vejce obsahuje sérový albumin (Gal d 5). Je odpovědný za reaktivitu nazývanou „bird-egg“. Jedná se o alergickou reakci na drůbeží maso, vajíčko a ptačí peří (119).



Obrázek 4: Vyšetření sIgE protilátek proti vybraným molekulárním komponentám slepičích vajec. Predikce rizika alergické reakce (113).

#### 2.9.4 Zdroj alergenu – Lískový ořech (*Corylus avellana*)

Reakce na stromové ořechy patří k velmi rizikovým senzibilizacím z hlediska anafylaxe v dospívání a dospělém věku. Může být vyvolána jak po prvním kontaktu

s potravinou (orální cestou) senzibilizací zásobními proteiny, například 2S albuminem, vicilinem (7S globulin) a leguminem (11S globulin), tak po předchozí senzibilizaci inhalačními panalergeny ze skupiny profilinů a proteinů s vysokou homologií s alergenem Bet v 1 (120).

Lískové ořechy jsou plody lísky obecné, která patří mezi keře z čeledi břízovitých, podčeleď lískovité. Oříšky jsou konzumovány celosvětově především díky významné nutriční hodnotě. Přestože jsou popisovány značné geografické a věkově podmíněné rozdíly v závažnosti příznaků, je alergie na lískové ořechy považována za jednu z nejčastějších alergií na ořechy v Evropě (120). Více než polovinu obsahu oříšku tvoří nenasycené tuky, přibližně 15–20 % cukry a 10–15 % bílkoviny. Dále jsou bohaté na řadu minerálních látek (vápník, hořčík, draslík, fosfor, železo, zinek a měď), vlákninu a vitamíny řady B a E. Jsou hojně využívány v potravinářství a cukrářství, z lískových jader můžeme připravit ořechové máslo, mléko a pastu (121). Hlavním alergenem lískového ořechu je Cor a 1, který patří do rodiny PR-10 (Bet v 1 homologní protein). Byly identifikovány celkem čtyři isoalergeny, kde Cor a 1.01, Cor a 1.02 a Cor a 1.03 nalezneme v lískovém pylu a Cor a 1.04 v lískovém ořechu, který svoji alergenicitu běžnou tepelnou úpravou (pečením či pražením) ztrácí velmi omezeně (120). Díky silné zkřížené reaktivitě s hlavním alergenem břízy Bet v 1 patří mezi nejčastější spouštěče příznaků OAS ve středoevropské populaci. V kombinaci se senzibilizací na jarní stromy, ovoce a stromové ořechy hovoříme o tzv. syndromu bříza-jablko-lískový ořech (56). Výrazně vyšší alergenicitu se závažnými klinickými projevy, včetně anafylaxe, mají druhově specifické termostabilní zásobní alergeny 2S albumin (Cor a 14) a 11S globulin (Cor a 9) se zvýšeným rizikem senzibilizace dětí školního věku (122). Pacienti s alergií na lískový oříšek mohou být senzibilizováni i na Cor a 8 (nsLTP) a Cor a 11 (7S globulin), které jsou také termostabilní a spojovány s rizikem systémové odpovědi (123,124).

### **2.9.5 Zdroj alergenu – Vlašský ořech (*Juglans regia*)**

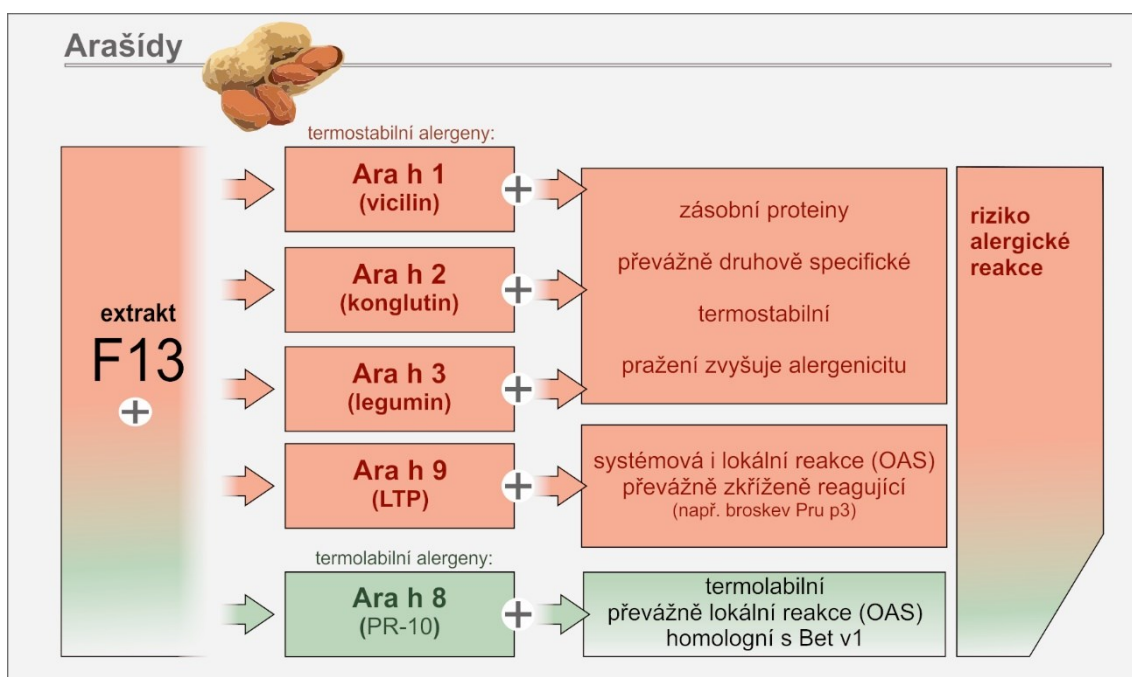
Vlašské ořechy jsou plody ořešáku královského z čeledi ořešákovitých, které se pěstují po celém světě převážně v mírném podnebí (120). Ořechy jsou výživné a energeticky bohaté, především díky vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin a řady minerálních látek a vitamínů. Využívají se v potravinářském průmyslu, zvláště v pekařství a cukrářství, jako dochucující nebo dekorační prvek. Alergie na vlašské

ořechy se u nás často vyskytuje spolu s alergií na lískové ořechy v podobě zkřížené senzibilizace na alergeny s Bet v 1 homologními proteiny, v případě lískového ořechu Cor a 1 (56) a u vlašského ořechu Jug r 5, který byl popsán nedávno (125). Hlavními alergeny vlašského ořechu jsou Jug r 1, Jug r 2 a Jug r 3. Nejvíce zastoupená je komponenta Jug r 1 (2S albumin), která je vysoce termostabilní a schopná vyvolat závažné systémové reakce. Senzibilizace na Jug r 1 bývá známkou primární alergie na ořechy (126). Dále je v menší míře zastoupený Jug r 3 (nsLTP), který je také termostabilní a může se projevit jak lokální, tak systémovou odpovědí. Riziko zkřížené reaktivity mezi dalšími alergeny ovoce a semen z čeledi růžovitých (broskev, třešeň, mandle a další) je poměrně vysoké. Zásobní protein Jug r 2 (7S globulin) je značně termostabilní a po tepelné úpravě (pražení) se jeho alergenicita může ještě zvýšit. Jeho struktura je často glykosylována a pozitivní laboratorní výsledek tak může být ovlivněn zkříženou reaktivitou s CCD. Senzibilizace bývá spojována se závažnými systémovými obtížemi (120,126).

#### **2.9.6 Zdroj alergenu – Podzemnice olejná (*Arachis hypogaea*)**

Podzemnice olejná je luštěnina z čeledi bobovitých, jejímž plodem je lusk obsahující semena (arašíd, burské oříšky). Můžeme je konzumovat v syrové, pražené i smažené podobě. Mají vysokou energetickou hodnotu, obsahují nasycené, mono- a polynenasycené mastné kyseliny, bílkoviny, sacharidy a vitamíny řady B a E. Hojně se využívají v potravinářském průmyslu na přípravu cukrářských produktů a v kosmetice. Arašíd je významným potravinovým alergenem a jednou z nejčastějších potravin vyvolávajících anafylaktické reakce, zejména v USA. Ve většině případů se závažné klinické obtíže objeví již po kontaktu s malým množstvím arašídového proteinu nejčastěji při konzumaci, ale i vdechnutím a při styku s kůží (56,127). Mezi běžně vyšetřované molekulární komponenty patří Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8 a Ara h 9 (128). Hlavními alergeny arašídů jsou především zásobní proteiny semen Ara h 1 (7S globulin, vicilin), Ara h 2 (2S albumin, konglutin) a Ara h 3 (11S globulin, legumin). Jsou odolné vůči vysoké teplotě a proteolytickému štěpení, po požití mohou vyvolat závažné systémové reakce (123). Jejich alergenicita se může vlivem vysokých teplot zvýšit (pražením). Alergici citliví na arašíd bývají z více než 90 % senzibilizováni právě na Ara h 1 a Ara h 2. Vyšetření specifických IgE protilátek proti Ara h 2 je považováno za laboratorní ukazatel skutečné alergie na arašíd (129,130). Senzibilizace na termostabilní molekulu Ara h 6 (2S albumin), která je z části homologní s Ara h 2, může u některých

pacientů predikovat těžké systémové reakce (127,128). Alergen Ara h 8 patří do proteinové rodiny PR-10 proteinů, je termolabilní a snadno podléhá enzymatickému štěpení. Vykazuje zkříženou reaktivitu s dalšími Bet v 1 homologními proteiny. Alergická odpověď se projevuje především lokálně ve formě OAS. Z rozsáhlé rodiny nsLTP přítomné v rostlinách, zelenině, ovoci a luštěninách pochází komponenta Ara h 9. Je termostabilní a odolná enzymatickému působení, může vyvolat jak lokální, tak systémové alergické reakce, **Obrázek 5** (56,128). U senzibilizace na jednotlivé molekulární komponenty jsou popisovány výrazné geografické rozdíly, například v USA je typická senzibilizace na Ara h 1, Ara h 2 a Ara h 3 a bývá spojována s těžšími příznaky. Ve Španělsku dominuje senzibilizace na Ara h 9, u které k alergické odpovědi na nsLTP arašídů dochází po předchozí senzibilizaci na jiné rostlinné a ovocné nsLTP (broskev, platan, pelyněk a další). Senzibilizace na Ara h 1 a Ara h 3 je častá u států střední a severní Evropy, ale nejvíce zastoupeným bývá Ara h 8, který má vysokou homologii s Bet v 1 proteinem břízy a v případě klinické manifestace je spojován s mírnějšími OAS příznaky. U pacientů alergických na pyl břízy se mohou velmi vzácně vyskytnout také systémové reakce vyvolané Ara h 8 po požití arašídů (56). Vzhledem k vysokému riziku anafylaktické reakce po kontaktu s arašídů byl americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, „Food and Drug Administration“), recentně schválen komerčně dostupný terapeutický alergen pro léčbu potravinové alergie na arašídů. Jedná se vůbec o první a jedinou alergenovou imunoterapii u potravinových alergií. Preparát je určen k navození tolerance na alergeny arašídů a je indikován ve věku 4–17 let (131).



Obrázek 5: Vyšetření sIgE protilátek proti vybraným molekulárním komponentám arašidů.

Predikce rizika alergické reakce (113).

### 2.9.7 Zdroj alergenu – Ryby, měkkýši a koryši

Alergie na ryby, měkkýše a koryše patří mezi klinicky závažná onemocnění s vysokým rizikem anafylaktických reakcí. Ryby jako strunatci jsou fylogeneticky výrazně odlišné od měkkýšů i koryšů. Alergie na ryby postihuje méně než jedno procento populace, přičemž počet senzibilizovaných pacientů může být výrazně vyšší dle potravních návyků v různých geografických oblastech (102). Přímořské státy s vysokou konzumací ryb a rybolovem mají vyšší prevalenci alergických reakcí na ryby. Základními a nejvýznamnějšími alergeny ryb jsou parvalbuminy. Jsou součástí svaloviny a jsou odpovědné za vazbu vápníkových iontů. Jsou termostabilní a udržují si svou alergenicitu i v kyselém prostředí a po pepsinolýze. Parvalbuminy jsou v rybách lokalizovány především v bílé svalovině, která je odpovědná za rychlé pohyby ryb. Naproti tomu tmavá svalovina využívaná k vytrvalému pohybu je na parvalbuminy chudší. Z hlediska složení rozlišujeme  $\alpha$ -parvalbuminy, které jsou méně alergenní a vyskytují se u jiných obratlovců než ryb, a vysoce alergenní acidické rybí  $\beta$ -parvalbuminy. Parvalbuminy z různých druhů ryb vykazují výraznou zkříženou reaktivitu. Běžně se u nás můžeme setkat s parvalbuminy Clu h 1 ze sledě obecného, Cyp c 1 z kapra, Gad m 1 z tresky, Onc m 1 ze pstruha, Sal s 1 z lososa, Thu a 1 z tuňáka a dalšími. Neméně významnými alergeny jsou beta-enolázy, které se vyskytují v mnoha druzích ryb. Mezi beta-enolázy patří Gad m 2 tresky, Sal s 2

lososa a Thu a 2 tuňáka. Zvýšené hladiny specifických IgE protilátek proti beta-enolázám se vyskytují u poloviny pacientů s alergií na ryby. Výběr významných rybích alergenů doplňují aldolázy A zastoupené alergeny Gad m 3 tresky, Sal s 3 lososa a Thu a 3 tuňáka (103).

Některé reakce na požití ryb mohou být způsobeny alergií na parazitického helminta *Anisakis simplex*, jímž je nakaženo až tři čtvrtiny mořských ryb žijících v hejnech. Sled'ový červ obsahuje více alergenů, ale nejdůležitější z nich je tropomyosin Ani s 3 zkříženě reagující s měkkýši, korýši a členovci včetně roztočů (103).

Podstatně komplikovanější je situace u měkkýšů a korýšů, kde bylo popsáno několik desítek molekulárně definovaných alergenů. Nejdůležitější z nich jsou tropomyosiny, panalergeny, jejichž struktura je vysoce konzervována napříč bezobratlými a slouží ke svalové kontrakci. Jsou vysoce termostabilní a přečkají většinu tepelných úprav korýšů a měkkýšů. Jsou také dobře rozpustné a mohou kontaminovat potraviny zpracovávané spolu s těmito bezobratlými živočichy. Tropomyosinů je popsáno mnoho druhů. Jako příklady můžeme uvést Pen m 1 krevety nebo Hom a 1 humra. Tropomyosiny korýšů a měkkýšů sdílejí shodné epitopy s alergeny roztočů a hmyzu. Zkřížená reaktivita byla popsána mezi tropomyosiny Pen m 1 krevety, Per a 7 švába, Der p 10 a Der f 10 roztočů. Kromě tropomyosinů korýši a měkkýši obsahují tepelně labilní arginin kinázy (Pen m 2 krevet), lehký řetězec myosinu (Hom a 3 humra) a sarkoplasmatický vápník vázající protein (Pen m 4 krevet) (132). Užití alergenových extraktů v laboratorní diagnostice může kvůli výrazné zkřížené reaktivitě a velké druhové rozmanitosti těchto živočichů vést k nesprávným klinickým interpretacím. Zde se otevírá cesta k využití molekulárně definovaných alergenů a CRD diagnostice, která může tyto problémy zmírnit nebo odstranit (133).

### **2.9.8 Zdroj alergenu – Pšeničná mouka (*Triticum aestivum*)**

Výrazný posun v chápání imunopatogenze, epidemiologie a klinických projevů alergických i nealergických reakcí na bílkoviny pšenice seté *Triticum aestivum* přineslo detailní poznání alergenního spektra této obiloviny (134). Do mezinárodní nomenklatury bylo zařazeno 28 molekulárně definovaných alergenů pšenice (58). Teprve použití CRD diagnostiky umožní lékařům orientovat se v této složité situaci a správně odhadnout cestu expozice i riziko závažnosti alergického zánětu (135). Pšenice patří k nejdéle domestikovaným plodinám a spolu s rýží a kukuřicí je nejvíce pěstovanou kulturní



rostlinou na Zemi. Bílkovina získaná z této obilniny je součástí nepřeborné škály pokrmů a potravin. Proteiny představují cca 10–15 % sušiny zrna. Nejčastěji jsou tříděny podle své extrahovatelnosti (rozpuštěnosti) v solných roztocích na solubilní albuminy a globuliny, které se podílejí zhruba 15–20 %, a na nerozpustné prolaminy, označované též souborným názvem lepek (gluten). Prolaminy pšenice můžeme rozdělit na gliadiny (monomery) a gluteniny (polymery). Představují hlavní zásobní proteiny zrna a díky nim je možné využívat pšeničnou mouku k pečení. Mezi zásobními proteiny pšenice můžeme najít velmi významné alergeny. Patří k nim zejména gliadiny, a to tepelně stabilní  $\omega$ -5-gliadin, nesoucí mezinárodní označení Tri a 19, dále pak termolabilní  $\alpha$ - $\beta$ -gliadin (Tri a 21) a  $\gamma$ -gliadin (Tri a 20) (101). Tri a 19 ( $\omega$ -5-gliadin) je odpovědný za celou řadu alergických projevů včetně závažných systémových reakcí. Tento alergen se také vyznačuje výraznou zkříženou reaktivitou s jinými prolaminami obsaženými v dalších cereáliích, zejména se sekaliny žita a hordeiny ječmene (136). Specifickou podobou alergie na bílkoviny pšenice je WDEIA („Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis“, anafylaxe na pšenici vyvolaná fyzickou aktivitou) spouštěná fyzickou námahou spojenou s konzumací potravin obsahujících větší množství pšeničných bílkovin. K typickým spouštěčím alergenům tohoto onemocnění řadíme právě Tri a 19. Rovněž pekařské astma, jako typická choroba spojená s profesionální expozicí prachu při manipulaci s moukou a dalšími sypkými pšeničnými surovinami, je vyvoláno zásobními bílkovinami (134). Kromě gliadinů obsahuje pšenice také gluteniny (101). Gliadiny vyvolávají také celiakii, imunopatologické onemocnění s odlišnou patogenezi, ve které nesehrává úlohu IgE zprostředkovaný zánět.

Z alergenů obsažených v rozpustné frakci bílkovin pšeničného zrna můžeme uvést v první řadě skupinu  $\alpha$  amylázových inhibitorů. Patří k nim zejména Tri a 28, Tri a 29, ale také Tri a 15 (101). Tyto alergeny se do organismu dostávají převážně respirační cestou, jsou odpovědné za vznik alergických exacerbací astmatu a za závažné až anafylaktické reakce. Jsou termostabilní a vysoce odolné vůči působení proteáz. Navíc bylo zjištěno, že tato skupina proteinů z pšenice je schopna aktivovat mechanismy vrozené imunity a stimulovat produkci prozánětlivých cytokinů v zažívacím traktu. To může vést k infiltraci střevní sliznice imunitními buňkami a k zánětu. Tento mechanismus by mohl být jednou z příčin neceliakální glutenové senzitivity (NCGS, „Non-Celiac Gluten Sensitivity“) (137).

Pšenice obsahuje také alergeny ze skupiny nsLTP (Tri a 14) nebo ze skupiny profilinů (Tri a 12). Obě skupiny mohou být spoluzodpovědné za klinické projevy

pekařského astmatu. Byla identifikována celá řada dalších molekulárně definovaných alergenů pšenice, pro které se klinické korelace stále hledají (101).

## PRAKTICKÁ ČÁST

### 3 Cíle práce

Tato práce se zabývá zhodnocením přínosu laboratorního stanovení specifických IgE protilátek pomocí multiplexního systému ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup> sIgE 112 u dospívajících a dospělých pacientů s atopickou dermatidou. Konkrétní cíle práce byly následující:

1. Analýza senzibilizace na inhalační a potravinové molekulární komponenty u pacientů s atopickou dermatidou.
2. Zhodnocení senzibilizačního profilu u pacientů s mírnou, středně těžkou a těžkou formou atopické dermatitidy a u podskupiny pacientů s atopickou dermatidou komplikovanou bronchiálním astmatem a alergickou rýmou.
3. Zhodnocení výsledků senzibilizace na inhalační a potravinové molekulární alergeny metodou klastrové analýzy.
4. Posouzení přítomnosti specifických IgE protilátek reagujících s alergeny vybraných složek potravy.

### 4 Materiál a metody

#### 4.1 Soubor pacientů

V období let 2018 až 2019 bylo na Klinice nemocí kožních a pohlavních, Fakultní nemocnice Hradec Králové, vyšetřeno 104 pacientů s atopickou dermatidou. Diagnóza atopické dermatitidy byla stanovena dle Hanifin-Rajkových kritérií (47). Vylučovacími kritérii pro zařazení do studie byla dlouhodobá terapie cyklosporinem, metotrexátem, azathioprinem, systémovými kortikoidy, biologickou terapií, a dále těhotenství a kojení. Rovněž nemohli být zahrnuti pacienti s atopickou dermatidou mající současně jiná systémová onemocnění a pacienti s onkologickým onemocněním.

U všech pacientů zařazených do studie bylo provedeno kompletní dermatologické a alergologické vyšetření a zároveň *in-vitro* stanovení sérových specifických IgE protilátek proti molekulárně definovaným alergenům (ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup> sIgE 112). Sběr krevních vzorků probíhal prospektivně. Všichni pacienti byli informováni o účelu studie a svou dobrovolnou účast potvrdili podpisem informovaného souhlasu. Studie byla schválena

Etickou komisí Fakultní nemocnice a LF UK v Hradci Králové (číslo jednací: 201806 S04P; 201911 I01P).

#### 4.2 Charakteristika souboru pacientů

Výsledky testu ImmunoCAP ISAC byly postupně zpracovány v souboru 60, 81, 100 a 104 pacientů s atopickou dermatitidou a jejich charakteristika je uvedena v příslušných publikacích (138–141). Tyto soubory pacientů byly statisticky porovnány, zda se zastoupení pacientů liší. Bylo zjištěno, že ve všech případech se potvrdila hypotéza shody pravděpodobností, tzn. zastoupení pacientů se významně neliší.

V každém souboru byli pacienti rozděleni dle indexu SCORAD do tří skupin na mírnou formu AD, středně těžkou formu AD a těžkou formu AD. Dále byli AD pacienti rozlišení na dvě skupiny dle přítomnosti bronchiálního astmatu nebo alergické rýmy. Pacienti, kteří trpěli oběma chorobami, byli zařazeni do obou skupin. Závažnost alergické rýmy či bronchiálního astmatu nebyla v rámci studie sledována. Převážná část příspěvků zahrnovala výsledky s počtem 100 pacientů, viz **Tabulka 2**.

**Tabulka 2** Charakteristika souboru 100 pacientů s atopickou dermatitidou

<b>Počet pacientů</b>	100 pacientů (48 mužů, 52 žen)
<b>Věk</b>	průměrný věk 40,9 roku
<b>Index SCORAD</b>	průměrná hodnota 39,0 bodů (s. d. 13,1)
<b>Pozitivní výsledky sIgE ve sledovaném souboru</b>	93 pacientů (93,0 %)
<b>Mírná forma AD</b>	14 pacientů (14,0 %)
<b>Středně těžká forma AD</b>	58 pacientů (58,0 %)
<b>Těžká forma AD</b>	28 pacientů (28,0 %)
<b>Počet pacientů s AB</b>	55 pacientů (55,0 %)
<b>Počet pacientů s AR</b>	78 pacientů (78,0 %)

AD – atopická dermatitida, AB – bronchiální astma, AR – alergická rýma

#### 4.3 Anamnestická data

Anamnestická data byla odebírána v dermatologické ambulanci při zařazení pacientů do studie formou cíleně zodpovězených dotazů. Zvláště bylo zjišťováno, jestli pacient pozoruje nežádoucí reakce po požití konkrétních potravin s upřesněním, o jaké obtíže se jedná. Nežádoucí reakce na potraviny jsou považovány za významný

faktor zhoršující průběh atopické dermatitidy. Zároveň byly u všech pacientů odebrány anamnestické údaje ohledně výskytu alergické rýmy a bronchiálního astmatu.

#### **4.4 Diagnostika bronchiálního astmatu a alergické rýmy**

Diagnostika bronchiálního astmatu (AB) byla provedena dle doporučených postupů Globální iniciativy pro astma (GINA) (142) ve spolupráci s klinickými specialisty z Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Alergická rýma (AR) byla diagnostikována dle doporučení ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) (143,144) rovněž v kooperaci s lékaři z Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

#### **4.5 Zhodnocení závažnosti atopické dermatitidy**

Závažnost atopické dermatitidy byla hodnocena podle indexu SCORAD (51). Byl zhodnocen rozsah postižení, intenzita onemocnění a subjektivní parametry. SCORAD index ve svém výpočtu zahrnuje rozsah postižené plochy pro jednotlivé části těla frontální a dorzální strany (0-100), intenzitu erytému, edému, mokvání, exkoriací, lichenifikace a suchosti kůže (každý bod 0-3) a subjektivní parametry hodnotící nespavost a svědění kůže. Obtíže jsou posuzovány na vizuální analogové škále (0-10 bodů). Všechny hodnoty byly zaznamenány do SCORAD formuláře, **Příloha 8.1**. Výsledek vyšetření je dále počítán matematickým vzorcem SCORAD:  $A/5 + 7B/2 + C$ . Ve schématu je A definován jako rozsah postižení (0-100 bodů), B jako intenzita onemocnění (0-18 bodů) a C jako subjektivní parametry (0-20 bodů). Závažnost atopické dermatitidy byla hodnocena do 25 bodů jako mírná forma AD, nad 25 bodů do 50 bodů jako středně těžká forma AD a nad 50 bodů jako těžká forma AD. Toto vyšetření bylo provedeno každé dva měsíce v průběhu jednoho roku a byla vypočítána průměrná hodnota SCORAD (50).

#### **4.6 Odběr krevních vzorků**

Vzorky periferní krve byly odebrány z kubitální žíly od pacientů s atopickou dermatitidou do odběrových zkumavek s aktivátorem krevního srážení (BD Vacutainer®, Becton Dickinson). Po koagulaci bylo sérum odděleno od krevních elementů centrifugací (10 min při 2500 g) a zamrazeno na -80 °C až do provedení analýzy. Před vlastní analýzou byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě.

Při zavádění metody ImmunoCAP ISAC® sIgE 112 do klinické praxe byla srážlivá krev odebrána i od 15 zdravých dárců, kteří sloužili jako kontrolní skupina. Zastoupení

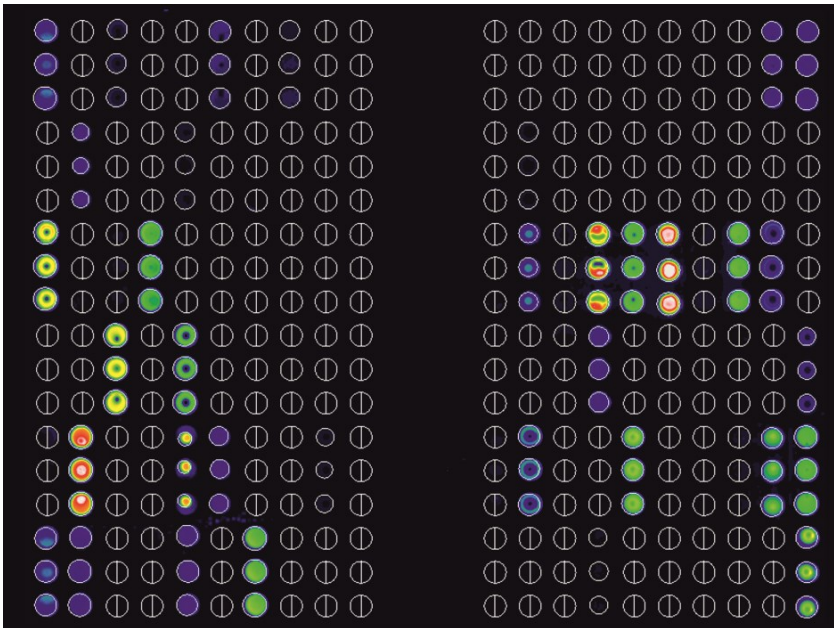
mužů a žen bylo rovnoměrné. U všech testovaných dárců byly naměřeny hodnoty sIgE <0,3 ISU-E, vyjádřeny jako negativní.

#### 4.7 Vyšetření sérových sIgE protilátek metodou ImmunoCAP ISAC

Analýza byla provedena na Ústavu klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

##### 4.7.1 Princip analýzy

Hladina sérových sIgE protilátek byla u všech pacientů stanovena komerčně dostupnou diagnostickou soupravou ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup> sIgE 112 (Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Švédsko). Systém ISAC (Immuno Solid-Phase Allergen Chip) je semi-kvantitativní multiplexová metoda. Reakce probíhá na skleněné destičce, která má čtyři reakční prostory (biočip) určené pro 4 vzorky (pacienty) a na každém je ukotveno celkem 112 molekulárně definovaných alergenů v triplikátech, **Obrázek 6**. Biočip obsahuje spektrum molekulárních komponent z různých alergenových zdrojů, které patří mezi nejčastější spouštěče alergických reakcí. Jsou zde zastoupeny molekulární komponenty potravin rostlinného a živočišného původu, inhalační komponenty pylů (stromů, trav a plevelů), dále komponenty zvířat, roztočů, spor plísní, hmyzích jedů, parazitů a latexu. Zároveň lze tyto molekulární komponenty rozlišit na převážně druhově specifické a převážně zkříženě reagující. Celkem je na biočipu zastoupeno 70 komponent připravených rekombinantní technologií a 42 komponent purifikovaných z přírodních zdrojů (nativní). Zkříženě reagující cukerné determinanty (CCD) jsou na biočipu zastoupeny v podobě komponenty nMUXF3, prostřednictvím které je testována přítomnost anti-CCD protilátek v patientských sérech. Na biočipu je přítomno celkem šest nativních komponent nesoucích ve své struktuře CCD. Jedná se o nJug r 2 (vlašský ořech), nPhl p 4 (bojínek), nCyn d 1 (troskut), nPla a 2 (platan), nCup a 1 (cypřiš) a nCry j 1 (kryptomerii). Další nativní komponenty nejsou ovlivněny. V případě pozitivního výsledku sIgE proti nMUXF3 je pravděpodobné, že těchto šest molekulárních komponent nesoucích CCD, jsou také pozitivní. Výsledky jsou pohledem současných znalostí klinicky irelevantní. Pokud některá z těchto šesti komponent nevykazuje výrazně vyšší výsledky než nMUXF3 a není podložena žádným klinickým podezřením, lze ji považovat pouze za CCD pozitivní (106). Podrobný seznam molekulárních komponent zastoupených na biočipu ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup> sIgE 112 znázorňuje **Tabulka 3**.



**Obrázek 6: Systém ImmunoCAP ISAC – příklad výsledku našeho pacienta s nálezem zvýšené hladiny sIgE protilátek proti několika molekulárně definovaným alergenům.**

Molekulární alergeny jsou na biočipu seřazeny vertikálně v tripletech, v rozích jsou umístěny kontrolní body. Intenzita fluorescence je vizualizovaná ve formě barevných spotů, kterým jsou přiřazeny hodnoty koncentrace po výpočtu z kalibrační křivky. Barevné spoty na obrázku znázorňují pozitivní nález sIgE na danou molekulární komponentu (145).

#### 4.7.2 Pracovní postup

V rámci jedné soupravy ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup> sIgE 112 bylo vyšetřeno 20 vzorků, resp. 19 pacientů a 1 kontrolní vzorek sIgE pro kalibraci. Na příslušný reakční prostor bylo přidáno 30  $\mu$ l neředěného krevního séra a následovala dvouhodinová inkubace, při které došlo k vychytání specifického IgE na odpovídající molekulární komponenty. Nenavázané protilátky byly odstraněny promytím. Na zcela suchý biočip bylo napipetováno 30  $\mu$ l fluorescenčně značené sekundární protilátky proti lidskému IgE. Po třicetiminutové inkubaci byl opakován proces promytí a kompletního usušení biočipu. Intenzita fluorescence vzniklých imunokomplexů byla snímána mikročipovým laserovým scannerem LuxScan 10K/A (CapitalBio, Peking, Čína) a analyzována speciálním počítačovým softwarem Phadia MIA (Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Švédsko), který pomocí kalibrační křivky kvantifikoval fluorescenční signál jednotlivých molekulárních komponent (86,87,106). Analýza byla provedena dle doporučení výrobce (106).

Výsledky analýzy jsou vyjadřovány v arbitrárních jednotkách zvaných standardizované jednotky ISAC pro specifické IgE (ISU-E). Kalibrace je prováděna

pomocí kontrolního vzorku, který je součástí každé diagnostické soupravy. Měřící rozsah metody je udáván od 0,3 do 100 ISU-E. Výsledky větší než 0,3 ISU-E jsou považovány za pozitivní. Naměřené hodnoty sIgE lze zároveň vyjádřit v podobě čtyř semi-kvantitativních tříd, a to třída 0: <0,3 ISU-E jako negativní, třída 1: 0,3> 0,9 ISU-E odpovídá nízké pozitivitě, třída 2: 0,9> 15 ISU-E střední pozitivitě a třída 3: ≥ 15 ISU-E vysoké pozitivitě (106).

**Tabulka 3 Seznam molekulárních komponent zastoupených na biočipu ImmunoCAP ISAC® sIgE 112**

Zdroj alergenu	Druh	n/r	Molekulární komponenta	Biochemický název	Velikost
<b>Převážně druhově specifické – potravinové komponenty živočišného původu</b>					
Vaječný bílek	<i>Gallus domesticus</i>	n	Gal d 1	ovomukoid	28 kDa
		n	Gal d 2	ovalbumin	44 kDa
		n	Gal d 3	ovotransferin/ conalbumin	78 kDa
Vaječný žloutek	<i>Gallus domesticus</i>	n	Gal d 5	sérový albumin/ alfa-livetin	69 kDa
Kravské mléko	<i>Bos domesticus</i>	n	Bos d 4	alfa-laktalbumin	14,2 kDa
		n	Bos d 5	beta-laktoglobulin	18,3 kDa
		n	Bos d 8	kasein	20-30 kDa
		n	Bos d lactoferrin	laktoferin	-
Treska	<i>Gadus callarias</i>	r	Gad c 1	parvalbumin	12 kDa
Kreveta	<i>Penaeus monodon</i>	n	Pen m 2	arginin kináza	40 kDa
		n	Pen m 4	sarkoplasmatický protein vázající vápník	20 kDa
<b>Převážně druhově specifické – potravinové komponenty rostlinného původu</b>					
Kešu ořech	<i>Anacardium occidentale</i>	r	Ana o 2	11S globulin, zásobní protein	55 kDa
Para ořech	<i>Bertholletia excelsa</i>	r	Ber e 1	2S albumin, zásobní protein	9 kDa
Lískový ořech	<i>Corylus avellana</i>	n	Cor a 9	11S globulin, zásobní protein	40 kDa
Vlašský ořech	<i>Juglans regia</i>	r	Jug r 1	2S albumin, zásobní protein	15-16 kDa
		n	Jug r 2	7S albumin, zásobní protein, CCD*	44 kDa
Sezamové semínko	<i>Sesamum indicum</i>	r	Ses i 1	2S albumin, zásobní protein	9 kDa
Arašíd	<i>Arachis hypogaea</i>	r	Ara h 1	7S globulin zásobní protein	64 kDa
		r	Ara h 2	2S albumin, zásobní protein	17 kDa
		r	Ara h 3	11S globulin, zásobní protein	60 kDa
		n	Ara h 6	2S albumin, zásobní protein	15 kDa



Sója	<i>Glycine max</i>	n	Gly m 5	7S globulin, zásobní protein	47-65 kDa
		n	Gly m 6	11S globulin, zásobní protein	52-61 kDa
Pohanka	<i>Fagopyrum esculentum</i>	n	Fag e 2	2S albumin, zásobní protein	16 kDa
Pšenice	<i>Triticum aestivum</i>	r	Tri a 19.0101	Omega-5 gliadin	65 kDa
		n	Tri a aA_TI	trypsin/ $\alpha$ -amylázový inhibitor	14-15 kDa
Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	n	Act d 1	cysteinová proteáza	30 kDa
		n	Act d 5	kiwelín	28 kDa
<b>Převážně druhově specifické – inhalační komponenty pylu trav</b>					
Troskut	<i>Cynodon dactylon</i>	n	Cyn d 1	beta-expansin, CCD*	32 kDa
Bojíněk	<i>Phleum pratense</i>	r	Phl p 1	beta-expansin	27 kDa
		r	Phl p 2	expansin	10-12 kDa
		n	Phl p 4	berberine bridge enzym, CCD*	55 kDa
		r	Phl p 5	trávy třídy 5	32 kDa
		r	Phl p 6	trávy třídy 6	11 kDa
		r	Phl p 11	Ole e 1-like protein	20 kDa
<b>Převážně druhově specifické – inhalační komponenty pylu stromů</b>					
Kryptomerie	<i>Cryptomeria japonica</i>	n	Cry j 1	pektát lyáza, CCD*	41-45 kDa
Cypřiš	<i>Cupressus arizonica</i>	n	Cup a 1	pektát lyáza, CCD*	43 kDa
Olivovník	<i>Olea europaea</i>	r	Ole e 1	olivovník, skupina 1	16 kDa
		r	Ole e 9	1,3-beta glukánáza	46 kDa
Platan	<i>Platanus acerifolia</i>	r	Pla a 1	putative invertase inhibitor	18 kDa
		n	Pla a 2	polygalakturonáza, CCD*	43 kDa
<b>Převážně druhově specifické – inhalační komponenty pylu plevele</b>					
Ambrózie	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	n	Amb a 1	pektát lyáza	38 kDa
Pelyněk	<i>Artemisia vulgaris</i>	n	Art v 1	defensin	28 kDa
Merlík	<i>Chenopodium album</i>	r	Che a 1	Ole e 1-like protein	17 kDa
Jíthrocel	<i>Plantago lanceolata</i>	r	Pla l 1	Ole e 1-like protein	18 kDa
Slanobýl	<i>Salsola kali</i>	n	Sal k 1	pektin methylesteráza	43 kDa
<b>Převážně druhově specifické – inhalační komponenty zvířat</b>					
Pes	<i>Canis familiaris</i>	r	Can f 1	lipokalin	23-25 kDa
		r	Can f 2	lipokalin	19 (27) kDa
		r	Can f 5	arginin esteráza, prostatický kalikrein	28 kDa
Kůň	<i>Equus caballus</i>	r	Equ c 1	lipokalin	25 kDa
Kočka	<i>Felis</i>	r	Fel d 1	uteroglobín	38 kDa

	<i>domesticus</i>	r	Fel d 4	lipokalin	22 kDa
Myš	<i>Mus musculus</i>	n	Mus m 1	lipokalin	17 kDa
<b>Převážně druhově specifické – inhalační komponenty spor plísní</b>					
<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	r	Alt a 1	neznámý	16,4-15,3 kDa
		r	Alt a 6	enoláza	45 kDa
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	r	Asp f 1	mitogillin	18 kDa
		r	Asp f 3	peroxisomální protein	19 kDa
		r	Asp f 6	Mn superoxid dismutáza	26,5 kDa
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	r	Cla h 8	manitol dehydrogenáza	28 kDa
<b>Převážně druhově specifické – inhalační komponenty roztočů a švábů</b>					
Roztoč domácího prachu	<i>Blomia tropicalis</i>	r	Blo t 5	neznámý	14 kDa
		n	Der f 1	cysteinová proteáza	27 kDa
	<i>Dermatophya goides farinae</i>	r	Der f 2	NPC2	15 kDa
		n	Der p 1	cysteinová proteáza	24 kDa
<i>Dermatophya goides pteronyssinus</i>	r	Der p 2	NPC2	15 kDa	
Roztoč skladištní	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	r	Lep d 2	NPC2	16 kDa
Rus domácí	<i>Blattella germanica</i>	r	Bla g 1	neznámý	46 kDa
		r	Bla g 2	aspartátová proteáza	36 kDa
		n	Bla g 5	glutathion S-transferáza	23 kDa
<b>Převážně druhově specifické – další komponenty (hmyzí jed, paraziti, latex)</b>					
Jed včely	<i>Apis mellifera</i>	r	Api m 1	fosfolipáza A2	16 kDa
		n	Api m 4	melitin	3 kDa
Jed vosíka	<i>Polistes dominulus</i>	r	Pol d 5	antigen 5	23 kDa
Jed vosy	<i>Vespula vulgaris</i>	r	Ves v 5	antigen 5	23 kDa
Škrkavka	<i>Anisakis simplex</i>	r	Ani s 1	inhibitor serinových proteáz	24 kDa
Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	r	Hev b 1	elongační faktor (rubber elongation factor)	14 kDa
		r	Hev b 3	small rubber particle protein	24 kDa
		r	Hev b 5	neznámý	16 kDa
		r	Hev b 6.01	prohevein	20 kDa
<b>Převážně zkříženě reagující komponenty – profilin (Bet v 2 homologie)</b>					
Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	r	Hev b 8	profilin	15 kDa
Bojínek	<i>Phleum pratense</i>	r	Phl p 12	profilin	14 kDa
Bříza	<i>Betula verrucosa</i>	r	Bet v 2	profilin	15 kDa
Bažanka	<i>Mercurialis annua</i>	r	Mer a 1	profilin	14,1-15,8 kDa

<b>Převážně zkříženě reagující komponenty – PR-10 protein (Bet v 1 homologie)</b>					
Pyl lísky	<i>Corylus avellana</i>	r	Cor a 1.0101	PR-10 protein	17 kDa
Lískový ořech	<i>Corylus avellana</i>	r	Cor a 1.0401	PR-10 protein	17 kDa
Arašíd	<i>Arachis hypogaea</i>	r	Ara h 8	PR-10 protein	17 kDa
Sója	<i>Glycine max</i>	r	Gly m 4	PR-10 protein	17 kDa
Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	r	Act d 8	PR-10 protein	17 kDa
Celer	<i>Apium graveolens</i>	r	Api g 1	PR-10 protein	16 kDa
Jablko	<i>Malus domestica</i>	r	Mal d 1	PR-10 protein	17,5 kDa
Broskev	<i>Prunus persica</i>	r	Pru p 1	PR-10 protein	18 kDa
Olše	<i>Alnus glutinosa</i>	r	Aln g 1	PR-10 protein	18 kDa
Bříza	<i>Betula verrucosa</i>	r	Bet v 1	PR-10 protein	17 kDa
<b>Převážně zkříženě reagující komponenty – thaumatin-like protein (PR-5 protein)</b>					
Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	n	Act d 2	Thaumatin-like protein	24 kDa
<b>Převážně zkříženě reagující komponenty – polkalcin</b>					
Bojínek	<i>Phleum pratense</i>	r	Phl p 7	polkalcin	6 kDa
Bříza	<i>Betula verrucosa</i>	r	Bet v 4	polkalcin	7-8 kDa
<b>Převážně zkříženě reagující komponenty – tropomyosin</b>					
Kreveta	<i>Penaeus monodon</i>	n	Pen m 1	tropomyosin	38 kDa
Rus domácí	<i>Blattella germanica</i>	n	Bla g 7	tropomyosin	33 kDa
Škrkavka	<i>Anisakis simplex</i>	r	Ani s 3	tropomyosin	41 kDa
Roztoč domácího prachu	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	r	Der p 10	tropomyosin	36 kDa
<b>Převážně zkříženě reagující komponenty – sérový albumin</b>					
Kravné mléko	<i>Bos domesticus</i>	n	Bos d 6	sérový albumin	67 kDa
Pes	<i>Canis familiaris</i>	n	Can f 3	sérový albumin	69 kDa
Kůň	<i>Equus caballus</i>	n	Equ c 3	sérový albumin	67 kDa
Kočka	<i>Felis domesticus</i>	r	Fel d 2	sérový albumin	69 kDa
<b>Převážně zkříženě reagující komponenty – nsLTP</b>					
Lískový ořech	<i>Corylus avellana</i>	r	Cor a 8	nsLTP	9 kDa
Vlašský ořech	<i>Juglans regia</i>	n	Jug r 3	nsLTP	9 kDa
Arašíd	<i>Arachis</i>	r	Ara h 9	nsLTP	9,8 kDa

	<i>hypogaea</i>				
Pšenice	<i>Triticum aestivum</i>	r	Tri a 14	nsLTP	9 kDa
Broskev	<i>Prunus persica</i>	r	Pru p 3	nsLTP	10 kDa
Olivovník	<i>Olea europaea</i>	n	Ole e 7	nsLTP	9,5 kDa
Platan	<i>Platanus acerifolia</i>	r	Pla a 3	nsLTP	10 kDa
Pelyněk	<i>Artemisia vulgaris</i>	n	Art v 3	nsLTP	12 kDa
Drnavec	<i>Parietaria judaica</i>	r	Par j 2	nsLTP	10-14 kDa
<b>Zkříženě reagující cukerné determinanty</b>					
CCD		n	MUXF3	bromelain	-

**Vysvětlivky:** nsLTP (non-specific lipid transfer protein), CCD (zkříženě reagující cukerné determinanty, cross-reactive carbohydrate determinants), n (nativní), r (rekombinantní).

Upraveno dle [www.allergen.org](http://www.allergen.org), [www.allergome.org](http://www.allergome.org) a (106).

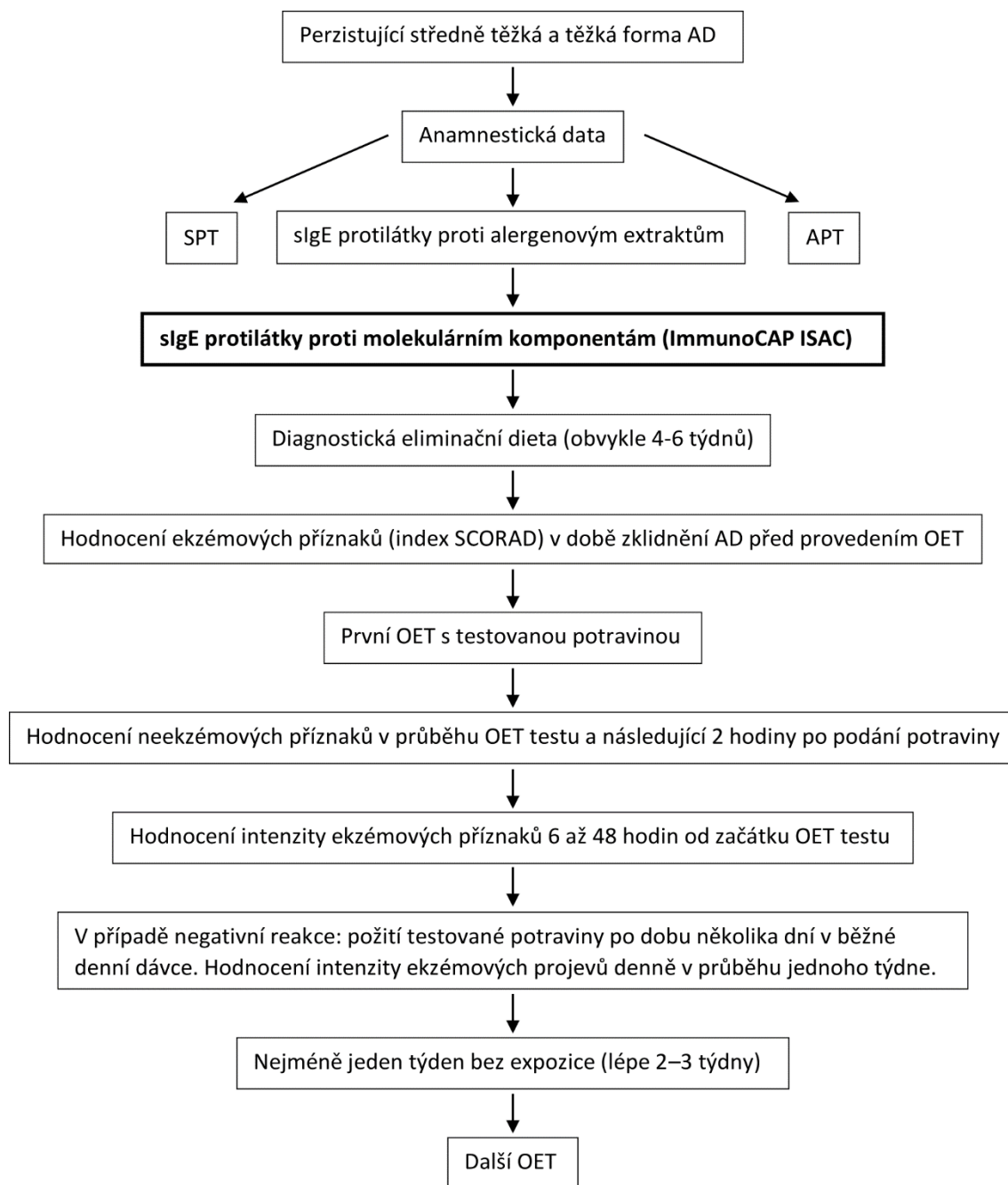
#### 4.8 Diagnostika potravinové alergie u pacientů s atopickou dermatitidou

Cílem diagnostického postupu potravinové alergie u pacientů s atopickou dermatitidou je identifikovat spouštěcí potravinu, případně její složku (molekulární komponentu), která se podílí na zhoršení AD či dalších klinických reakcích spojených s prozánětlivým účinkem potravinových alergenů (48,67). Obecně je postupováno dle doporučení vycházejících z návrhu Evropské akademie alergologie a klinické imunologie (EAACI a GA<sup>2</sup>LEN) (66).

V našem souboru AD pacientů jsme se v první řadě zaměřili na důkladné anamnestické údaje včetně posouzení rizikových potravin a kofaktorů ovlivňujících alergickou reakci (fyzická námaha, farmakologická anamnéza aj.). Při podezření na časně IgE mediované reakce po konzumaci dané potraviny byly v předchozích letech provedeny kožní prick testy s nativní potravinou, atopické epikutánní testy a laboratorní stanovení sérových sIgE protilátek proti extraktovým potravinovým alergenům (146–148). Stávající vyšetření byla v rámci této studie doplněna o multiplexní stanovení sIgE protilátek proti molekulárním komponentám (ImmunoCAP ISAC). V rámci doporučeného diagnostického postupu FA (66) jsme toto stanovení zařadili před diagnostickou eliminační dietu, viz **Obrázek 7**. V případě neurčité klinické reakce po požití potraviny nebo při podezření na non-IgE mediované reakce lze provést APT testy (149), které ale nebyly předmětem této práce.

Na základě pozitivních výsledků sIgE protilátek proti potravinovým komponentám (ImmunoCAP ISAC) a anamnestických údajů (např. opakované obtíže při konzumaci dané

potravinou) podstoupili pacienti eliminační dietu s vyloučením podezřelé potraviny ze stravy. Následně byl proveden otevřený expoziční test, kterým byla potvrzena nebo vyloučena skutečná potravinová alergie na testovanou potravinu (66,101,150).



**Obrázek 7: Diagnostický postup potravinové alergie u pacientů s atopickou dermatitidou.**

Diagnostický postup vychází z návrhu Evropské akademie alergologie a klinické imunologie (EAACI a GA<sup>2</sup>LEN) (66). V rámci naší práce jsme stanovení sIgE protilátek proti molekulárním komponentám (ImmunoCAP ISAC) zařadili před diagnostickou eliminační dietu (zvýrazněno tučně).

#### 4.9 Diagnostická eliminační a diagnostická hypoalergenní dieta

U všech pacientů s mírnou formou AD byla při podezření na potravinovou alergii dle anamnestických údajů nebo dle výsledků laboratorního stanovení sIgE (ImmunoCAP ISAC test) doporučena eliminační dieta s vyloučením podezřelé potraviny ze stravy nejméně po dobu 14 dní.

Pacienti se středně těžkou a těžkou formou AD podstoupili diagnostickou hypoalergenní dietu obvykle v délce 4–6 týdnů. Ze stravy byly vyloučeny potraviny s výraznou alergenicitou jako je kravské mléko, pšeničná mouka, sója, vejce, stromové ořechy, arašídy a zároveň potraviny, na které vzniklo podezření dle výsledků anamnestických údajů a laboratorního stanovení sIgE (ImmunoCAP ISAC test). Dále byly ze stravy vyloučeny potraviny s histaminoliberačním účinkem (např.: sýry, ryby, uzené maso, kyselé zelí aj.), potraviny s barvivy, stabilizátory a konzervanty. Také byly vyloučeny ovoce a zelenina v syrové podobě, koření a potraviny obsahující přídavné látky, tzv. potravinová aditiva. Základ diety tvořila především rýže, kukuřice, brambory, maso (s výjimkou ryb a mořských plodů) a tepelně upravená zelenina (s výjimkou celeru, petržele a mrkve) a tepelně upravené ovoce. V rámci pitného režimu byly povoleny pouze pitná voda, minerální voda a černý čaj (48,147,151), **Příloha 8.2**.

V průběhu eliminační, event. diagnostické hypoalergenní diety si pacient zaznamenával intenzitu obtíží spojených s atopickou dermatitidou (pruritus, erytém, výsev nových ložisek aj.). Před zahájením a po ukončení eliminační i diagnostické hypoalergenní diety byla objektivně zhodnocena intenzita AD pomocí indexu SCORAD.

#### 4.10 Otevřený expoziční test

V případech, že u pacientů, kteří podstoupili eliminační či diagnostickou hypoalergenní dietu došlo ke zlepšení projevů atopické dermatitidy, byl proveden vlastní expoziční test s podezřelou potravinou (např. ryby a korýši, stromové ořechy, arašídy, jablko, broskev, celer).

Před provedením expozičního testu byly vysazeny léky, které by mohly ovlivnit výsledky vyšetření, a to antihistaminika alespoň pět dní, další lokální ošetření kůže zůstalo bez omezení. Pokud pacient v minulosti neprodělal akutní systémovou anafylaktickou reakci a testovaná potravina byla součástí běžné stravy, byl test proveden v domácím prostředí. Pacienti s těžší formou bronchiálního astmatu a/nebo po prodělané systémové alergické reakci byli přijati ke krátkodobé hospitalizaci pro provedení OET s podezřelou potravinou. Pacientům, kteří anamnesticky uvedli časnou alergickou reakci po požití

arašídů, ryb nebo stromových ořechů nebyl kvůli riziku anafylaktické reakce proveden OET.

Vlastní provedení OET následovalo po podstoupení diety uvedené výše, a to v období bez příznaků nebo s ohledem na průběh onemocnění AD (např.: u pacientů s pylovou alergií nebyl test prováděn v pylové sezóně). Každý test byl proveden dle obecného schématu, a to se třemi dávkami testované potraviny v průběhu dvou dnů. Jedna dávka potraviny byla podávána v dílčích podílech v 10minutových intervalech po dobu jedné hodiny.

Výsledky expozičního testu byly hodnoceny jako pozitivní, pokud byla zaznamenána jedna nebo více z následujících objektivních a subjektivních klinických reakcí: kožní (exantém, urtikárie, angioedém, pruritus, zhoršení atopické dermatitidy), gastrointestinální (OAS, nauzea, bolest břicha, průjem) a respirační (nosní kongesce, dechové obtíže). Časné reakce byly definovány jako klinické příznaky, které se vyskytly do 2 hodin po požití potravy, pozdní reakce byly patrné minimálně po 6 hodinách. V případě, že v průběhu expozičního testu bylo zaznamenáno zhoršení AD nebo jiné klinické reakce, pacient pokračoval v eliminaci podezřelé potraviny a následně byla závažnost AD hodnocena každé 3 měsíce během 1 roku s vyloučením potraviny. Pokud byl expoziční test negativní, pacient mohl zavést tuto potravinu zpět do jídelníčku a závažnost AD byla v průběhu konzumace tolerované potraviny hodnocena každé 3 měsíce v průběhu 1 roku. V případě podezření na potravinovou alergii na více než jednu potravinu, byl další OET proveden za 2–3 týdny po prvním OET (148).

#### 4.11 Statistické hodnocení

Výsledky vyšetření sIgE proti 112 molekulárním komponentám (ImmunoCAP ISAC® sIgE 112) a klinické údaje s výsledky otevřeného expozičního testu byly zpracovány do tabulek. Získaná data byla statisticky zpracována ve spolupráci s Ing. Josefem Bukačem a RNDr. Evou Čermákovou (Ústav lékařské biofyziky, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové) a prof. RNDr. Hanou Skalskou, CSc. (Katedra informatiky a kvantitativních metod, Univerzita Hradec Králové, Fakulta informatiky a managementu).

#### **Analýza senzibilizace na molekulární komponenty stanovené ImmunoCAP ISAC**

Pro zhodnocení vztahu mezi hladinou sIgE a závažností atopické dermatitidy a/nebo výskytem bronchiálního astmatu a/nebo výskytem alergické rýmy byl použit test nezávislosti chí-kvadrát. Jedním faktorem byl počet negativních a pozitivních reakcí (nízká, střední a vysoká pozitivita hladiny sIgE proti molekulárním komponentám), druhým faktorem byla závažnost atopické dermatitidy (mírná, středně těžká a těžká forma AD). Hladina významnosti byla 5 %. Zároveň byl takto hodnocen vztah mezi počtem pozitivních reakcí (nízká, střední, vysoká pozitivita) a výskytem bronchiálního astmatu, a/nebo alergické rýmy. Data byla zpracována v softwaru Microsoft Excel 2007.

Ve sledovaném souboru pacientů s atopickou dermatidou byla vypočítána relativní četnost (frekvence) výskytu senzibilizace na jednotlivé molekulární komponenty. Četnost je udávána v procentech a je počítána buď z celkového počtu pacientů s AD, anebo z příslušné podskupiny pacientů. Statistickou analýzou bylo zhodnoceno, zda výskyt senzibilizace na molekulární komponenty souvisí se závažností atopické dermatitidy nebo s výskytem bronchiálního astmatu a alergické rýmy. Sledované parametry byly vloženy do kontingenčních tabulek a vyhodnoceny testem nezávislosti chí-kvadrát s hladinou významnosti 5 %. Zároveň bylo v těchto podskupinách pacientů hodnoceno pořadí molekulárních komponent, zdali patří do množiny alergenů s nejvyšší pravděpodobností pozitivního výsledku sIgE či nikoli. Naměřené výsledky sIgE byly zpracovány unikátní statistickou analýzou dle práce Worsleyho (152) založenou rovněž na testu nezávislosti chí-kvadrát s hladinou významnosti 5 %. Četnost senzibilizace na molekulární komponenty vlašského a lískového ořechu, jablka, broskve, celeru a arašídů byla graficky znázorněna pomocí Vennových diagramů. Data byla zpracována v softwaru Microsoft Excel 2007.



## **Zhodnocení výsledků sIgE (ImmunoCAP ISAC) pomocí klastrové analýzy**

Výsledky sIgE protilátek stanovené testem ImmunoCAP ISAC byly statisticky zpracovány pomocí klastrové analýzy (Cluster Analysis, shluková analýza). Pro výpočet byl použit statistický software NCSS 2019 Statistical Software (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA). Naměřené hodnoty sIgE (ISU-E) byly převedeny do čtyř kategorií (0-3), tzn.  $0 = <0,3$  ISU-E;  $1 = 0,3 > 0,9$  ISU-E;  $2 = 0,9 > 15$  ISU-E;  $3 = \geq 15$  ISU-E. Tato data byla zpracována pro různé počty klastrů (např. pro počet 3, 6, 8, 10 klastrů a další) metodou „Clustering by Medoid Partitioning“ a postupem „Kaufman-Rousseeuw“ s těmito parametry: objektivní funkce: silueta, typ vzdálenosti: euklidovský, typ stupnice: směrodatná odchylka, molekulární komponenty: ordinální proměnné (153).

Cílem klastrové analýzy je rozdělení souboru objektů (v našem případě 112 molekulárních komponent zastoupených na biočipu ISAC) do dvou a více klastrů (shluků) tak, aby molekulární komponenty v rámci jednoho klastru byly podobné (blízké) a molekulární komponenty z různých klastrů byly odlišné (vzdálené). Tato analýza vytváří matematický model rozdělení dat do klastrů dle semi-kvantitativních hodnot sIgE. V rámci analýzy však nejsou zohledněny chemické a biologické charakteristiky jednotlivých molekulárních komponent.

**Interpretace siluet:** Zda objekt (molekulární komponenta) patří do příslušného klastru nebo ne, lze vyjádřit hodnotou tzv. siluety (Silhouette Value). Silueta je vypočítána dle matematického vzorce pro každý objekt a nabývá hodnot od mínus jedné do jedné. Hodnota siluety udává, jak dobře byl objekt klasifikován do příslušného klastru a do jaké míry je odlišný (vzdálený) od nejbližšího sousedního klastru. Když je hodnota siluety blízká číslu jedna, tak je objekt klasifikován dobře. Pokud klaster obsahuje pouze jeden objekt, je mu přiřazena hodnota nula. Je-li hodnota siluety blízká záporné hodnotě jedna, objekt je klasifikován špatně (tzn. je blíže sousednímu klastru než tomu, do kterého byl přiřazen). Zároveň je pro každý klaster udáván průměr siluet (Cluster Average) (153).

**Stanovení počtu klastrů:** Jedna z možností, jak vybrat vhodný počet klastrů v analyzovaném souboru dat, je zvolit takový počet klastrů, které mají nejvyšší průměrnou hodnotu siluety vypočítanou ze všech klastrů. Tato hodnota se označuje *SC* (Silhouette value – Cluster average, Overall Average) a lze ji matematicky interpretovat dle tabulky, kterou navrhli Kaufman a Rousseeuw (153,154), viz **Tabulka 4**.

**Tabulka 4 Klastrová analýza – navrhovaná interpretace siluet dle Kaufmana a Rousseeuw**

<b>SC</b> (Silhouette value – Cluster average)	<b>Interpretace</b>
0,71 – 1,00	nalezena silná struktura
0,51 – 0,70	nalezena přiměřená struktura
0,26 – 0,50	struktura je slabá a může být uměle vytvořená
-1 – 0,25	nebyla nalezena žádná podstatná struktura

### **Zhodnocení senzitivity vybraných potravinových komponent (ImmunoCAP SAC)**

Senzitivita testu ImmunoCAP ISAC byla hodnocena pro molekulární komponenty ryb a koryšů. Klinická reakce po požití ryb byla potvrzena na základě anamnestických údajů nebo výsledku OET. Senzitivita byla vypočítána jako podíl pozitivních výsledků sIgE u pacientů s potvrzenou klinickou reakcí.

## 5 Výsledky

Výsledky této studie jsou koncipovány jako soubor komentovaných publikací.

Disertační práce zahrnuje celkem 12 prací, které úzce souvisí s jejím tématem. Jedná se o 11 původních prací a 1 přehledový článek. Celkem 9 původních prací bylo publikováno v impaktovaném časopise *Food and Agricultural Immunology* a 1 původní prvoautorská práce v časopise *Acta Medica*. Další 2 prvoautorské práce, původní a přehledová, byly publikovány v časopise *Česko-slovenská dermatologie*.

Náplní publikovaných prací je zhodnocení přínosu laboratorního stanovení specifických IgE protilátek pomocí multiplexního systému ImmunoCAP ISAC® sIgE 112 u dospívajících a dospělých pacientů s atopickou dermatitidou. Dalším cílem je vyhodnocení vztahu senzibilizace na molekulární komponenty k výskytu dalších alergických onemocnění a vyhodnocení významu inhalačních a potravinových molekulárních komponent ve vztahu k závažnosti atopické dermatitidy.

Prvotní výsledky byly publikovány na souboru 60 pacientů. Postupně byly výsledky zpracovány s větším počtem pacientů.

Kvůli rozsáhlému obsahu publikovaných článků jsou v přílohách uvedeny plné texty pouze 4 hlavních publikací souvisejících s cíli této práce (Práce č. IX – XII). Zbývající publikace jsou zmíněny formou stručných komentářů (Práce č. I – VIII).

## Komentáře výsledků prací

### 5.1 Práce č. I

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. Sensitisation to molecular allergens of *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* in atopic dermatitis patients. *Food Agric Immunol.* 2019;30(1):1097-1111.

V této práci jsme hodnotili senzibilizaci na inhalační alergeny plísni rodu *Alternaria* (rAlt a 1, rAl a 6), *Cladosporium* (rCla h 8) a *Aspergillus* (rAsp f 1, rAsp f 3 a rAsp f 6) u pacientů s atopickou dermatitidou. Zároveň jsme hodnotili vztah mezi výskytem senzibilizace na komponenty plísni a výskytem senzibilizací na další potravinové nebo inhalační molekulární komponenty. Celkem bylo vyšetřeno 60 pacientů s atopickou dermatitidou (průměrný věk 41,4 roku).

**Závěr:** Senzibilizace na testované komponenty plísni byla zaznamenána u 58 % pacientů s atopickou dermatitidou. Při zhodnocení reakcí na jednotlivé komponenty plísni byla zjištěna významná závislost mezi senzibilizací na komponenty plísni a výskytem reakcí na některé potravinové a inhalační komponenty jako je arašíd, vlašský ořech, lískový ořech, jablko, kiwi, broskev, celer, treska, krevety, bojínek, platan, kryptomerie, pelyněk, myš, kočka a kůň.

### 5.2 Práce č. II a III

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. Sensitisation to molecular components in patients with atopic dermatitis, relation to asthma bronchiale and allergic rhinitis. *Food Agric Immunol.* 2020;31(1):600–629.

Citace: Vaňková R, Čelakovská J, Bukač J, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. Využití multiplexového systému ImmunoCAP ISAC k určení senzibilizace na molekulární komponenty související se závažností atopické dermatitidy. *Česko-Slovenská Dermatologie.* 2020;95(5):166–79.

V obou publikacích jsme se zabývali senzibilizací na inhalační a potravinové molekulární komponenty u 81 pacientů s atopickou dermatitidou (průměrný věk 41,7 roku). Hodnotili jsme nejčastěji zastoupené molekulární komponenty u mírné, středně těžké a těžké formy atopické dermatitidy a posuzovali jsme, zda existuje závislost mezi

závažností atopické dermatitidy a výskytem senzibilizace na inhalační a potravinové komponenty. Dále jsme hodnotili, zda četnost senzibilizace na molekulární komponenty souvisí s výskytem bronchiálního astmatu nebo alergické rýmy.

**Závěr:** Byl potvrzen vztah mezi závažností atopické dermatitidy a hladinou sIgE protilátek proti molekulárním komponentám ( $p$ -hodnota  $<0,001$ ). Statisticky významný vztah byl také potvrzen v hladinách sIgE protilátek ( $p$ -hodnota  $<0,001$ ) mezi pacienty s bronchiálním astmatem a bez bronchiálního astmatu. Naopak významný rozdíl v hladině sIgE mezi pacienty s alergickou rýmou a bez alergické rýmy prokázán nebyl ( $p$ -hodnota = 0,099). Z analýzy dle Worsleyho (152) vyplývá, že pořadí četnostní zastoupení molekulárních komponent dle závažnosti AD a/nebo přítomnosti AB a AR vzhledem k velikosti sledovaného souboru se statisticky významně nelišilo. Významnou roli v alergickém pochodu by mohly mít následující komponenty, které se významně častěji vyskytovaly současně u pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy, bronchiálním astmatem a alergickou rýmou. Jedná se o zvířecí alergeny rFel d 1 a rFel d 4 (kočka), rCan f 1 a rCan f 5 (pes), rEqu c 1 (kůň) a rAlt a 6 (*Alternaria*).

### 5.3 Práce č. IV

**Citace:** Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krcmova I, Krejsek J, Andrýs C. ISAC multiplex testing – results of examination in 100 patients suffering from atopic dermatitis. *Food Agric Immunol.* 2020;31(1):1014–35.

V této práci jsme pomocí analýzy dle Worsleyho (152) hodnotili, které molekulární komponenty patří do množiny alergenů s nejvyšší pravděpodobností pozitivního výsledku ve skupině pacientů s atopickou dermatitidou a v podskupinách pacientů s alergickou rýmou nebo bronchiálním astmatem. Zároveň jsme posuzovali, zda existují rozdíly v senzibilizaci u mírné, středně těžké a těžké formy AD a u pacientů trpících astmatem bronchiale nebo alergickou rýmou. Celkem jsme vyšetřili 100 pacientů s atopickou dermatitidou (průměrný věk 40,9 roku).

**Závěr:** Nejčastěji byla zaznamenána senzibilizace na pyly trav a stromů v podobě hlavního alergenu bojínku rPhl p 1 (beta-expansin) a hlavního alergenu břízy rBet v 1 (PR-10 protein). Časté byly také senzibilizace na potraviny rostlinného původu (PR-10 proteiny), roztoče (NPC2 rodina) a zvířecí alergeny (uteroglobiny, lipokaliny). Pořadí četnosti výskytu molekulárních komponent u mírné formy AD nebylo statisticky

významné. Naopak u pacientů se středně těžkou a těžkou formou AD a u podskupiny pacientů s alergickou rýmou byla nalezena množina komponent s vyšší pravděpodobností pozitivního výsledku, avšak jejich přesné pořadí nebylo možné určit. Na základě našich výsledků u pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy doporučujeme při diagnostickém postupu zaměřit se na inhalační alergeny pylu trav, stromů, zvířecí alergeny a roztoče.

#### 5.4 Práce č. V

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krejsek J, Andrýs C. The relation between the sensitization to molecular components of inhalant allergens and food reactions in patients suffering from atopic dermatitis. *Food Agric Immunol.* 2021;32(1):33–53.

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krejsek J, Andrýs C. Correction to: The relation between the sensitization to molecular components of inhalant allergens and food reactions in patients suffering from atopic dermatitis. *Food Agric Immunol.* 2021;32(1):121–5.

Hodnotili jsme vztah mezi senzibilizací na inhalační molekulární komponenty pylu trav, stromů a plísní a výskytem klinických reakcí po požití ořechů, arašídů, sóji, pšeničné mouky, celeru, jablka, broskve a kiwi u pacientů s atopickou dermatitidou. Dále jsme určovali kombinaci molekulárních komponent s vysokou hladinou sIgE, které by mohly být asociovány s atopickou dermatitidou. Vyšetřili jsme 100 pacientů s atopickou dermatitidou (průměrný věk 40,9 roku).

**Závěr:** Celkem u 64,3 % pacientů s AD jsme zaznamenali pozitivní výsledky u jedné nebo více z jednadvaceti komponent s velmi vysokou hladinou sIgE (>15 ISU-E). Jednalo se o komponenty nDer f 1 a rDer f 2 (cysteinová proteáza), nDer p 1 a rDer p 2 (NPC2 rodina), rAlt a 1 (*Alternaria*), rBet v 1, rMal d 1, rAln g 1, rCor a 1.0401 (PR-10 protein), rCan f 1, rFel d 4, nMus m 1, rEqu c 1 (lipokaliny), rFel d 1 (uteroglobin), rCan f 5 (prostatický kallikrein) a rPhl p 1, rPhl p2, nPhl p 4, rPhl p 5, rPhl p 6 a nCyn d 1. Významně vyšší výskyt senzibilizace na některou z molekulárních komponent rAln g 1, rBet v 1, rPhl p 1, rPhl p2, nPhl p 4, rPhl p 5, rPhl p 6, rPhl p 11 byl potvrzen u pacientů trpících reakcemi na arašídů, lískové ořechy, vlašské ořechy, celer, jablko a broskev.

## 5.5 Práce č. VI

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krejsek J, Andrýs C. Peanuts allergy in atopic dermatitis patients, analysis of sensitization to molecular components. Food Agric Immunol. 2021;32(1):221–36.

V této práci jsme hodnotili výskyt potravinové alergie na arašidy ve vztahu k senzibilizaci na komponenty arašídů u pacientů s atopickou dermatitidou. Zároveň jsme hodnotili vztah mezi výskytem klinických reakcí po požití arašídů a mezi senzibilizací na inhalační molekulární komponenty pylu trav, stromů a plísní u pacientů s atopickou dermatitidou. Senzibilizaci na molekulární komponenty arašídů jsme graficky znázornili pomocí Vennova diagramu. Vyšetřili jsme 100 pacientů s atopickou dermatitidou (průměrný věk 40,9 roku).

**Závěr:** Alergie na arašidy byla potvrzena u 27 % pacientů s atopickou dermatitidou. U většiny pacientů byly klinické obtíže spojovány s alergenem rAra h 8 ze skupiny PR-10 proteinů, u menší části pacientů byly zaznamenány klinické obtíže vyvolané rAra h 9 z rodiny nsLTP a zásobními proteiny arašídů rAra h 1, rAra h 2, rAra h 3 a rAra h 6. Byl potvrzen výrazně vyšší výskyt senzibilizace na komponenty pylu stromů (rAln g 1, rBet v 1) a komponenty pylu bojínku (rPhl p 1, rPhl p 2, nPhl p 4, rPhl p 5, rPhl p 6, rPhl p 7) u pacientů s klinickou reakcí po požití arašídů.

## 5.6 Práce č. VII

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krejsek J, Andrýs C. Food allergy to apple, peach and celery in atopic dermatitis patients, analysis of sensitisation to molecular components. Food Agric Immunol. 2021;32(1):184–203.

V této práci jsme hodnotili výskyt alergie na jablko, broskev a celer u pacientů s atopickou dermatitidou. Četnost senzibilizace na molekulární komponenty jablka, broskve a celeru jsme graficky znázornili pomocí Vennových diagramů.

**Závěr:** Alergie na jablko byla prokázána u 15,9 %, na broskev u 15,1 % a na celer u 5,3 % pacientů s atopickou dermatitidou. U jedinců, kteří byli senzibilizováni alergenem Bet v 1, jsme zaznamenali potravinovou alergii na jablko, broskev a celer u 42,2 % a senzibilizaci na komponenty jablka, broskve a celeru jsme prokázali u 48,4 %. Většina pacientů s klinickou reakcí na jablko, broskev nebo celer trpěla lokálními projevy

alergického zánětu ve formě orálního alergického syndromu. Pruritus popisovala více než polovina pacientů. Urtikarie a zažívací obtíže byly méně časté a pouze ve vzácných případech byly zaznamenány dechové obtíže.

### 5.7 Práce č. VIII

Citace: Vaňková R, Čelakovská J, Krejsek J, Krčmová I, Andrýs C. Molekulárně definované alergeny a jejich využití v diagnostice alergického zánětu (atopické dermatitidy). Čes-slov Derm. 2020;95(4):127–140.

Použití molekulárně definovaných alergenů je dalším krokem ke zpřesnění diagnózy, určení příčinných alergenů pro alergenovou imunoterapii a predikci závažných reakcí. Lze také odlišit reakci na druhově specifické alergeny od zkříženě reagujících. Cílem přehledového článku bylo informovat o možnostech laboratorní diagnostiky molekulárních alergenů u atopické dermatitidy.

### 5.8 Práce č. IX

Citace: Vaňková R, Čelakovská J, Bukač J, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. Sensitization to Molecular Components in 104 Atopic Dermatitis Patients in Relation to Subgroups of Patients Suffering from Bronchial Asthma and Allergic Rhinitis. Acta Medica (Hradec Kral Czech Republic). 2020;63(4):164–75.

Plný text příspěvku je uveden v **příloze 8.3**.

Cílem tohoto příspěvku bylo zhodnocení senzibilizace na inhalační a potravinové molekulární komponenty v celém souboru 104 pacientů s atopickou dermatitidou (průměrný věk 40,1 roku). Hodnotili jsme, které molekulární komponenty jsou nejčastěji zastoupené u pacientů s AD. Posuzovali jsme, zda se liší senzibilizační profily u mírné, středně těžké a těžké formy AD a jestli je senzibilizace ovlivněna přítomností bronchiálního astmatu nebo alergické rýmy.

Při porovnání četnosti výskytu pozitivních reakcí na molekulární komponenty u pacientů s mírnou, středně těžkou a těžkou formou AD byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $p$ -hodnota  $<0,05$ ). Uvedené molekulární komponenty s vysokou četností výskytu byly potvrzeny významně častěji u pacientů s těžkou formou AD. Jedná se



o hlavní inhalační alergeny bojínku (rPhl p 1), roztočů (rDer f 2 a rDer p 2), kočky (rFel d 1, rFel d 4), psa (rCan f 1, rCan f 5), koně (rEqu c 1), myši (nMus m 1), celeru (rApi g 1) a také o vedlejší alergeny plísni rodu *Alternaria* (rAlt v 6) a *Aspergillus* (rAsp f 6) a alergen krevet (nPen m 2).

Následně bylo zvlášť provedeno porovnání četnosti výskytu pozitivních reakcí na molekulární komponenty v souboru pacientů s bronchiálním astmatem a s alergickou rýmou. U pacientů trpících atopickou dermatitidou a zároveň bronchiálním astmatem byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $p$ -hodnota  $<0,05$ ) v zastoupení senzibilizací na komponenty bojínku (rPhl p 2), olivovníku (rOle e 9), plísni rodu *Alternaria* (rAlt a 6) a jedu vosy (rVes v 5). U pacientů trpících atopickou dermatitidou a zároveň alergickou rýmou byl také prokázán statisticky významný rozdíl ( $p$ -hodnota  $<0,05$ ). Významně častěji byly zastoupeny senzibilizace na inhalační a potravinové alergeny z rodiny PR-10 proteinů, konkrétně alergeny břízy (rBet v 1), lísky (rCor a 1.0101), jablka (rMal d 1), broskve (rPru p 1), celeru (rApi g 1). Zároveň byly zaznamenány významně častěji senzibilizace na inhalační alergeny pylů trav troskutu (nCyn d 1), bojínku (rPhl p 5, rPhl p 6), roztočů (rDer f 2) a zvířecí alergeny kočky (rFel d 4), psa (rCan f 1), koně (rEqu c 1) a myši (nMus m 1).

**Závěr:** Stejně jako u skupiny s menším počtem AD pacientů byla nejčastěji zaznamenána senzibilizace na hlavní alergen bojínku rPhl p 1 (beta-expansin) a hlavní alergen břízy rBet v 1 (PR-10 protein). Opakovaně byla potvrzena možná souvislost mezi senzibilizací na některé alergenní komponenty a závažností atopické dermatitidy. Jednalo se především o hlavní alergeny roztočů (rDer f 2, rDer p 2), domácích zvířat (rFel d 1, rFel d 4, rCan f 1, rCan F 5, rEqu c 1, nMus m 1) a plísni rodu *Alternaria* (rAlt v 6) a *Aspergillus* (rAsp f 6). V tomto směru doporučujeme zaměřit vyšetření specifických IgE na tyto alergeny v rámci klinických postupů a léčby pacientů s AD se zvláštním ohledem na riziko vzniku závažných reakcí.

## 5.9 Práce č. X

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Cermakova E, Krcmova I, Krejsek J, Andrýs C. Cluster analysis of molecular components in 100 patients suffering from atopic dermatitis according to the ISAC Multiplex testing. Food Agric Immunol. 2020;31(1): 810–831.

Celý text příspěvku je uveden v **příloze 8.4**.

Výsledky testu ImmunoCAP ISAC jsme zhodnotili pomocí klastrové analýzy. Posuzovali jsme, zda je senzibilizace na molekulární komponenty asociována s klasifikací alergenů do příslušných proteinových rodin na základě jejich molekulárních a biochemických vlastností. Klastrová analýza zahrnuje různé metody a algoritmy pro seskupování podobných objektů do příslušných kategorií. Pro klasifikaci objektů (molekulárních komponent) do příslušných klastrů jsme využili algoritmu, kdy je každý objekt charakterizován hodnotou tzv. siluety, která vyjadřuje vzdálenost jednoho objektu od ostatních (komponent). Na základě matematické interpretace hodnot siluet dle „Kaufmana a Rousseeuw“ a zohlednění chemických a biologických charakteristik jednotlivých molekulárních komponent byla vybrána analýza s počtem 10 klastrů. Report statistické analýzy pro 10 klastrů je součástí plného textu publikace.

**Závěr:** Dle výsledků klastrové analýzy mají v souboru AD pacientů jedinečné postavení komponenty bojínku rPhl p 1 (beta-expansin) a nPhl p 4 (Berberine bridge enzyme), břízy rBet v 1 (PR-10 protein) a spory plísně rodu *Alternaria* rAlt a 1. Tyto komponenty byly zaznamenány samostatně a nevyskytovaly se v dalších klastrech. Uspořádání dalších molekulárních komponent do příslušných klastrů potvrzuje úzkou chemickou a biologickou podobnost (homologii) v rámci proteinových rodin. Do samostatného klastru byly například zařazeny molekulární komponenty potravin rostlinného původu, které vykazují vysokou homologii v rámci Bet v 1 homologních proteinů. Samostatný klaster byl také identifikován pro komponenty bojínku. Zároveň byly nalezeny klastry s molekulárními komponentami patřícími do proteinových rodin, jako jsou cysteinové proteázy a rodina NPC2, lipokalinů, uteroglobinů a tropomyosinů.

## 5.10 Práce č. XI

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krejsek J, Andrýs C, Krcmova I. Food allergy to shrimps and fish in patients suffering from atopic dermatitis, the results of ISAC Multiplex examination. Food Agric Immunol. 2020;31(1):1061–78.

Celý text příspěvku je uveden v **příloze 8.5**.

Hodnotili jsme výskyt senzibilizace na komponenty ryb a korýšů u pacientů s atopickou dermatitidou. Posuzovali jsme vztah mezi výskytem hypersenzitivních reakcí

na ryby a korýše a mezi výskytem senzibilizace na plísňě, roztoče a šváby u pacientů s atopickou dermatitidou. Hypersenzitivní reakce na ryby a korýše byla potvrzena na základě výsledků otevřeného expozičního testu nebo na základě anamnestických údajů. Zároveň jsme hodnotili senzitivitu stanovení sIgE protilátek proti komponentám ryb a korýšů stanovených metodou ImmunoCAP ISAC. Výsledky byly zpracovány ve skupině 100 pacientů s atopickou dermatitidou (průměrný věk 40,9 roku). Alergie na ryby byla diagnostikována u 13 % pacientů a alergie na korýše pouze u 6 % pacientů s atopickou dermatitidou. Exacerbaci kožních lézí popisovali 4 % pacientů s alergií na ryby a 2 % pacientů s alergií na korýše.

**Závěr:** Senzitivita byla vyhodnocena pro komponentu ryb rGad c 1 (46,2 %) a pro komponenty koryšů nPen m 1 (33,3 %) a nPen m 2 (50,0 %). U pacientů s alergií na ryby a zároveň na korýše byl zaznamenán signifikantně vyšší výskyt senzibilizace na plísňě rodu *Alternaria* (rAlt a 6) a *Aspergillus* (rAsp f 6). U pacientů s alergií na ryby byl potvrzen vyšší výskyt senzibilizace na komponenty roztočů (nDer f 1, rDer f 2, nDer p 1, rDer p 2, rLep d 2, rBlo t 5) a plísni (rAlt a 6, rAsp f 1, rAsp f 6). U pacientů s alergií na korýše byl patrný vyšší výskyt senzibilizace na alergeny plísni (rAlt a 6, rAsp f 6, rCla h 8) a švába (r Bla g 1, nBla g 5). Významnou asociaci mezi alergií na korýše a senzibilizací na tropomyosin roztočů rDer p 10 jsme u pacientů s atopickou dermatitidou neprokázali. Při diagnostice pacientů s alergickou reakcí na ryby či korýše je důležité brát v úvahu, že tyto reakce mohou být způsobeny konzumací kontaminovaného jídla parazitickým helmintem *Anisakis simplex* (sled'ový červ). Významnou asociaci s tímto helmintem a alergií na ryby a korýše jsme však neprokázali.

## 5.11 Práce č. XII

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Salavec M, Krejsek J, Andrýs C. Allergy to walnuts and hazelnuts in atopic dermatitis patients and analysis of sensitization to molecular components. *Food Agric Immunol.* 2021;32(1):105–20.

Celý text příspěvku je uveden v **příloze 8.6.**

V této práci jsme hodnotili výskyt potravinové alergie na vlašské a lískové ořechy u pacientů s atopickou dermatitidou. Četnost senzibilizace na molekulární komponenty

vlašského a lískového ořechu jsme graficky znázornili pomocí Vennových diagramů. Celkem jsme vyšetřili 100 pacientů s atopickou dermatitidou (průměrný věk 40,9 roku).

**Závěr:** Potravinová alergie na lískový ořech byla potvrzena u 25 % pacientů s atopickou dermatitidou. Tito pacienti byli alergičtí především na rCor a 1.0401 z rodiny PR-10 proteinů, méně na rCor a 8 (nsLTP) a zásobní protein nCor a 9 (11S globulin). Potravinová alergie na vlašský ořech byla potvrzena u 14 % pacientů s atopickou dermatitidou. Alergie na zásobní proteiny nJug r 2 a rJug r 1 byla patrná u 8 % pacientů a na zkříženě reagující alergen nJug r 3 (nsLTP) u 6 % pacientů.

U pacientů s alergií na lískový ořech byly v případě positivity sIgE proti rCor a 1.0401 (PR-10 protein) zaznamenány mírné klinické obtíže v podobě orálního alergického syndromu, pruritu a zhoršení AD. Při pozitivitě sIgE proti rCor a 8 (nsLTP) byly také patrné projevy orálního alergického syndromu, pruritus, zhoršení AD a navíc zažívací obtíže.

U pacientů s alergií na vlašský ořech byly v případě positivity sIgE proti zásobním proteinům nJug r 2 (7S globulin) a rJug r 1 (2S albumin) patrné projevy pruritu, zažívací obtíže a zhoršení AD. U pacientů s pozitivitou sIgE proti nJug r 3 (nsLTP) byly popisovány projevy orálního alergického syndromu, pruritu a zhoršení AD.

### **Výsledky vyšetření sIgE protilátek pomocí multiplexní analýzy ALEX**

V průběhu studie jsme měli příležitost rozšířit naše zkušenosti v oblasti CRD diagnostiky o další analýzu, konkrétně o multiplexní systém ALEX<sup>2</sup><sup>®</sup>, který byl do laboratorní praxe uveden v průběhu roku 2019. Celkem jsme touto metodou vyšetřili 100 vzorků ze sledovaného souboru pacientů s AD. Prvotní výsledky byly již publikovány ve dvou sděleních. Postupně tyto práce plánujeme doplnit o další výsledky zpracované obdobnými statistickými postupy, jako v případě výsledků systému ImmunoCAP ISAC.

Citace: Celakovska J, Vankova R, Bukac J, Cermakova E, Andrys C, Krejsek J. Atopic Dermatitis and Sensitisation to Molecular Components of Alternaria, Cladosporium, Penicillium, Aspergillus, and Malassezia Results of Allergy Explorer ALEX 2. J Fungi. 2021;7(183):1–15.

V prvním příspěvku jsme se zaměřili na význam senzibilizace na molekulární komponenty plísní a kvasinek rodu *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* a *Malassezia* u pacientů s atopickou dermatitidou. Zároveň jsme posuzovali četnost senzibilizace ve vztahu k závažnosti atopické dermatitidy a přítomnosti bronchiálního astmatu nebo alergické rýmy.

**Závěr:** Senzibilizace na Mala s 6, Mala s 11, Sac c, Asp f 6, Cla h a Cla h 8 korelovala se závažností atopické dermatitidy. Senzibilizace na komponenty Sac c, Alt a 6, Cla h, Cla h 8 byla pozorována významně častěji u pacientů trpících bronchiálním astmatem. U pacientů s alergickou rýmou byla zaznamenána vyšší četnost senzibilizace na Mala s 6.

Citace: Čelakovská J, Bukač J, Cermáková E, Vaňková R, Skalská H, Krejsek J, et al. Analysis of Results of Specific IgE in 100 Atopic Dermatitis Patients with the Use of Multiplex Examination ALEX2—Allergy Explorer. Int J Mol Sci. 2021;22(10):1–32.

V druhé práci jsme se zabývali analýzou senzibilizace na molekulární a extraktové alergeny stanovené ALEX<sup>2</sup><sup>®</sup>. Byl prokázán vztah mezi hladinou specifického IgE a závažností AD a zároveň výskytem bronchiálního astmatu a alergické rýmy. Vysoká a velmi vysoká hladina specifického IgE proti 18 molekulárním komponentám byla prokázána u 75 % pacientů. Jednalo se o komponenty pylu stromů a potravin rostlinného původu odvozených z rodiny Bet v 1 homologních proteinů (Aln g 1 oše, Bet v 1 bříza, Cor a1.0103 pyl lísky, Cor a1.0401 lískový ořech, Fag s 1 buk). Dále byly zastoupeny komponenty Can f 1 (lipokalin, pes), Der f 2 a Der p 2 (NPC2 rodina, roztoč), Der p 23 (proteinová doména podobná peritrofinu, roztoč), Fel d 1 (uteroglobin, kočka), Alt a 1 (plíseň rodu *Alternaria*), Lol p 1 (beta-expansin, jílek) a Phl p 1 (beta-expansin, bojínek), Phl p 2 (expansin, bojínek), Phl p 5.0101 a Phl p 6, (trávy skupiny 5/6, bojínek) a extrakt z pylu lísky (Cor a pollen) a extrakt z žita (Sec c pollen). Senzibilizace na následující komponenty korelovala se závažností atopické dermatitidy. Jednalo se o komponenty skladových roztočů z NPC2 rodiny (Gly d 2, Lep d 2), lipokaliny (Can f 1, Can f 2, Can f 4 a Can f 6), arginin kinázu (Asp f 6, Bla g 9, Der p 20, Pen m 2), uteroglobin (Fel d 1, Ory c 3), Mn superoxid dismutázu (Mala s 11), PR-10 proteiny (Fag s 1, Mal d 1, Cor a 1.0401, Cor a 1.0103), komponenty proteinové domény podobné peritrofinu (Der p 21, Der p 23) a extrakt z žita (Sec c pollen). U podskupiny pacientů

s diagnostikovaným bronchiálním astmatem dominovala senzibilizace především na alergeny roztočů z NPC2 rodiny (Lep d 2, Der p 2, Der f 2), ze skupiny cysteinových proteáz (Der p 1) a z proteinové domény podobné peritrofinu (Der p 21, Der p 23). Neméně častá byla senzibilizace na Alt a 6 (enoláza, *Alternaria*) a Phl p 1 (beta-expansin, bojínek). Recentně identifikovaný hlavní alergen roztočů Der p 23, který je součástí této soupravy, je dle literatury asociován s bronchiálním astmatem a je považován za klinicky důležitý marker při diagnostice roztočové alergie a při indikaci specifické alergenové imunoterapie.

**Závěr:** Výsledky práce znázorňují detailní senzibilizační profil pacientů s atopickou dermatitidou a zároveň poukazují na důležitost epidermální bariéry, jejíž narušení vede ke zvýšenému prostupu alergenů do organismu. Naše výsledky by mohly být přínosné jak z hlediska režimových opatření, tak při indikaci specifické alergenové imunoterapie.

## 6 Závěr

Výsledky práce popisují detailní senzibilizační profil pacientů s atopickou dermatitidou a zároveň poukazují na důležitost epidermální bariéry, jejíž narušení vede ke zvýšenému prostupu alergenů do organismu.

Vyšetření specifických IgE protilátek multiplexní metodou ISAC by mohlo být přínosné u dospělých jedinců trpících těžkou formou atopické dermatitidy, kdy zásadní roli v senzibilizaci mohou hrát především hlavní alergeny pylů trav, stromů, roztočů, kočky, psa, koně a spory plísní. Dominující postavení roztočů by mohlo být klíčové pro rozvoj polysenzibilizace u těžkých forem AD. Současná data se však neshodují v tom, zda alergeny roztočů mají hlavní význam cestou přímého kontaktu s kůží pacienta nebo přes adhezi v dýchacích cestách. Je však zřejmé, že u pacientů s AD a alergií na roztoče hraje zásadní roli porucha kožní bariérové funkce.

Naopak u mírné formy AD se zdá přínosné se v klinické praxi spíše zaměřit na to, zda ekzémové projevy nesouvisí s alergií na hlavní alergeny pylu trav (bojínek) a stromů (bříza s bohatou zkříženou reaktivitou s potravinami rostlinného původu v rámci Bet v 1 homologie).

Významnou roli v alergickém pochodu by mohly mít komponenty, které se významně častěji vyskytovaly současně u pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy, bronchiálním astmatem a alergickou rýmou. Jedná se o alergeny zvířat a plísní rodu *Alternaria*.

Na základě analýzy přítomnosti sIgE protilátek reagujících s alergeny vybraných složek potravin (stromové ořechy, ryby, korýši, arašídy, jablka, celeru a broskve) jsme získali informace, které by mohly zpřesnit specifickou léčbu a být přínosné z hlediska režimových a eliminačních opatření.

## 7 Použitá literatura

1. Johansson S, Hourihane J, Bousquet J, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56(9):813–24.
2. Mu Z, Zhao Y, Liu X, Chang C, Zhang J. Molecular Biology of Atopic Dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014;47(2):193–218.
3. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: Progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2011;3(2):67–73.
4. Czarnowicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Novel concepts of prevention and treatment of atopic dermatitis through barrier and immune manipulations with implications for the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(6):1723–34.
5. Kowalska-Oleđzka E, Czarnecka M, Baran A. Epidemiology of atopic dermatitis in Europe. *J Drug Assess*. 2019;8(1):126–8.
6. Nutten S. Atopic dermatitis: Global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab*. 2015;66:8–16.
7. Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, Girolomoni G, Puig L, Simpson EL, et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2018;73(6):1284–93.
8. Kim J, Kim BE, Leung DYM. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy Asthma Proc*. 2019;40(2):84–92.
9. Roguedas-Contios A-M, Misery L. What is intrinsic atopic dermatitis? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011 Dec;41(3):233–6.
10. Brunner PM, Leung DYM, Guttman-Yassky E. Immunologic, microbial, and epithelial interactions in atopic dermatitis. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2018;120(1):34–41.
11. Lowe AJ, Leung DYM, Tang MLK, Su JC, Allen KJ. The skin as a target for prevention of the atopic march. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2018;120(2):145–51.
12. Kim BE, Leung DYM. Epidermal Barrier in Atopic Dermatitis. *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2012;4(1):12–6.
13. Wollina U. Microbiome in atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017;10:51–6.
14. Cookson WOCM, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, Cox HE, et al. Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet*. 2001;27(4):372–3.
15. Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(4):792–9.
16. Irvine AD, McLean WHI, Leung DYM. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2011;365(14):1315–27.
17. Fortugno P, Furio L, Teson M, Berretti M, El hachem M, Zambruno G, et al. The 420k LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease



- deregulation: Implications for atopic dermatitis. *Hum Mol Genet.* 2012;21(19):4187–200.
18. Nishio Y, Noguchi E, Shibasaki M, Kamioka M, Ichikawa E, Ichikawa K, et al. Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. *Genes Immun.* 2003;4(7):515–7.
  19. Mohamed HG, Abbas A, El-Kabarity RH, Diab HME. Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis. *Egypt J Immunol.* 2009;16(2):125—138.
  20. Oh D-Y, Schumann RR, Hamann L, Neumann K, Worm M, Heine G. Association of the toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis. *Allergy.* 2009 Nov;64(11):1608–15.
  21. Salpietro C, Rigoli L, Miraglia Del Giudice M, Cuppari C, Di Bella C, Salpietro A, et al. TLR2 and TLR4 gene polymorphisms and atopic dermatitis in Italian children: a multicenter study. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011 Oct;24(4 Suppl):33–40.
  22. Novak N, Yu C-F, Bussmann C, Maintz L, Peng W-M, Hart J, et al. Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy.* 2007 Jul;62(7):766–72.
  23. Macaluso F, Nothnagel M, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Bechara FG, Epplen JT, et al. Polymorphisms in NACHT-LRR (NLR) genes in atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2007 Aug;16(8):692–8.
  24. Bin L, Leung DYM. Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2016;12(1):1–14.
  25. Namkung J-H, Lee J-E, Kim E, Kim H-J, Seo E-Y, Jang H-Y, et al. Association of polymorphisms in genes encoding IL-4, IL-13 and their receptors with atopic dermatitis in a Korean population. *Exp Dermatol.* 2011 Nov;20(11):915–9.
  26. Oiso N, Fukai K, Ishii M. Interleukin 4 receptor alpha chain polymorphism Gln551Arg is associated with adult atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol.* 2000;142(5):1003—1006.
  27. Hoffjan S, Beygo J, Akkad DA, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Epplen JT. Analysis of variation in the IL7RA and IL2RA genes in atopic dermatitis. Vol. 55, *Journal of dermatological science.* Netherlands; 2009. p. 138–40.
  28. Gharagozlou M, Farhadi E, Khaledi M, Behniafard N, Sotoudeh S, Salari R, et al. Association between the interleukin 6 genotype at position -174 and atopic dermatitis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(2):89–93.
  29. Namkung J-H, Lee J-E, Kim E, Kim S, Kim S, Shin E-S, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-12 (IL-12A and B) and IL-12 receptor (IL-12Rbeta1 and beta2) genes and gene-gene interactions with atopic dermatitis in Koreans. *J Dermatol Sci.* 2010 Mar;57(3):199–206.
  30. Novak N, Kruse S, Potreck J, Maintz L, Jenneck C, Weidinger S, et al. Single nucleotide polymorphisms of the IL18 gene are associated with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Apr;115(4):828–33.
  31. Hong C-H, Yu H-S, Ko Y-C, Chang W-C, Chuang H-Y, Chen G-S, et al. Functional regulation of interleukin-31 production by its genetic polymorphism in patients with extrinsic atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2012 Jul;92(4):430–2.

32. Imai Y. Interleukin-33 in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2019;96(1):2–7.
33. Wen D, Du X, Qiao Y, Dong J-Z, Ma C-S. RANTES gene polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis and atopic dermatitis: a meta-analysis. *Int Rev Immunol*. 2015;34(6):500–8.
34. Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N, Sugiura H, Uehara M, Hopkin JM. Upregulating promoter polymorphisms of RANTES relate to atopic dermatitis. *Int J Immunogenet*. 2006 Dec;33(6):423–8.
35. Liang Y, Chang C, Lu Q. The Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis-Filaggrin and Other Polymorphisms. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016 Dec;51(3):315–28.
36. Yu B, Shao Y, Zhang J, Dong XL, Liu WL, Yang H, et al. Polymorphisms in human histamine receptor H4 gene are associated with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2010 May;162(5):1038–43.
37. Heine G, Hoefler N, Franke A, Nöthling U, Schumann RR, Hamann L, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults. *Br J Dermatol*. 2013 Apr;168(4):855–8.
38. Chen CC, Yang YH, Lin YT, Hsieh SL, Chiang B-L. Soluble decoy receptor 3: increased levels in atopic patients. Vol. 114, *The Journal of allergy and clinical immunology*. United States; 2004. p. 195–7.
39. Hussein YM, Alzahrani SS, Alharthi AA, Alhazmi AS, Ghonaim MM, Alghamdy AAN, et al. Gene polymorphism of interleukin-4, interleukin-4 receptor and STAT6 in children with atopic dermatitis in Taif, Saudi Arabia. *Immunol Invest*. 2016;45(3):223–34.
40. Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A. Linkage and association studies of STAT6 gene polymorphisms and allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;131(1):33–8.
41. Nedoszytko B, Reszka E, Gutowska-Owsiak D, Trzeciak M, Lange M, Jarczak J, et al. Genetic and epigenetic aspects of atopic dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6484):1–18.
42. Sonkoly E, Janson P, Majuri M-L, Savinko T, Fyhrquist N, Eidsmo L, et al. MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Sep;126(3):520–81.
43. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2018;454(7203):445–54.
44. Krejssek J, Andrýs C, Krčmová I. *Imunologie člověka*. In Hradec Králové: Garamon; 2016. p. 213–22.
45. Brunner PM, Guttman-Yassky E, Leung DYM. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):S65–76.
46. Císařová Z, Křupková I, Stolaříková A. Malassezia ve vztahu k atopické dermatitidě. *Alergie*. 2021;1:21–6.
47. Hanifin JM, Rajla G. Diagnostic features of atopic dermatitis. Vol. 92, *Acta*

- Dermatovener (Stockholm). 1980. p. 44–7.
48. Bělohávková S, Kopelentová E, Šetinová I, Liška M, Fuchs M. Doporučené postupy pro provádění expozičních testů s potravinami. *Alergie Suppl.* 2018;1:1–43.
  49. Chopra R, Vakharia PP, Simpson EL, Paller AS, Silverberg JI. Severity assessments used for inclusion criteria and baseline severity evaluation in atopic dermatitis clinical trials: a systematic review. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2017 Nov;31(11):1890–9.
  50. Oranje AP, Glazenburg EJ, Wolkerstorfer A, De Waard-Van Der Spek FB. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: The SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol.* 2007;157(4):645–8.
  51. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD Index (Consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis). *Dermatology.* 1993;186:23–31.
  52. Benáková N. Celková léčba atopické dermatitidy – evropské doporučené postupy a současný stav. *Česko-Slovenská Dermatologie.* 2019;94(6):223–32.
  53. Gelmetti C, Colonna. The value of SCORAD and beyond. Towards a standardized evaluation of severity? *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol Suppl.* 2004;59(78):61–5.
  54. Heinzerling L, Mari A, Bergmann KC, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, et al. The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy.* 2013;3(1):1–10.
  55. Röckmann H, Van Geel MJ, Knulst AC, Huiskes J, Bruijnzeel-Koomen CAFM, De Bruin-Weller MS. Food allergen sensitization pattern in adults in relation to severity of atopic dermatitis. *Clin Transl Allergy.* 2014;4(1):1–9.
  56. Fuchs M. Potravinová alergie a intolerance. 1st ed. Mladá Fronta; 2016. 448 p.
  57. Yu W, Freeland D m. H, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(12):751–65.
  58. Johansson SGO, 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;113(5):832–6.
  59. Valenta R, Hochwallner H, Linhart B, Pahr S. Food allergies: the basics. *Gastroenterology.* 2015 May;148(6):1120–31.
  60. Bělohávková S, Kopelentová E, Šetinová I, Víšek P, Novobilská J, Gvozdiaková T, et al. Registr potravinových alergií DAFALL – první výsledky. *Alergie.* 2015;2:80–9.
  61. Stapel SO, Asero R, Ballmer-Weber BK, Knol EF, Strobel S, Vieths S, et al. Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy.* 2008 Jul;63(7):793–6.
  62. Carr S, Chan E, Lavine E, Moote W. CSACI Position statement on the testing of food-specific IgG. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2012;8(1):1.
  63. Soares-Weiser K, Panesar SS, Rader T, Takwoingi Y, Werfel T, Muraro A, et al. The diagnosis of food allergy: protocol for a systematic review. *Clin Transl Allergy.* 2013;3(18):1–5.
  64. Beyer K, Teuber SS. Diagnostika potravinové alergie : vědecké i neověřené metody.

- Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2005;2:25–30.
65. Manea I, Ailenei E, Deleanu D. Overview of food allergy diagnosis. *Clujul Med.* 2016;89(1):5–10.
  66. Werfel T, Ballmer-Weber B, Eigenmann PA, Niggemann B, Rancé F, Turjanmaa K, et al. Eczematous reactions to food in atopic eczema: Position paper of the EAACI and GA2LEN. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2007;62(7):723–8.
  67. Šetinová I. Potravinová alergie a intolerance. *Vnitr Lek.* 2020;66(6):340–4.
  68. Wüthrich B. Food-induced cutaneous adverse reactions. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 1998;53(Suppl 46):131–5.
  69. Walsh J, O’Flynn N. Diagnosis and assessment of food allergy in children and young people in primary care and community settings: NICE clinical guideline. *Br J Gen Pract.* 2011;61(588):473–5.
  70. McGowan EC, Saini S. Update on the performance and application of basophil activation tests. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13(1):101–9.
  71. Koh GCH, Shek LPC, Goh DYT, Van Bever H, Koh DSQ. Eosinophil cationic protein: Is it useful in asthma? A systematic review. *Respir Med.* 2007;101(4):696–705.
  72. Petrů doc. Anafylaxe u dětí - praktické doporučení. *Pediatr pro praxi.* 2015;16(4):224–6.
  73. Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006 Aug;26(3):451–63.
  74. Graham F, Bégin P, Paradis L, Lacombe-Barrios J, Paradis J, Des Roches A. Comparison of ImmunoCAP and Immulite serum specific IgE assays for the assessment of egg allergy. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2016;12(29):1–3.
  75. Lokas SB, Plavec D, Piškovic JR, Živkovic J, Nogalo B, Turkalj M. Allergen-Specific IgE Measurement: Intermethod Comparison of Two Assay Systems in Diagnosing Clinical Allergy. *J Clin Lab Anal.* 2017;31:1–9.
  76. Mothes-Luksch N, Jordakieva G, Hinterhölzl L, Jensen AN, Hallmann PK, Kundi M, et al. Allergy diagnosis from symptoms to molecules, or from molecules to symptoms: A comparative clinical study. *World Allergy Organ J.* 2018;22(1):1–11.
  77. van Hage M, Hamsten C, Valenta R. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(4):974–7.
  78. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007;17 Suppl 1:36–40.
  79. Choi J, Roh J, Lee J. Clinical Availability of Component-Resolved Diagnosis Using Microarray Technology in Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2014;26(4):437–46.
  80. Vachová M, Panzner P, Vlas T, Vítovcová P. Analysis of Sensitization Profiles in Central European Allergy Patients Focused on Animal Allergen Molecules. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(4):278–84.
  81. Panzner P, Vachová M, Vítovcová P, Brodská P, Vlas T. A comprehensive analysis of middle-european molecular sensitization profiles to pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;164(1):74–82.

82. Panzner P, Vachová M, Vlas T, Vítovcová P, Brodská P, Malý M. Cross-sectional study on sensitization to mite and cockroach allergen components in allergy patients in the Central European region. *Clin Transl Allergy*. 2018;8(19):1–9.
83. Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, Maggi E, Mussap M, Passalacqua G, et al. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem*. 2011;44(12):1005–11.
84. Dodig S, Čepelak I. The potential of component-resolved diagnosis in laboratory diagnostics of allergy. *Biochem medica*. 2018;28(2):1–9.
85. Francesca B, Mirella DR, Enrico S, Paola M, Mariaelisabetta C, Ignazio B, et al. Evaluation of a new multiplex assay for allergy diagnosis. *Clin Chim Acta*. 2019;493:73–8.
86. Martínez-Aranguren R, Lizaso MT, Goikoetxea MJ, García BE, Cabrera-Freitag P, Trellez O, et al. Is the determination of specific IgE against components using ISAC 112 a reproducible technique? *PLoS One*. 2014;9(2):1–7.
87. Jakob T, Forstenlechner P, Matricardi P, Kleine-Tebbe J. Molecular allergy diagnostics using multiplex assays : methodological and practical considerations for use in research and clinical routine. *Allergo J Int*. 2015;24:320–32.
88. MacroArray Diagnostics GmbH (MADx). ALEX2 Instruction for Use. 2020. p. 1–11.
89. Bojcukova J, Vlas T, Forstenlechner P, Panzner P. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clin Transl Allergy*. 2019;9(1):1–6.
90. Heffler E, Puggioni F, Peveri S, Montagni M, Canonica GW, Melioli G. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: A novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organ J*. 2018;11(7):1–8.
91. Hemmer W, Altmann F, Holzweber F, Gruber C, Wantke F, Wöhrl S. ImmunoCAP cellulose displays cross-reactive carbohydrate determinant (CCD) epitopes and can cause false-positive test results in patients with high anti-CCD IgE antibody levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):372–81.
92. Ansotegui IJ, Melioli G, Walter G, Gómez RM, Cox L, Demoly P, et al. Open Access A WAO—ARIA—GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. *World Allergy Organ J*. 2020;13(2):1–46.
93. He Y, Liu X, Huang Y, Zou Z, Chen H, Lai H, et al. Reduction of the number of major representative allergens: From clinical testing to 3-dimensional structures. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–11.
94. Radauer C, Nandy A, Ferreira F, Goodman RE, Larsen JN, Lidholm J, et al. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy*. 2014 Apr;69(4):413–9.
95. Pomés A, Davies J, Gadermaier G, Hilger C, Holyhauser T, Lidholm J, et al. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Mol Immunol*. 2018;100:1–25.
96. Martorell A, Alonso E, Boné J, Echeverría L, López MC, Martín F, et al. Position document: IgE-mediated allergy to egg protein. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2013;41(5):320–36.

97. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(2):228–38.
98. Weber RW. Cross-reactivity of pollen allergens: Impact on allergen immunotherapy. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2007;99(3):203–12.
99. Asero R, Pravettoni V. Anaphylaxis to plant-foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013;13(4):379–85.
100. Fernández-Rivas M. Fruit and vegetable allergy. *Chem Immunol Allergy.* 2015;101:162–70.
101. Matricardi PM, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, Aalberse RC, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27(23):1–250.
102. Tong WS, Yuen AWT, Wai CYY, Leung NYH, Chu KH, Leung PSC. Diagnosis of fish and shellfish allergies. *J Asthma Allergy.* 2018;11:247–60.
103. Kuehn A, Swoboda I, Arumugam K, Hilger C, Hentges F. Fish allergens at a glance: Variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Front Immunol.* 2014;5(179):1–9.
104. Bělohávková S, Fuchs M. Pracovní skupina pro potravinové alergie ČSAKI (PAPRSK). *Alergie Suppl.* 2021;23(1):16–8.
105. Sub-committee. WHO/IUIS Allergen Nomenclature, Glycan Epitopes Currently Recognized as Targets for IgE Antibodies [Internet]. 2008. Available from: <http://allergen.org/carboep.php>
106. ThermoFisher SCIENTIFIC. ImmunoCAP ISAC® sIgE 112. 2017. p. 1–16.
107. Kim JF, Mcclary N, Nwaru BI, Stoddart A, Sheikh A. Diagnostic accuracy, risk assessment, and cost-effectiveness of component-resolved diagnostics for food allergy: A systematic review. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2018;73:1609–21.
108. Mari A, Wallner M, Ferreira F. Fagales pollen sensitization in a birch-free area: A respiratory cohort survey using Fagales pollen extracts and birch recombinant allergens (rBet v 1, rBet v 2, rBet v 4). *Clin Exp Allergy.* 2003;33:1419–28.
109. Klemans RJB, Knol EF, Michelsen-Huisman A, Pasmans SGMA, De Kruijf-Broekman W, Bruijnzeel-Koomen CAFM, et al. Components in soy allergy diagnostics: Gly m 2S albumin has the best diagnostic value in adults. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2013;68(11):1396–402.
110. Berneder M, Bublin M, Hoffmann-Sommergruber K, Hawranek T, Lang R. Allergen chip diagnosis for soy-allergic patients: Gly m 4 as a marker for severe food-allergic reactions to soy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161:229–33.
111. Holzhauser T, Wackermann O, Ballmer-Weber BK, Bindslev-Jensen C, Scibilia J, Perono-Garoffo L, et al. Soybean (*Glycine max*) allergy in Europe: Gly m 5 ( $\beta$ -conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(2):452–8.
112. Ito K, Sjölander S, Sato S, Movérare R, Tanaka A, Söderström L, et al. IgE to Gly m 5 and Gly m 6 is associated with severe allergic reactions to soybean in Japanese

- children. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):673–5.
113. Vaňková R, Čelakovská J, Krejsek J, Krčmová I, Andrýs C. Molekulárně definované alergeny a jejich využití v diagnostice alergického zánětu (atopické dermatitidy). *Česko-Slovenská Dermatologie*. 2020;95(4):127–40.
  114. Fiocchi A, Bouygue GR, Albarini M, Restani P. Molecular diagnosis of cow's milk allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011;11(3):216–221.
  115. Alessandri C, Sforza S, Palazzo P, Lambertini F, Paoletta S, Zennaro D, et al. Tolerability of a fully matured cheese in cow's milk allergic children: Biochemical, immunochemical, and clinical aspects. *PLoS One*. 2012;7(7):1–14.
  116. Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, Spitzauer S, Valenta R. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*. 2014;66(1):22–33.
  117. Dona DW, Suphioglu C. Egg allergy: Diagnosis and immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1–35.
  118. Benhamou AH, Zamora SA, Eigenmann PA. Correlation between specific immunoglobulin E levels and the severity of reactions in egg allergic patients. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19(2):173–179.
  119. Quirce S, Marañón F, Umpiérrez A, De Las Heras M, Fernández-Caldas E, Sastre J. Chicken serum albumin (Gal d 5\*) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2001;56(8):754–62.
  120. Geiselhart S, Hoffmann-Sommergruber K, Bublin M. Tree nut allergens. *Mol Immunol*. 2018;100:71–81.
  121. Fuchs M. Oříšek popáté – lískový ořech. *Alergie Astma Bronchitida*. 2014;3:18–23.
  122. Masthoff LJN, Mattsson L, Zuidmeer-Jongejan L, Lidholm J, Andersson K, Akkerdaas JH, et al. Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(2):393–9.
  123. Treudler R, Simon JC. Overview of component resolved diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13(1):110–7.
  124. Datema M, Van Ree R, Asero R, Barreales L, Belohlavkova S, Blay F, et al. Component-resolved diagnosis and beyond: Multivariable regression models to predict severity of hazelnut allergy. *Allergy*. 2018;73(3):549–59.
  125. Wangorsch A, Jamin A, Lidholm J, Gräni N, Lang C, Ballmer-Weber B, et al. Identification and implication of an allergenic PR-10 protein from walnut in birch pollen associated walnut allergy. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(4):1–24.
  126. Costa J, Carrapatoso I, Oliveira MBPP, Mafra I. Walnut allergens: Molecular characterization, detection and clinical relevance. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(3):319–41.
  127. Rajamohamed SH, Boye JI. Processing foods without peanuts and tree nuts. *Allerg Manag Food Ind*. 2010;11:289–331.
  128. Palladino C, Breiteneder H. Peanut allergens. *Mol Immunol*. 2018;100:58–70.
  129. Klemans RJB, Otte D, Knol M, Knol EF, Meijer Y, Gmelig-Meyling FHJ, et al. The

- diagnostic value of specific IgE to Ara h 2 to predict peanut allergy in children is comparable to a validated and updated diagnostic prediction model. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(1):157–63.
130. Wolthers OD. Component-Resolved Diagnosis in Pediatrics. *ISRN Pediatr.* 2012;1–6.
  131. Patrawala M, Shih J, Lee G, Vickery B. Peanut Oral Immunotherapy: a Current Perspective. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2020;20(14):1–10.
  132. Lopata AL, Kleine-Tebbe J, Kamath SD. Allergens and molecular diagnostics of shellfish allergy. *Allergo J Int.* 2016;25(7):210–8.
  133. Lopata AL, Kamath S. Shellfish allergy diagnosis - gaps and needs. *Curr Allergy Clin Immunol.* 2012;25(2):60–6.
  134. Cianferoni A. Wheat allergy: Diagnosis and management. *J Asthma Allergy.* 2016;9:13–25.
  135. Samasca G, Sur G, Iancu M, Lupan I, Deleanu D. Current Trends and Investigative Developments in Wheat Allergy. *Int Rev Immunol.* 2015;34(6):538–41.
  136. Pahr S, Constantin C, Mari A, Scheibelhofer S, Thalhamer J, Ebner C, et al. Molecular characterization of wheat allergens specifically recognized by patients suffering from wheat-induced respiratory allergy. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(4):597–609.
  137. Procházková V, Sánchez D, Štěpánová Honzová S, Hospodková M, Hoffmanová I. Neglutenové proteiny pšeničného zrna v imunopatogenezi onemocnění zažívacího traktu. *Alergie.* 2018;3:156–61.
  138. Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krcmova I, Krejsek J, Andrýs C. Sensitisation to molecular allergens of *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* in atopic dermatitis patients. *Food Agric Immunol.* 2019;30(1):1079–111.
  139. Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krcmova I, Krejsek J, Andrýs C. Sensitisation to molecular components in patients with atopic dermatitis, relation to asthma bronchiale and allergic rhinitis. *Food Agric Immunol.* 2020;31(1):600–29.
  140. Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krcmova I, Krejsek J, Andrýs C. ISAC multiplex testing – results of examination in 100 patients suffering from atopic dermatitis. *Food Agric Immunol.* 2020;31(1):1014–35.
  141. Vaňková R, Čelakovská J, Bukač J, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. Sensitization to Molecular Components in 104 Atopic Dermatitis Patients in Relation to Subgroups of Patients Suffering from Bronchial Asthma and Allergic Rhinitis. *Acta Medica (Hradec Kral Czech Republic).* 2020;63(4):164–75.
  142. Teřl M, Čáp P, Dvořáková R, Kašák V, Kočí T, Novotná B, et al. Doporučený postup diagnostiky a léčby bronchiálního astmatu. 1. vydání. Vízner K, editor. Nakladatelství GEUM, s.r.o.; 2015. 1–60 p.
  143. Seberova E, Bachert C, Fokkens W, Haahtela T, Hellings PW, Klimek L, et al. ARIA 2019 : Doporučení péče o pacienty s alergickou rýmou v České republice. *Alergie Suppl.* 2020;1:5–18.
  144. Brožek JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. *J*



- Allergy Clin Immunol. 2017;140(4):950–8.
145. Vaňková R, Čelakovská J, Bukač J, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. Využití multiplexového systému ImmunoCAP ISAC k určení senzibilizace na molekulární komponenty související se závažností atopické dermatitidy. *Česko-Slovenská Dermatologie*. 2020;95(5):166–79.
  146. Čelakovská J, Ettlrová K, Ettler K, Bukač J. Egg Allergy in Adolescent and Adult Patient Suffering from Atopic Dermatitis – Association with Concomitant Allergic Diseases. *Acta Medica (Hradec Kral Czech Republic)*. 2015;58(1):9–14.
  147. Čelakovská J, Ettlrová K, Ettler K, Vaněčková J, Bukač J. Význam diagnostické hypoalergenní diety u pacientů s atopickým ekzémem. *Česko-Slovenská Dermatologie*. 2011;86(3):138–43.
  148. Čelakovská J, Ettlrová K, Ettler K, Vaněčková J, Bukač J. Evaluation of food allergy to wheat, cow milk, egg, soy and peanuts in patients suffering from atopic dermatitis. *Food Agric Immunol*. 2015;26(1):26–37.
  149. Necas M. Atopy patch testing with airborne allergens. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica Adriat*. 2013;22(2):39–42.
  150. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2014;69(8):1008–25.
  151. Čelakovská J, Ettlrová K, Ettler K, Vaněčková J, Bukač J. Vliv diagnostické hypoalergenní diety u pacientů s atopickým ekzémem na intenzitu zánětu, svědění a nespavost. *Česko-Slovenská Dermatologie*. 2012;87(3):93–7.
  152. Worsley JK. The Power of Likelihood Ratio and Cumulative Sum Tests for a Change in a Binomial Probability. *Biometrika*. 1983;70(2):455–64.
  153. Medoid Partitioning [Internet]. NCSS Statistical Software. 2019. p. 1–13. Available from: NCSS.com
  154. Kaufman L, Rousseeuw PJ. Partitioning Around Medoids (Program Pam). In: *Finding groups in data: an introduction to cluster analysis*. 1990. p. 68–125.

## 8 Přílohy

### 8.1 Formulář hodnocení indexu SCORAD

Příjmení  Jméno

Rodné číslo

Zařízení

Lékař

Datum

( ) platí pro děti mladší 2 let

**A: Postižená plocha**

**B: Intenzita objektivních příznaků (součet)**

Kritéria	Intenzita
Erytém	
Edém	
Krusty	
Exkoriace	
Lichenifikace	
Suchost*	

\*na nepostižených místech

**Hodnocení intenzity (průměr)**  
 0 = nepřítomnost  
 1 = slabá  
 2 = střední  
 3 = silná

**C: Subjektivní příznaky (svědění + nespavost)**

Hodnocení (průměr ze 3 dnů)	
Svědění (0 až 10)	<input type="text"/>
Nespavost (0 až 10)	<input type="text"/>

**SCORAD**  
 $A/5 + 7B/2 + C$

Obr. 2. Stanovení indexu SCORAD u atopického ekzému.

**Vysvětlivky:** Výsledek vyšetření je počítán matematickým vzorcem SCORAD:  $A/5 + 7B/2 + C$ , kde A je definován jako rozsah postižení (0-100 bodů), B jako intenzita onemocnění (0-18 bodů) a C jako subjektivní parametry (0-20 bodů)

## 8.2 Doporučený jídelníček v průběhu eliminační diety

### DOPORUČENÝ JÍDELNÍČEK V PRŮBĚHU ELIMINAČNÍ DIETY

Dodržení dietních opatření v průběhu eliminační diety je důležitá součást vyšetření potravinové alergie.

Expoziční test se sledovanými potravinami následuje tuto dietu a jeho výsledek je považován za nejpřínosnější při stanovení potravinové alergie.

Pro spolehlivé stanovení potravinové alergie je nutné stanovit přísnou diagnostickou dietu na 14-21 dní, dodržovat níže uvedená doporučení. Jde sice o přísnou dietu, ale je to pouze diagnostická dieta, která je součástí vyšetření

Při přípravě stravy zcela vynecháváme mléko, mléčné výrobky, obilnou mouku a potraviny, které všeobecně dráždí atopický ekzém (čokoláda, citrusy, kakao, apod.). Dále je nutné při sestavování eliminační diety vyloučit potraviny, na které vzniklo podezření na základě výsledku kožních testů, vyšetření krve a pohovoru nemocného s lékařem.

Základem diety je úplné vyloučení obilné mouky a mléčných výrobků ze stravy. To tedy zahrnuje i vyloučení pečiva, chleba, sušenek, těstovin, knedlíků, polévek a omáček zahuštěných obilnou moukou, bramboráky, měkké salámy, párky, jitrnice, paštiky, plněné čokolády, karamely, pivo.

#### DOPORUČENÉ POTRAVINY

- Rýžový, kukuřičný chléb
- K pečivu možno přidat domácí džem, ale záleží na individuální snášenlivosti
- Jako přílohy rýži, brambory a bezlepkové těstoviny
- Maso hovězí, vepřové, kuřecí; ryby pouze po schválení lékařem
- Maso připravovat na sádle, popř. na rafinovaném slunečnicovém oleji (nepoužívat rostlinné tuky!)
- Uzeniny nejsou vhodné
- Zeleninu a ovoce konzumovat po tepelné úpravě (dušená zelenina, kompotované ovoce, atd.)
- Syrovou zeleninu a ovoce zařadit do jídelníčku pouze po domluvě s lékařem
- Nepoužívat koření, u pylových alergiků je nutné vyloučit celer, petržel
- Vhodnými nápoji jsou minerálka, čistá voda, nedoporučujeme bylinkové a ovocné čaje

**8.3 Práce č. IX: Sensitization to Molecular Components in 104 Atopic Dermatitis Patients in Relation to Subgroups of Patients Suffering from Bronchial Asthma and Allergic Rhinitis**

# Sensitization to Molecular Components in 104 Atopic Dermatitis Patients in Relation to Subgroups of Patients Suffering from Bronchial Asthma and Allergic Rhinitis

Radka Vaňková<sup>1</sup>, Jarmila Čelakovská<sup>2,\*</sup>, Josef Bukač<sup>3</sup>, Irena Krčmová<sup>1</sup>, Jan Krejsek<sup>1</sup>, Ctirad Andrýs<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**Background:** Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease. The progression from AD to bronchial asthma (AB) and allergic rhinitis (AR) is called atopic march. The aim of this study was to evaluate the difference in the sensitization to molecular components in patients suffering from AD in relation to subgroups of patients with AR and AB.

**Material and Methods:** The complete dermatological and allergological examinations were performed. Specific IgE antibodies against 112 molecular components were measured with the multiplex ImmnoCAP ISAC test.

**Results:** Altogether 104 atopic dermatitis patients (50 men, 54 women) at the average age 40.1 years were examined. The sensitization to molecular components was confirmed in 93.3% of patients. The sensitization to components of mites, grasses, trees, animals, moulds, and shrimps was significantly more frequent in patients with severe form of AD and the sensitization to components of grasses, trees, and moulds was significantly higher in subgroup of patients with AB. In subgroup of patients suffering from AR the higher occurrence of pollen-derived and pollen-food derived PR-10 proteins, grasses, mites, and animals was observed also.

**Conclusions:** We have confirmed the significant differences in the sensitization to molecular components in patients suffering from severe form of AD, and in subgroups of patients suffering from AB and AR. These molecular components may play the important role in the consecutive development of different allergy pathologies called atopic march.

## KEYWORDS

molecular components; multiplex ISAC testing; severity of atopic dermatitis; bronchial asthma; allergic rhinitis; atopic march

## AUTHOR AFFILIATIONS

<sup>1</sup> Department of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital Hradec Králové and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Dermatology and Venereology, University Hospital Hradec Králové and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Medical Biophysics, University Hospital Hradec Králové and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic

\* Corresponding author: Department of Dermatology and Venereology, University Hospital Hradec Králové and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic; e-mail: celakovskaj@lfhk.cuni.cz

Received: 28 May 2020

Accepted: 3 September 2020

Published online: 22 December 2020

Acta Medica (Hradec Králové) 2020; 63(4): 164–175

<https://doi.org/10.14712/18059694.2020.59>

© 2020 The Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## INTRODUCTION

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease. The pathogenesis of AD involves susceptibility genes, immune dysregulation, and disrupted epidermal barrier function resulting in increased transepidermal water loss (TEWL), permeation of irritants, microbes and aeroallergens (1-3). The immune response is polarized towards innate immunity cells, such as dendritic cells, innate lymphoid cells type 2 (ILC-2), mast cells, basophilic granulocytes, and eosinophilic granulocytes. The direct contact of skin with allergens could trigger signals to initiate Th2 allergic response. A typical manifestation of allergic inflammation is the production of IgE antibodies directed against causative allergens (4, 5). A progression from AD to allergic rhinitis (AR) and bronchial asthma (AB) may develop in the first several years of life. This process is a phenomenon called atopic march (6). Positive correlations have been demonstrated between the severity of AD and the risk of development bronchial asthma, and allergic rhinitis (1). However, the exact mechanism explaining the atopic march remains to be elucidated. Emerging data suggest that epithelial cell-derived cytokines such as thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-25, and IL-33 may drive the progression from AD to bronchial asthma and food allergy (1). Various allergens may cause exacerbation of eczematous skin lesions in atopic dermatitis. The main allergenic sources are food, moulds, trees, weeds, grasses, mites, and animals (7). Specific IgE sensitization to food and aeroallergens, especially to house dust mites, pollen-derived and plant-derived food allergens has been described in adult AD patients (8).

Diagnostic tests of allergic diseases such as *in-vivo* skin prick tests or *in-vitro* measurement of specific IgE, and basophil activation test, are based on allergens derived from natural sources (extracts). Each allergen source is a very complex mixture of allergenic and non-allergenic proteins. This methodology has its limitations. Allergic extracts are incapable to differentiate between primary sensitization and immunological cross-reactivity (9-11). Progress in laboratory diagnostics of IgE-mediated allergy was made by the introduction of component-resolved diagnosis (CRD). The molecularly defined allergens (components) are used in a singleplex test or a multiplex allergen microarray assay. The main goal of CRD is to distinguish between the mainly species-specific components and the cross-reactive allergen molecules. It is evident that CRD enhances the specificity of IgE-diagnosis in polysensitized respiratory allergies (12), and can be also applied in food allergies (13) and atopic dermatitis (13, 14) and in addition, may reveal unexplained anaphylaxis (10).

The aim of this study was to evaluate the sensitization to molecular components in relation to severity of AD and to determine whether there are some differences between the sensitization profiles in subgroups of patients suffering from bronchial asthma and allergic rhinitis. To identify the sensitization and co-sensitization to species-specific and cross-reacting allergen components we used a commercially available microarray immunoassay ImmunoCAP ISAC. It is a complex assay for simultaneous determination of allergen specific IgE (sIgE) against 112 molecular

components (purified natural and recombinant) originating for more than 50 sources (14, 15). The major advantage of ISAC is the comprehensive IgE pattern obtained with a minute amount of serum (16).

Only few reports demonstrate the sensitization to molecular components in atopic dermatitis patients and the relation of this sensitization to the severity of atopic dermatitis, and to the occurrence of bronchial asthma and allergic rhinitis (8, 17, 18). It should be emphasized that in this study we focused on the degree of sensitization only and not on its clinical relevance.

## MATERIAL AND METHODS

### PATIENTS

In the period 2018-2019, 104 patients suffering from atopic dermatitis were examined. All these patients were examined at the Department of Dermatology and Venereology, University Hospital Hradec Králové, Czech Republic. Complete dermatological and allergological examination was performed in all patients enrolled to this study. The diagnosis of atopic dermatitis was made using the Hanifin-Rajka criteria (19). Exclusion criteria were long term therapy with cyclosporin or systemic corticoids, pregnancy, breastfeeding. Patients with atopic dermatitis having other systemic diseases were excluded from the study as well. This study was approved by the Ethics Committee, University Hospital Hradec Králové, Czech Republic.

### BRONCHIAL ASTHMA

The diagnosis of bronchial asthma (AB), was determined according to the guidelines of the Global Initiative for Asthma (GINA) at allergy outpatients clinic of the Institute of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital Hradec Králové, Czech Republic.

### ALLERGIC RHINITIS

The evaluation of allergic rhinitis (AR), was made according to the allergy testing and personal history.

### SEVERITY OF ATOPIC DERMATITIS

Severity of atopic dermatitis was scored according to SCORAD index (Scoring of Atopic Dermatitis) with the assessment of topography items (affected skin area), intensity criteria and subjective parameters (20). The severity of atopic dermatitis was evaluated with SCORAD index as a mild form to 25 points, as a moderate form over 25 to 50 points, as a severe form over 50 points. The evaluation of the severity was calculated as the average SCORAD measured every 2 month during 1 last year (21).

### EXAMINATION OF SPECIFIC IGE TO MOLECULAR COMPONENTS BY IMMUNOCAP ISAC TEST

Samples of blood were collected from the cubital vein. Blood serum was isolated by centrifugation and stored under -70 °C until analysis. Repeated thawing and freezing

were avoided. The levels of specific IgE in all patients were determined by the component-resolved diagnosis microarray-based sIgE detection assay ImmunoCAP ISAC sIgE 112 (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden). ImmunoCAP ISAC sIgE 112 is a solid-phase semi-quantitative multiple immunoassay which enables to determine 112 different components from 51 allergen sources (22, 23). The molecular components are applied in triplicates (70 recombinant, 42 purified natural) to ensure the test reproducibility. The specific IgE values are measured in arbitrary units ISU-E (ISAC Standardized Units), measuring range of 0.3–100 ISU-E. The results of sIgE are presented semi-quantitatively in 4 classes: < 0.3 ISU-E negative, 0.3 > 0.9 ISU-E low positivity, 0.9 > 15 ISU-E moderate positivity, ≥ 15 ISU-E very high positivity (the level of specific IgE greater than 0.3 ISU-E was considered as positive) (14). The analysis was conducted according to the manufacturer's instruction.

### STATISTICAL ANALYSIS

We analysed the data to determine whether the occurrence of sensitization to examined molecular components is in relation to the severity of atopic dermatitis. In addition, we assess if there are some differences in the sensitization to molecular components in the subgroups of patients suffering from bronchial asthma or allergic rhinitis. Relative frequencies of sensitization to the investigated molecular components were determined in all patients according to the severity of atopic dermatitis, bronchial asthma and allergic rhinitis. Pairs of these categories were enrolled in the contingency tables and the Chi-square independence test was performed. The significance level was set to 5%.

### RESULTS

We examined 104 patients suffering from AD, 50 men and 54 women with the average age 40.1 years (s.d. 15.9) and with the average SCORAD index 39 points (s.d. 13.1). Mild form of AD was recorded in 13.5% of patients, moderate

form of AD in 58.7% of patients and severe form of AD in 27.9% of patients. Subgroup of patients suffering from bronchial asthma or allergic rhinitis was recorded in 55.8% and 76.0%, respectively. The sensitization to at least one of the tested molecular components was confirmed in 93.3% of patients. No positive results to molecular components were obtained in 6.7% patients. The characteristics of the patients are summarised in Table 1. The results describing the sensitization patterns to tested components in all AD patients are listed below and shown in Table 2.

In the whole group of patients, the highest sensitization rate was observed to pollen-derived components and *Betulaceae*-specific components. Timothy is present on the biochip in eight molecular components. Sensitization rate to rPhl p 1 (61.0%) was followed by nPhl p 4 (52.0%), rPhl p 5 (43.0%), rPhl p 6 (42.0%), rPhl p 2 (39.0%) and rPhl p 11 (20.0%). The sensitization rate to polcalcin rPhl p 7 and profilin rPhl p 12 was lower than 10.0%. The second most frequent sensitization was 57.0% to rBet v 1, which was followed by other *Betulaceae*-specific components, such as rCor a 1.0101 (45.0%) and rAln g 1 (43.0%). Sensitization to pollen-food derived PR-10 proteins was observed frequently as well; on the other hand, sensitization to profilin rBet v 2 and polcalcin rBet v 4 were observed rarely (< 10%). The sensitization rates to mite-specific molecules were observed more frequently in the group 2 (rDer p 2, 46.0% and rDer f 2, 45.0%) in comparison with group 1 (nDer p 1, 36.0% and nDer f 1, 34.0%). The sensitization to animal components was observed most frequently to cat allergen rFel d 1 (42.0%) and dog allergens rCan f 1 (39.0%) and rCan f 5 (26.0%), which were followed by the sensitization to animal lipocalins rFel d 4 (29.0%), rEqu c 1 (27.0%), nMus m 1 (20.0%), rCan f 2 (17.0%). The frequency of sensitization to individual components is shown in Table 2 and schematically illustrated in Figure related to Table 2.

### SENSITIZATION TO THE MOLECULAR COMPONENTS IN RELATION TO THE SEVERITY OF ATOPIC DERMATITIS

All 104 patients were divided into three groups according to SCORAD index. We evaluated the relative frequency of positive reactions to molecular components in patients with mild, moderate and severe form of atopic dermatitis. Increased relative frequency of positive reactions ranging from mild to moderate to severe form of AD was confirmed for most molecular components. Positive results of specific IgE antibodies against 47 molecular components were presented in mild form of AD, and 105 components were recorded in moderate and severe form of AD.

In the severe form of AD (29 patients; 100%) the highest sensitization rate to grass-species specific component rPhl p 1 (timothy, beta-expansin) reached 72.4% of patients. The second most frequent sensitization rate to components of mites rDer f 2 and rDer p 2 (NPC2 family) was observed in 65.5% of patients with severe form of AD.

The relation between the occurrence of sensitization to some molecular components and the severity of AD was confirmed. The following molecular components were recorded significantly more frequently in patients with severe form of AD than with mild form of AD ( $p < 0.05$ ).

**Tab. 1** The characteristics of patients.

Number of patients with AD	104 patients (50 men, 54 women)
age	average age 40.1 years (s.d. 15.9)
index SCORAD	average SCORAD 39 points (s.d. 13.1)
sensitization to allergen components	97 patients (93.3%)
mild form of AD	14 patients (13.5%)
moderate form of AD	61 patients (58.7%)
severe form of AD	29 patients (27.9%)
subgroups of patients:	
number of patients with AB	58 patients (55.8%)
number of patients with AR	79 patients (76.0%)

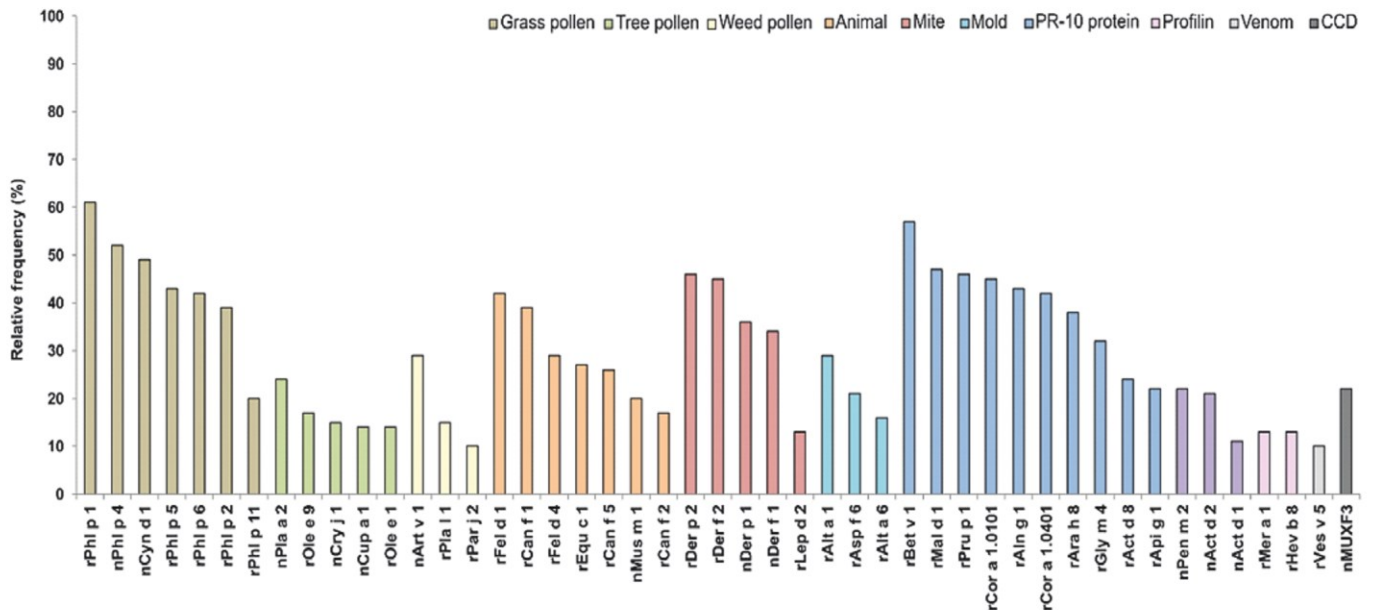
AD – atopic dermatitis, AB – bronchial asthma, AR – allergic rhinitis

**Tab. 2** The list of molecular components according to positivity (relative frequency) in 104 patients with atopic dermatitis.

Allergen source	Molecular components	Protein groups	No. of patients (%)
Timothy grass	<b>rPhl p 1</b>	β-expansin	61.0
Birch	<b>rBet v 1</b>	PR-10 protein	57.0
Timothy grass	<i>nPhl p 4</i>	Berberine bridge enzyme	52.0
Bermuda grass	<b>nCyn d 1</b>	β-expansin	49.0
Apple	<b>rMal d 1</b>	PR-10 protein	47.0
House dust mite	<b>rDer p 2</b>	NPC2 family	46.0
Peach	<b>rPru p 1</b>	PR-10 protein	46.0
Hazel pollen	<b>rCor a 1.0101</b>	PR-10 protein	45.0
House dust mite	<b>rDer f 2</b>	NPC2 family	45.0
Timothy grass	<b>rPhl p 5</b>	Ribonucleases	43.0
Alder	<b>rAln g 1</b>	PR-10 protein	43.0
Timothy grass	<i>rPhl p 6</i>	Grass group 6	42.0
Cat	<b>rFel d 1</b>	Uteroglobin	42.0
Hazelnut	<b>rCor a 1.0401</b>	PR-10 protein	42.0
Timothy grass	<i>rPhl p 2</i>	Expansin	39.0
Dog	<b>rCan f 1</b>	Lipocalin	39.0
Peanut	<b>rAra h 8</b>	PR-10 protein	38.0
House dust mite	<b>nDer p 1</b>	Cysteine protease	36.0
House dust mite	<b>nDer f 1</b>	Cysteine protease	34.0
Soy	<b>rGly m 4</b>	PR-10 protein	32.0
Mugwort	<b>nArt v 1</b>	Defensin	29.0
<i>Alternaria</i>	<b>rAlt a 1</b>	Acidic glycoprotein	29.0
Cat	<b>rFel d 4</b>	Lipocalin	29.0
Horse	<b>rEqu c 1</b>	Lipocalin	27.0
Dog	<b>rCan f 5</b>	Arginine esterase, Prostatic kallikrein	26.0
Plane tree	<b>nPla a 2</b>	Polygalacturonase	24.0
Kiwifruit	<b>rAct d 8</b>	PR-10 protein	24.0
Shrimp	<i>nPen m 2</i>	Arginine kinase	22.0
Celery	<b>rApi g 1</b>	PR-10 protein	22.0
CCD	<i>nMUXF3</i>	Sugar epitope from bromelain	22.0
<i>Aspergillus</i>	<i>rAsp f 6</i>	Mn superoxide dismutase	21.0
Kiwifruit	<b>nAct d 2</b>	Thaumatococcus-like protein	21.0
Timothy grass	<i>rPhl p 11</i>	Ole e 1-related protein	20.0
Mouse	<b>nMus m 1</b>	Lipocalin	20.0
Olive pollen	<b>rOle e 9</b>	1.3-β-glucanase	17.0
Dog	<i>rCan f 2</i>	Lipocalin	17.0
<i>Alternaria</i>	<i>rAlt a 6</i>	Enolase	16.0
Japanese cedar	<b>nCry j 1</b>	Pectate lyase	15.0
Plantain	<b>rPla l 1</b>	Ole e 1-related protein	15.0
Cypress	<b>nCup a 1</b>	Pectate lyase	14.0
Olive pollen	<b>rOle e 1</b>	Common olive group 1	14.0
Annual mercury	<i>rMer a 1</i>	Profilin	13.0
Storage mite	<i>rLep d 2</i>	NPC2 family	13.0
Latex	<i>rHev b 8</i>	Profilin	13.0
Kiwifruit	<b>nAct d 1</b>	Cysteine protease	11.0
Wall pelitory	<b>rPar j 2</b>	Lipid transfer protein	10.0
Yellow jacket	<b>rVes v 5</b>	Antigen 5	10.0

CCD – cross-reactive carbohydrate determinants; major allergens are highlighted in bold (e.g. **rPhl p 1**), minor allergens are highlighted in italics (e.g. *rPhl p 6*) and cross-reactive components are illustrate in grey box (e.g. **rBet v 1**); molecular components with sensitization rate less than 10% are not mentioned





**Fig. 1 related to Tab. 2:** Sensitization rate to molecular components according to positivity (relative frequency) in 104 patients with atopic dermatitis. Molecular components are sorted by protein group and decreasing relative frequency in each group; molecular components with sensitization rate less than 10% are not mentioned.

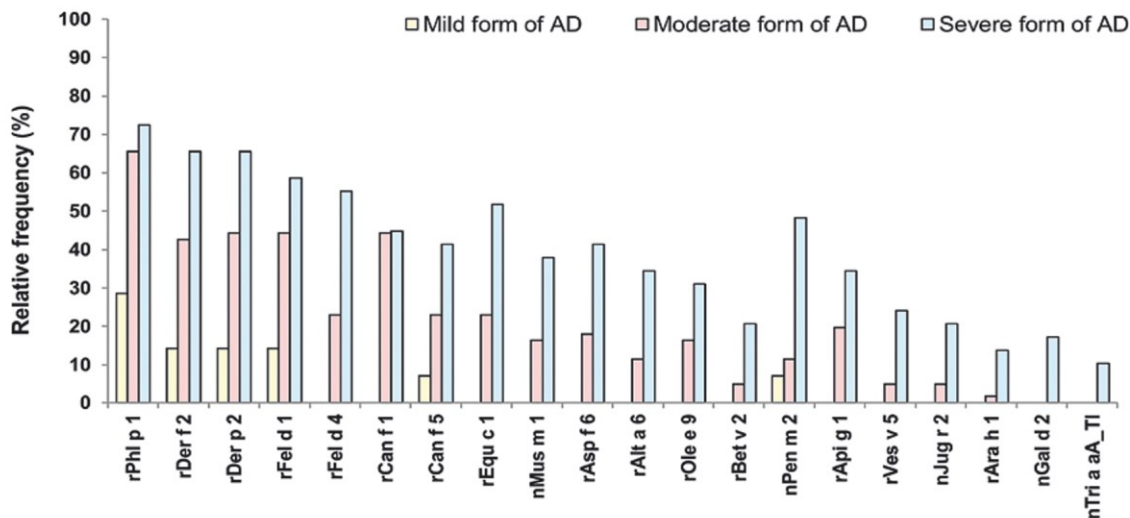
High sensitization rate of positive reactions were reported against the major inhalant allergen components of grasses rPhl p 1 (timothy, beta-expansin); mites rDer f 2 and rDer p 2 (house dust mite, NPC2 family); animals rCan f 1

(dog, lipocalin), rCan f 5 (dog, arginine esterase), rFel d 1 (cat, uteroglobin), rFel d 4 (cat, lipocalin), rEqu c 1 (horse, lipocalin), nMus m 1 (mouse, lipocalin); and vegetables rApi g 1 (celery, PR-10 protein) in severe form of AD. The

**Tab. 3** The list of molecular components according to positivity (relative frequency) in mild, moderate and severe form of AD – statistically significant difference (p-value < 0.05).

Allergen source	Molecular components	No. of patients in mild form of AD (%) (14 patients = 100%)	No. of patients in moderate form of AD (%) (61 patients = 100%)	No. of patients in severe form of AD (%) (29 patients = 100%)	p-value
Timothy grass	<b>rPhl p 1</b>	4 (28.6%)	40 (65.6%)	21 (72.4%)	0.015
House dust mite	<b>rDer f 2</b>	2 (14.3%)	26 (42.6%)	19 (65.5%)	0.006
House dust mite	<b>rDer p 2</b>	2 (14.3%)	27 (44.3%)	19 (65.5%)	0.006
Cat	<b>rFel d 1</b>	2 (14.3%)	27 (44.3%)	17 (58.6%)	0.023
Cat	<b>rFel d 4</b>	0 (0.0%)	14 (23.0%)	16 (55.2%)	0.000
Dog	<b>rCan f 1</b>	0 (0.0%)	27 (44.3%)	13 (44.8%)	0.006
Dog	<b>rCan f 5</b>	1 (7.1%)	14 (23.0%)	12 (41.4%)	0.040
Horse	<b>rEqu c 1</b>	0 (0.0%)	14 (23.0%)	15 (51.7%)	0.001
Mouse	<b>nMus m 1</b>	0 (0.0%)	10 (16.4%)	11 (37.9%)	0.008
Olive	<b>rOle e 9</b>	0 (0.0%)	10 (16.4%)	9 (31.0%)	0.040
Birch	<i>rBet v 2</i>	0 (0.0%)	3 (4.9%)	6 (20.7%)	0.021
<i>Alternaria</i>	<i>rAlt a 6</i>	0 (0.0%)	7 (11.5%)	10 (34.5%)	0.005
<i>Aspergillus</i>	<i>rAsp f 6</i>	0 (0.0%)	11 (18.0%)	12 (41.4%)	0.004
Shrimp	<i>nPen m 2</i>	1 (7.1%)	7 (11.5%)	14 (48.3%)	0.000
Celery	<b>rApi g 1</b>	0 (0.0%)	12 (19.7%)	10 (34.5%)	0.031
Yellow jacket	<b>rVes v 5</b>	0 (0.0%)	3 (4.9%)	7 (24.1%)	0.006
Walnut	<b>nJug r 2</b>	0 (0.0%)	3 (4.9%)	6 (20.7%)	0.021
Egg white	<b>nGal d 2</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5 (17.2%)	0.001
Peanut	<b>rAra h 1</b>	0 (0.0%)	1 (1.6%)	4 (13.8%)	0.028
Wheat	<b>nTri a a_TI</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (10.3%)	0.018

AD – atopic dermatitis; major allergens are highlighted in bold (e.g. **rPhl p 1**), minor allergens are highlighted in italics (e.g. *rAlt a 6*), and cross-reactive components are illustrate in grey box (e.g. **rApi g 1**)



**Fig. 2 related to Tab. 3:** Sensitization to molecular components according to positivity (relative frequency) in mild, moderate and severe forms of AD – statistically significant difference (p-value < 0.05).

sensitization rate to minor allergen components of moulds rAlt a 6 (*Alternaria*, enolase), rAsp f 6 (*Aspergillus*, Mn superoxide dismutase), and crustaceans nPen m 2 (shrimp, arginine kinase), was also high. Furthermore, significant differences were confirmed, but with a lower frequency of positive cases, against to tree pollen allergens, such as major component of olive rOle e 9 (glucanase) and to minor component of birch rBet v 2 (profilin) in severe form of AD. Moreover, the lower frequency of positive cases were observed in the major food allergens, such as nTri a aA\_TI (wheat, trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitor), rAra h 1 (peanut, 7S globulin), nJug r 2 (walnut, 7S globulin), nGal d 2 (egg white, ovalbumin), and the major allergen of wasp rVes v 5 (yellow jacket, antigen 5). These differences (p-value < 0.05) are shown in Table 3 and schematically illustrated in Figure related to Table 3.

#### SENSITIZATION TO THE MOLECULAR COMPONENTS IN RELATION TO SUBGROUPS OF PATIENTS SUFFERING FROM ALLERGIC RHINITIS AND BRONCHIAL ASTHMA

We determined whether there are some differences between the sensitization to molecular components in relation to concomitant bronchial asthma or allergic rhinitis in all of 104 atopic dermatitis patients.

The occurrence of AB was recorded in 55.8% of patients. Following molecular components were observed significantly more frequently in patients with AB, such as a minor grass-specific component rPhl p 2 (timothy, expansin), and a major component of trees rOle e 9 (olive, glucanase). Sensitization rate to the minor component of mould rAlt a 6 (*Alternaria*, enolase) was also high. Moreover, lower frequency of positive case against the major allergen of wasp rVes v 5 (antigen 5) was noticed in patients with AB. Interestingly, the sensitization rate to polcalcin regarding rPhl p 7 (timothy) and rBet v 4 (birch) showed no positive results of sIgE in patients with AB. Surprisingly, the occurrence of the CCD component MUXF3 were observed more frequently in subgroup of patients with

AB. These differences (p-value < 0.05) are shown in Table 4 and schematically illustrated in Figure related to Table 4.

The occurrence of AR was recorded in 76.0% of patients. These molecular components were observed significantly more frequently in patients with AR: major components of pollen-derived and pollen-food derived PR-10 proteins (Bet v 1 family), such as rBet v 1 (birch), rCor a 1.0101 (hazel), rMal d 1 (apple), rPru p 1 (peach), and rApi g 1 (celery). Sensitization rate to the major grass-specific components nCyn d 1 (bermuda grass, beta-expansin), rPhl p 5 (timothy, ribonuclease), and a minor component rPhl p 6 (timothy, grass group 6), and a major component of house dust mite rDer f 2 (NPC2 family) and lipocalins, such as rCan f 1 (dog), rFel d 4 (cat), rEqu c 1 (horse), nMus m 1 (mouse) was also high in patients with AR. The sensitization rate to nAct d 1 (kiwifruit, cysteine protease) was less frequent. These differences (p-value < 0.05) are shown in Table 5 and schematically illustrated in Figure related to Table 5.

#### DISCUSSION

Skin barrier abnormalities have been proposed to play an essential role in the initiation of atopic dermatitis in infancy (6). Epicutaneous allergens sensitization through an impaired skin barrier stimulates antigen-presenting cells and induces Th2 responses and consequent allergic manifestations. In a Th2-promoting environment, T-cell/B-cell interactions in regional lymph nodes lead to an excessive IgE switch (1). Simultaneous release of memory T cells into the circulation and their homing back to the skin can induce not only exacerbation of AD but also can initiate the atopic march. The progression of atopic disorders from AD in infants to allergic rhinitis and asthma in children is usually described as atopic march. The most important factor that precipitates atopic march is now considered an impaired epidermal barrier. Barrier disturbances result from genetic defects and early epicutaneous sensitization to food and aeroallergens may be enhanced by damage of the skin barrier function (6, 24). However, the exact

**Tab. 4** The list of molecular components according to positivity (relative frequency) in subgroup of patients suffering from bronchial asthma – statistically significant difference (p-value < 0.05).

Allergen source	Molecular components	No. of patients without AB (%)	No. of patients with AB (%)	p-value
		(46 patients = 100%)	(58 patients = 100%)	
Timothy grass	<i>rPhl p 2</i>	13 (28.3%)	28 (48.3%)	0.038
Olive	<b>rOle e 9</b>	4 (8.7%)	15 (25.9%)	0.024
<i>Alternaria</i>	<i>rAlt a 6</i>	2 (4.3%)	15 (25.9%)	0.003
CCD	nMUXF3	6 (13.0%)	17 (29.3%)	0.047
Yellow jacket	<b>rVes v 5</b>	1 (2.2%)	9 (15.5%)	0.022
Birch	<i>rBet v 4</i>	4 (8.7%)	0 (0.0%)	0.022
Timothy grass	<i>rPhl p 7</i>	7 (15.2%)	0 (0.0%)	0.002

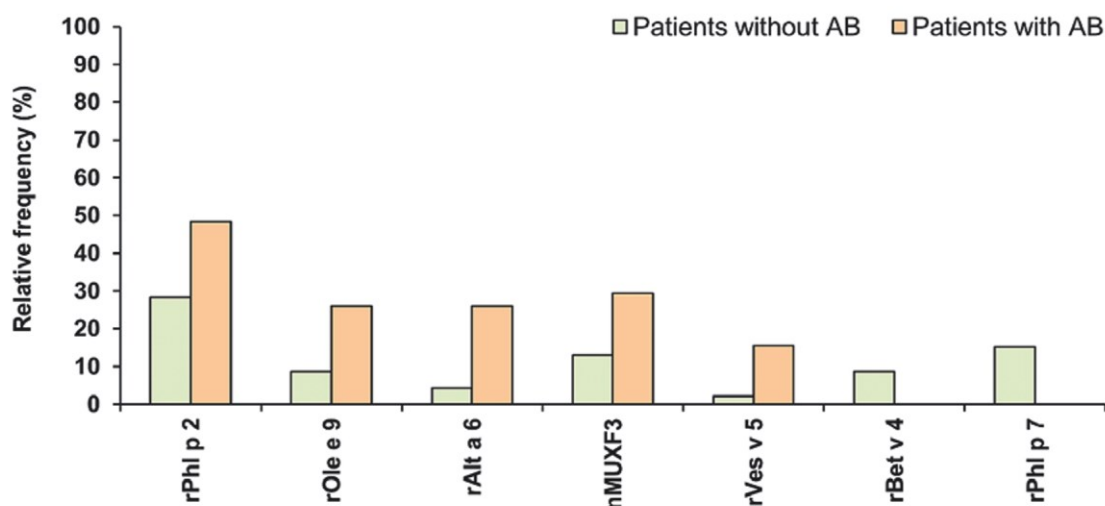
AB – bronchial asthma, CCD – cross-reactive carbohydrate determinants; major allergens are highlighted in bold (e.g. **rOle e 9**), minor allergens are highlighted in italics (e.g. *rAlt a 6*), and cross-reactive components are illustrate in grey box (e.g. *rBet v 4*)

mechanisms explaining the atopic march remain to be elucidated.

Progress in laboratory diagnostics of IgE-mediated allergies is the use of component-resolved diagnosis that implies determination of sIgE against purified native and recombinant components which are used in laboratory as singleplex or multiplex assays (25). There is currently no consensus on the use of multiplex microarray ImmunoCAP ISAC worldwide (26–28). Hatzler et al. (29) investigated the IgE response to grass-specific pollen allergens and determined that sensitization can start years before clinical disease onset through the process called “molecular spreading”. There is some evidence (30, 31) that studies show a strong correlation between results of extract-based skin prick testing (SPT), multiplex microarray assay (ImmunoCAP ISAC, Phadia) and fluorescence enzyme immunoassays (UniCAP, Phadia) with excellent correlation especially in pollen allergens (32) and house dust mite allergens (33). Molecular allergy diagnosis may improve the risk evaluation, sorts out genuine from cross-reactive sensitizations, and finally, improves the accuracy of allergen immunotherapy indication. Currently, more than 130 molecular components are available for *in-vitro* sIgE

testing which can be performed on singleplex or multiplex measurement platforms (e.g. for ALEX<sup>2</sup> more than 170 components) (5). In the WAO-ARIA-GA2LEN consensus document (5) molecular-based allergy diagnosis is recommended in the third line-diagnostic workup, if medical history and exact-based skin prick- and sIgE testing are inconclusive. Multiplex assays are especially suited for use in patients with complex sensitization patterns or symptoms, in small children with limited skin area, in elderly when skin test is less reliable, and when medications interfering with skin prick testing cannot be discontinued (5, 34).

We compared our results with other studies from the Middle-European region in the point of view the outcomes describing the sensitization patterns to molecular components (9, 35, 36). Panzner et al. investigated 1255 sensitized patients, with a mean age of 29 years, and with the following diagnoses: chronic rhinitis (73%), bronchial asthma (41%), atopic dermatitis (34%), urticaria or edema (19%), and/or anaphylaxis (11%) (35, 36). In our study, we investigated the group of patients suffering from atopic dermatitis, some of these patients suffer from bronchial asthma (55.8%) and from allergic rhinitis (76.0%). Our



**Fig. 3 related to Tab. 4:** Sensitization to molecular components according to positivity (relative frequency) in subgroup of patients suffering from bronchial asthma – statistically significant difference (p-value < 0.05).

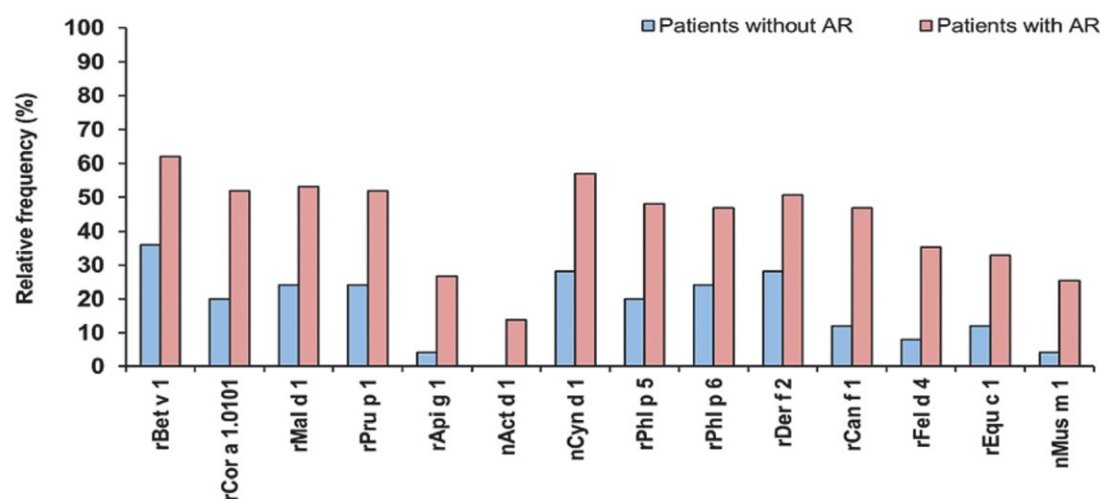
**Tab. 5** The list of molecular components according to positivity (relative frequency) in subgroup of patients suffering from allergic rhinitis – statistically significant difference (p-value < 0.05).

Allergen source	Molecular components	No. of patients without AR (%)	No. of patients with AR (%)	p-value
		(25 patients = 100 %)	(79 patients = 100 %)	
Birch	<b>rBet v 1</b>	9 (36.0 %)	49 (62.0 %)	0.022
Hazel pollen	<b>rCor a 1.0101</b>	5 (20.0 %)	41 (51.9 %)	0.005
Apple	<b>rMal d 1</b>	6 (24.0 %)	42 (53.2 %)	0.011
Peach	<b>rPru p 1</b>	6 (24.0 %)	41 (51.9 %)	0.015
Celery	<b>rApi g 1</b>	1 (4.0 %)	21 (26.6 %)	0.016
Kiwifruit	<b>nAct d 1</b>	0 (0.0 %)	11 (13.9 %)	0.048
Bermuda grass	<b>nCyn d 1</b>	7 (28.0 %)	45 (57.0 %)	0.012
Timothy grass	<b>rPhl p 5</b>	5 (20.0 %)	38 (48.1 %)	0.013
Timothy grass	<i>rPhl p 6</i>	6 (24.0 %)	37 (46.8 %)	0.043
House dust mite	<b>rDer f 2</b>	7 (28.0 %)	40 (50.6 %)	0.048
Dog	<b>rCan f 1</b>	3 (12.0 %)	37 (46.8 %)	0.002
Cat	<b>rFel d 4</b>	2 (8.0 %)	28 (35.4 %)	0.008
Horse	<b>rEqu c 1</b>	3 (12.0 %)	26 (32.9 %)	0.042
Mouse	<b>nMus m 1</b>	1 (4.0 %)	20 (25.3 %)	0.021

AR – allergic rhinitis; major allergens are highlighted in bold (e.g. **rBet v 1**), minor allergens are highlighted in italics (e.g. *rPhl p 6*), and cross-reactive components are illustrate in grey box (e.g. **rMal d 1**)

results are in agreement with the Panzner's hypothesis (9) that grasses (*rPhl p 1*) and *Betulaceae* (*rBet v 1*) components comprised the vast majority of pollen sensitizations in the condition of Middle-European region. On the other hand, the sensitization to animal allergen molecules was higher in our study (to *rFel d 1* in 42.0%, to *rCan f 1* in 39.0%, to *rFel d 4* in 29.0%, to *rEqu c 1* in 27%, to *rCan f 5* in 26%); the sensitization to mite molecular allergens was in our study higher also (to *rDer p 2* in 46.0%, to *rDer f 2* in 45%, to *nDer p 1* in 36.0%, to *nDer f 1* in 34.0%). In the Panzner's study, the sensitization rate to animal allergen molecules was confirmed to *rFel d 1* in 31.8%, to *rCan f 1* in 13.9%, to *rCan f 5* in 16.4%, to *rEqu c 1* in 6.2%, to *rFel d 4* in 5.3% (36). The sensitization to at least one mite-specific molecule (*nDer p 1*, *rDer p 2*, *nDer f 1*, *rDer f 2*) was observed in 32.7% of

patients in Panzner's study (35). The explanation of higher sensitization rate to animal and mite molecular allergens in our group of patients can be in the fact, that we included patients suffering from atopic dermatitis; in the Panzner's study, atopic dermatitis patients represent only 34% of patients. Our results may demonstrate the significance of disturbed epidermal barrier, resulting in increased transepidermal water loss and permeation of allergens, irritants, and microbes. It is evident that the direct contact of skin with allergens could trigger signals to initiate Th2 allergic response. Emerging data now suggest that epithelial cell-derived cytokines such as TSLP, IL-33, and IL-25 may drive the progression from atopic dermatitis to bronchial asthma and food allergy (1–3). In 2014, it was reported that IgE antibodies to *Der p 11* are more common in

**Fig. 4 related to Tab. 5:** Sensitization to molecular components according to positivity (relative frequency) in subgroup of patients suffering from allergic rhinitis – statistically significant difference (p-value < 0.05).

sera from patients with atopic dermatitis (37). Thus, sensitization to this allergen may reflect the fact that the eczematous skin allows easy penetration of allergens even with molecular weight as high as 100,000. In ISAC testing, the molecular component Der p 11 is not present, so we cannot compare it with our results. Although the house dust mite allergens are present in the mite bodies, the main allergenic sources are the mite faeces which, with a diameter higher than 10 µm (37), can be easily inhaled into the airways and consequently be entered deep into the lungs (37).

Our preliminary results regarding the analysis of sensitization to molecular components in atopic dermatitis patients were already published or they are in press (38, 39, 40, 41). We analysed the data to find the molecular components with the highest underlying probability of sensitization in patients suffering from atopic dermatitis and in subgroups of patients with allergic rhinitis and bronchial asthma (38). According to our results, the order of molecular components in mild form of AD is not statistically significant, but a set of molecular components with the highest underlying probability in moderate and severe form of AD and in a subgroup of patients suffering from allergic rhinitis was recorded (38). According to the statistical method with cluster analysis, we found 10 clusters with different numbers of molecular components (39). Fundamental position have the components rPhl p 1 (timothy), rBet v 1 (birch), rAlt a 1 (*Alternaria*) followed by molecular components of NPC2 family, cysteine protease, tropomyosin, uteroglobin, lipocalin and PR-10 protein. Our results correspond to the association of molecular components into protein families according to their biochemical structure (39). The preliminary data regarding the sensitization to molecular components in 81 atopic dermatitis patients were processed in other publications (40, 41).

There are various allergens that can trigger an eczema flare up. An allergen-specific IgE-mediated response to a wide spectrum of food and inhalant allergens, especially house dust mite, pollen and plant-derived food allergens, has been described in adult AD patients (8). The aim of our study was to identify some differences in the occurrence of the sensitization to the molecular components in the group of 104 atopic dermatitis patients in relation to severity of AD and to the occurrence of bronchial asthma and allergic rhinitis.

According to our results, rPhl p 1 is a leading molecular component in patients suffering from severe form of AD as well as in subgroups of patients with AR and AB. However, the occurrence of rPhl p 1 was significantly more frequent only in patients with severe form of AD. The IgE response usually evolves from monosensitization to polysensitization, this phenomenon has been described as “molecular spreading”. rPhl p 1 (beta-expansin) is a presumable the “initiator” of the sensitization process in most patients. It is the major grass-specific allergen belongs to grass group 1. In addition, it is an essential diagnostic marker for allergic patients to establish “true sensitization” to grass pollen (timothy). In a few cases the grass pollen allergy might be evoke by isolated IgE sensitization to another major grass-specific allergen (e.g. rPhl p 5), but it is rather unlikely (34). nPhl p 4 is a minor grass-specific allergen, a highly glycosylated protein, that can bind to IgE specific

for cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) (5). High sensitization rate to nPhl p 4 was observed in our study in subgroup of patients with AR, but there was no evidence of significant difference in comparison to patients without AR. The major allergen of bermuda grass pollen is a nCyn d 1 from the beta-expansin family that is commonly found in subtropical regions but is not presented in our region (rarely in south Moravia) (9). Possible cross-reactivity with beta-expansins from other grasses, especially with the major allergen of timothy could be the explanation of higher occurrence of nCyn d 1 in subgroup of AR patients in our study. Sensitization to other components from the same pollen source usually come before the sensitization to panallergens (e.g. polcalcins and profilins) which are typically recognized at the late stage of molecular spreading (29, 42). Specific IgE to rPhl p 7 determine a relatively distinct category of grass pollen allergic patients, who may suffer from more severe symptoms, with a higher prevalence of bronchial asthma, and a higher frequency of other allergic comorbidities (34). In contrast to these findings, our subgroup of patients with bronchial asthma showed no positive results of sIgE against polcalcins rPhl p 7 and rBet v 4 ( $p < 0.05$ ).

Surprisingly, not negligible sensitization rate to component of olive rOle e 9 was observed more frequently in patients with severe form of AD and in subgroup of patients with AB; rOle e 9 (glucanase) is a major olive allergen which commonly cause sensitivity in geographical areas exposed to high levels of olive pollen (43). Moreover, rOle e 9 shares some common epitopes with glucanases from birch and ash pollens, tomato, potato, pepper, banana, and latex (44) that might be the explanation of higher sensitization rate to this component.

Our results pointed out that the sensitization to major components of mites in severe form of AD might be associated with the sensitization to major components of animals (rCan f 1, rCan f 5, rFel d 1, rFel d 4, rEqu c 1, nMus m 1) and minor components of moulds (rAlt a 6, rAsp f 6). Animals are the second most important source of indoor allergens after house dust mites (45). They are considered as risk factors for the development of allergic rhinitis and asthma (46). Numbers of dog, cat, and horse allergens have been described. Vast majority belongs to the protein families of uteroglobin, lipocalin and kallikrein. We observed the high sensitization rates to lipocalins and uteroglobins. Lipocalins represent the most important protein family, which are synthesized in salivary glands. Most of them are major animal allergens (rCan f 1, rFel d 4, rEqu c 1, nMus m 1). Can f 5, considered as a major dog allergen, is a prostatic kallikrein (arginine esterase) that is found only in male dogs (34, 47). Fel d 1, a major cat allergen, is a uteroglobin expressed in salivary glands and skin. The severity of induced symptoms varies widely and cat and dog allergy could be the principal risk factor of both rhinitis and asthma, associated with higher severity, which can develop into a life-threatening condition (45, 47). It is in an agreement with our results. House dust mites (HDM) belong to the most potent indoor allergen sources that are associated with allergic manifestations in the respiratory tract and the skin (37). The effect of mites on the human organism is complex because of mites can carry microbial and fungal

antigens, respectively pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), thus initiating mechanisms of innate immunity. The largest number of HDM molecules is known in the two most important species *Dermatophagoides (D.) farinae* and *D. pteronyssinus* (34). Their molecular components can be divided into groups according to protein families. Group 1 (cysteine proteases) includes the major molecular components of nDer f 1 and nDer p 1, which show 85% homology (35). Group 2 (NPC2 family) comprise the major components rDer f 2 and rDer p 2, which show up to 90% homology within the group (35). These allergens are assumed to be the specific components for mite allergy. The presence of sIgE to major molecular components nDer p 1, rDer p 2 (34) and Der p 23 (48), that are present in fecal particles of mites, has strong association with asthma. However, this is not in the concordance with our results. We recorded that the sensitization to group 2 allergens was significantly higher only in patients with severe form of AD (rDer f 2 and rDer p 2) and in subgroup of patients suffering from allergic rhinitis (rDer f 2). Recently identified Der p 11 is present predominantly in the muscle of HDM bodies that belong to the family of proteins known as paramyosins. Der p 11 seems to be a useful serological marker for HDM-allergic patients suffering from atopic dermatitis (37). Unfortunately, molecular components Der p 23 and Der p 11 are not included in the ISAC test, thus we cannot compare them with our results. A strong immunogenic potential of mite components may play a crucial role in the atopic march (49). Moreover, an impaired epidermal barrier is considered as the most important factor that elicit atopic march (50). The prevalence of mould sensitization displays wide geographical variability (34). Considering the sensitization to minor components rAsp f 6 (*Aspergillus fumigatus*, Mn superoxide dismutase) and rAlt a 6 (*Alternaria alternata*, enolase) were recorded with significantly higher occurrence in patients suffering from severe form of AD (rAsp f 6, rAlt a 6) and in subgroup of patients with bronchial asthma (rAlt a 6). Sensitization to *Alternaria (A.) alternata* is a risk factor to develop asthma (51). Furthermore, bronchial asthma is characterized by more persistent symptoms and enhanced disease severity. *A. alternata* is a widespread saprophyte that is usually found in outdoor, however, it can also occur in indoor environments. Moreover, sensitization to *A. alternata* seems to be a triggering factor in the development of poly-sensitization (52). Nevertheless, the clinical relevance of high level of specific IgE to *Alternaria* in patients with AD remains unclear (53). *Aspergillus (A.) fumigatus* is a mould permanently present in the indoor and outdoor environment (34). *Aspergillus* allergy is rare in atopic individuals without asthma or cystic fibrosis (54). Interestingly, the phylogenetically highly conserved allergens Asp f 6, Asp f 8, Asp f 11, Asp f 27, Asp f 28 and Asp f 29 show a high degree of cross-reactivity with other mould proteins belonging to the same families. The clinical relevance of these reactions remains elusive (34).

Bet v 1 homologous allergens (PR-10 like proteins) shows a highly cross-reactivity pattern. Birch (rBet v 1), followed by alder (rAln g 1) and hazel (rCor a 1.0101) constitute the most potent cause of tree pollen allergy (55). According to our result, there is no relation between the

subgroup of patients with AB and the sensitization to *Betulaceae*-specific components. The significantly higher occurrence of sensitization to PR-10 proteins was recorded to rApi g 1 (celery) in patients suffering from severe form of AD and to major components of tree-specific components, such as rBet v 1 (birch), rCor a 1.0101 (hazel), and pollen-food derived proteins like rMal d 1 (apple), rPru p 1 (peach), and rApi g 1 (celery) in subgroup of patients suffering from AR. These pollen-food derived PR-10 proteins mainly cause local manifestations of allergic reactions and may induce a variety of “pollen-food” syndromes (8). Results of sensitization profile in the subgroup of patients with AR suggest that AR patients are mostly sensitized to inhalant allergens (pollen or pollen-food derived PR-10) via the respiratory tract or digestive system. Röckmann et al. (8) demonstrated that sensitization to food-derived PR-10 allergens occurred most frequently in AD patients but there was no association between their presence and severity of AD. They recorded higher sensitization rate to rAra h 1 (peanut) and nBos d lactoferrin (cow’s milk) in patients with severe form of AD. We recorded in the higher frequency the presence of specific IgE to major food allergens of wheat (nTri a aA\_TI), egg white (nGal d 2), walnut (nJug r 2) and peanut (rAra h 1) but only in patients with severe form of AD. The outcome of our analysis could be influenced by the fact that some allergens showed zero frequencies of positive values which were particularly evident when we have compared mild, moderate and severe form of AD. The molecular component nTri a aA\_TI is a part of the ISAC assay and it is a trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitor of wheat grains. Its designation is not based on the official WHO/IUIS database ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)), but it names from Phadia. Peanut allergens are the most common trigger of food-induced anaphylaxis (34). rAra h 1 (7S globulin) is a thermostable seed storage protein whose allergenicity can be increased by roasting (34). nGal d 2 (ovalbumin), a major allergen, is the most abundant egg white protein. It is less heat-stable than ovomucoid (nGal d 1). IgE responses to Gal d 2 indicate a risk for clinically relevant reaction to raw or slightly heated egg (34, 56). nJug r 2, a highly glycosylated protein, has been identified as an important allergen in common walnut. Native vicilin-like protein nJug r 2 (7S globulin), can bind to IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs), and can also be raised in patients sensitized to CCDs (57). For this reason, the real clinical significance of a positive nJug r 2 result must be carefully evaluated in the context of the results of other components and clinical findings (5).

Food allergy to shellfish (crustaceans and molluscs) may cause cross-sensitization and clinical reactivity to house dust mites, insects and arachnids (34). Numbers of crustacean allergens have been described. Tropomyosin is a major shrimp allergen. Several others allergenic components have been identified (arginine kinase, myosin light chain and sarcoplasmic calcium binding protein) (34). Our result showed the higher occurrence of a minor shrimp allergen nPen m 2 (arginine kinase) in patients suffering from severe form of AD. Similar to tropomyosin, arginine kinase is highly abundant in invertebrate muscle, and up to now it has been described in various shellfish and other invertebrates such as mites, cockroaches, crab, shrimp,

and crayfish (58, 59). Unlike tropomyosins, they show ter-molabile properties (60).

Component-resolved diagnostics seems to be a promising tool for the diagnosis of food allergy, offering the potential to determine specific phenotypes and estimate the risk of immune response to a given allergen. Nevertheless, the diagnostic accuracy of these laboratory tests varies across studies. Therefore, their clinical utility remains unclear (61). The assessment of diagnostic accuracy (sensitivity, specificity) for certain food allergen components (ISAC test) will be the topic for our future research.

## CONCLUSIONS

Sensitization to following molecular components of grasses (rPhl p 1), trees (rOle e 9, rBet v 2), house dust mites (rDer f 2, rDer p 2), animals (rFel d 1, rFel d 4, rCan f 1, rCan f 5, rEqu c 1, nMus m 1), moulds (rAlt a 6, rAsp f 6), and foods (nTri a aA\_TI, nGal d 2, rAra h 1, nJug r 2, nPen m 2, rApi g 1) was significantly more frequent in patients with severe form of AD. In this regard, we recommend enrolling the assessment of the presence of specific IgE against these components into the clinical procedures and treatment of allergy patients with the special respect to the risk of development of severe reactions.

Typically, in subgroup of patients suffering from allergic rhinitis the significantly higher sensitization to molecular components, such as tree pollen (rBet v 1, rCor a 1.0101), grass pollen (rPhl p 5, rPhl p 6), house dust mites (rDer f 2), animals (rCan f 1, rFel d 4, rEqu c 1, nMus m 1), and foods (rMal d 1, rPru p 1, rApi g 1, nAct d 1) is recorded in our study. In patients with bronchial asthma the significantly higher sensitization to molecular components of grasses (rPhl p 2), trees (rOle e 9) and *Alternaria* (rAlt a 6) was recorded. These molecular components may play the important role in the atopic march in an individual patient.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Králové, programme PROGRES Q40/10.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Czarnowicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Novel concepts of prevention and treatment of atopic dermatitis through barrier and immune manipulations with implications for the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139(6): 1723–34.
- Paller AS, Spergel JM, Mina-Osorio P, Irvine AD. The atopic march and atopic multimorbidity: Many trajectories, many pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 143(1): 46–55.
- Zhu TH, Zhu TR, Tran KA, Sivamani RK, Shi VY. Epithelial barrier dysfunctions in atopic dermatitis: a skin-gut-lung model linking microbiome alteration and immune dysregulation. *Br J Dermatol* 2018; 179(3): 570–81.
- Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I. *Imunologie člověka*. In Hradec Králové: Garamon; 2016, p. 213–22.
- Ansotegui IJ, Melioli G, Walter G, et al. Open Access A WAO-ARIA-GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. *World Allergy Organ J* 2020; 13(2): 1–46.
- Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: Progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy, Asthma Immunol Res* 2011; 3(2): 67–73.
- He Y, Liu X, Huang Y, Zou Z, et al. Reduction of the number of major representative allergens: From clinical testing to 3-dimensional structures. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 1–11.
- Röckmann H, Van Geel MJ, Knulst AC, Huiskes J, Bruijnzeel-Koomen CAFM, De Bruin-Weller MS. Food allergen sensitization pattern in adults in relation to severity of atopic dermatitis. *Clin Transl Allergy* 2014; 4(1): 1–9.
- Panzner P, Vachová M, Vítovcová P, Brodská P, Vlas T. A comprehensive analysis of middle-european molecular sensitization profiles to pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2014; 164(1): 74–82.
- Patelis A, Borres MP, Kober A, Berthold M. Multiplex component-based allergen microarray in recent clinical studies. *Clin Exp Allergy* 2016; 46(8): 1022–32.
- Mothes-Luksch N, Jordakieva G, Hinterhölzl L, et al. Allergy diagnosis from symptoms to molecules, or from molecules to symptoms: A comparative clinical study. *World Allergy Organ J* 2018; 11(1): 22.
- Passalacqua G, Melioli G, Bonifazi F, et al. The additional values of microarray allergen assay in the management of polysensitized patients with respiratory allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2013; 68(8): 1029–33.
- Foong RX, Roberts G, Fox AT, Toit G. Pilot study: Assessing the clinical diagnosis of allergy in atopic children using a microarray assay in addition to skin prick testing and serum specific IgE. *Clin Mol Allergy* 2016; 14(1): 1–7.
- Choi J, Roh J, Lee J. Clinical Availability of Component-Resolved Diagnosis Using Microarray Technology in Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol* 2014; 26(4): 437–46.
- van Hage M, Hamsten C, Valenta R. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(4): 974–7.
- Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, et al. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem* 2011; 44(12): 1005–11.
- Wojciechowska M, Żbikowska-Gotz M, Marek-Józefowicz L, Przybyszewski M, Gocki J, Bartuzi Z. Allergic phenotypes in adult patients with atopic dermatitis, determined with the ISAC test (ImmunoCAP ISAC). *Postep Dermatologii i Alergol* 2018; 35(4): 351–9.
- Ott H, Fölster-Holst R, Merk HF, Baron JM. Allergen microarrays: A novel tool for high-resolution IgE profiling in adults with atopic dermatitis. *Eur J Dermatology* 2010; 20(1): 54–61.
- Hanifin JM, Rajla G. Diagnostic features of AD. Vol. 92, *Acta Dermatovener (Stockholm)*, 1980, p. 44–7.
- Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD Index (Consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis). *Dermatology* 1993; 186: 23–31.
- Oranje AP, Glazenburg EJ, Wolkerstorfer A, De Waard-Van Der Spek FB. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: The SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol* 2007; 157(4): 645–8.
- Martínez-Aranguren R, Lizaso MT, Goikoetxea MJ, et al. Is the determination of specific IgE against components using ISAC 112 a reproducible technique? *PLoS One* 2014; 9(2): 1–7.
- Jakob T, Forstenlechner P, Matricardi P, Kleine-Tebbe J. Molecular allergy diagnostics using multiplex assays: methodological and practical considerations for use in research and clinical routine. *Allergo J Int* 2015; 24: 320–32.
- Horimukai K, Morita K, Narita M, et al. Transepidermal water loss measurement during infancy can predict the subsequent development of atopic dermatitis regardless of filaggrin mutations. *Allergol Int* 2016; 65(1): 103–8.
- Dodig S, Čepelak I. The potential of component-resolved diagnosis in laboratory diagnostics of allergy. *Biochem Medica* 2018; 28(2): 1–9.
- Boyce JA. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126(6): 301–402.
- Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2014; 69(8): 1008–25.
- Prosperi MCF, Belgrave D, Buchan I, Simpson A, Custovic A. Challenges in interpreting allergen microarrays in relation to clinical symptoms: A machine learning approach. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25(1): 71–9.

29. Hatzler L, Panetta V, Lau S, et al. Molecular spreading and predictive value of preclinical IgE response to *Phleum pratense* in children with hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130(4): 894–901.
30. Williams P, Önell A, Baldracchini F, Hui V, Jolles S, El-Shanawany T. Evaluation of a novel automated allergy microarray platform compared with three other allergy test methods. *Clin Exp Immunol* 2016; 184(1): 1–10.
31. Huss-Marp J, Gutermuth J, Schäffner I, et al. Comparison of molecular and extract-based allergy diagnostics with multiplex and singleplex analysis. *Allergo J Int* 2015; 24(2): 46–53.
32. Ahlgrim C, Gutermuth J, Önell A, et al. Comparison of Molecular Multiplex and Singleplex Analysis of IgE to Grass Pollen Allergens in Untreated German Grass Pollen – Allergic Patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015; 25(3): 190–5.
33. Jung JH, Kang G, Kim TS. Comparison of Component-Resolved Diagnosis by Using Allergen Microarray With the Conventional Tests in Allergic Rhinitis Patients : The First Using in Korea. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2015; 8(4): 385–9.
34. Matricardi PM, Hoffmann HJ, Valenta R, et al. EAACI Molecular Allergy User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol* 2016; 27(23): 1–250.
35. Panzner P, Vachová M, Vlas T, Vítovcová P, Brodská P, Malý M. Cross-sectional study on sensitization to mite and cockroach allergen components in allergy patients in the Central European region. *Clin Transl Allergy* 2018; 8(19): 1–9.
36. Vachová M, Panzner P, Vlas T, Vítovcová P. Analysis of Sensitization Profiles in Central European Allergy Patients Focused on Animal Allergen Molecules. *Int Arch Allergy Immunol* 2020; 181(4): 278–84.
37. Banerjee S, Resch Y, Chen KW, et al. Der p 11 is a Major Allergen for House Dust Mite-Allergic Patients Suffering from Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2015; 135(1): 102–9.
38. Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. ISAC multiplex testing – results of examination in 100 patients suffering from atopic dermatitis. *Food Agric Immunol* 2020; 31(1): 1014–35.
39. Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, et al. Cluster analysis of molecular components in 100 patients suffering from atopic dermatitis according to the ISAC Multiplex testing. *Food Agric Immunol* 2020; 31(1): 810–31.
40. Čelakovská J, Bukač J, Vaňková R, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. Sensitisation to molecular components in patients with atopic dermatitis, relation to asthma bronchiale and allergic rhinitis. *Food Agric Immunol* 2020; 31(1): 600–29.
41. Vaňková R, Čelakovská J, Bukač J, Krčmová I, Krejsek J, Andrýs C. Využití multiplexového systému ImmunoCAP ISAC k určení senzibilizace na molekulární komponenty související se závažností atopické dermatitidy. *Čes-slov Derm*, in print.
42. Nicoló S, Braun T, Eder K, Berghaus A, Gröger M. Clinical Relevance of IgE to Profilin and/or Polcalcin in Pollen-Sensitized Patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2016; 169: 101–7.
43. Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, et al. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol Suppl* 2002; 57(71): 6–16.
44. Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Polo F, Rodrı R. 1,3- $\beta$ -glucanases as candidates in latex–pollen–vegetable food cross-reactivity. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 345–51.
45. Bonnet B, Messaoudi K, Jacomet F, et al. An update on molecular cat allergens: Fel d 1 and what else? Chapter 1: Fel d 1, the major cat allergen. *Allergy, Asthma Clin Immunol* 2018; 14(14): 1–9.
46. Konradsen JR, Fujisawa T, Hage M Van, Hedlin G. Current perspectives Allergy to furry animals: New insights, diagnostic approaches, and challenges. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(3): 616–25.
47. Obando SU, Domínguez JS. Clinical impact of molecular diagnosis in dog allergy. *Clin Transl Allergy* 2014; 4(Suppl 2): P52.
48. Celi G, Brusca I, Scala E, et al. House dust mite allergy in Italy—Diagnostic and clinical relevance of Der p 23 (and of minor allergens): A real-life, multicenter study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2019; 74(9): 1787–9.
49. Posa D, Perna S, Resch Y, et al. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139(2): 541–9.
50. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, et al. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergen sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(1): 214–9.
51. Feo Brito F, Alonso AM, Carnés J, et al. Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternata*-monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; 22(3): 154–9.
52. Gabriel MF, Postigo I, Tomaz CT, Martínez J. *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environ Int* 2016; 89–90: 71–80.
53. Vailes LD, Perzanowski MS, Wheatley LM, Platts-Mills TAE, Chapman MD. IgE and IgG antibody responses to recombinant Alt a 1 as a marker of sensitization to *Alternaria* in asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(12): 1891–5.
54. Cramer R, Blaser K. Allergy and immunity to fungal infections and colonization. *Eur Respir J* 2002; 19(1): 151–7.
55. Scala E, Cecchi L, Guerra C. Molecular Recognition Profiles and Clinical Patterns of PR-10 Sensitization in a Birch-Free Mediterranean Area. *Int Arch Allergy Immunol* 2017; 173: 138–46.
56. Petrosino MI, Scaparrotta A, Marcovecchio ML, et al. Usefulness of molecular diagnosis in egg allergic children. *Arch Med Sci* 2018; 14(1): 132–7.
57. Villalta D, Conte M, Asero R, Re M Da, Stella S. Isolated IgE reactivity to native walnut vicilin-like protein (nJug r 2) on ISAC™ microarray is due to cross-reactive carbohydrate epitopes. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(10): 1991–5.
58. Yu C-J, Lin Y-F, Chiang B-L, Chow L-P. Proteomics and Immunological Analysis of a Novel Shrimp Allergen, Pen m 2. *J Immunol* 2003; 170(1): 445–53.
59. Faber MA, Pascal M, Kharbouchi O El, et al. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy* 2017; 72: 842–8.
60. Lopata AL, Kleine-Tebbe J, Kamath SD. Allergens and molecular diagnostics of shellfish allergy. *Allergo J Int* 2016; 25(7): 210–8.
61. Kim JF, McCreary N, Nwaru BI, Stoddart A, Sheikh A. Diagnostic accuracy, risk assessment, and cost-effectiveness of component-resolved diagnostics for food allergy: A systematic review. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2018; 73: 1609–21.



**8.4 Práce č. X: Cluster analysis of molecular components in 100 patients suffering from atopic dermatitis according to the ISAC Multiplex testing**

# Cluster analysis of molecular components in 100 patients suffering from atopic dermatitis according to the ISAC Multiplex testing

J. Čelakovská<sup>a</sup>, J. Bukač<sup>b</sup>, R. Vaňková<sup>c</sup>, E. Cermakova<sup>b</sup>, I. Krcmova<sup>c</sup>, J. Krejsek<sup>c</sup> and C. Andrýs<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Dermatology and Venereology, Faculty Hospital and Medical Faculty of Charles University, Hradec Králové, Czech Republic; <sup>b</sup>Department of Medical Biophysics, Medical Faculty of Charles University, Hradec Králové, Czech republic; <sup>c</sup>Department of Clinical Immunology and Allergy, Faculty Hospital and Medical Faculty of Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

## ABSTRACT

**Aim:** The cluster analysis for the evaluation of the results in Multiplex ISAC test in atopic dermatitis patients. **Method:** The complete dermatological and allergological examination including the examination of the sensitisation to molecular components with Multiplex ISAC testing was performed. The cluster analysis of molecular components (silhouette value) was processed. **Results and conclusion:** Altogether 100 atopic dermatitis patients were examined - 48 men, 52 women, the average age 40.9 years. We found 10 clusters with different numbers of molecular components. Fundamental position have the components Phl p 1 (Timothy), Bet v 1 (Birch), Alt a 1 (Alternaria) followed by molecular components of NPC2 family, cystein proteasa, tropomyosin, uteroglobin, lipocalin and PR-10 protein. Our results correspond to the association of molecular components into protein families according to their biochemical structure.

## ARTICLE HISTORY

Received 2 April 2020  
Accepted 21 May 2020

## KEYWORDS

Atopic dermatitis; molecular components; multiplex ISAC testing; protein families; biochemical structure; cluster analysis - silhouette

## Introduction

Diagnostic work – up for IgE mediated allergic reactions starts with the history, followed by sensitisation tests (skin, IgE and basophil tests) and optional challenge tests (Top – down approach). Molecular allergens for IgE testing provide additional information, particularly in polysensitized patients and with allergens of low abundance, low stability or associated risks. IgE reactivity to members of the same allergen family reflect the degree of protein homology and IgE cross – reactivity. If it is high, the relevance needs to be sorted out clinically. In case it is low, selected IgE testing of other family members can provide additional information. Proper interpretation should complete diagnostic testing. Positive sensitisations to allergen extracts or molecules are only clinically relevant in case of corresponding symptoms (Matricardi et al., 2016). Testing with molecular components is a part of the development of novel allergy vaccines and identification of non-

**CONTACT** J. Čelakovská  jarmila.celakovska@seznam.cz  Department of Dermatology and Venereology, Faculty Hospital and Medical Faculty of Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor and Francis Group, LLC

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

allergenic isoforms (Matricardi et al., 2016). The introduction of allergen molecules has had a major effect on analytic specificity and allergy diagnosis. They are used in both singleplex ImmunoCAP and multiplex ImmunoCAP ISAC assays. The major advantage of ISAC is the comprehensive IgE pattern obtained with a minute amount of serum (van Hage et al., 2017). ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher), based on 112 different molecular components (both extracted and recombinant), is the most studied and most frequently used molecular diagnostic tool based on a microarray (Melioli et al., 2011). The usefulness of ImmunoCAP ISAC has been validated in a wide spectrum of allergic diseases like asthma, allergic rhinoconjunctivitis, atopic dermatitis, eosinophilic esophagitis, food allergy and anaphylaxis. ISAC provides a broad picture of a patient's sensitization profile from a single test, and provides information on specific and cross-reactive sensitizations that facilitate diagnosis, risk assessment, and disease management. Furthermore, it can reveal unexpected sensitizations which may explain anaphylaxis previously categorized as idiopathic and also display for the moment clinically non-relevant sensitizations. ISAC can facilitate a better selection of relevant allergens for immunotherapy compared with extract testing. Microarray technique can visualize the allergic march and molecular spreading in the preclinical stages of allergic diseases, and may indicate that the likelihood of developing symptomatic allergy is associated with specific profiles of sensitization to allergen components. ISAC is shown to be a useful tool in routine allergy diagnostics due to its ability to improve risk assessment, to better select relevant allergens for immunotherapy as well as detecting unknown sensitization. Multiplex component testing is especially suitable for patients with complex symptomatology (Melioli et al., 2011).

Proteins that are described worldwide as allergens can be classified roughly into 30–40 protein families. Based on their molecular, biologic and biochemical properties, allergenic proteins are able to initiate both innate and adaptive immune responses during the sensitisation process that ultimately result in the production of allergen – specific IgE. The most important families and selected allergenic member proteins are shown in Table 1.

The list of the molecular components in ImmunoCAP ISAC (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden) sorted by protein group is recorded in Table 2. We distinguish these superfamilies: Prolamin (family Cereal prolamins, Bifunctional inhibitors,

**Table 1.** The most important allergen superfamilies and families with their corresponding sources (Matricardi et al., 2016).

Superfamily	Family	Sources
Prolamin	cereal prolamin	grains of cereal grasses
	bifunctional inhibitors	grains of cereal grasses
	2Salbumin	tree nuts, peanuts, legumes, seeds
	non specific lipid transfer protein	fruits, tree nuts, peanuts, vegetables, tree and weed pollen, latex
EF hand	polcalcins	tree, grass and weed pollen
	parvalbumins	fish
Profilin like	Profilin	tree, grass and weed pollen, fruits, vegetables, latex
Tropomyosin like	Tropomyosin	crustaceans, mollusk, fish parasite Anisakis, mites, cockroaches
Cupin	Vicilins	tree nuts, peanuts, legumes, seeds
	Legumins	tree nuts, peanuts, legumes, seeds
Bet v 1 like	Bet v 1	fagales tree pollen, fruits, vegetables, legumes, tree nuts
Calycin	Lipocalcins	mammals, mites, cockroaches
Double –psi – beta –barrel	DPBB1	grass pollen
	Pollen aller 1	grass pollen

**Table 2.** The list of the molecular components sorted by protein group. (ImmunoCAP ISAC - Phadia, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden).

Allergen Source	Molecular component	Protein Group
<b>Food components</b>		
Egg white	nGal d 1	Ovomucoid
	nGal d 2	Ovalbumin
Egg yolk/ chicken meat	nGal d 3	Conalbumin/ Ovotransferrin
	nGal d 5	Livetin/Serum albumin
Cow's milk	nBos d 4	Alpha-lactalbumin
	nBos d 5	Beta-lactoglobulin
	nBos d 8	Casein
	nBos d lactoferrin	Transferrin
Cod	rGad c 1	Parvalbumin
Shrimp	nPen m 2	Arginine kinase
	nPen m 4	Sarcoplasmic calcium binding protein
Cashew nut	rAna o 2	Storage protein, 11S globulin
Brazil nut	rBer e 1	Storage protein, 2S albumin
Hazelnut	nCor a 9	Storage protein, 11S globulin
Walnut	rJug r 1	Storage protein, 2S albumin
	nJug r 2	Storage protein, 7S globulin
Sesame seed	nSes i 1	Storage protein, 2S albumin
Peanut	rAra h 1	Storage protein, 7S globulin
	rAra h 2	Storage protein, 2S albumin
	rAra h 3	Storage protein, 11S globulin
	nAra h 6	Storage protein, 2S albumin
Soybean	nGly m 5	Storage protein, Beta-conglycinin
Buckwheat	nGly m 6	Storage protein, Glycinin
	nFag e 2	Storage protein, 2S albumin
Wheat	rTri a 14	Lipid transfer protein (nsLTP)
	rTri a 19.0101	Omega-5 gliadin
	nTri a aA_TI	Alpha-amylase/ Trypsin inhibitor
	nAct d 1	Cysteine protease
Kiwi	nAct d 5	Kiwellingin
<b>Aeroallergen components</b>		
<b>Grass pollen</b>		
Bermuda grass	nCyn d 1	Grass group 1
Timothy grass	rPhl p 1	Grass group 1
	rPhl p 2	Grass group 2
	nPhl p 4	Berberine bridge enzyme
	rPhl p 5	Grass group 5
	rPhl p 6	Grass group 6
	rPhl p 11	Ole e 1-related protein
<b>Tree pollen</b>		
Birch	rBet v 1	PR-10 protein
Japanese cedar	nCry j 1	Pectate lyase
Cypress	nCup a 1	Pectate lyase
Olive pollen	rOle e 1	Common olive group 1
	rOle e 9	Beta-1,3-glucanase
Plane tree	rPla a 1	Putative invertase inhibitor
	nPla a 2	Polygalacturonase
<b>Weed pollen</b>		
Ragweed	nAmb a 1	Pectate lyase
Mugwort	nArt v 1	Defensin
Goosefoot	rChe a 1	Ole e 1-related protein
Wall pellitory	rPar j 2	Lipid transfer protein (nsLTP)
Plantain	rPla l 1	Ole e 1-related protein
Saltwort	nSal k 1	Pectin methylesterase
<b>Animal</b>		
Dog	rCan f 1	Lipocalin
	rCan f 2	Lipocalin
	rCan f 5	Arginine esterase
Horse	rEqu c 1	Lipocalin
Cat	rFel d 1	Uteroglobulin

(Continued)

**Table 2.** Continued.

Allergen Source	Molecular component	Protein Group
Mouse	rFel d 4	Lipocalin
<b>Mold</b>	nMus m 1	Lipocalin
Alternaria	rAlt a 1	Acidic glycoprotein
Aspergillus	rAlt a 6	Enolase
	rAsp f 1	Mitogillin family
	rAsp f 3	Peroxisomal protein
	rAsp f 6	Mn superoxide dismutase
Cladosporium	rCla h 8	Mannitol dehydrogenase
<b>Mite</b>		
House dust mite	rBlo t 5	Mite group 5
	nDer f 1	Cysteine protease
	rDer f 2	NPC2 protease
	nDer p 1	Cysteine protease
	rDer p 2	NPC2 family
Storage mite	rLep d 2	NPC2 family
<b>Cockroach</b>		
Cockroach	rBla g 1	Cockroach group 1
	rBla g 2	Aspartic protease
	rBla g 5	Glutathione S-transferase
<b>Other components</b>		
<b>Venom</b>		
Honey bee venom	rApi m 1	Phospholipase A2
	nApi m 4	Melittin
Paper wasp venom	rPol d 5	Venom, Antigen 5
Common wasp venom	rVes v 5	Venom, Antigen 5
<b>Parasite</b>		
Anisakis	rAni s 1	Serine protease inhibitor
<b>Latex</b>		
Latex	rHev b 1	Rubber elongation factor
	rHev b 3	Small rubber particle protein
	rHev b 5	Acidic protein
	rHev b 6.01	Prohevein
<b>Cross-reactive components</b>		
<b>Serum albumin</b>		
Cow's milk/meat	nBos d 6	Serum albumin
Dog	nCan f 3	Serum albumin
Horse	nEqu c 3	Serum albumin
Cat	nFel d 2	Serum albumin
<b>Tropomyosin</b>		
Anisakis	rAni s 3	Tropomyosin
Cockroach	nBla g 7	Tropomyosin
House dust mite	rDer p 10	Tropomyosin
Shrimp	nPen m 1	Tropomyosin
<b>Lipid transfer protein (nsLTP)</b>		
Peanut	rAra h 9	Lipid transfer protein (nsLTP)
Hazelnut	rCor a 8	Lipid transfer protein (nsLTP)
Walnut	nJug r 3	Lipid transfer protein (nsLTP)
Peach	rPru p 3	Lipid transfer protein (nsLTP)
Mugwort	nArt v 3	Lipid transfer protein (nsLTP)
Olive pollen	nOle e 7	Lipid transfer protein (nsLTP)
Plane tree	rPla a 3	Lipid transfer protein (nsLTP)
<b>PR-10 protein</b>		
Birch	rBet v 1	PR-10 protein
Alder	rAln g 1	PR-10 protein
Hazel pollen	rCor a 1.0101	PR-10 protein
Hazelnut	rCor a 1.0401	PR-10 protein
Apple	rMal d 1	PR-10 protein
Peach	rPru p 1	PR-10 protein
Soybean	rGly m 4	PR-10 protein
Peanut	rAra h 8	PR-10 protein

(Continued)

**Table 2.** Continued.

Allergen Source	Molecular component	Protein Group
Kiwi	rAct d 8	PR-10 protein
Celery	rApi g 1	PR-10 protein
<b>Thaumatine-like protein</b>		
Kiwi	nAct d 2	Thaumatine-like protein
<b>Profilin</b>		
Birch	rBet v 2	Profilin
Latex	rHev b 8	Profilin
Annual mercury	rMer a 1	Profilin
Timothy grass	rPhl p 12	Profilin
<b>CCD</b>		
Sugar epitope from Bromelain	nMUXF3	Cross-reactive Carbohydrate Determinants
<b>Polcalcin (Calcium binding 2-EF-hand protein)</b>		
Birch	rBet v 4	Polcalcin
Timothy grass	rPhl p 7	Polcalcin

2S albumin, Non – specific lipid – transfer proteins), EF hand (family Polcalcins, Parvalbumins), Profilin like (family profilin), Tropomyosin like (family Tropomyosin), Cupin (family Vicilins and Legumins), Bet v 1 – like (family Bet v 1), Calycin (family Lipocalins) and Double – psi beta – barrel (family DPBB and Pollen allergy). The families of highly cross-reactive molecules taken into consideration are as follows: profilins, PR-10-like molecules, nsLTP, serum albumins, tropomyosins, polcalcins, lipocalins, and parvalbumins (Matricardi et al., 2016; Nicolaou et al., 2010; Vieths et al., 2002).

The aim of our study is to evaluate the results of examination with Multiplex ImmunoCAP ISAC in atopic dermatitis according to the Cluster analysis. This statistic method is commonly used to group similar samples across a diverse range of applications. Typically, the goal of clustering is to form groups of samples that are more similar to each other than to samples in other groups (Frades & Matthiesen, 2010). Silhouette width is a widely used index for assessing the fit of individual objects in the classification, as well as the quality of clusters and the entire classification (Frades & Matthiesen, 2010). In our study, we evaluate if these results correspond to the association of molecular components into protein families according to their biochemical structure. Our results can demonstrate the importance of molecular components in atopic dermatitis patients.

### **Patients and methods**

In the period 2018–2019, 100 patients suffering from atopic dermatitis were examined. All these patients were examined in the Department of Dermatology, Faculty Hospital Hradec Králové, Charles University, Czech republic. The diagnosis of atopic dermatitis was made with the Hanifin-Rajka criteria (Hanifin & Rajka, 1980). Exclusion criteria were long term therapy with cyclosporin or systemic corticoids, pregnancy, breastfeeding. Patients with atopic dermatitis having other systemic diseases were excluded from the study as well. Complete dermatological and allergological examination was performed in patients included in the study. This study was approved by Ethics committee of Faculty Hospital Hradec Králové, Charles University of Prague, Czech Republic.

### ***Examination of specific IgE to molecular components***

The serum level of the sIgE was measured by the component-resolved diagnosis microarray-based sIgE detection assay ImmunoCAP ISAC (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden). ImmunoCAP ISAC is a solid-phase multiple immunoassay which enables to determine 112 different components from 51 allergen sources (Jakob et al., 2015). The allergens are applied in triplicates to ensure the test reproducibility. The specific IgE values are presented in arbitrary units called ISAC Standardized Units (measuring range of 0.3 - 100 ISU-E). The level of specific IgE higher than 0.3 ISU-E was assessed as positive. The level of molecular components was evaluated in ISU -E: < 0.3 - negative, 0.3- >0.9 low positivity, 0.9 > 15 moderate positivity,  $\geq 15$  ISU -E very high positivity (Choi et al., 2014; Jakob et al., 2015).

### **Statistic**

We analysed the data to determine 10 clusters with molecular components according to the positivity to molecular components and to their level of specific IgE. The level of molecular components in ISU -E was evaluated: < 0.3 - negative, 0.3-0.9 ISU -E low positivity, 0.9-15 ISU -E moderate positivity, above 15 ISU -E very high positivity. This statistic method for the evaluation of results was used: Clustering by Medoid Partitioning, Method: Kaufman-Rousseeuw, Objective Function: Silhouette, Distance Type: Euclidean, Scale Type: Standard Deviation. Molecular components are ordinal variables (Kaufman & Rousseeuw, 1990; Rousseeuw, 1987).

### ***Interpreting silhouettes***

A silhouette value is constructed for each object. The value can range from minus one to one. It measures how well an object has been classified by comparing its dissimilarity within its cluster to its dissimilarity with its nearest neighbour. When  $s$  is close to one, the object is well classified. Its dissimilarity with other objects in its cluster is much less than its dissimilarity with objects in the nearest cluster. When  $s$  is near zero, the object was just between clusters  $A$  and  $B$ . It was arbitrarily assigned to  $A$ . When  $s$  is close to negative one, the object is poorly classified. Its dissimilarity with other objects in its cluster is much greater than its dissimilarity with objects in the nearest cluster. Why isn't it in the neighbouring cluster? Hence, the silhouette value summarizes how appropriate each object's cluster is.

### ***Determining the number of clusters***

One useful summary statistic is the average value of  $s$  across all objects. This summarizes how well the current configuration fits the data. An easy way to select the appropriate number of clusters is to choose that number of clusters which maximizes the average silhouette. We denote the maximum average silhouette across all values of  $k$  as  $SC$ . Kaufman and Rousseeuw (Kaufman & Rousseeuw, 1990) present the following table to aid in the interpretation of  $SC$ . We evaluated our data according to this table, it is shown in Table 3.

**Table 3.** Cluster analysis - Proposed Interpretation (Kaufman & Rousseeuw, 1990).

Cluster average – Silhouette value	Interpretation
0.71–1.00	A strong structure has been found
0.51–0.70	A reasonable structure has been found
0.26–0.50	The structure is weak and could be artificial.
–1–0.25	No substantial structure has been found

## Results

### Patients

Altogether 112 different components from 51 allergen sources were examined in 100 atopic dermatitis patients included in the study (48 men and 52 women with the average age 40.9 years and with the average SCORAD 39, s.d.13.1 points). The mild form of AD was recorded in 14 patients (14%), moderate form in 58 patients (58%), severe form in 28 patients (28%). In the included patients, 55 patients (55%) suffer from asthma bronchiale and 78 patients (78%) suffer from rhinitis. The positive results in sensitisation to molecular components was recorded in 93 patients (93%). The characteristics of patients is shown in Table 4.

We found 10 clusters with different numbers of molecular components.

The results of ISAC Multiplex testing evaluated by Clustering by Medoid Partitioning Report are shown in Table 5. We show the average of Silhouette Value: **Cluster 1:** Phlp 1 (Silhouette Value 0.000), **Cluster 2:** Phl p 4 (Silhouette Value 0.000), **Cluster 3:** Phl p 2, 5, 6, Cyn d 1 (Silhouette Value 0.1278), **Cluster 4:** Bet v 1 (Silhouette Value 0.000), **Cluster 5:** Alt a 1 (Silhouette Value 0.000), **Cluster 6:** Der f 2, Der p 2, Der p 1, Der f 1 (Silhouette Value 0.4167), **Cluster 7:** Pen m 2, Mus m 1, Lep d 2, Can f 5, Phl p 11, Pen m 1, Bla g 7, Der p 10, Ole e 1, Blot 5, Ani s 3 (Silhouette Value - 0.0893). **Cluster 8:** Can f 1, Fel d 1, Fel d 4, Equ c 1 (Silhouette Value - 0.0357), **Cluster 9:** Pru p 1, Cor a 1.010, Mal d 1, Aln g 1, Cor a 1.040 (Silhouette Value 0.3692). **Cluster 10:** 82 molecular components in ISAC multiplex testing (Silhouette Value 0.3743). Groups of 10 Clusters of molecular components with their biochemical name, protein family and allergen source and number of patients with positive results to molecular components are recorded in Table 6.

## Discussion

The sense of our study was to evaluate the results of examination of molecular components with ISAC Multiplex testing in atopic dermatitis patients with the use of the Clustering

**Table 4.** The characteristic of patients with atopic dermatitis

- 100 patients examined – 48 men, 52 women, the average age 40.9 years
- the average SCORAD 39 s.d. 13.1 points
- the positive results in sensitisation to molecular components - 93 patients (93%)
- mild form of AD patients 14 (14%)
- moderate form of AD patients 58 (58%)
- severe form of Ad patients 28 (28%)
- number of patients with asthma bronchiale – 55 (55%)
- number of patients with allergic rhinitis - 78 (78%)



**Table 5.** Results of ISAC Multiplex testing evaluated by Clustering by Medoid Partitioning Report. There are 10 clusters. Cluster average is shown extra bold.

Row Detail Section						
Row	Cluster	Nearest Neighbor	Average Distance Within	Average Distance Neighbor	Silhouette Value	Silhouette Bar
rPhlp1	1	3	0.00	74.59	0.0000	
<b>Cluster Average</b>	<b>1</b>	<b>(1)</b>	<b>0.00</b>	<b>74.59</b>	<b>0.0000</b>	
nPhlp4	2	3	0.00	74.62	0.0000	
<b>Cluster Average</b>	<b>2</b>	<b>(1)</b>	<b>0.00</b>	<b>74.62</b>	<b>0.0000</b>	
Phlp5	3	9	53.09	69.49	0.2360	
Phlp6	3	10	48.22	59.64	0.1916	
Cynd1	3	9	58.66	64.85	0.0954	
rPhlp2	3	9	56.77	56.10	-0.0118	
<b>Cluster Average</b>	<b>3</b>	<b>(4)</b>	<b>54.19</b>	<b>62.52</b>	<b>0.1278</b>	
Betv 1	4	9	0.00	67.67	0.0000	
<b>Cluster Average</b>	<b>4</b>	<b>(1)</b>	<b>0.00</b>	<b>67.67</b>	<b>0.0000</b>	
Alta1	5	10	0.00	69.05	0.0000	
<b>Cluster Average</b>	<b>5</b>	<b>(1)</b>	<b>0.00</b>	<b>69.05</b>	<b>0.0000</b>	
Derf2	6	9	35.94	69.38	0.4820	
Derp2	6	9	37.22	70.83	0.4745	
Derp1	6	7	43.28	68.43	0.3676	
Derf1	6	7	38.00	57.81	0.3427	
<b>Cluster Average</b>	<b>6</b>	<b>(4)</b>	<b>38.61</b>	<b>66.61</b>	<b>0.4167</b>	
Penm2	7	10	46.75	47.46	0.0151	
Musm1	7	10	45.67	45.26	-0.0088	
Lepd2	7	10	37.32	35.99	-0.0356	
Canf5	7	10	48.96	47.18	-0.0363	
Phlp11	7	10	44.86	43.18	-0.0373	
Penm1	7	10	28.14	24.81	-0.1184	
Blag7	7	10	27.17	23.85	-0.1221	
Derp10	7	10	27.17	23.85	-0.1221	
Olee1	7	10	39.58	34.51	-0.1279	
Blot5	7	10	34.58	29.55	-0.1455	
Anis 3	7	10	28.46	21.54	-0.2431	
<b>Cluster Average</b>	<b>7</b>	<b>(11)</b>	<b>37.15</b>	<b>34.29</b>	<b>-0.0893</b>	
Canf1	8	10	64.71	68.78	0.0591	
Feld1	8	3	62.72	65.55	0.0432	
Feld4	8	10	49.20	44.46	-0.0964	
Equc1	8	10	51.63	43.94	-0.1488	
<b>Cluster Average</b>	<b>8</b>	<b>(4)</b>	<b>57.06</b>	<b>55.68</b>	<b>-0.0357</b>	
Prup1	9	10	28.47	53.32	0.4660	
Cora1.010	9	10	30.61	54.65	0.4400	
Mald1	9	10	32.84	58.47	0.4384	
Alng1	9	10	31.69	55.45	0.4285	
Cora1.040	9	10	34.56	56.22	0.3853	
Arah8	9	10	30.56	47.70	0.3593	
Glym4	9	10	36.30	38.90	0.0668	
<b>Cluster Average</b>	<b>9</b>	<b>(7)</b>	<b>32.15</b>	<b>52.10</b>	<b>0.3692</b>	
Fage2	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Plaa1	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Bosd4	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Alng4	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Apim4	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Actd5	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Pla1	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Bere1	10	7	14.70	31.00	0.5260	
rhevb602	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Lolp1	10	7	14.70	31.00	0.5260	
TriaGliad	10	7	14.70	31.00	0.5260	
Cora9	10	7	15.17	30.99	0.5106	
Bosd5	10	7	15.19	31.00	0.5102	

(Continued)

**Table 5.** Continued.

Row Detail Section						
Row	Cluster	Nearest Neighbor	Average Distance Within	Average Distance Neighbor	Silhouette Value	Silhouette Bar
Blag1	10	7	15.28	31.02	0.5075	
Olee7	10	7	15.64	31.38	0.5017	
Glym5	10	7	15.39	30.58	0.4965	
Tria14	10	7	15.83	31.15	0.4920	
Blag5	10	7	16.08	31.27	0.4857	
Bosd	10	7	16.18	31.41	0.4848	
Hevb3	10	7	16.60	31.57	0.4741	
Bosd6	10	7	16.78	31.75	0.4714	
Glym6	10	7	16.85	31.55	0.4661	
Phlp12	10	7	17.13	31.91	0.4632	
Apim1	10	7	16.55	30.80	0.4626	
TriaaA	10	7	16.67	30.84	0.4596	
Arah6	10	7	17.24	31.68	0.4558	
Salk 1	10	7	16.69	30.58	0.4541	
Gald5	10	7	17.73	31.93	0.4448	
Hevb1	10	7	17.68	31.73	0.4430	
Bosd8	10	7	18.00	32.23	0.4415	
Equc3	10	7	18.21	32.29	0.4360	
Blag2	10	7	18.10	32.00	0.4342	
Hevb5	10	7	18.42	32.45	0.4322	
Anis 1	10	7	17.33	30.52	0.4321	
Clah8	10	7	17.75	31.01	0.4276	
Sesi1	10	7	18.89	32.48	0.4184	
Penm4	10	7	17.77	30.50	0.4175	
Cora8	10	7	19.85	33.77	0.4122	
gald2	10	7	19.65	33.22	0.4084	
Arah2	10	7	19.78	32.81	0.3969	
Arah3	10	7	19.91	32.96	0.3961	
Plaa3	10	7	20.84	34.51	0.3961	
Arah1	10	7	19.97	32.65	0.3883	
Gald1	10	7	19.39	31.46	0.3837	
Artv 3	10	7	20.88	33.71	0.3807	
Hevb6.01	10	7	20.85	33.32	0.3743	
Jugr3	10	7	21.90	34.91	0.3726	
Arah9	10	7	21.44	34.17	0.3725	
Aspf1	10	7	19.39	30.89	0.3724	
Pold5	10	7	20.82	33.17	0.3722	
Jugr1	10	7	21.29	33.88	0.3715	
Prup3	10	7	22.23	34.51	0.3560	
Parj2	10	7	21.09	32.74	0.3560	
Feld2	10	7	21.32	32.65	0.3472	
Gald3	10	7	21.31	32.17	0.3377	
Canf3	10	7	21.82	32.89	0.3366	
Gadc1	10	7	22.21	33.16	0.3302	
Olee9	10	7	23.96	35.12	0.3178	
Betv 4	10	7	23.24	33.77	0.3118	
Vesv 5	10	7	23.68	34.20	0.3077	
Aspf3	10	7	21.71	31.31	0.3065	
Betv2	10	7	24.30	34.79	0.3017	
Actd1	10	7	24.03	34.35	0.3005	
Jugr2	10	7	22.89	32.50	0.2958	
Anao2	10	7	27.31	37.49	0.2715	
Mera1	10	7	26.40	35.94	0.2654	
Cryj1	10	7	24.66	33.01	0.2530	
Cupa1	10	7	25.67	34.32	0.2521	
Actd8	10	7	29.74	37.96	0.2165	
Phlp7	10	7	26.86	34.18	0.2141	

(Continued)

**Table 5.** Continued.

Row	Cluster	Row Detail Section				
		Nearest Neighbor	Average Distance Within	Average Distance Neighbor	Silhouette Value	Silhouette Bar
Chea1	10	7	28.64	36.14	0.2074	
Alta6	10	7	31.07	39.18	0.2069	
Apig1	10	7	31.64	39.74	0.2037	
Hevb8	10	7	35.18	43.19	0.1856	
MUXF3	10	7	29.71	36.11	0.1771	
Amba1	10	7	41.61	49.24	0.1550	
Plaa2	10	7	32.62	38.12	0.1442	
Plal1	10	7	41.95	48.63	0.1373	
Actd2	10	7	43.67	50.11	0.1285	
Aspf6	10	7	45.31	50.68	0.1060	
Canf2	10	7	41.26	45.96	0.1024	
Artv 1	10	7	61.00	64.60	0.0559	
<b>Cluster Average</b>	<b>10</b>	<b>(82)</b>	<b>22.01</b>	<b>34.29</b>	<b>0.3743</b>	
Overall Average		(116)	26.19	39.47	0.2960	= SC

analysis. It needs to be emphasized that in this paper we focus only on sensitization rates and not their clinical relevance without using specific provocation tests.

The clustering problem has been addressed in many contexts and disciplines. Cluster analysis encompasses different methods and algorithms for grouping objects of similar kinds into respective categories. Clustering techniques are widely used in the analysis of large datasets to group together samples with similar properties. There are many algorithms for performing clustering, and the results can vary substantially (Rousseeuw, 1987). At our study each cluster is represented by a so-called silhouette, which is based on the comparison of its tightness and separation. This silhouette shows which objects he well within their cluster, and which ones are merely somewhere in between clusters. The entire clustering is displayed by combining the silhouettes into a single plot, allowing an appreciation of the relative quality of the clusters and an overview of the data configuration. The average silhouette width provides an evaluation of clustering validity. Silhouette width is a widely used index for assessing the fit of individual objects in the classification, as well as the quality of clusters and the entire classification. Silhouette combines two clustering criteria, compactness and separation, which imply that spherical cluster shapes are preferred over others—a property that can be seen as a disadvantage in the presence of complex, nonspherical clusters, which is common in real situations (Rousseeuw, 1987).

We did not find similar studies dealing with this question in adolescents and adults suffering from atopic dermatitis according to the databates in Medline, Pubmed, and Web of Science.

Our results confirme the fundamental and exceptional position of the components such as Phl p 1, Bet v 1, Alt a 1 – these components were recorded as a principal components without any other components in the separated clusters. The intersting cluster is Cluster No. 4 with the single component of Phl p 4. Important role play also the molecular components of NPC2 family (Niemann-Pick disease type C2), cystein proteasa, tropomyosin, uteroglobin, lipocalin and PR-10 proteins.

The single molecular component Phl p 1 was recorded in Cluster 1. Sensitization to Phl p 1 usually precedes sensitization to other grass pollen allergen and is the most prevalent

**Table 6.** Results of Multiplex ISAC testing - molecular components in 10 clusters with their biochemical name, protein family and allergen source, number of patients with positive results to molecular components. Examination in 100 patients (= 100%).

Cluster	Molecular components	Biochemical name, protein family	Allergen	Biological function	Number of patients with positive results in %
Cluster 1	Phl p 1	Beta-expansin	Timothy	Expansins	61%
Cluster 2	Phl p 4	Berberine bridge enzymes, CCD-bearing protein	Timothy	Berberine bridge enzymes	52%
Cluster 3	Phl p 5	Grass group 5	Timothy	Ribonucleases	43%
	Phl p 6	Grass group 6	Timothy	unknown	42%
	Phl p 2	Grass group 2	Timothy	unknown	39%
	Cyn d 1	Beta-expansin CCD-bearing protein	Bermuda grass	Expansins	49%
Cluster 4	Bet v 1	PR-10 protein	Birch	Ribonucleases	57%
Cluster 5	Alt a 1	Alt a 1-related protein	Alternaria	unknown	29%
Cluster 6	Der f 2	NPC2 family	House dust mite	NPC2 family	45%
	Der p 2	NPC2 family	House dust mite	NPC2 family	46%
Cluster 7	Der p 1	Cysteine protease	House dust mite	Cysteine proteases	36%
	Der f 1	Cysteine protease	House dust mite	Cysteine proteases	34%
	Pen m 2	Arginine kinase	Shrimp	Arginine kinases	22%
	Mus m 1	Lipocalin	Mouse	Lipocalins	20%
	Lep d 2	NPC2 family	Storage mite	NPC2 family	13%
	Can f 5	Arginine esterase	Dog	Arginine esterases	26%
	Phl p 11	Ole e 1-related protein	Timothy	Trypsin inhibitors	20%
	Pen m 1	Tropomyosin	Shrimp	Muscle contraction proteins	8%
	Bla g 7	Tropomyosin	Cockroach	Muscle contraction proteins	5%
	Der p 10	Tropomyosin	House dust mite	Muscle contraction proteins	5%
Ole e 1	Commom olive group 1	Olive	Trypsin inhibitors	14%	
Blo t 5	Mites group 5/21	House dust mite	unknown	9%	
Ani s 3	Tropomyosin	Anisakis	Muscle contraction proteins	4%	
Cluster 8	Can f 1	Lipocalin	Dog	Lipocalins	39%
	Fel d 1	Uteroglobin	Cat	Uteroglobins	42%
	Fel d 4	Lipocalin	Cat	Lipocalins	29%
	Equ c 1	Lipocalin	Horse	Lipocalins	27%
Cluster 9	Pru p 1	PR-10 protein	Peach	Ribonucleases	46%
	Cor a 1.0101	PR-10 protein	Hazel pollen	Ribonucleases	45%
	Mal d 1	PR-10 protein	Apple	Ribonucleases	47%
	Aln g 1	PR-10 protein	Alder	Ribonucleases	43%
	Cor a 1.0401	PR-10 protein	Hazelnut	Ribonucleases	42%
	Ara h 8	PR-10 protein	Peanut	Ribonucleases	38%
	Gly m 4	PR-10 protein	Soy	Ribonucleases	32%
	Cluster 10	Fag e 2	2S albumin	Buck wheat	2S albumins
Pla a 1	Putative invertase inhibitor	London plane tree	Invertase inhibitors	0%	
Bos d 4	Alpha-lactalbumin	Cow's milk	Albumins	0%	
Api m 4	Melittin	Honey bee	Hemolysins	0%	
Act d 5	Kiwellin	Kiwi	unknown	0%	
Ber e 1	2S albumin	Brazil nut	2S albumins	0%	
Tri a 19.0101	omega-5 gliadin	Wheat	Gliadins	0%	
Cor a 9	11S globulin	Hazelnut	Legumine-like Proteins	1%	
Bos d 5	Beta-lactoglobulin	Cow's milk	Lipocalins	1%	
Bla g 1	Microvilli-like protein	Cockroach	unknown	2%	
Ole e 7	nsLTP	Olive	Lipid transfer proteins	1%	

(Continued)

**Table 6.** Continued.

Cluster	Molecular components	Biochemical name, protein family	Allergen	Biological function	Number of patients with positive results in %
	Gly m 5	7S globulin, Beta-conglycinin	Soy	Vicilin-like proteins	2%
	Tri a 14	nsLTP	Wheat	Lipid transfer proteins	1%
	Bla g 5	Glutathione-S-transferase	Cockroach	Glutathione-S-transferase	3%
	Bos d lactoferrin	Transferrin	Cow's milk		2%
	Hev b 3	Small rubber particle protein	Latex	Small Rubber Particle Proteins	2%
	Bos d 6	Serum albumin	Cow's milk/meat	Albumins	2%
	Gly m 6	11S globulin, Glycinin	Soy	Legumin-like Proteins	2%
	Phl p 12	Profilin	Timothy	Actin-binding Proteins	3%
	Api m 1	Phospholipase A2	Honey bee	Phospholipases	2%
	Tri a aA_TI	Alpha-amylase/trypsin inhibitor	Wheat		3%
	Ara h 6	2S albumin, Coglutin	Peanut	2S albumins	2%
	Sal k 1	Pectin methylesterase	Saltwort	Pectinesterases	2%
	Gal d 5	Serum albumin	Egg yolk/chicken meat	Albumins	3%
	Hev b 1	Rubber elongation factor	Latex	Elongation factors	3%
	Bos d 8	Casein	Cow's milk	Caseins	2%
	Equ c 3	Serum albumin	Horse	Albumins	3%
	Bla g 2	Inactive aspartic protease	Cockroach	Aspartic proteases (inactive)	3%
	Hev b 5	Hev b 5-like	Latex	unknown	2%
	Ani s 1	Serine protease inhibitor	Anisakis	Serine protease inhibitors	1%
	Cla h 8	Mannitol dehydrogenase	Cladosporium	Mannitol dehydrogenases	4%
	Ses i 1	2S albumin	Sesame	2S albumins	5%
	Pen m 4	Sarcoplasmic calcium-binding protein	Shrimp	Calcium-binding proteins	2%
	Cor a 8	nsLTP	Hazelnut	Lipid transfer proteins	4%
	Gal d 2	Ovalbumin	Egg white	Albumins	5%
	Ara h 2	2S albumin, Coglutin	Peanut	2S Albumins, Trypsin inhibitors	3%
	Ara h 3	11S globulin, Glycinin	Peanut	Legumine-like proteins	4%
	Pla a 3	nsLTP	London plane tree	Lipid transfer proteins	5%
	Ara h 1	7S globulin, Vicilin	Peanut	7S Vicilin-like globulins	4%
	Gal d 1	Ovomucoid	Egg white	Trypsin inhibitors	7%
	Art v 3	nsLTP	Mugwort	Lipid transfer proteins	5%
	Hev b 6.01	Prohevein	Latex	Chitin-binding proteins	6%
	Jug r 3	nsLTP	Walnut	Lipid transfer proteins	7%
	Ara h 9	nsLTP	Peanut	Lipid transfer proteins	7%
	Asp f 1	Mitogillin family	Aspergillus	Ribonucleases	6%
	Pol d 5	Antigen 5	Mediterranean paper wasp	unknown	6%

(Continued)

**Table 6.** Continued.

Cluster	Molecular components	Biochemical name, protein family	Allergen	Biological function	Number of patients with positive results in %
	Jug r 1	2S albumin	Walnut	2S albumins	3%
	Pru p 3	nsLTP	Peach	Lipid transfer proteins	8%
	Par j 2	Phospholipid transfer protein	Wall pellitory	Lipid transfer proteins	10%
	Fel d 2	Serum albumin	Cat	Albumins	7%
	Gal d 3	Conalbumin, Ovotransferrin	Egg white	Transferrins	6%
	Can f 3	Serum albumin	Dog	Albumins	8%
	Gad c 1	Beta-parvalbumin	Cod	Calcium-binding Proteins	6%
	Ole e 9	Glucanase	Olive	Glucanases	17%
	Bet v 4	Polcalcin	Birch	Calcium-binding proteins	4%
	Ves v 5	Antigen 5	Yellow jacket	unknown	10%
	Asp f 3	Peroxisomal protein	Aspergillus	Peroxisomal membrane proteins	6%
	Bet v 2	Profilin	Birch	Actin-binding proteins	9%
	Act d 1	Cysteine protease	Kiwi	Cysteine proteases	11%
	Jug r 2	7S globulin, Vicilin, CCD-bearing protein	Walnut	7S Vicilin-like globulins	8%
	Ana o 2	Legumin-like protein	Cashew nut	Legumine-like proteins	4%
	Mer a 1	Profilin	Annual Mercury	Actin-binding proteins	13%
	Cry j 1	Pectate lyase, CCD-bearing protein	Japanese cedar	Pectate lyases	15%
	Cup a 1	Pectate lyase, CCD-bearing protein	Cypress	Pectate lyases	14%
	Act d 8	PR-10 protein	Kiwi	PR-10 proteins	24%
	Phl p 7	Polcalcin	Timothy	Calcium-binding proteins	7%
	Che a 1	Ole e 1-related protein	Goosefoot	Trypsin inhibitors	8%
	Alt a 6	Enolase	Alternaria	Glycolytic enzymes	16%
	Api g 1	PR-10 protein	Celery	Ribonucleases	22%
	Hev b 8	Profilin	Latex	Actin-binding proteins	13%
	MUXF3	Sugar epitope from Bromelain	CCD	Glycan side-chains	22%
	Amb a 1	Pectate lyase	Ragweed	Pectate lyases	5%
	Pla a 2	Polygalacturonase, CCD-bearing protein	London plane tree	Polygalacturonase	24%
	Pla l 1	Ole e 1-related protein	English plantain	Trypsin inhibitors	15%
	Act d 2	Thaumatococcus-like protein	Kiwi	Thaumatococins	21%
	Asp f 6	Mn superoxide dismutase	Aspergillus	Mn Superoxide Dismutases	21%
	Can f 2	Lipocalin	Dog	Lipocalins	17%
	Art v 1	Defensin-like protein	Mugwort	Defensins	29%

component sensitization in grass pollen -allergic patients (Hatzler et al., 2012). Phl p 1 is a beta-expansin, bound to the cell wall and important for pollen tube penetration; it is a major grass pollen allergen with more than 80% homology to group 1 allergens from the Pooideae subfamily (Focke et al., 2001; Hatzler et al., 2012). Phl p 1 is in most patients the “initiator” molecule. Moreover, even in the few grass pollen - allergic patients who start

their sensitization process with other molecules, IgE against Phl p 1 are produced quite soon. Therefore, IgE to Phl p 1 is an essential marker in grass pollen-allergic patients to establish “true sensitization”. The presence of IgE to Phl p 1 confirms that the patient with a positive skin test or IgE assay to grass pollen extract is truly sensitized to grass pollen. The absence of IgE to Phl p 1 does not exclude “true” sensitization to grass pollen, which might be due (in a few cases) to isolated IgE sensitization to other major allergenic proteins (e.g. Phl p 5) but makes it rather unlikely. The molecular component Phl p 4 is recorded in Cluster 2; it is a tryptase-resistant glycoprotein, berberine bridge enzyme, involved in the synthesis of alkaloids. It can be classified as a major allergen. It shows IgE cross-reactivity with other group 4 grass pollen allergens, including with Cyn 4 to some extent. Moreover, cross-reactivity to the major ragweed allergen Amb a 1 and to Oilseed Rape pollen has been demonstrated. Natural Phl p 4 contains cross-reactive carbohydrate determinants (CCD), which may lead to IgE cross-reactivity with a wide range of plants and plant products. This explains why in several epidemiological studies IgE positivity to Phl p 4 scores over 90% of the grass pollen-allergic patients. However, when the recombinant version of the molecules is used for assays, over 50% of the positivity is not confirmed anymore. Phl p 4 may also serve as a marker for sensitization to Bermuda grass pollen due to its similarity with Cyn d 4, a major allergen of Bermuda grass pollen, but this needs to be investigated in relevant patient populations (Matricardi et al., 2016). As Bermuda grass pollen is not present in our region, possible cross-reactivity with  $\beta$ -expansins from other grasses could be the explanation for the results with high sensitisation to Cyn d 1 in our study.

Molecular components such as Phl p 5, Phl p 6, Cyn d 1 and Phl p 2 were found in Cluster 3. Phl p 5 is another major pollen allergen of temperate grasses with low sensitization prevalence, but often with high IgE levels. Phl p 5 is a cytoplasmatic ribonuclease, important in the enzymatic degradation of RNA. It shows broad IgE cross-reactivity with other group 5 allergens from the Pooideae subfamily of temperate grasses. Although IgE to Phl p 5 usually appear later than those to Phl p 1 in the sensitization process, their concentration grows in many patients rapidly and higher and their contribution to patients' symptoms has been demonstrated. Testing IgE to Phl p 5 can be useful as a second-line test and has been shown to be useful for distinguishing between allergy to grass and olive pollen in southern Europe. Phl p 5-specific IgE may have some prognostic value for indicating disease severity or likely progression from allergic rhinitis to asthma, but this needs to be confirmed with well-designed studies. Phl p 6 is another major grass pollen allergen, specific for the Pooideae subfamily. Its function has not yet been described (Matricardi et al., 2016). Phl p 2 is rarely the only molecule inducing grass pollen sensitization and the presence of IgE antibodies to this Phl p 2 – observed in around 60–80% of the European grass pollen-allergic patients – just confirms that a positive SPT reaction is the expression of true sensitization to grass. Phl p 6 is highly cross-reacting with Phl p 5 and does not add more diagnostic information, once IgE to Phl p 5 has been tested (Matricardi et al., 2016). The only component found in Cluster 4 is Bet v 1. Birch, followed by alder and hazel, represents the most potent cause of tree pollen allergy. In Europe, the prevalence of positive skin prick test to birch pollen allergens ranges from 5% in The Netherlands to 54% in Switzerland, while Scandinavian countries have the highest number of patients with exclusive sensitization to Bet v 1 (Asam et al., 2015; Breiteneder et al., 1988). Bet v 1 in birch pollen is responsible for most of the IgE binding to the allergen source. For

tree pollen allergic patients in Northwestern and Central Europe, Bet v 1 is of decisive clinical importance because there is no “competing” major allergen (Matricardi et al., 2016). Pathogenesis-related protein group 10 PR-10 molecules (i.e. Bet v 1 and homologous allergens) are the major allergens in Fagales pollen and are recognized by virtually all allergic patients, thus representing the major cause of clinical allergy (D’Amato et al., 1998). PR-10 proteins defend plants against fungi and other microorganisms (Asam et al., 2015; Breiteneder et al., 1988). Their homologs are also present in a large number of plant-derived foods, and thus frequently cause cross-sensitization and consequently plant-food allergy (oral allergy syndrome, in most cases). In our study, molecular components from PR – 10 protein family (Pru p 1, Cor a 1.010, Mal d 1, Aln g 1, Cor a 1.040, Ara h 8 and Gly m 4) are recorded in Cluster 9.

Exceptional position was recorded for molecular component Alt a 1, which was found as a single component in Cluster 5. Sensitisation to *Alternaria alternata* spores are considered a well-known biological contaminant and a very common potent aero-allergen source that is found in environmental samples. The major allergen, Alt a 1, has been reported as the main elicitor of airborne allergies in patients affected by a mold allergy and considered a marker of primary sensitization to *Alternaria alternata*. Moreover, *Alternaria alternata* sensitization seems to be a triggering factor in the development of poly-sensitization, most likely because of the capability of *Alternaria alternata* to produce, in addition to Alt a 1, a broad and complex array of cross-reactive allergens that present homologs in several other allergenic sources (Chruszcz et al., 2012). According to our previous results, the sensitisation to molecular fungal allergen was recorded altogether in 58% atopic dermatitis patients (Čelakovská et al., 2019). The study and understanding of *Alternaria alternata* allergen information may be the key to explaining why sensitization to *Alternaria alternata* is a risk factor for asthma and also why the severity of asthma is associated to this mold. Recent research on the identification and characterization of *Alternaria alternata* allergens has allowed for the consideration of new perspectives in the categorization of allergenic molds, assessment of exposure and diagnosis of fungi-induced allergies (Chruszcz et al., 2012; Gabriel et al., 2016).

The molecular components such as Der f 2, Der p 2, Der p 1 and Der f 1 were recorded in Cluster 6. Der p 1, Der f 1 are cystein proteasa, Der p 2, Der f 2 are from NPC2 protein family (epidermal secretory proteins). For *D. pteronyssinus* and *D. farinae*, the fecal particles are the cardinal form in which the allergens became airborne (de Blay et al., 1997; Tovey, Chapman, and Platts-Mills, 1981; Tovey, Chapman, Wells, et al., 1981). In addition, for Der p 1, there is specific evidence about the effects of reducing exposure from 13 to 0.2 µg/g on symptoms among mite-allergic individuals (Banerjee et al., 2015; de Blay et al., 1997; Tovey, Chapman, & Platts-Mills, 1981; Tovey, Chapman, Wells, et al., 1981). The nature of these particles is relevant to both the induction of the IgE response and the subsequent contribution to inflammation of the nose and lungs. For dust mite particles, it is clear that they not only carry a high concentration of several allergens but also are an important source of other substances both nucleic acids and proteins that act as toll receptor ligands or PAMPs. While this has been well recognized for mites, it may be just as important for cockroach allergens (Banerjee et al., 2015; de Blay et al., 1997; Matricardi et al., 2016; Spieksma & Voorhorst, 1969; Tovey, Chapman, & Platts-Mills, 1981; Tovey, Chapman, Wells, et al., 1981).



The components such as Pen m 2, Mus m 1, Lep d 2, Can f 5, Phl p 11, Pen m 1, Bla g 7, Der p 10, Ole e 1, Blo t 5 and Ani s 3 are found together in the Cluster 7. Phl p 11 belongs to the Ole e 1 related proteins and hence exhibits a broad range of cross-reactivities to pollen from different plants as olive, ash, privet, saffron crocus, thistle, plantain, and corn. It is an acidic polypeptide with homology to the tryptase inhibitor of soybean. The shrimp (*Penaeus aztecus*) major allergen, Pen a 1, is one of the most clinically relevant allergenic tropomyosins (Ahumada et al., 2015; Daul et al., 1994; Reese et al., 2006). Tropomyosins from invertebrates are allergenic for genetically susceptible individuals, and due to their extensive cross-reactivity, are considered panallergens. Most allergenic tropomyosins are major shellfish allergens. Symptoms may be induced by very low amounts of the offending food and sometimes by inhalation. In Europe, sensitization to mite tropomyosin Der p 10 is low and has been considered an effect of cross-reactivity but also a marker for broad sensitization among house dust mite allergic patients. Component-resolved diagnosis of *D. pteronyssinus* allergens Der p 1, Der p 2, and Der p 10 has been suggested for selecting patients for house dust mite immunotherapy. The prevalence of sensitization to Der f 10 was found around 80% in Japan. In addition, sensitization to Der p 10 was found 55% in Zimbabwe and 34% in Colombia, probably because of perennial exposure to shellfish and helminth infections. Therefore, the clinical impact of non-food allergenic tropomyosins may be greater than previously thought. In fact, it has been suggested that sensitization to tropomyosin from mite cockroach, *Ascaris* (Ahumada et al., 2015), and mosquito could influence the prevalence and severity of asthma in places where coexposition to several sources of tropomyosin occurs. The frequency of IgE sensitization to tropomyosins in shellfish-allergic patients ranges from 50% to 100%. In addition, Pen a 1 binds up to 75% of all shrimp-specific IgE antibodies, which is supported by histamine release experiments (Daul et al., 1994; Reese et al., 1997; Reese et al., 2006). Molecular components such as Can f 1 (Lipocalin), Fel d 1 (Uteroglobin), Fel d 4 (Lipocalin) and Equ c 1 (Lipocalin) were found in Cluster 8. The majority of the mammalian allergens are lipocalins (Hilger, Swiontek, et al., 2012). Lipocalins are proteins that are ubiquitous; they are present also in arthropods, plants and bacteria, and have very diverse functions. They are characterized by a common tertiary structure composed of a central  $\beta$ -barrel formed of eight antiparallel  $\beta$ -strands. The internal binding pocket carries small hydrophobic molecules such as retinol, steroids, pheromones, and odorants. Mammalian allergens isolated so far are mostly odorant and pheromone binding lipocalins. Only few natural ligands have been characterized. Lipocalin allergens are present in dander, saliva, and urine. They stick to particles and become easily airborne and transported to public places such as schools or day care centers (Hilger, Kuehn, et al., 2012; Hilger, Swiontek, et al., 2012; Konradsen et al., 2014; Nilsson et al., 2012; Saarelainen et al., 2008; Zahradnik & Raulf, 2014). Lipocalins are small, secreted molecules of 150–250 amino acids. Representatives of this cross-reactive group are Equ c 1, Fel d 4 and Can f 6. However, even between molecules of low general sequence identity such as Fel d 4 and Can f 2 (25% identity), single epitopes may have short stretches of sequence identity and lead to patient-dependent IgE cross-reactivity. (Hilger, Kuehn, et al., 2012; Nilsson et al., 2012; Saarelainen et al., 2008). In Cluster 9, these components were found: Pru p 1 (Peach), Cor a 1.010 (Hazelnut), Mal d 1 (Apple), Aln g 1 (Alder), Cor a 1.040 (), Ara h 8 (Peanut), Gly m 4 (Soy) – all these components belong to the family PR –10 protein. In 1980, pathogenesis-related proteins (PR proteins) were defined as “proteins

encoded by the host plant but induced only in pathological or related situations” and subsequently grouped into families. Today, the list of PR proteins comprises 14 families. When the sequence of Bet v 1 was discovered in 1989, the PR-10 family had not been defined yet but it was noted that Bet v 1 was homologous to a PR protein from pea. Bet v 1 is constitutively expressed in pollen at rather high concentrations. Hence, the term PR-10 for the Bet v 1 homologous allergens is not entirely correct. These constitutively expressed proteins are referred to as PR-10 like proteins. Positive specific IgE to Bet v 1 homologs plant-food allergens (i.e. Pru p 1 from peach) demonstrates allergic sensitization, being clinically relevant in case of corresponding symptoms (Antoniw et al., 1980; Gepp et al., 2014; Geroldinger-Simic et al., 2011; Kitzmüller et al., 2015; van Loon & van Strien, 1999).

In Cluster 10, 82 molecular components from different pollen and food allergen sources were recorded. Phl p 7 and Phl p 12 are minor allergens, representing panallergens from the plant world. Phl p 7, polcalcin, is a calcium-binding protein present in many different pollens, hence representing a broad cross-reacting allergen: birch, alder, juniper, ragweed, mugwort, olive, goosefoot, etc. Phl p 7 sensitization can be used as a marker for a more general pollen sensitization. Phl p 12 is a member of the profilin family, an actin-binding protein that is present throughout the whole plant world. As profilins are ubiquitous in plant cells, profilin sensitization gives rise to a long range of cross-reacting plants and plant products as birch, soybean, corn, latex, and plant foods. Phl p 12 is the highly cross-reacting profilin of *Phleum pratense*. As a heat-labile, relatively weak allergenic molecule, IgE sensitization to profilin comes later in the molecular spreading process, reaches only moderate levels of IgE antibodies and only in a minority of patients. Hence, IgE to Phl p 12 mark in general patients with a higher atopic background and/or longer disease duration. Patients with a positive skin test/IgE to grass pollen extract but no IgE to Phl p 1 and Phl p 5 must be tested for IgE to Phl p 12 as these antibodies – that can be induced by other pollens containing profilin – are the first cause of “false” positivity to assays based on grass pollen extract. In the presence of IgE to Phl p 12, patients should be asked about oral allergy syndrome triggered by the ingestion of fruit and vegetables containing profilin, with a focus on apple, celery, and birch. Phl p 7, is the highly cross-reacting polcalcin of *Phleum pratense*. This is a heat-stable, relatively potent allergen that can induce quite high IgE antibody levels. An IgE response to Phl p 7 is observed only infrequently among grass pollen-allergic patients and usually many years after the disease onset. IgE to Phl p 7 marks a relatively distinct category of grass pollen-allergic patients, with more severe symptoms, a higher prevalence of asthma, and a higher frequency of additional allergic comorbidities. Moreover, many other pollens and allergenic sources contain polcalcin so that the origin sensitization to polcalcin in a grass pollen-allergic patient must be carefully searched. These allergenic sources could be indeed responsible of a more severe disease (Bousquet et al., 2007; Davies, 2014; Devanaboyina et al., 2014; Popescu, 2014).

In our previous studies we evaluated the occurrence of sensitisation to food and inhalant allergens in patients suffering from AD. The challenge test was performed according to the results of examinations sIgE and APT atopy patch tests with suspected foods. The diagnostic work-up should comprise not only the laboratory methods, but also the diagnostic hypoallergenic diet and the challenge test in patients with suspected food allergy (Čelakovská, Ettlerová, Ettler, and Bukač, 2015; Čelakovská, Ettlerová, Ettler, Vaněčková,

et al., 2015). Our previous study demonstrates that there is a significant association between the severity of AD and the incidence of perennial rhinitis, asthma bronchiale, and the worsening of atopic dermatitis in relation to food (Čelakovská & Bukač, 2011).

According to the literature, quantitative competition immunoassays with appropriate combinations of antibodies give consistent dose-response patterns which may be used to identify and estimate amounts of cross-reacting compounds. Previously reported methods of analyzing cross-reaction patterns include multiple regression, principal components analysis and minimum estimates of variance (MEV). Four other techniques which are preferable in theory have been surveyed: discriminant analysis (DA), maximum likelihood estimates (MLE), classification and regression trees (CART), and computational neural networks (NN). MLE and simple back-propagation neural networks can estimate the concentration, as well as the identity, of individual compounds. These four methods worked well with unfitted, unscaled data from monoclonal assays of triazines, phenylureas and avermectins. Immunoassays must be properly designed to provide adequate data for pattern recognition. Cross-reactivity pattern analysis will make multi-analyte, multi-antibody immunoassays feasible for many applications in toxicology and hazard assessment (Karu et al., 1994).

According to the literature, little is known about pollen-food allergy syndrome (PFS) in China. Ma Shikun et al. investigated the clinical characteristics, as well as sensitization patterns, of PFS in China. Clinical parameters and serum Immunoglobulin E (IgE) responses to prevalent pollens, plant foods and corresponding allergen components were evaluated. The top three most common pollen-associated allergenic foods were peach, apple and pear. Peach was the most common allergenic food in PFS patients. Patients with PFS in China showed an LTP-dominant sensitization profile and usually presented systemic reactions upon consumption of the allergenic foods (Ma et al., 2018).

Food allergies, including kiwi fruit allergy, have been the subject of extensive research in the last few years. The aim of Gavrovic-Jankulovic 's study was to examine a possible relationship between the developmental stage of kiwi fruit and its allergenic potency. The protein and allergen patterns of kiwi fruit extracts in September, October, November and December fruit in the period from 2000–2002 were analysed. Two major allergens of kiwi fruit, Act c 1 and Act c 2, mainly accounted for the highest allergenic potential of November kiwi extract *in vivo* and *in vitro*. Not only the content of major allergens, but also the ratio of different proteins and even isoforms of the same allergen (Act c 2) change with fruit ripening. These findings should be taken into account during preparation of extracts for allergy diagnosis (Gavrovic-Jankulovic et al., 2005).

The prevalence of fish allergies has become a serious health problem and has increased alarmingly over the past few years. Liu, Chu-Yi 's study attempted to identify and purify the major allergen implicated in the allergic response to largemouth bass (*Micropterus salmoides*), a freshwater fish widely consumed in China. According to their results, nucleoside diphosphate kinase B was identified as a novel fish allergen in largemouth bass. This finding is important for allergy diagnoses and the treatment of freshwater fish-allergic disorders (Liu et al., 2014).

The quality of an applied protein extract is important in both serological and *in vivo* diagnosis of allergy, and for allergen detection methods. In Dooper 's study the effects of the extraction procedure and hazelnut source on antibody binding to hazelnut (*Corylus avellana*) proteins were investigated. This study indicates that for the production of hazelnut protein extracts, the use of fresh hazelnuts is important. A quick, vigorous

extraction in a tris buffer might contribute positively, at least for extraction of Cor a 9 (Dooper et al., 2008).

## Conclusion

The results of ISAC multiplex examination in 100 atopic dermatitis patients were processed with cluster analysis, we found 10 clusters with different numbers of molecular components. Our results correspond to the association of molecular components into protein families according to their biochemical structure. Fundamental position have the components Phl p1, Bet v 1, Alt a 1 followed by molecular components of NPC2 family, cystein proteasa, tropomyosin, uteroglobin, lipocalin and PR-10 protein. These molecular components play the most important role in atopic dermatitis patients.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

This work was supported by Charles University of Prague: [Grant Number Progress Charles University of Prague,Q40/10]; Progress Charles University of Prague: [Grant Number Progress Charles University of Prague,Q40/10].

## References

- Ahumada, V., García, E., Dennis, R., Rojas, M. X., Rondón, M. A., Pérez, A., Peñaranda, A., Barragán, A. M., Jimenez, S., Kennedy, M. W., & Caraballo, L. (2015). Ige responses to Ascaris and mite tropomyosins are risk factors for asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(7), 1189–1200. <https://doi.org/10.1111/cea.12513>
- Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S., & van Loon, L. C. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology*, 47(1), 79–87. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-47-1-79>
- Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L., & Wallner, M. (2015). Tree pollen allergens-an update from a molecular perspective. *Allergy*, 70(10), 1201–1211. <https://doi.org/10.1111/all.12696>
- Banerjee, S., Resch, Y., Chen, K.-W., Swoboda, I., Focke-Tejkl, M., Blatt, K., Novak, N., Wickman, M., van Hage, M., Ferrara, R., Mari, A., Purohit, A., Pauli, G., Sibanda, E. N., Ndlovu, P., Thomas, W. R., Krzyzanek, V., Tacke, S., Malkus, U., ... Vrtala, S. (2015). Der p 11 is a major allergen for house dust mite-allergic patients suffering from atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(1), 102–109. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.271>
- Bousquet, P.-J., Chinn, S., Janson, C., Kogevinas, M., Burney, P., & Jarvis, D. (2007). Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory health Survey I. *Allergy*, 62(3), 301–309. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01293.x>
- Breiteneder, H., Hassfeld, W., Pettenburger, K., Jarolim, E., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., & Scheiner, O. (1988). Isolation and characterization of messenger RNA from male inflorescences and pollen of the white birch (*Betula verrucosa*). *International Archives of Allergy and Immunology*, 87(1), 19–24. <https://doi.org/10.1159/000234643>
- Čelakovská, J., & Bukač, J. (2011). Food adverse reactions in patients over 14 years of age suffering from atopic eczema. *Food and Agricultural Immunology*, 22(2), 105–114. <https://doi.org/10.1080/09540105.2010.533751>

- Čelakovská, J., Bukač, J., Vaňková, R., Krcmova, I., Krejsek, J., & Andráš, C. (2019). Sensitisation to molecular allergens of *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* in atopic dermatitis patients. *Food and Agricultural Immunology*, 30(1), 1097–1111. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1660624>
- Čelakovská, J., Ettlrová, K., Ettler, K., & Bukač, J. (2015). Food allergy, asthma bronchiale, and rhinitis in atopic dermatitis patients with total immunoglobulin E under and above 200 IU/ml. *Food and Agricultural Immunology*, 26(5), 671–681. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1007447>
- Čelakovská, J., Ettlrová, K., Ettler, K., Vaněčková, J., & Bukač, J. (2015). Evaluation of food allergy to wheat, cow milk, egg, soy and peanuts in patients suffering from atopic dermatitis. *Food and Agricultural Immunology*, 26(1), 26–37. <https://doi.org/10.1080/09540105.2013.864603>
- Choi, J. S., Roh, J. Y., & Lee, J. R. (2014). Clinical availability of component-resolved diagnosis using microarray technology in atopic dermatitis. *Annals of Dermatology*, 26(4), 437–446. <https://doi.org/10.5021/ad.2014.26.4.437>
- Chruszcz, M., Chapman, M. D., Osinski, T., Solberg, R., Demas, M., Porebski, P. J., Majorek, K. A., Pomés, A., & Minor, W. (2012). *Alternaria alternata* allergen Alt a 1: A unique  $\beta$  barrel protein dimer found exclusively in fungi. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(1), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.047>
- D'Amato, G., Spieksma, F. T. M., Liccardi, G., Jäger, S., Russo, M., Kontou-Fili, K., Nikkels, H., Wüthrich, B., & Bonini, S. (1998). Pollen-related allergy in Europe. *Allergy*, 53(6), 567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb03932.x>
- Daul, C. B., Slattery, M., Reese, G., & Lehrer, S. B. (1994). Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 105(1), 49–55. <https://doi.org/10.1159/000236802>
- Davies, J. M. (2014). Grass pollen allergens globally: The contribution of subtropical grasses to burden of allergic respiratory diseases. *Clinical & Experimental Allergy*, 44(6), 790–801. <https://doi.org/10.1111/cea.12317>
- de Blay, F., Sanchez, J., Hedelin, G., Perez-Infante, A., Vérot, A., Chapman, M., & Pauli, G. (1997). Dust and airborne exposure to allergens derived from cockroach (*Blattella germanica*) in low-cost public housing in Strasbourg (France). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(1), 107–112. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70307-5](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70307-5)
- Devanaboyina, S. C., Cornelius, C., Lupinek, C., Fauland, K., Dall'Antonia, F., Nandy, A., Hagen, S., Flicker, S., Valenta, R., & Keller, W. (2014). High-resolution crystal structure and IgE recognition of the major grass pollen allergen Phl p 3. *Allergy*, 69(12), 1617–1628. <https://doi.org/10.1111/all.12511>
- Dooper, M. M. B. W., Plassen, C., Holden, L., Moen, L. H., Namork, E., & Egeas, E. (2008). Antibody binding to hazelnut (*Corylus avellana*) proteins: The effects of extraction procedure and hazelnut source. *Food and Agricultural Immunology*, 19(3), 229–240. <https://doi.org/10.1080/09540100802243325>
- Focke, M., Mahler, V., Ball, T., Sperr, W. R., Majlesi, Y., Valent, P., Kraft, D., & Valenta, R. (2001). Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination. *The FASEB Journal*, 15(11), 2042–2044. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0016fj>
- Frades, I., & Matthiesen, R. (2010). Overview on techniques in cluster analysis. In *Bioinformatics methods in clinical research* (pp. 81–107). Humana Press.
- Gabriel, M., Postigo, I., Tomaz, C., & Martínez, J. (2016). *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environment International*, 89–90, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.003>
- Gavrovic-Jankulovic, M., Polovic, N., Prusic, S., Jankov, R. M., Atanaskovic-Markovic, M., Vuckovic, O., & Velickovic, T. C. (2005). Allergenic potency of kiwi fruit during fruit development. *Food and Agricultural Immunology*, 16(2), 117–128. <https://doi.org/10.1080/09540100500090804>
- Gepp, B., Lengger, N., Bublin, M., Hemmer, W., Breiteneder, H., & Radauer, C. (2014). Chimeras of Bet v 1 and Api g 1 reveal heterogeneous IgE responses in patients with birch pollen allergy.

- Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(1), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1073>
- Geroldinger-Simic, M., Zelniker, T., Aberer, W., Ebner, C., Egger, C., Greiderer, A., Prem, N., Lidholm, J., Ballmer-Weber, B. K., Vieths, S., & Bohle, B. (2011). Birch pollen-related food allergy: Clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.027>
- Hanifin, J., & Rajka, G. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermatovenereologica*, 92, 44–47.
- Hatzler, L., Panetta, V., Lau, S., Wagner, P., Bergmann, R. L., Illi, S., Bergmann, K. E., Keil, T., Hofmaier, S., Rohrbach, A., Bauer, C. P., Hoffman, U., Forster, J., Zepp, F., Schuster, A., Wahn, U., & Matricardi, P. M. (2012). Molecular spreading and predictive value of preclinical IgE response to *Phleum pratense* in children with hay fever. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(4), 894–901.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.053>
- Hilger, C., Kuehn, A., & Hentges, F. (2012). Animal lipocalin allergens. *Current Allergy and Asthma Reports*, 12(5), 438–447. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0283-2>
- Hilger, C., Swiontek, K., Arumugam, K., Lehnert, C., & Hentges, F. (2012). Identification of a new major dog allergen highly cross-reactive with Fel d 4 in a population of cat- and dog-sensitized patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 1149–1151. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.10.017>
- Jakob, T., Forstenlechner, P., & Matricardi, P. (2015). Kleine – Tebbe J. Molecular allergy diagnostics using multiplex assays: Methodological and practical consideration for use in research and clinical routine. *Allergo Journal International*, 24(8), 320–332. <https://doi.org/10.1007/s40629-015-0087-8>
- Karu, A. E., Lin, T. H., Breiman, L., & Mark, T. (1994). Muldoon & Jean Hsu Use of multivariate statistical methods to identify immunochemical cross-reactants. *Food and Agricultural Immunology*, 6(4), 371–384. <https://doi.org/10.1080/09540109409354849>
- Kaufman, L., & Rousseeuw, P. J. (1990). *Finding groups in data*. John Wiley.
- Kitzmüller, C., Zulehner, N., Roulias, A., Briza, P., Ferreira, F., Faé, I., Fischer, G. F., & Bohle, B. (2015). Correlation of sensitizing capacity and T-cell recognition within the Bet v 1 family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(1), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1928>
- Konradsen, J. R., Nordlund, B., Onell, A., Borres, M. P., Grönlund, H., & Hedlin, G. (2014). Severe childhood asthma and allergy to furry animals: Refined assessment using molecular-based allergy diagnostics. *Pediatric Allergy and Immunology*, 25(2), 187–192. <https://doi.org/10.1111/pai.12198>
- Liu, C.-Y., Tao, S., Xue, J.-Y., Zhang, H., Xue, W.-T., & Chen, F.-S. (2014). Identification and purification of a novel fish allergen from largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Food and Agricultural Immunology*, 25(1), 70–81. <https://doi.org/10.1080/09540105.2012.745122>
- Ma, S., Wang, R., Nie, L., & Yin, J. (2018). Pollen – food allergy syndrome in China. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 281–293. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1372372>
- Matricardi, P. M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H. J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., Aalberse, R. C., Agache, I., Asero, R., Ballmer-Weber, B., Barber, D., Beyer, K., Biedermann, T., Bilò, M. B., Blank, S., Bohle, B., Bosshard, P. P., Breiteneder, H., Brough, H. A., ... Ollert, M. (2016). EAACI molecular Allergology User's guide. *Pediatric Allergy and Immunology*, 27(Suppl 23), 1–250. <https://doi.org/10.1111/pai.12563>
- Melioli, G., Bonifazi, F., Bonini, S., Maggi, E., Mussap, M., Passalacqua, G., Rossi, E. R., Vacca, A., & Canonica, G. W. (2011). The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clinical Biochemistry*, 44(12), 1005–1011. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.05.007>
- Nicolaou, N., Poorafshar, M., Murray, C., Simpson, A., Winell, H., Kerry, G., Härlin, A., Woodcock, A., Ahlstedt, S., & Custovic, A. (2010). Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: Prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(1), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.008>

- Nilsson, O. B., Binnmyr, J., Zoltowska, A., Saarne, T., van Hage, M., & Grönlund, H. (2012). Characterization of the dog lipocalin allergen Can f 6: The role in cross-reactivity with cat and horse. *Allergy*, 67(6), 751–757. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02826.x>
- Popescu, F. D. (2014). Molecular biomarkers for grass pollen immunotherapy. *World Journal of Methodology*, 4(1), 26–45. <https://doi.org/10.5662/wjm.v4.i1.26>
- Reese, G., Jeoung, B. J., Daoul, C. B., & Lehrer, S. B. (1997). Characterization of recombinant shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *International Archives of Allergy and Immunology*, 113(1-3), 240–242. <https://doi.org/10.1159/000237558>
- Reese, G., Schick Tanz, S., Lauer, I., Randow, S., Luttkopf, D., Vogel, L., Lehrer, S. B., & Vieths, S. (2006). Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. *Clinical and Experimental Allergy*, 36(4), 517–524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02454.x>
- Rousseeuw, P. J. (1987). Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 20, 53–65. [https://doi.org/10.1016/0377-0427\(87\)90125-7](https://doi.org/10.1016/0377-0427(87)90125-7)
- Saarelainen, S., Rytönen-Nissinen, M., Rouvinen, J., Taivainen, A., Auriola, S., Kauppinen, A., Kinnunen, T., & Virtanen, T. (2008). Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(2), 374–381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02895.x>
- Spieksma, F., & Voorhorst, R. (1969). Comparison of skin reactions to extracts of house dust, mites, and human skin scales. *Allergy*, 24(2), 124–146. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1969.tb03762.x>
- Tovey, E. R., Chapman, M. D., & Platts-Mills, T. A. (1981). Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*, 289(5798), 592–593. <https://doi.org/10.1038/289592a0>
- Tovey, E. R., Chapman, M. D., Wells, C. W., & Platts-Mills, T. A. (1981). The distribution of dust mite allergen in the houses of patients with asthma. *American Review of Respiratory Disease*, 124, 630–635.
- van Hage, M., Hamsten, C., & Valenta, R. (2017). ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), 974–977. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.008>
- van Loon, L. C., & van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85–97. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0213>
- Vieths, S., Scheurer, S., & Ballmer-Weber, B. (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964(1), 47–68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04132.x>
- Zahradnik, E., & Raulf, M. (2014). Animal allergens and their presence in the environment. *Frontiers in Immunology*, 5, 76. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00076>

**8.5 Práce č. XI: Food allergy to shrimps and fish in patients suffering from atopic dermatitis, the results of ISAC Multiplex examination**



# Food allergy to shrimps and fish in patients suffering from atopic dermatitis, the results of ISAC Multiplex examination

J. Čelakovská<sup>a</sup>, J. Bukač<sup>b</sup>, R. Vaňková<sup>c</sup>, J. Krejsek<sup>c</sup>, C. Andrýs<sup>c</sup> and I. Krcmova<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Dermatology and Venereology Faculty Hospital and Medical Faculty of Charles University, Hradec Králové, Czech Republic; <sup>b</sup>Department of Medical Biophysic, Medical Faculty of Charles University, Hradec Králové, Czech republic; <sup>c</sup>Department of Clinical Immunology and Allergy, Faculty Hospital and Medical Faculty of Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

## ABSTRACT

: The aim of this study is the evaluation of the occurrence of fish/shrimp allergy in atopic dermatitis patients. The occurrence of fish/shrimp allergy was confirmed in the challenge test or according to the history; the sensitisation to molecular components with ISAC Multiplex testing was analysed. Altogether 100 atopic dermatitis patients were examined. The food allergy to fish was confirmed in 13 patients (13%), while shrimp allergy occurred in 6 patients (6%). In patients with allergy to fish, the significantly higher occurrence of sensitisation to Asp f 1, Asp f 6, Alt a 6, Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2, Lep d 2 and Blo t 5 was confirmed. In patients with food allergy to shrimps, the significantly higher occurrence of sensitisation to Asp f 6, Alt a 6, Cla h 8, Bla g 1 and Bla g 5 was confirmed also.

## ARTICLE HISTORY

Received 10 July 2020  
Accepted 17 September  
2020

## Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a chronic intermittent inflammatory skin disease that may be in some cases associated with food allergies. Other numerous trigger factors for AD have been identified, including inhalable respiratory allergens, irritative substances and infectious microorganisms, such as *Staphylococcus aureus*. Psychogenic and climatic factors may also cause exacerbation of AD (Matricardi et al., 2016). Food allergy was considered to be an important factor in exacerbation of AD in only a subset of children (and a much smaller subset of adults) where non-IgE mediated mechanisms are sometimes implicated in AD flare-ups associated with ingestion of the foods in question (Matricardi et al., 2016). In patients with suspected food allergy, that is thought to be aggravating AD, it is therefore important that any food avoidance measures suggested are based on a detailed history and supportive evidence from objective allergy tests. Generally, three different clinical patterns are described after ingesting of food allergens: (a) immediate type symptoms such as erythema, angioedema, urticaria, but no eczema, bronchial,

**CONTACT** J. Čelakovská  [jarmila.celakovska@seznam.cz](mailto:jarmila.celakovska@seznam.cz)  Department of Dermatology and Venereology Faculty Hospital and Medical Faculty of Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group The Author(s). Published with license by Taylor and Francis Group, LLC

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

gastrointestinal or cardiovascular symptoms of anaphylaxis, which appear within minutes up to two hours after ingesting the relevant food; (b) isolated, eczematous, late-type reactions, which normally appear as flare-ups of typical eczematous lesions occurring within hours to two days after ingestion and (c) combined reaction pattern of non-eczematous, immediate type reactions and eczematous, late-type reactions (Matricardi et al., 2016). *As animal – derived allergens among the eight most common food allergens, fish, egg, milk and shellfish are the chief allergens in food allergy* (Flammarion et al., 2011; Matricardi et al., 2016; Soares-Weiser et al., 2014). As fish is both an important food component and a potent source of food allergens, fish has been included in the European Union regulation of food labeling (Kremmyda et al., 2011; Taylor & Baumert, 2015).

Fish allergy is generally IgE-mediated, and affected patients present with immediate clinical signs, which are usually severe. The classic clinical signs include oral allergy syndrome, cutaneous symptoms (diffuse urticaria, angioedema), gastrointestinal manifestations (abdominal pain, diarrhea, and sudden-onset vomiting), respiratory symptoms (rhinitis, asthma), and, in the most severe cases, anaphylactic shock. Respiratory symptoms can occur due to inhalation of vapor while cooking fish (Kremmyda et al., 2011; Sharp & Lopata, 2014; Taylor & Baumert, 2015). Non – IgE-mediated reactions have mainly been reported in pediatric cases as food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES) (Sharp & Lopata, 2014). Despite the broad biodiversity among fishes, the most frequently consumed species belong to a limited number of orders. Fish allergens have been described in around 40 species but detailed analysis of the allergy-eliciting molecules was performed mainly for fish, which are commonly consumed in Europe such as carp, cod, salmon, trout, and tuna (Sharp & Lopata, 2014). Food processing does not seem to affect the allergenic potency of the fish but rather the allergen content which varies in different species (Kuehn et al., 2010). An increasing number of studies reports on IgE-mediated allergy which is caused by the parasite *Anisakis simplex* found in contaminated raw or undercooked fish. *Anisakis* is a parasitic nematode which mainly infects fish, but has been found in fish or shellfish and can induce severe allergic reaction in fish or shellfish (Nieuwenhuizen & Lopata, 2014). Parvalbumins are the major fish allergens, other fish allergens present in the muscle are enolases and aldolases. A strong and clinically relevant crossreactivity seems to exist between parvalbumins of different fish species. Major and relevant minor fish allergenic molecules are recorded in Table 1 (Griesmeier et al., 2010; Kuehn et al., 2013; Radauer et al., 2008; Sicherer et al., 2004; Worm et al., 2015). Shellfish (shrimps), along with fish are commonly termed as seafood, but these two groups are very distinct in evolutionary terms and contain different molecular repertoires of food allergens. All shellfish species are invertebrate animals, in comparison with fish, which are lower vertebrates. Comparing evolutionary distance, crustaceans are placed closer to insects and arachnids, and this seems to be the major factor for molecular cross-sensitization and clinical cross-reactivity between crustacean, house dust mites, and insects (Chokshi et al., 2015; Kamath et al., 2014a; Yu et al., 2011). In general, 2% of the population are affected by food allergy to shellfish, including the crustacean and mollusk groups. Shellfish allergy, particularly to prawns, has one of the highest rates of food-induced anaphylaxis with nearly 42% among affected adults and 12% in children (Chokshi et al., 2015). The tropomyosin family represent the major heatstable allergen present in all shellfish species, and may

**Table 1.** Major and relevant minor fish allergenic molecules (Griesmeier et al., 2010; Kuehn et al., 2013; Matricardi et al., 2016; Radauer et al., 2008; Sicherer et al., 2004; Worm et al., 2015). Molecular components in ISAC Multiplex testing are shown extra bold\*.

	Allergen	Molecular component	Biochemical name Protein family
Clupeiformes	Herring ( <i>Clupea harengus</i> )	Clu h 1	Parvalbumin
	Pilchard ( <i>Sardinops sagax</i> )	Sar sa 1	Parvalbumin
Cypriniformes	Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Cyp c 1	Parvalbumin
Gadiformes	Atlantic cod ( <i>Gadus callarias</i> )	<b>Gad c 1*</b>	Parvalbumin
	Atlantic cod ( <i>Gadus morhua</i> )	Gad m 1	Parvalbumin
		Gad m 2	Enolase
		Gad m 3	Aldolase
Perciformes	Tuna ( <i>Thunnus albacares</i> )	Thu a 1	Parvalbumin
		Thu a 2	Enolase
		Thu a 3	Aldolase
Pleuronectiformes	Megrim, whiff ( <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> )	Lep w 1	Parvalbumin
Salmoniformes	Pacific salmon ( <i>Oncorhynchus keta</i> )	Onc k 5	Vitellogenin
	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Onc m 1	Parvalbumin
	Salmon ( <i>Salmo salar</i> )	Sal s 1	Parvalbumin
		Sal s 2	Enolase
		Sal s 3	Aldolase
Scorpaeniformes	Redfish ( <i>Sebastes marinus</i> )	Seb m 1	Parvalbumin

constitute up to 20% of the total protein content (Koeberl et al., 2014). In the seafood industry, workers are constantly exposed to airborne shellfish particulate matter arising from different processing activities that results in the inhalation of airborne allergens and cooking fumes (Kamath et al., 2014b; Lopata & Jeebhay, 2013). The foodborne parasite *Anisakis* or herring worm is an important food allergen also (Nieuwenhuizen & Lopata, 2013). More importantly, the tropomyosin family of allergens are thought to be primarily responsible for cross-reactivity between *Anisakis* and other invertebrates such as insects, mites, and crustaceans. However, it is difficult to estimate the prevalence data of *Anisakis* and shellfish cross-reactivity due to the lack of population-based studies. At least 6 shellfish allergens have been identified displaying mainly metabolic or structural functions. The major allergen, tropomyosin was first identified in 1993 as the major shrimps allergen (Shanti et al., 1993). Subsequently, arginine kinase (Yu et al., 2003), myosin light chain (Ayuso et al., 2008), and sarcoplasmic calcium-binding protein (Fernandes et al., 2015) were identified as minor crustacean allergens. Previous sensitization rates were mainly based on skin or IgE testing to whole shellfish extracts (Abramovitch et al., 2013; Osborne et al., 2011; Pascal et al., 2015; Rona et al., 2007; Sicherer et al., 2004; Vidal et al., 2015). Allergenic molecules present in crustacean species are shown in Table 2. Registered allergen names are stated in accordance with WHO/IUIS Allergen Nomenclature (Matricardi et al., 2016). There are only rare studies investigating the sensitisation to molecular components of fish/ shrimp allergy in atopic dermatitis patients.

The initial laboratory approach in the diagnosis of allergies (such as atopic dermatitis, rhinitis and wheezing disorders) is to detect the type of allergic reaction, *i.e.* whether the patient's allergy is mediated by immunoglobulin E (IgE) or not. Using traditional forms of allergen-extract-based diagnosis such as skin testing (*i.e.* skin prick testing, atopy patch testing), it is often challenging and sometimes impossible to identify the disease-triggering allergens.

Progress in laboratory diagnostics of IgE-mediated allergy is the use of component-resolved diagnosis (CRD) or molecular diagnosis of allergies. The CRD approach has been developed when highly purified or recombinant allergen molecules have become

**Table 2.** Allergenic molecules present in crustacean species. Registered allergen names are stated in accordance with WHO/IUIS Allergen Nomenclature (Matricardi et al., 2016). Molecular components in ISAC Multiplex testing are shown extra bold\*.

Molecular components	Biochemical name Protein family
Cha f 1, Cra c 1, Hom a 1, Lit v 1	Tropomyosin
Mel l 1, Met e 1, Pan b 1, <b>Pen m 1*</b> , Por p 1, Cra c 2, Lit v 2, <b>Pen m 2*</b>	Arginin kinase
Hom a 3, Lit v 3, Pen m 3	Myosin light chain
Cra c 4, Lit v 4, <b>Pen m 4*</b> , Pon l 4	Sarcoplasmic calcium-binding protein
Cra c 6, Horn a 6, Pen m 6	Troponin C
Arc s 8, Cra c 8	Triose Phosphate isomerase

available. These molecules are the allergenic proteins toward which the specific and clinically relevant IgE immune response is directed (Matricardi et al., 2016; Melioli et al., 2011; van Hage et al., 2017). Molecular allergy diagnosis using singleplex allergens or multiplex allergen microarrays are typical methods of precision medicine (Matricardi et al., 2016) and they enhance the specificity of IgE-diagnosis in polysensitized respiratory allergies, can be applied in food allergies and atopic dermatitis (Hanifin & Rajka, 1980) and may even reveal unexplained anaphylaxis (Matricardi et al., 2016). ImmunoCAP ISAC is an in vitro assay for the measurement of allergen specific IgE antibodies in human plasma (Melioli et al., 2011; van Hage et al., 2017). It is intended to aid in the diagnosis of IgE-mediated allergic disorders (Melioli et al., 2011; van Hage et al., 2017). ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher), based on 112 different molecular components (both extracted and recombinant), is the most studied and most frequently used molecular diagnostic tool based on a microarray (Melioli et al., 2011; van Hage et al., 2017). The major advantage of ISAC is the comprehensive IgE pattern obtained with a minute amount of serum (Melioli et al., 2011).

## Aim

The aim of our study is to show the occurrence of fish/shrimp allergy in atopic dermatitis patients, to evaluate the sensitivity of ISAC Multiplex testing and to analyse the results of ISAC Multiplex testing. We evaluate also, if there is a significant relation between the occurrence of fish/shrimp allergy and the sensitisation to molecular components of *Alternaria* Alt a 1 (Acidic glycoprotein), Alt a 6 (Enolasa), molecular components of *Aspergillus* such as Asp f 1 (Mitogillin family), Asp f 3 (Peroxisomal protein), Asp f 6 (Mn superoxide dismutase), molecular component of *Cladosporium* Cla h 8 (Mannitol dehydrogenase), molecular components of House dust mites Der f 1 (Cysteine protease), Der f 2 (NPC2 protease), Der p 1 (Cysteine protease), Der p 2 (NPC2 family), Der p 10 (Tropomyosin), molecular components of Cockroach such as Bla g 1 (Cockroach group 1), Bla g 2 (Aspartic protease), Bla g 5 (Glutathione S-transferase), Bla g 7 (Tropomyosin), and Lep d 2 (Storage mite, NPC2 family), Blo t 5 (Mite group 5).

## Method

### *Patients and methods*

*In the period of 2018–2019*, 100 patients suffering from atopic dermatitis at the age of 14 years and older were examined. All these patients were examined in the Department of

Dermatology, Faculty Hospital Hradec Králové, Charles University, Czech Republic. The diagnosis of atopic dermatitis was made with the Hanifin-Rajka criteria (Hanifin & Rajka, 1980). Exclusion criteria were long term therapy with cyclosporin or systemic corticoids, pregnancy, breastfeeding. Patients with atopic dermatitis having other systemic diseases were excluded from the study as well. Complete dermatological and allergological examination was performed in patients included in the study. This study was approved by Ethics committee of Faculty Hospital Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic.

### **Examination of specific IgE to molecular components**

The sIgE level of the serum was measured by the component-resolved diagnosis microarray-based sIgE detection assay ImmunoCAP ISAC (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden). ImmunoCAP ISAC is a solid-phase multiple immunoassay which enables to determine 112 different components from 51 allergen sources (Melioli et al., 2011; van Hage et al., 2017). The allergens are applied in triplicates to ensure the test reproducibility. The specific IgE values are presented in arbitrary units called ISAC Standardized Units (measuring range of 0.3 – 100 ISU-E). The level of specific IgE higher than 0.3 ISU-E was assessed as positive. The level of molecular components in ISU – E was evaluated: < 0.3 – negative, 0.3–0.9 low positivity, 0.9–15 moderate positivity, above 15 ISU – E very high positivity (Melioli et al., 2011; van Hage et al., 2017).

### **Confirmation of food allergy**

The fish/shrimp allergy was confirmed in these cases: (1) In patients with the positive result in the open exposure test (early and/or late reactions) with examined food allergens. (2) In patients with the clinical allergic reaction after the ingestion of fish and/or shrimps in their history; the open exposure test was not performed in these patients because of anaphylactic reaction danger. (3) Sensitisation to examined food allergens was confirmed in patients with positive results in ISAC Multiplex testing and with the negative results in the open exposure test or history.

### **The elimination diet**

In patients without previous history about fish/shrimp allergy and with the positive results in ISAC Multiplex testing we recommended the elimination diet with the elimination of suspected food allergens for the period of 5 weeks (Čelakovská et al., 2015a, 2015b).

### **Open exposure test**

Open exposure test was performed after this diet in intervals without symptoms or during a consistent period with regard to atopic dermatitis (not in pollen season in patients with pollen allergy). In generally, the open exposure test (OET) was recommended to performe with three doses of examined foods given during two days. One dose of examined food was given in incremental dosages in 10 min intervals

during one hour. The food challenge results was scored as positive if one or more of the following objective and subjective clinical reactions were noted: itching, rash, urticaria, angioedema, vomiting, wheezing, abdominal pain, diarrhea, pruritus, or worsening of atopic dermatitis. Early reactions were defined as clinical symptoms within 2 h after the ingestion of food and late symptoms if occurring after more than 2 h. In the case the physician or the patient recorded worsening of the atopic dermatitis or some other reactions during the open exposure test, the patient continued in the elimination of suspected food and the severity of atopic dermatitis was evaluated every 3 month during 1 year. If the open exposure test was negative, the patient introduced this food in the diet regimen. The severity of atopic dermatitis was evaluated during the ingestion of food over a period of 3 months during 1 year. If there is a suspicion to food allergy to more than one food, the next open exposure test was performed in 2–3 weeks after the first exposure test (Čelakovská et al., 2015a, 2015b).

### **Statistical analysis**

The comparison of the results in the examination of ISAC Multiplex testing and really confirmed fish/shrimp allergy in the open exposure (patient 's history) test was performed; according to these results, we calculated the sensitivity of the ISAC Multiplex testing.

Sensitivity was calculated as proportion of positive IgE antibody tests in patients with allergic reaction. We tested if there is the significant relation between the really confirmed fish/shrimp allergy and the sensitisation to some molecular components of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, molecular components of House dust mites and molecular components of Cockroach. Such a table was evaluated by the usual Chi – squared test. The p – value is displayed in the right hand column. Unfortunately, zeroes appeared in some of the tables and one has to be careful in making conclusions.

## **Results**

### **Patients**

One-hundred patients suffering from atopic dermatitis were included in the study – 48 men and 52 women with the average age 40.9 years and with the average SCORAD 39 points (s.d.13.1 points). The mild form of AD was recorded in 14 patients (14%), moderate form in 58 patients (58%), severe form in 28 patients (28%); 55 patients (55%) suffer from asthma bronchiale and 78 patients (78%) suffer from rhinitis. The characteristics of patients is shown in Table 3. ISAC Multiplex examination was performed in all included patients. The highest observed sensitization rate was 61.0% to grass specific molecule Phl p 1, the second most frequent sensitization was 57.0% to Betulaceae-specific molecule Bet v 1. Frequently observed sensitizations were those to PR-10 proteins, NPC2 proteins family, Uteroglobin and Lipocalin. *The food allergy to fish was confirmed in 13 patients (13%), while shrimp allergy occurred in 6 patients (6%).* The results of the open exposure test (history) are shown in Table 4; gastrointestinal symptoms (vomiting), pruritus, and worsening of AD were recorded in patients suffering from fish/shrimp allergy. In 9 patients (9%) with fish allergy, gastrointestinal symptoms such as abdominal pain, diarrhea,

**Table 3.** The characteristic of patients.

- 100 patients examined – 48 men, 52 women, the average age 40.9 years
- the average SCORAD 39 s.d. 13.1 points
- the positive results in sensitisation to molecular components – 93 patients (93%)
- mild form of AD patients 14 (14%)
- moderate form of AD patients 58 (58%)
- severe form of AD patients 28 (28%)
- number of patients with asthma bronchiale – 55 (55%)
- number of patients with allergic rhinitis – 78 (78%)

**Table 4.** The results of open exposure test (or history) with the symptoms of food allergy (pruritus, gastrointestinal symptoms, worsening of atopic dermatitis (AD) 100 patients = 100%).

	Clinical symptoms of <i>fish/shrimp allergy</i>			
	Number of patients with confirmed FA	GIT symptoms	Pruritus	Worsening of AD
Fish	13 (13%)	9 (9%)	3 (3%)	4 (4%)
Shrimps	6 (6%)	4 (4%)	2 (2%)	2 (2%)

One patient suffers simultaneously with food allergy to shrimp and fish. GIT = gastrointestinal symptoms (diarrhea, vomiting, cramps)

vomiting, cramps were recorded according to the history; the pruritus and new lesions of atopic dermatitis were observed after the open exposure test in another 4 patients with fish allergy. In 4 patients (4%) with shrimp allergy, gastrointestinal symptoms such as abdominal pain, diarrhea, vomiting, cramps were recorded according to the history; the pruritus and new lesions of atopic dermatitis were observed after the open exposure test in another 2 patients (2%) with shrimp allergy. One patient suffers simultaneously with shrimp/fish allergy, (Table 4). The positivity of specific IgE to fish/shrimp molecular components was evaluated in the whole group of 100 patients. We confirmed the positivity of specific IgE to Pen m 1 (Tropomyosin) in 8 patients (8%), to Pen m 2 (Arginin kinase) in 22 patients (22%), to Pen m 4 (Sarcoplasmic calcium binding protein) in 2 patients (2%), to Gad c 1 (Parvalbumin) in 6 patients (6%), to Ani s 1 (Serine protease inhibitor) in 1 patient, to Ani s 3 in 4 patients (4%). The sensitivity of the ISAC Multiplex testing examination is recorded in Table 5; the sensitivity of Pen m 1 is – 33.3%, Pen m 2 – 50.0%. Pen m 4 – 0%, Ani s 1 – 0%, Ani s 3 – 16.7%. In patients without clinical symptoms of food allergy to shrimp, the positive results of specific IgE were recorded to Pen m 1 in 6 patients (6%), to Pen m 2 in 19 patients (19%), to Pen m 4 in 2 patients (2%), to Ani s 1 in 1 patient (1%) and to Ani s 3 in 3 patients (3%). The sensitivity was calculated in patients with confirmed allergy to fish; the sensitivity of Gad c 1 is 46.2%, Ani s 1 – 7.7%, Ani s 3 – 7.7%. The positivity to Gad c 1 and to Ani s 1 was confirmed only in patients with clinical reactions to fish; we did not confirm the positive results to these molecular components in patients without clinical symptoms of food allergy. On the other hand, in patients without confirmed food allergy to fish, we recorded the sensitisation to Ani s 3 in 3 patients (3%), Table 5. In the **Complement to Table 5**, we show the positive results to Gad c 1 in patients suffering from food allergy to shrimps, the positive results to Pen m 1, Pen m 2 and Pen m 4 in patients with food allergy to fish.

We evaluated the mean level of specific IgE to molecular components in patients with clinical symptoms of fish/shrimp allergy and in patients *without* clinical symptoms of fish/shrimp allergy – with only sensitisation to fish/shrimp. In patients with confirmed

**Table 5.** The positivity to fish/shrimp molecular components.

Food allergen, number of patients with confirmed FA	Molecular component	Protein family	Number of positive results to molecular components – in patients			Sensitivity of molecular components %
			1) in the whole group	2) FA yes	3) FA no	
Shrimps, 6 patients	<b>Pen m 1</b>	Tropomyosin	8 (8%)	2 (2%)	6 (6%)	<b>33.3%</b>
	<b>Pen m 2</b>	Arginine kinase	22 (22%)	3 (3%)	19 (19%)	<b>50.0%</b>
	<b>Pen m 4</b>	Sarcoplasmic calcium binding protein	2 (2%)	0	2 (2%)	<b>0</b>
	<b>Ani s 1</b>	Serine protease inhibitor	1 (1%)	0	1 (1%)	<b>0</b>
	<b>Ani s 3</b>	Tropomyosin	4 (4%)	1 (1%)	3 (3%)	<b>16.7%</b>
Fish, 13 patients	<b>Gad c 1</b>	Parvalbumin	6 (6%)	6 (6%)	0	<b>46.2%</b>
	<b>Ani s 1</b>	Serine protease inhibitor	1 (1%)	1 (1%)	0	<b>7.7%</b>
	<b>Ani s 3</b>	Tropomyosin	4 (4%)	1 (1%)	3(3%)	<b>7.7%</b>

(1) in the whole group of patients (100 patients = 100%)

(2) in patients with confirmed food allergy to fish (13 patients) and shrimps (6 patients)

(3) in patients without clinical symptoms of food allergy to fish and shrimps. Sensitivity of ISAC Multiplex testing in patients with food allergy to fish, shrimps. FA = food allergy.

shrimp allergy, the mean level of specific IgE to Pen m 1 is 50.2 ISU – E, to Pen m 2 is 56.3 ISU – E, to Ani s 3 is 100. 0 (only 1 patient has the positive level of sIgE), on the other hand, *the mean levels of specific IgE in patients without clinical symptoms of food allergy are lower* (to Pen m 1 30.38 ISU – E, to Pen m 2 is 15.87 ISU – E, to Ani s 1 is 47.0 ISU – E (only in 1 patient), and to Ani s 3 is 17.56 ISU – E), (Table 6). In patients with confirmed food allergy to fish, the mean level of specific IgE to Gad c 1 is 11.93 ISU – E. The level of specific IgE to Ani s 1 is in 1 patient 47.0 ISU – E and the level to Ani s 3 is 100.0 ISU – E in 1 patient with confirmed fish allergy. No patients without clinical symptoms of fish allergy are sensitized to Gad c 1 and Ani s 1. On the other hand, in 3 patients without clinical symptoms of fish allergy, the mean level to Ani s 3 is 17.56 ISU – E, (Table 7).

We recorded the significant relation between the occurrence of fish/shrimp allergy and the sensitisation to molecular components of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, molecular components of House dust mites, molecular components of Cockroach. In patients suffering from fish allergy, the significantly higher occurrence of sensitisation

**Table 5.** Complement to Table 5. The positive results to Gad c 1 in patients suffering from food allergy to shrimps, the positive results to Pen m 1, Pen m 2 and Pen m 4 in patients with food allergy to fish. The positivity to Gad c 1 was confirmed in 1 patient suffering from food allergy to shrimps. In patients suffering from food allergy to fish (13 patients = 100%), the positivity to Pen m 1 was confirmed in 3 patients (23.07%), to Pen m 2 in 9 patients (69.2%) and to Pen m 4 in no patient.

Number of patients with FA	Molecular component	Number of patients	
		positive results in the whole group of patients	positive results in patients with FA
Shrimps, 6 patients (= 100%)	<b>Gad c 1</b>	6	1 (16.7%)
Fish, 13 patients (= 100%)	<b>Pen m 1</b>	8	3 (23.1%)
	<b>Pen m 2</b>	22	9 (69.2%)
	<b>Pen m 4</b>	2	0



**Table 6.** The levels of specific IgE to molecular components of shrimps in ISAC Multiplex testing in ISU – E.

Molecular component	Number of patients with positive results to molecular components and mean level of specific IgE in ISU – E					
	1) the whole group of patients		2) shrimp FA yes		3) FA no (sensitisation only)	
	number of patients	mean level of specific IgE in ISU – E	number of patients	mean level of specific IgE in ISU – E	number of patients	mean level of specific IgE in ISU – E
<b>Pen m 1</b>	8 (8%)	35.33	<b>2</b> (2%)	50.2	6 (6%)	30.38
<b>Pen m 2</b>	22 (22%)	21.38	<b>3</b> (3%)	56.3	19 (19%)	15.87
<b>Pen m 4</b>	2 (2%)	3.25	<b>0</b>	0	2 (2%)	3.25
Ani s 1	1 (1%)	47	<b>0</b>	0	1 (1%)	47.0
Ani s 3	4 (4%)	38.175	<b>1</b> (1%)	100.0	3 (3%)	17.56

1) in the whole group of 100 patients (= 100%)

2) in patients with confirmed food allergy (FA) to shrimps

3) in patients without clinical symptoms of food allergy to shrimps

to molecular components Alt a 6 (Alternaria, Enolase), Asp f 1 (Aspergillus, Mitogillin family), Asp f 6 (Aspergillus, Mn superoxide dismutase), Der f 1 (House dust mite, Cysteine protease), Der f 2 (House dust mite, NPC2 protease), Der p 1 (House dust mite, Cysteine protease), Der p 2 (House dust mite, NPC2 protease), Lep d 2 (NPC2 family) and Blo t 5 (Mite group 5) was confirmed, [Table 8](#). In patients suffering from shrimp allergy, the significantly higher occurrence of sensitisation to molecular components Alt a 6 (Alternaria, Enolase), Asp f 6 (Aspergillus, Mn superoxide dismutase), Cla h 8 (Cladosporium, Mannitol dehydrogenase), Bla g 1 (Cockroach, Cockroach group 1) Bla g 5 (Cockroach, Glutathione S-transferase) was confirmed, [Table 9](#). The list of molecular components with the significantly higher occurrence of sensitisation in patients suffering from fish/shrimp allergy is shown in the summary [Table 10](#).

## Discussion

The sense of our study was to show the occurrence of fish/shrimp allergy in atopic dermatitis patients and to analyze the data of ISAC Multiplex examination. The examination of sensitisation to food and inhalant allergens (skin prick test, examination of extract specific IgE, atopy patch test) is a common part of examination in atopic dermatitis, because these allergens may play the role in exacerbations of AD (Matricardi et al.,

**Table 7.** The levels of specific IgE to molecular components of fish in ISAC Multiplex testing in ISU – E.

Molecular component	Number of patients with positive results to molecular components and mean level of specific IgE in ISU – E					
	1) the whole group of patients (100 patients = 100%)		2) fish FA yes		3) FA no (sensitisation only)	
	number of patients	mean level of specific IgE in ISU – E	number of patients	mean level of specific IgE in ISU – E	number of patients	mean level of specific IgE in ISU – E
<b>Gad c 1</b>	6 (6%)	11.93	<b>6</b> (6%)	11.93	0	0
<b>Ani s 1</b>	1 (1%)	47	<b>1</b> (1%)	47.0	0	0
<b>Ani s 3</b>	4 (4%)	38.175	<b>1</b> (1%)	100.0	3 (3%)	17.56

1) in the whole group of 100 patients (= 100%)

2) in patients with confirmed food allergy (FA) to fish

3) in patients without clinical symptoms of food allergy to fish.

**Table 8.** The relation between the occurrence of fish allergy and the sensitisation to molecular components. The significant relation is marked extra bold.\*

Molecular components	positive results in the whole group (100 patients)	Number of positive results to molecular components in 100 patients		<i>p</i> – value
		Fish allergy no 87 patients = 100%	Fish allergy yes 13 patients = 100%	
Alt a 1	29	25(28.7%)	4(30.8%)	0.880
Alt a 6	16	11(12.6%)	5(38.5%)	<b>0.018*</b>
Asp f 1	6	3(3.4%)	3(23.1%)	<b>0.005*</b>
Asp f 3	6	6(6.9%)	0(0.0%)	0.329
Asp f 6	16	9(10.3%)	7(53.8%)	<b>0.000*</b>
Cla h 8	4	3(3.4%)	1(7.7%)	0.466
Der f 1	34	25(28.7%)	9(69.2%)	<b>0.004*</b>
Der f 2	45	34(39.1%)	11(84.6%)	<b>0.002*</b>
Der p 1	36	27(31.0%)	9(69.2%)	<b>0.007*</b>
Der p 2	46	35(40.2%)	11(84.6%)	<b>0.003*</b>
Der p 10	5	3(3.4%)	2(15.4%)	0.065
Bla g 1	2	2(2.3%)	0(0.0%)	0.581
Bla g 2	3	3(3.4%)	0(0.0%)	0.497
Bla g 5	3	2(2.3%)	1(7.7%)	0.288
Bla g 7	5	3(3.4%)	2(15.4%)	0.065
Lep d 2	13	9(10.3%)	4(30.8%)	<b>0.041*</b>
Blo t 5	9	4(4.6%)	5(38.5%)	<b>0.000*</b>

2016). Molecular allergy diagnosis is a typical method of precision medicine (Matricardi et al., 2016) and it enhances the specificity of IgE-diagnosis in polysensitized respiratory allergies, can be applied in food allergies and atopic dermatitis (Hanifin & Rajka, 1980). The results of our study may be valuable, because we show the sensitivity of ISAC Multiplex testing in atopic dermatitis patients suffering from fish/shrimp allergy and the relation between the fish/shrimp allergy and the sensitisation to other molecular components.

**Table 9.** The relation between the occurrence of shrimp allergy and the sensitisation to molecular components. The significant relation is marked extra bold.\*

Molecular components	positive results in the whole group (100 patients)	Number of positive results to molecular components		<i>p</i> – values
		Shrimps allergy no 94 patients = 100%	Shrimp allergy yes 6 patients = 100%	
Alt a 1	29	28(29.8%)	1(16.7%)	0.492
Alt a 6	16	13(13.8%)	3(50.0%)	<b>0.019*</b>
Asp f 1	6	5(5.3%)	1(16.7%)	0.256
Asp f 3	6	5(5.3%)	1(16.7%)	0.256
Asp f 6	16	13(13.8%)	3(50.0%)	<b>0.019*</b>
Cla h 8	4	2(2.1%)	2(33.3%)	<b>0.000*</b>
Der f 1	34	32(34.0%)	2(33.3%)	0.972
Der f 2	45	42(44.7%)	3(50.0%)	0.800
Der p 1	36	33(35.1%)	3(50.0%)	0.461
Der p 2	46	43(45.7%)	3(50.0%)	0.839
Der p 10	5	4(4.3%)	1(16.7%)	0.176
Bla g 1	2	1(1.1%)	1(16.7%)	<b>0.008*</b>
Bla g 2	3	3(3.2%)	0(0.0%)	0.657
Bla g 5	3	2(2.1%)	1(16.7%)	<b>0.043*</b>
Bla g 7	5	4(4.3%)	1(16.7%)	0.176
Lep d 2	13	11(11.7%)	2(33.3%)	0.127
Blo t 5	9	8(8.5%)	1(16.7%)	0.499

**Table 10. Summary table** – the list of molecular components with the significantly higher occurrence of sensitisation in patients suffering from fish/shrimp allergy.

Allergen	Molecular component	Protein family	Food allergens with the significantly higher occurrence of sensitisation to molecular components.
Alternaria	Alt a 6	Enolase	fish*, shrimps
Aspergillus	Asp f 1	Mitogillin family	fish*
Aspergillus	Asp f 6	Mn superoxide dismutase	fish*, shrimps
House dust mite	Der f 1	Cysteine protease	fish*
House dust mite	Der f 2	NPC2 protease	fish*
House dust mite	Der p 1	Cysteine protease	fish*
House dust mite	Der p 2	NPC2 protease	fish*
Storage mite	Lep d 2	NPC2 family	fish*
House dust mite	Blo t 5	Mite group 5	fish*
Cladosporium	Cla h 8	Mannitol dehydrogenase	shrimps
Cockroach	Bla g 1	Cockroach group 1	shrimps
Cockroach	Bla g 5	Glutathione S-transferase	shrimps

\*According to our results, patients suffering from food allergy to fish are sensitised to Pen m 1 in 23.1%, to Pen m 2 in 69.2%; patients suffering from food allergy to shrimp are sensitised to Gad c 1 in 16.7%.

The purpose of the study is to show, that the occurrence of fish/shrimp allergy in atopic dermatitis is high (fish allergy in 13% and shrimp allergy in 6%). As for diagnosis of fish/shrimp allergic patients, most people are aware of ingesting fish, and thus, the patient history is often quite reliable as for the exposure. We also observed, that patients suffering from food allergy to fish eliminated shrimps from their diet also. The fish/shrimp allergy was confirmed in majority of patients according to the history with clinical reactions such as gastrointestinal symptoms (diarrhea, vomiting, cramps, abdominal pain). According to the challenge test (history), fish allergy can lead to the exacerbation and worsening of the skin finding in 4% of atopic dermatitis patients and shrimp allergy in 2% of atopic dermatitis patients. All these patients eliminate fish and shrimp from their diet and they are always carefully monitored. Regarding the sensitivity of ISAC Multiplex testing, the sensitivity of Pen m 1 is 33%, higher sensitivity shows molecular component Pen m 2 (50.0%). High sensitisation rate was recorded in patients without clinical symptoms of food allergy to shrimp – to Pen m 2 in 19 patients (19%). In patients with confirmed shrimp allergy, the higher level of specific IgE to Pen m 1 and Pen m 2 was recorded in comparison to patients without the clinical symptoms of shrimp allergy, but with the positive results to molecular components of shrimps. The sensitivity of Gad c 1 is 46.2%; in patients without confirmed clinical reaction to fish, we recorded no sensitisation to Gad c 1 and to Ani s 1. The level of specific IgE to Ani s 3 was recorded 100.0 ISU – E in one patient with simultaneously occurrence of fish/shrimp allergy; 3 patients (3%) are sensitized to Ani s 3 and have no symptoms of fish/shrimp allergy.

Epidemiological studies on fish allergy are missing to present consistent data of sensitization to fish and fish allergens. Prevalence rates to fish have been determined in studies of variable design and methodology (Sicherer et al., 2004; Worm et al., 2015). In general, the main clinical manifestations of fish/shrimp allergy include vomiting and diarrhea, whereas the extreme form of reaction is life-threatening anaphylactic shock (Magnusson et al., 2013; Matricardi et al., 2016; Mazzucco et al., 2018). Occupationally exposed workers (fishermen, fishmongers and workers of fish-processing industries) documented specific IgE between 11.7% and 50% of cases. Symptomatic allergic patients to any kind of allergen were found to be positive to Anisakis specific IgE

detection between 0.0% (in children with mastocytosis) to 81.3% (among adults with shellfish allergy) (Mazzucco et al., 2018). Sensitization rates for parvalbumins were determined based on studies during allergen characterization (Sharp & Lopata, 2014; Sten et al., 2004). It was concluded that 90%–95% of the patients had specific IgE to these muscle proteins. Recent studies showed that the fish-allergic population might be subdivided into the following clinical clusters: (i) highly sensitized patients reacting to all fish, (ii) oligo-sensitized patients reacting to several, specific fishes, and (iii) patients with “selective reactions” to individual fish species only (Kuehn et al., 2014a, 2014b). Patients of these clinical clusters vary by their IgE recognition profiles. It was shown that the prevalence of IgE binding to parvalbumin was lower than assumed. The sensitization rate to this major allergen might be rather around 70%, which would need to be confirmed in future studies. A single study demonstrated that fish-allergic patients with specific IgE to cod parvalbumin might be cosensitized to cod enolases (81%) and aldolases (58%). The clinical origin and relevance of this cosensitization is not yet resolved. However, specific parvalbumin-negative patients seem to develop IgE antibodies to fish enolase (47%) and aldolase (41%) which is rather linked to species-specific fish allergies (Kuehn et al., 2014b).

In a US population, a diagnostic serum IgE level of 20 kUA/l to cod (ImmunoCAP, ThermoFisher) has been established to predict an allergy to this fish with 95% certainty (Sampson & Ho, 1997). However, clinical reactions have been indicated for patients with much lower IgE-titers. The availability of individual allergens for IgE testing is still limited and, thus, not of much help in predicting whether the patient is allergic to other fish species (Sampson & Ho, 1997). According to our results, in patients with confirmed fish/shrimp allergy, the mean level of specific IgE to molecular components was higher in comparison to patients with the positive results to molecular components, but without clinical reactions to these food allergens. While probably extremely rare, there are examples of patients reacting to fish allergens that are hidden in foods (Ani-barro et al., 2007); the lowest provoking dose of fish is in the low milligram range (Ballmer-Weber et al., 2015; Helbling et al., 1999; Poulsen et al., 2001; Untersmayr et al., 2005; Untersmayr et al., 2007).

Regarding the allergy to shrimps, previous sensitization rates were mainly based on skin or IgE testing to whole shellfish extracts (Rona et al., 2007) and some studies have identified the prevalence of shellfish allergy to be 2% for the general population and 0.1–0.9% for children (Nwaru et al., 2014); 60% of individuals with confirmed allergy to shellfish elicit specific IgE binding to tropomyosin. More importantly, it has been demonstrated that serum specific IgE to tropomyosin is a better predictor of shrimp allergy than shrimp skin prick test or IgE to whole shrimp extract. Tropomyosin (Pen m 1) and sarcoplasmic calcium-binding protein (Pen m 4) sensitization has been associated with clinical reactivity to shrimp allergy (Abramovitch et al., 2013). In our previous study we evaluated the occurrence of food hypersensitivity reactions to seafood in AD patients; the reactions to fish were recorded as mild OAS, vomiting, pruritus, and worsening of AD altogether in 11% of AD patients, (Čelakovská et al., 2020). In our previous studies we evaluated the occurrence of sensitisation to food and inhalant allergens in patients suffering from AD also. The challenge test was performed according to the results of examinations sIgE and atopy patch tests with suspected foods. Our previous studies demonstrate that there is a significant association between the severity of AD

and the incidence of perennial rhinitis, asthma bronchiale, and the worsening of atopic dermatitis in relation to food (Čelakovská & Bukač, 2017; Čelakovská et al., 2015a, 2015b; Magnusson et al., 2013).

At this study, we also evaluated, if there is some significant relation between the occurrence of fish/shrimp allergy and the sensitisation to molecular components of some inhalant allergens in ISAC Multiplex testing. In patients with fish allergy, the significantly higher occurrence of sensitisation to Asp f 1 (Mitogillin family), Asp f 6 (Mn superoxide dismutase), Alt a 6 (Enolase), Der f 1 (Cysteine protease), Der f 2 (NPC2 protease), Der p 1 (Cysteine protease), Der p 2 (NPC2 protease), Lep d 2 (NPC2 family) and Blo t 5 (Mite group 5) was confirmed. The explanation can be in the fact that patients suffering from food fish allergy are sensitised to molecular components of shrimps also (in fish allergic patients we recorded the positivity to Pen m 1 in 23.1%, to Pen m 2 in 69.2%).

In patients with shrimp allergy, the significantly higher occurrence of sensitisation to Asp f 6 (Mn superoxide dismutase), Alt a 6 (Enolase), Cla h 8 (Mannitol dehydrogenase), Bla g 1 (Cockroach group 1) and Bla g 5 (Glutathione S-transferase) was confirmed. Allergenic tropomyosins are highly conserved muscle proteins found in invertebrates, such as arachnids (house dust mites), insects (cockroaches), crustaceans (shrimp, prawn, lobster, crawfish, crab), and mollusks (mussel, oyster, squid, cuttlefish, octopus, abalone, limpet, snail), therefore being considered panallergens (Becker et al., 2012; Pedrosa et al., 2015; Witteman et al., 1994). Tropomyosin was the first identified allergen involved in cross-reactivity between *Dermatophagoides pteronyssinus* mite, shrimp and insects (Witteman et al., 1994) and it is still considered a major shellfish allergen frequently responsible for clinical cross-reactivity with inhaled house dust mites (Becker et al., 2012). The house dust mites-crustaceans-mollusks syndrome is a relatively rare variant of food allergy in which the house dust mites are the primary IgE sensitising agents, while shellfish can induce food allergy, up to anaphylaxis, even at first ingestion (Pedrosa et al., 2015). In the more usual mite-shrimp syndrome, the typical allergen component mentioned is tropomyosin Der p 10 (Pedrosa et al., 2015). In our study we did not confirm the significant relation between the allergy to shrimps and significantly higher occurrence of sensitisation to Der p 10.

Arginine kinase, a 40-kDa enzyme involved in the storage of excess energy as arginine phosphate, is a potential new class of invertebrate panallergens, identified mainly in crustaceans, such as black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Pen m 2). These are cross-reactive with arginin kinase allergens from house dust mites (Der p 20, Der f 20, Blo t 20), cockroaches (Bla g 9, Per a 9), (Čelakovská et al., 2015a). Myosin light chain is a 20 kDa crustacean allergen identified in common shrimp *Crangon crangon* (Cra c 5), brine shrimp *Artemia franciscana* (Art fr 5), black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Pen m 3), whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Lit v 3), American lobster *Homarus americanus* (Hom a 3), with potential cross-reactivity with aeroallergens from dust mite *Dermatophagoides farinae* (Der f 26) and German cockroach (Bla g 8), (Ayuso et al., 2008).

According to the literature, the IgE-sensitivity to shrimp tropomyosin in a Moroccan population from Fez region was evaluated. This work was conducted with a questionnaire completed by a sera-bank, obtained from 500 patients recruited from Fez Hospitals. Their sera were analyzed for specific IgE-sensitivity to shrimp tropomyosin. From questionnaire, 9.8% of people were allergic to fish and shellfish where shrimp was one of the

most common species causing allergy in patients. Evaluation of specific IgE showed that 10.2% of patients present higher values. Further indirect ELISA and Dot-blot results indicated that shrimp tropomyosin showed a decrease in the human IgE binding under heating or pepsin hydrolysis. These results demonstrate that this population was sensitive to shrimp tropomyosin and the sensitivity could be reduced by heating and more where it was digested by pepsin (Mejrhit et al., 2017).

Another study attempted to identify and purify the major allergen implicated in the allergic response to largemouth bass (*Micropterus salmoides*), a freshwater fish widely consumed in China. Fifteen patients with a positive history of type I allergy to fish were recruited from skin-prick test and the allergy screen. Total protein extracts and purified allergenic protein from bass were tested for their immunoglobulin E – binding properties. Immunoblot assay resulted in strong reactivity with the 17-kDa protein in all patients. In summary, nucleoside diphosphate kinase B was identified as a novel fish allergen in largemouth bass. This finding is important for allergy diagnoses and the treatment of freshwater fish–allergic disorders (Liu et al., 2014).

## Conclusion

In atopic dermatitis patients, the food allergy to fish was confirmed in 13% of patients, the food allergy to shrimps in 6% of patients. Gastrointestinal symptoms (diarrhea, vomiting, cramps, abdominal pain) and worsening of atopic dermatitis were recorded in patients suffering from food allergy to fish and /or shrimps. *Fish allergy can lead to the exacerbation and worsening of the skin lesions in 4% of atopic dermatitis patients and shrimp allergy in 2% of atopic dermatitis patients.* In patients without clinical symptoms of food allergy to shrimps, we recorded the sensitisation rate to Pen m 2 in 19% patients, but the levels of specific IgE to Pen m 2 were lower in comparison to the levels of specific IgE in patients with clinical symptoms of food allergy to shrimps.

The sensitivity of ISAC Multiplex testing is for Pen m 1 – 33.3%, Pen m 2 – 50.0%, and for Gad c 1 46.2%. In patients with food allergy to shrimps and fish, the significantly higher occurrence of sensitisation to Alt a 6 (*Alternaria*, Enolase) and to Asp f 6 (*Aspergillus*, Mn superoxide dismutase) was confirmed. Moreover, in patients with allergy to fish, the significantly higher occurrence of sensitisation to Asp f 1, Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2, Lep d 2 and Blo t 5 was confirmed; in patients with food allergy to shrimps the significantly higher occurrence of sensitisation to Cla h 8, Bla g 1 and Bla g 5 was confirmed also. Patients suffering from food allergy to fish are sensitised to molecular components of shrimps also (to Pen m 1 in 23.1%, to Pen m 2 in 69.2%).

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

This work was supported by the Charles University in Prague [grant number Progres Q40/N,Q 40/N,Q40/N].

## References

- Abramovitch, J. B., Kamath, S., Varese, N., Zubrinich, C., Lopata, A. L., O'Hehir, R. E., & Rolland, J. M. (2013). IgE reactivity of blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) tropomyosin, Por p 1, and other allergens; cross-reactivity with black tiger prawn and effects of heating. *PLoS One*, 8(6), e67487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067487>
- Aníbarro, B., Seoane, F. J., & Mugica, M. V. (2007). Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 17, 168–172.
- Ayuso, R., Grishina, G., Bardina, L., Carrillo, T., Blanco, C., Ibáñez, M. D., Sampson, H. A., & Beyer, K. (2008). Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(4), 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.07.023>
- Ballmer-Weber, B. K., Fernandez-Rivas, M., Beyer, K., Defernez, M., Sperrin, M., Mackie, A. R., Salt, L. J., O'B Hourihane, J., Asero, R., Belohlavkova, S., Kowalski, M., de Blay, F., Papadopoulos, N. G., Clausen, M., Knulst, A. C., Roberts, G., Popov, T., Sprickelman, A. B., Dubakiene, R., ... Clare Mills, E. N. (2015). How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(4), 964–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.047>
- Becker, S., Gröger, M., Canis, M., Pfrogner, E., & Kramer, M. F. (2012). Tropomyosin sensitization in house dust mite allergic patients. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 269(4), 1291–1296. <https://doi.org/10.1007/s00405-011-1826-1>
- Čelakovská, J., & Bukač, J. (2017). Severity of atopic dermatitis in relation to food and inhalant allergy in adults and adolescents. *Food and Agricultural Immunology*, 28(1), 121–133. <https://doi.org/10.1080/09540105.2016.1228838>
- Čelakovská, J., Ettlerová, K., Ettler, K., & Bukač, J. (2015a). Food allergy, asthma bronchiale, and rhinitis in atopic dermatitis patients with total immunoglobulin E under and above 200 IU/ml. *Food and Agricultural Immunology*, 26(5), 671–681. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1007447>
- Čelakovská, J., Ettlerová, K., Ettler, K., Vaněčková, J., & Bukač, J. (2015b). Evaluation of food allergy to wheat, cow milk, egg, soy and peanuts in patients suffering from atopic dermatitis. *Food and Agricultural Immunology*, 26(1), 26–37. <https://doi.org/10.1080/09540105.2013.864603>
- Čelakovská, J., Josef, B., Vaneckova, J., Krcmova, I., Komorousová, M., Cetkovská, P., Vankova, R., & Krejsek, J. (2020). Food hypersensitivity reactions to seafish in atopic dermatitis patients older than 14 year of Age - The Evaluation of association with other allergic diseases and Parameters. *Indian Journal of Dermatology*, 65(2), 97–104. [https://doi.org/10.4103/ijd.IJD\\_403\\_18](https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_403_18)
- Chokshi, N. Y., Maskatia, Z., Miller, S., Guffey, D., Minard, C. G., & Davis, C. M. (2015). Risk factors in pediatric shrimp allergy. *Allergy and Asthma Proceedings*, 36(4), 65–71. <https://doi.org/10.2500/aap.2015.36.3852>
- Fernandes, T. J. R., Costa, J., Beatriz P, M., Oliveira, P., & Mafra, I. (2015). An overview on fish and shellfish allergens and current methods of detection. *Food and Agricultural Immunology*, 26(6), 848–869. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1039497>
- Flammarion, S., Santos, C., Guimber, D., Jouannic, L., Thumerelle, C., Gottrand, F., & Deschildre, A. (2011). Diet and nutritional status of children with food allergies. *Pediatric Allergy and Immunology*, 22(2), 161–165. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01028.x>
- Griesmeier, U., Vazquez-Cortes, S., Bublin, M., Radauer, C., Ma, Y., Briza, P., Fernández-Rivas, M., & Breiteneder, H. (2010). Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species. *Allergy*, 65(2), 191–198. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02162.x>
- Hanifin, J., & Rajka, G. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermatovenereologica*, 92, 44–47.
- Helbling, A., Haydel, R. Jr, McCants, M. L., Musmand, J. J., El-Dahr, J., & Lehrer, S. B. (1999). Fish allergy: Is cross-reactivity among fish species relevant? Double-blind placebocontrolled food challenge studies of fish allergic adults. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 83(6), 517–523. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62862-1](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62862-1)

- Kamath, S. D., Rahman, A. M. A., Voskamp, A., Komoda, T., Rolland, J. M., O'Hehir, R. E., & Lopata, A. L. (2014a). Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(5), 1144–1155. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300584>
- Kamath, S. D., Thomassen, M. R., Saptarshi, S. R., Nguyen, H. M. X., Aasmoe, L., Bang, B. E., & Lopata, A. L. (2014b). Molecular and immunological approaches in quantifying the air-borne food allergen tropomyosin in crab processing facilities. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(7), 740–750. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.03.006>
- Koerberl, M., Clarke, D., & Lopata, A. L. (2014). Next generation of food allergen quantification using mass spectrometric systems. *Journal of Proteome Research*, 13(8), 3499–3509. <https://doi.org/10.1021/pr500247r>
- Kremmyda, L., Vlachava, M., Noakes, P., Diaper, N., Miles, E., & Calder, P. (2011). Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega-3 fatty acids: A systematic review. *Clinical Reviews in Allergy Immunology*, 41(1), 36–66. <https://doi.org/10.1007/s12016-009-8186-2>
- Kuehn, A., Fischer, J., Hilger, C., Sparla, C., Biedermann, T., & Hentges, F. (2014a). Correlation of clinical monosensitivity to cod with specific IgE to enolase and aldolase. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 113(6), 670–671. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.09.005>
- Kuehn, A., Hilger, C., Lehnert-Weber, C., Codreanu-Morel, F., Morisset, M., Metz-Favre, C., Pauli, G., de Blay, F., Revets, D., Muller, C. P., Vogel, L., Vieths, S., & Hentges, F. (2013). Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: Component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, 43(7), 811–822. <https://doi.org/10.1111/cea.12117>
- Kuehn, A., Metz-Favre, C., Pauli, G., Lehnert-Weber, C., Codreanu-Morel, F., Hentges, F., Auriol, P., Bienvenu, F., Braun, C., Crepin, C., Foessel, A., Guenard, L., Krieger, P., Renaudin, J.-M., Tuyeras, J.-F., de Blay, F., Morisset, M., & Hilger, C. (2014b). Comparison of fish allergy symptoms and patient-specific IgE profiles to parvalbumin, enolase, aldolase and fish gelatin. *Revue Française D'Allergologie*, 54(2), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2013.12.003>
- Kuehn, A., Scheuermann, T., Hilger, C., & Hentges, F. (2010). Important variations in parvalbumin content in common fish species: A factor possibly contributing to variable allergenicity. *International Archives of Allergy and Immunology*, 153(4), 359–366. <https://doi.org/10.1159/000316346>
- Liu, C.-Y., Tao, S., Xue, J.-Y., Zhang, H., Xue, W.-T., & Chen, F.-S. (2014). Identification and purification of a novel fish allergen from largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Food and Agricultural Immunology*, 25(1), 70–81. <https://doi.org/10.1080/09540105.2012.745122>
- Lopata, A. L., & Jeebhay, M. F. (2013). Airborne seafood allergens as a cause of occupational allergy and asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13, 288–297. <https://doi.org/10.1007/s11882-013-0347-y>
- Magnusson, J., Kull, I., Rosenlund, H., Håkansson, N., Wolk, A., Melén, E., Wickman, M., & Bergström, A. (2013). Fish consumption in infancy and development of allergic disease up to age 12 y. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(6), 1324–1330. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.045377>
- Matricardi, P. M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H. J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., Aalberse, R. C., Agache, I., Asero, R., Ballmer-Weber, B., Barber, D., Beyer, K., Biedermann, T., Bilò, M. B., Blank, S., Bohle, B., Bosshard, P. P., Breiteneder, H., Brough, H. A., ... Douladiris, N. (2016). EAACI molecular Allergology User's guide. *Pediatric Allergy and Immunology*, 27(Suppl 23), 1–250. <https://doi.org/10.1111/pai.12563>
- Mazzucco, W., Raia, D. D., Marotta, C., Costa, A., Ferrantelli, V., Vitale, F., & Casuccio, A. (2018). Anisakis sensitization in different population groups and public health impact: A systematic review. *PLoS One*, 13(9), e0203671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203671>
- Mejrhit, N., Azdad, O., Chda, A., Kabbaoui, M. E., Bousfiha, A., Bencheikh, R., Tazi, A., & Aarab, L. (2017). Evaluation of the sensitivity of Moroccans to shrimp tropomyosin and effect of heating and enzymatic treatments. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 969–980. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1323187>



- Melioli, G., Bonifazi, F., Bonini, S., Maggi, E., Mussap, M., Passalacqua, G., Rossi, E. R., Vacca, A., Canonica, G. W., & Italian Board for ISAC (IBI). (2011). The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clinical Biochemistry*, 44(12), 1005–1011. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.05.007>
- Nieuwenhuizen, N. E., & Lopata, A. L. (2013). Anisakis– a food-borne parasite that triggers allergic host defences. *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), 1047–1057. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.001>
- Nieuwenhuizen, N. E., & Lopata, A. L. (2014). Allergic reactions to Anisakis found in fish. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(8), 455. <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0455-3>
- Nwaru, B. I., Hickstein, L., Panesar, S. S., Roberts, G., Muraro, A., Sheikh, A., & EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. (2014). Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and metaanalysis. *Allergy*, 69(8), 992–1007. <https://doi.org/10.1111/all.12423>
- Osborne, N. J., Koplin, J. J., Martin, P. E., Gurrin, L. C., Lowe, A. J., Matheson, M. C., Ponsonby, A.-L., Wake, M., Tang, M. L. K., Dharmage, S. C., & Allen, K. J. (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.039>
- Pascal, M., Grishina, G., Yang, A. C., Sánchez-García, S., Lin, J., Towle, D., Ibañez, M. D., Sastre, J., Sampson, H. A., & Ayuso, R. (2015). Molecular diagnosis of shrimp allergy: Efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 3(4), 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.02.001>
- Pedrosa, M., Boyano-Martínez, T., García-Ara, C., & Quirce, S. (2015). Shellfish allergy: A comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 49(2), 203–216. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8429-8>
- Poulsen, L. K., Hansen, T. K., & Nørgaard, A. C. (2001). Allergens from fish and egg. *Allergy*, 56 (Suppl. 67), 39–42. 465. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.00912.x>
- Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., & Breiteneder, H. (2008). Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4), 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.01.025>
- Rona, R. J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S. T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D., & Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: A metaanalysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 638–646. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.05.026>
- Sampson, H. A., & Ho, D. G. (1997). Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(4), 444–451. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70133-7](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70133-7)
- Shanti, K. N., Martin, B. M., Nagpal, S., Metcalfe, D. D., & Rao, P. V. (1993). Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *Journal of Immunology*, 151, 5354–5363.
- Sharp, M. F., & Lopata, A. L. (2014). Fish allergy: In review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 46(3), 258–271. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8363-1>
- Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A., & Sampson, H. A. (2004). Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.04.018>
- Soares-Weiser, K., Takwoingi, Y., Panesar, S. S., Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Halken, S., Poulsen, L., van Ree, R., Vlieg-Boerstra, B. J., Sheikh, A., & EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. (2014). The diagnosis of food allergy: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 69(1), 76–86. <https://doi.org/10.1111/all.12333>
- Sten, E., Hansen, T. K., Stahl Skov, P., Andersen, S. B., Torp, A., Bindslev-Jensen, U., Bindslev-Jensen, C., & Poulsen, L. K. (2004). Cross-reactivity to eel, eelpout and ocean pout in codfish-allergic patients. *Allergy*, 59(11), 1173–1180. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00497.x>

- Taylor, S. L., & Baumert, J. L. (2015). Worldwide food allergy labeling and detection of allergens in processed foods. *Chemical Immunology and Allergy*, *101*, 227–234. <https://doi.org/10.1159/000373910>
- Untersmayr, E., Vestergaard, H., Malling, H.-J., Jensen, L. B., Platzer, M. H., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Skov, P. S., Jensen-Jarolim, E., & Poulsen, L. K. (2005). The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *115*(2), 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.029>
- Untersmayr, E., Vestergaard, H., Malling, H.-J., Jensen, L. B., Platzer, M. H., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Skov, P. S., Jensen-Jarolim, E., & Poulsen, L. K. (2007). Incomplete digestion of codfish represents a risk factor for anaphylaxis in patients with allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *119*(3), 711–717. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.10.039>
- van Hage, M., Hamsten, C., & Valenta, R. (2017). ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(4), 974–977. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.008>
- Vidal, C., Bartolome, B., Rodriguez, V., Armisen, M., Linneberg, A., & Gonzalez-Quintela, A. (2015). Sensitization pattern of crustacean-allergic individuals can indicate allergy to molluscs. *Allergy*, *70*(11), 1493–1496. <https://doi.org/10.1111/all.12693>
- Witteveen, A. M., Akkerdaas, J. H., van Leeuwen, J., van der Zee, J. S., & Aalberse, R. C. (1994). Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. *International Archives of Allergy and Immunology*, *105*(1), 56–61. <https://doi.org/10.1159/000236803>
- Worm, M., Reese, I., Ballmer-Weber, B., Beyer, K., Bischoff, S. C., Classen, M., Fischer, P. J., Fuchs, T., Huttegger, I., Jappe, U., Klimek, L., Koletzko, B., Lange, L., Lepp, U., Mahler, V., Niggemann, B., Rabe, U., Raithel, M., Saloga, J., ... Kleine-Tebbe, J. (2015). Guidelines on the management of IgE-mediated food allergies. *Allergo Journal International*, *24*(7), 256–293. <https://doi.org/10.1007/s40629-015-0074-0>
- Yu, C. J., Lin, Y. F., Chiang, B. L., & Chow, L. P. (2003). Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *The Journal of Immunology*, *170*(1), 445–453. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.445>
- Yu, H. L., Cao, M. J., Cai, Q. F., Weng, W. Y., Su, W. J., & Liu, G. M. (2011). Effects of different processing methods on digestibility of *Scylla paramamosain* allergen (tropomyosin). *Food and Chemical Toxicology*, *49*(4), 791–798. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.046>

**8.6 Práce č. XII: Allergy to walnuts and hazelnuts in atopic dermatitis patients and analysis of sensitization to molecular components**

# Allergy to walnuts and hazelnuts in atopic dermatitis patients and analysis of sensitization to molecular components

J. Čelakovská<sup>a</sup>, J. Bukač<sup>b</sup>, R. Vaňková<sup>c</sup>, M. Salavec<sup>a</sup>, J. Krejsek<sup>c</sup> and C. Andrys<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Dermatology and Venereology, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic;

<sup>b</sup>Department of Medical Biophysics, Charles University, Hradec Králové, Czech republic; <sup>c</sup>Department of Clinical Immunology and Allergy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

## ABSTRACT

**Aim:** To evaluate the occurrence of food allergy to walnuts and hazelnuts in atopic dermatitis patients.

**Methods:** The examination of specific IgE to molecular components with Multiplex ISAC testing was performed. The diagnosis of food allergy was confirmed in patients suffering from food reactions to walnuts/hazelnuts together with positive results of specific IgE to molecular components.

**Results and conclusion:** Altogether 100 atopic dermatitis patients were examined – 48 men, 52 women, the average age 40.9 years. Hazelnuts allergy was confirmed in 25% of patients; these patients are majorly allergic to PR 10 protein, minorly to storage proteins. Walnut allergy was confirmed in 14% of patients; these patients are majorly allergic to storage proteins and to non-specific lipid transfer proteins. Sensitization to Bet v 1 homologues and profilins was associated with mild symptoms; nsLTPs and seed storage proteins were related to severe reactions.

## ARTICLE HISTORY

Received 20 October 2020

Accepted 7 January 2021

## Introduction

Tree nuts are a potent and frequent allergen source, inducing IgE-mediated food allergic reactions, which can cause serious and sometimes even fatal reactions. Tree nut allergy has been reported from all over the world with a prevalence of up to 4.9% of the general population (McWilliam et al. (2015)). Food allergy (FA) and atopic dermatitis (AD) are often co-expressed, and a causal link of foods, triggering skin lesions, has been shown (McWilliam et al. (2015), Weidinger and Novak (2016)). Many studies reveal the prevalence of allergic diseases; however, most studies analysed a limited period from infancy to later childhood and/or to early adolescence. The incidence of new-onset food allergy in adult atopic dermatitis patients is currently unknown as are the main routes of sensitization (Weidinger and Novak (2016)). It is evident that the direct contact of skin with allergens could trigger signals to initiate Th2 allergic response (Weidinger and Novak (2016)). Emerging data now suggest that epithelial cell-derived

**CONTACT** J. Čelakovská  jarmila.celakovska@seznam.cz  Department of Dermatology and Venereology, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor and Francis Group, LLC

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

cytokines, such as thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-33, and IL-25, may drive the progression from atopic dermatitis to asthma and food allergy (Weidinger and Novak (2016)). AD affects up to 20% of children and up to 3% of adults; recent data show that its prevalence is still increasing (Weidinger and Novak (2016)). AD patients, who are sensitized to a food protein, can show three distinct reaction patterns: non-eczematous reactions, isolated atopic dermatitis flares or a combination of both reactions (McWilliam et al. (2015), Weidinger and Novak (2016), Manam et al. (2014)).

Hazelnuts (*Corylus avellana*) are classified as tree nuts belonging to the family of Betulaceae. They are consumed worldwide due to their nutritional value and beneficial health effect. Although there are significant geographic and age-related variations regarding the severity of symptoms, hazelnut allergy has been reported to be the most common tree nut allergy in Europe (McWilliam et al. (2015)). So far, 8 hazelnut allergens have been recognized: Cor a 1 (Bet v 1 like, PR-10 protein), Cor a 2 (Profilin), Cor a 8 (Non-specific lipid transfer protein), Cor a 9 (Legumin), Cor a 11 (Vicilin), Cor a 12, Cor a 13 (Oleosin), Cor a 14 (2S albumin), (Masthoff et al. (2013), Pastorello et al. (2004), Burney et al. (2014), Matricardi et al. (2016)).

The common walnut (*Juglans regia*) belongs to the family of Juglandaceae and is cultivated around the world, predominantly in temperate climates. The edible kernels are part of healthy, balanced food diets because of their high content of polyunsaturated fatty acids, phytochemicals, and antioxidants. Generally, there is little information concerning the prevalence of walnut allergy. In contrast to Europe, where the prevalence of walnut allergy is rather low with an overall incidence of 2.2% (Sato et al. (2017)), it is the most frequently reported tree nut allergy in the US (Tuano and Davis (1998)). So far, eight walnut allergens have been recognized: Jug r 1 (2S albumin), Jug r 2 and Jug r 6 (Vicilin), Jug r 3 and Jug r 8 (Non-specific lipid transfer proteins - nsLTP), Jug r 4 (11S globulin), Jug r 5 (PR-10), and Jug r 7 (Profilin), (Masthoff et al. (2013), Pastorello et al. (2004), Burney et al. (2014), Matricardi et al. (2016), Sato et al. (2017), Tuano and Davis (1998)). Hazelnut and walnut allergy diagnosis is based on a clinical history supported by positive results from IgE sensitization tests. Extract-based hazelnut tests are sensitive, but moderate predictors of allergy (Masthoff et al. (2012), Clark and Ewan (2003)). The current gold standard for diagnosing food allergy is the double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC), a time-consuming and costly procedure (McWilliam et al. (2015)).

Molecular diagnosis provides a major step in improving the accuracy of diagnosing IgE-mediated sensitizations in food allergy (Uotila et al. (2015), van Hage et al. (2016)). This approach has been developed when highly purified or recombinant allergen molecules have become available. These molecules are the allergenic proteins towards which the specific and clinically relevant IgE immune response is directed (Uotila et al. (2015), van Hage et al. (2016)). The ability to identify and characterize single allergens at a molecular level has added a significant body of understanding as to the mechanism of sensitization to foods (Uotila et al. (2015), van Hage et al. (2016)). Research into the structural similarity between allergens and the amino acid sequence homology between food allergens also helps to explain cross-reactivity between allergens, which may be clinically relevant or irrelevant. Certain pan-allergen molecules can indicate broad cross-sensitization and unfold particular pollen-food or plant-food syndromes (Uotila et al. (2015), van Hage et al. (2016), Costa et al. (2016), Ebo et al. (2012),

**Table 1.** Tree nuts allergens. Overview of the different proteins per protein families for the tree nut allergens (Matricardi et al. (2016)). Molecular components in ISAC Multiplex testing are shown extra bold\*.

Allergen	Storage protein			Pathogenesis-related protein			
	11 S globulin legumin	7 S globulin vicilin	2 S albumin	PR 10 protein Bet v 1 like	PR 14 protein nsLTP	Oleosin	Profilin
Hazelnut <i>Corylus avellana</i>	<b>Cor a 9*</b>	Cor a 11	Cor a 14	<b>Cor a 1*</b>	<b>Cor a 8*</b>	Cor a 12, Cor a 13	Cor a 2
Walnut <i>Juglans regia</i>	Jug r 4	<b>Jug r 2*</b> , Jug r 6	<b>Jug r 1*</b>	Jug r 5	<b>Jug r 3*</b> , Jug r 8		Jug r 7

Weidinger and Novak (2012)). The examination of molecular components is used in both singleplex ImmunoCAP and multiplex ImmunoCAP ISAC assays. The major advantage of ISAC is the comprehensive IgE pattern obtained with a minute amount of serum (Verweij et al. (2017)). ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher), based on 112 different molecular components (both extracted and recombinant), is the most studied and most frequently used molecular diagnostic tool based on a microarray (Melioli et al. (2011)). Overview of the different proteins per protein families for the hazelnut/walnut allergens is recorded in Table 1, (Matricardi et al. (2016)); molecular components examined in ISAC Multiplex testing are shown extra bold.

In our previous studies, we evaluated the occurrence of sensitization to food and inhalant allergens in patients suffering from AD; these patients were subjected to skin prick test, atopy patch tests and extract specific IgE to different food and inhalant allergens (Čelakovská and Bukač (2011), Čelakovská and Bukač (2017), Čelakovská et al. (2018 Jul–Aug)).

## Aim

The aim of our study is to evaluate the occurrence of hazelnut/walnut allergy in atopic dermatitis patients. Our aim is also to analyze the results of specific IgE to molecular components to show the role of species – specific and cross-reactive molecular components in the walnut/hazelnut allergy.

## Method

### Patients and methods

During 2018–2019, 100 patients suffering from atopic dermatitis at the age of 14 years and older were examined. All these patients were examined in the Department of Dermatology, Faculty Hospital Hradec Králové, Charles University, Czech Republic. The diagnosis of atopic dermatitis was made with the Hanifin-Rajka criteria (Hanifin and Rajka (1980)). Exclusion criteria were systemic therapy (cyclosporin, systemic corticoids, biological therapy), pregnancy, breastfeeding. Patients with atopic dermatitis, having other systemic diseases, were excluded from the study as well. Complete dermatological and allergological examination (evaluating the occurrence of asthma bronchiale and

allergic rhinitis) was performed in all patients included in the study. This study was approved by Ethics committee of Faculty Hospital Hradec Králové, Charles University of Prague, Czech Republic.

### ***Examination of specific IgE to molecular components***

The serum level of the specific IgE was measured by the component-resolved diagnosis microarray-based sIgE detection assay ImmunoCAP ISAC (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden). ImmunoCAP ISAC is a solid-phase multiple immunoassay, which enables to determine 112 different components from 51 allergen sources (Verweij et al. (2017), Melioli et al. (2011)). The allergens are applied in triplicates to ensure the test reproducibility. The specific IgE values are presented in arbitrary units called ISAC Standardized Units (measuring range of 0.3–100 ISU-E). The level of specific IgE higher than 0.3 ISU-E was assessed as positive. The level of molecular components in ISU – E was evaluated: < 0.3 – negative, 0.3–0.9 low positivity, 0.9–15 moderate positivity, above 15 ISU-E very high positivity (Verweij et al. (2017), Melioli et al. (2011)).

### ***Scoring of AD***

Severity of atopic dermatitis was scored in agreement with SCORAD (Scoring of atopic dermatitis) with the assessment of topography items (affected skin area), intensity criteria and subjective parameters. The severity of atopic dermatitis was evaluated with SCORAD as a mild form to 25 points, as moderate over 25–50 points, as a severe form over 50 points (European Task Force on Atopic Dermatitis (1993)). This examination was performed during one year every two months and the average SCORAD index was calculated.

### ***Anamnestic data***

A detailed personal history of possible food allergy was taken in all included patients. The patients indicate whether they suffer from immediate or late food reactions affecting the skin, gastrointestinal tract, or respiratory tract, not only after the ingestion of hazelnuts and walnuts, but also after the ingestion of other foods. We recorded previous reactions to hazelnuts and/or walnuts; symptoms; affected organ system, onset and course, cofactors (exercise, NSAID, alcohol). The open exposure test was not performed in patients with the early reaction after the ingestion of hazelnuts and/or walnuts in their history because of anaphylactic reaction danger. All of these patients have been carefully examined and they are always monitored.

### ***Confirmation of food allergy***

- (1) The diagnosis of hazelnut/walnut allergy was confirmed according to the convincing history with the food reactions after hazelnut/walnut ingestion (gastrointestinal symptoms – oral allergy syndrome, vomiting, cramps, abdominal pain, skin symptoms –

pruritus and worsening of AD), together with the positive results of specific IgE to molecular components of hazelnuts/walnuts in ISAC Multiplex testing.

- (2) Sensitization to hazelnuts and/or walnuts was confirmed in patients with positive results of specific IgE to molecular components in ISAC Multiplex testing and with no clinical reaction after the ingestion of hazelnuts and/or walnuts.
- (3) Patients with clinical reactions after hazelnut and/or walnut ingestion with no positive results to molecular components in ISAC Multiplex testing are always monitored and the clinical reactions are observed.

### Statistical analysis

The analysis of the results in the examination of ISAC Multiplex testing in patients with walnut/hazelnut allergy was performed. Venn diagram was used to show the positivity to molecular components of walnuts/ hazelnuts in patients suffering from food allergy.

## Results

### Patients

One hundred patients suffering from atopic dermatitis were included in the study – 48 men and 52 women with the average age 40.9 years and with the average SCORAD 39, s.d.13.1 (points). The mild form of AD was recorded in 14 patients (14%), moderate form in 58 patients (58%), severe form in 28 patients (28%).

From one hundred patients included in the study, the diagnosis of asthma bronchiale was confirmed in 55 patients (55%), the diagnosis of allergic rhinitis in 78 patients (78%). The food reactions after the ingestion of walnuts were recorded in 49 patients (49%), after the ingestion of hazelnuts in 46 patients (46%). The food reactions after the ingestion of hazelnuts and walnuts at the same time were recorded in 35 patients (35%). The positive results to molecular components of walnuts were recorded in 16 patients (16%), of hazelnuts in 43 patients (43%), of hazelnuts and walnuts at the same time in 11 patients (11%). The characteristics of patients are shown in Table 2.

In patients suffering from food reactions to walnuts (49 patients = 100%) and to hazelnuts (46 patients = 100%), we recorded in rare cases only late reactions with the

**Table 2.** The characteristic of patients with atopic dermatitis.

	Number of patients
Patients suffering from atopic dermatitis	100 - 48 men, 52 women, the average age 40.9 years
Severity of AD	mild form 14 (14%) moderate form 58 (58%) severe form 28 (28%)
Asthma bronchiale	55 (55%)
Allergic rhinitis	78 (78%)
The food reaction with clinical symptoms to walnuts	49 (49%)
The food reaction with clinical symptoms to hazelnuts	46 (46%)
The positive results of specific IgE to molecular components of walnuts	16 (16%)
The positive results of specific IgE to molecular components of hazelnuts	43 (43%)



worsening of AD (to walnuts in 2.1%, to hazelnuts in 4.3%). Only early reactions were observed in 24.5% of patients to walnuts and in 21.8% of patients to hazelnuts. In majority of patients, we recorded combined reactions (early + late reactions) – in 73.5% of patients to walnuts and in 73.9% of patients to hazelnuts. Patients observed oral allergy syndrome, abdominal pain, pruritus of the skin and in rare cases the worsening of atopic dermatitis, [Table 3](#). In patients suffering from clinical reactions after the ingestion of walnuts and/or hazelnuts, we recorded the mild form of AD only in minority of them; majority of these patients suffer from moderate form of AD and more than one-third of patients suffer from severe form of AD ([Table 3](#)).

The food allergy to walnuts/hazelnuts was confirmed in the case of convincing clinical symptoms after the ingestion of walnuts and/or hazelnuts together with the positive results of specific IgE to molecular components of walnuts/hazelnuts. We analyzed these data in the whole group of 100 patients ([Tables 4 and 5](#)). The food allergy to hazelnuts was confirmed in 25 patients (25%); in all of these patients, we recorded the positive results of specific IgE to Cora1.0401 (PR – 10 protein); the positive result of specific IgE to Cor a 9 (Storage protein, 11S globulin) was recorded only in 1 patient (1%). The food allergy to walnuts was confirmed in 14 patients (14%) – the positive result of specific IgE to storage proteins, Jug r 2 and Jug r 1, was confirmed in 8% of patients, the positivity

**Table 3.** Characteristic of patients with clinical reaction to walnuts and hazelnuts. Severity of atopic dermatitis (AD), clinical reactions (early, late, combined) after the ingestion of walnuts (49 patients = 100%) and hazelnuts (46 patients = 100%) OAS – oral allergy syndrome, GIT – gastrointestinal symptoms (nausea, abdominal pain).

Characteristic of patients with clinical reaction to walnuts (49 patients = 100%)				
Severity of AD		Number of patients		
	mild	4 (8.1%)		
	moderate	26 (53.1%)		
Reaction to walnuts	severe	19 (38.8%)		
	early	12 (24.5%)		
		OAS	10 (20.4%)	
		GIT	2 (4.1%)	
	late	1 (2.1%)		
	combined (early + late)	36 (73.5%)		
		OAS	20 (40.9%)	
		GIT	6 (12.2%)	
		Pruritus	8 (16.3%)	
		Worsening of AD	7 (14.3%)	
Characteristic of patients with clinical reaction to hazelnuts (46 patients = 100%)				
Severity of AD		Number of patients		
	mild	4 (8.7%)		
	moderate	25 (51.1%)		
Reaction to hazelnuts	severe	17 (36.9%)		
	early	10 (21.8%)		
		OAS	8 (17.4%)	
		GIT	2 (4.3%)	
	late	2 (4.3%)		
	combined (early + late)	34 (73.9%)		
		OAS	18 (39.1%)	
		GIT	6 (13.4%)	
		Pruritus	6 (13.4%)	
		Worsening of AD	7 (15.2%)	

**Table 4.** Analysis of sensitization to molecular components of walnuts in 100 atopic dermatitis patients (100 patients = 100%). The positive results of specific IgE to molecular components of walnuts.

Molecular component	Protein family	Number of patients with positive results of specific IgE to molecular components of walnuts			
		1) in the whole group of 100 patients	2) in patients suffering from clinical reaction to walnuts		3) in patients without clinical reaction to walnuts
Jug r 2	Storage protein, 7S globulin	8 (8%)	7 (7%)	8 (8%)	1 (1%)
Jug r 1	Storage protein, 2S albumin	3 (3%)	3 (3%)		0
Jug r 3*	Lipid transfer protein (nsLTP)	7 (7%)	6 (6%)	6 (6%)	1 (1%)
<b>Total number of patients</b>		<b>16 (16%)</b>	<b>14 (14%)</b>		<b>2 (2%)</b>

1) in the whole group of 100 patients.

2) in patients suffering from clinical reaction to walnuts.

3) in patients without clinical reaction to walnuts (= sensitization).

\* cross-reactive components.

of specific IgE to nsLTP Jug r 3 was confirmed in another 6% of patients. We show the Venn diagram of positive results of specific IgE to molecular components in patients suffering from walnut allergy (Diagram 1) and hazelnut allergy (Diagram 2).

The positive results of specific IgE to molecular components of hazelnuts with no clinical reaction in these patients (= sensitization) were confirmed in another 18% of patients; majority of these patients have the positive results of specific IgE to Cor a 1.0401 (PR – 10 protein), the positive results of specific IgE to Cor a 8 (nsLTP) are rare (in 2%). The positive results of specific IgE to molecular components of walnuts with no clinical reaction (= sensitization) were confirmed only in 2% of patients (to Jug r 2 and to Jug r 3), (Tables 4 and 5).

The negative results of specific IgE to molecular components of walnuts were recorded in 35 patients (71.4%) from 49 patients suffering from clinical symptoms after walnut ingestion. The negative results of specific IgE to molecular components of hazelnuts were recorded in 21 patients (45.6%) from 46 patients suffering from clinical symptoms after hazelnut ingestion (Table 6). These ratios could be formally called sensitivity, but we

**Table 5.** Analysis of sensitization to molecular components of hazelnuts in 100 atopic dermatitis patients (100 patients = 100%). The positive results of specific IgE to molecular components of hazelnuts.

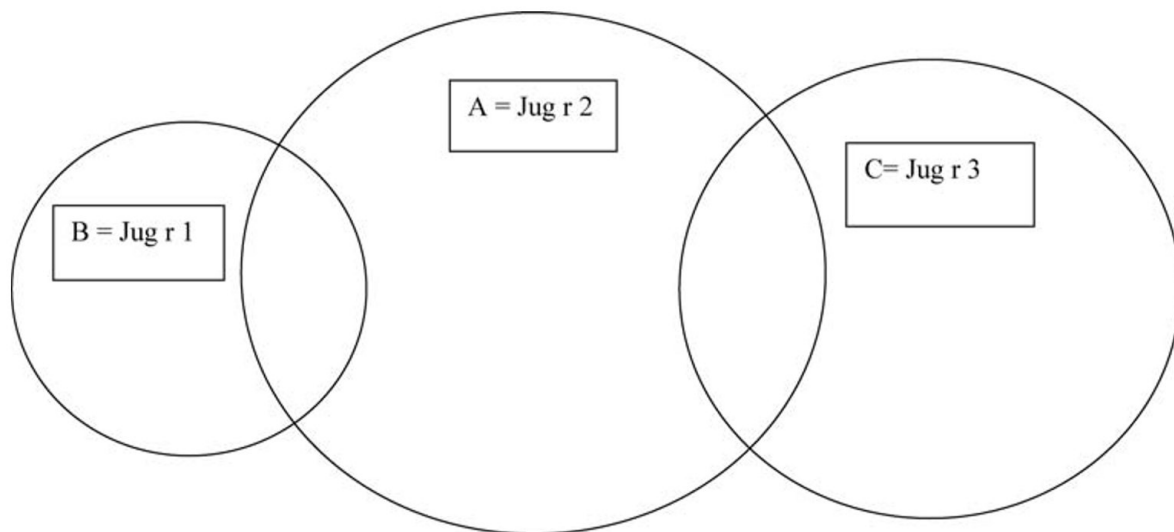
Molecular component	Protein family	Number of patients with positive results of specific IgE to molecular components of hazelnuts			
		1) in the whole group of 100 patients	2) in patients suffering from clinical reaction to hazelnuts		3) in patients without clinical reaction to hazelnuts
rCor a 1.0401*	PR – 10 protein	42 (42%)	25 (25%)	25	17
rCor a 8*	Lipid transfer protein (nsLTP)	4 (4%)	2 (2%)		2
nCor a 9	<b>Storage protein, 11S globulin</b>	1 (1%)	1 (1%)	1	0
<b>Total number of patients</b>		<b>43 (43%)</b>	<b>25 (25%)</b>		<b>18 (18%)</b>

1) in the whole group of 100 patients.

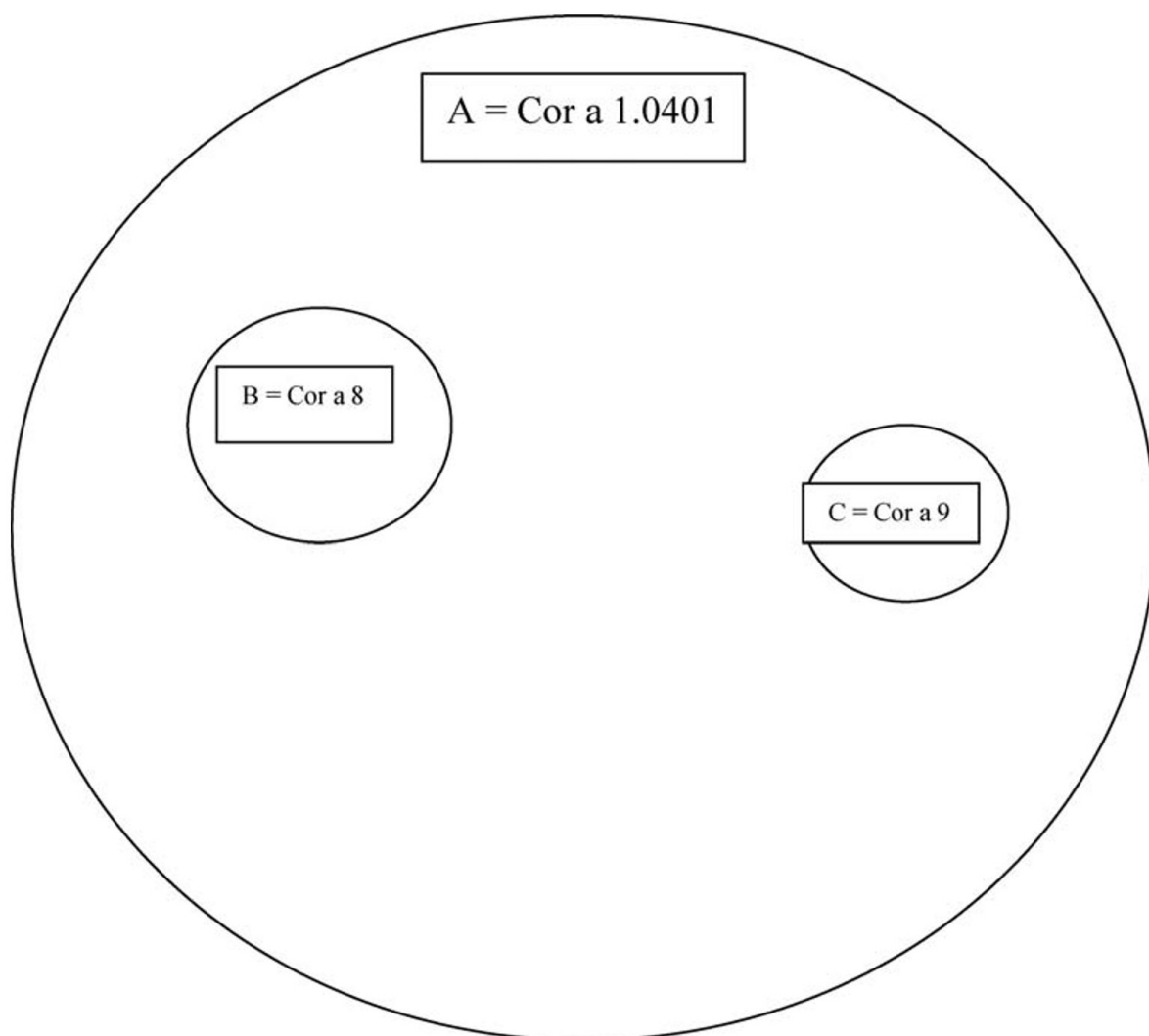
2) in patients suffering from clinical reaction to hazelnuts.

3) in patients without clinical reaction to hazelnuts (= sensitization).

\* cross-reactive components.



**Diagram 1.** Venn diagram (areas proportional to frequencies) of positive results to molecular components in patients suffering from food allergy to walnuts A – altogether 7 patients with positivity to Jug r 2, B – altogether 3 patients with positivity to Jug r 1, C – altogether 6 patients with positivity to Jug r 3.



**Diagram 2.** Venn diagram (areas proportional to frequencies) of positive results to molecular components in patients suffering from food allergy to hazelnuts A – altogether 25 patients with the positivity to Cor a 1.0401, B – 2 patients with the positivity to Cor a 8, C – 1 patient with positivity to Cor a 9.

**Table 6.** The results of specific IgE to molecular components of walnuts/hazelnuts in ISAC Multiplex testing in patients suffering from food reactions to walnuts (49 patients = 100%) and hazelnuts (46 patients = 100%).

Specific IgE to molecular components – number of patients with positive and negative results to molecular components of walnuts and hazelnuts		
	Positive specific IgE – food allergy confirmed	Negative specific IgE
Food reaction to walnuts 49 patients = 100%	14 (28.6%)	35 (71.4%)
Food reaction to hazelnuts 46 patients = 100%	25 (54.3%)	21 (45.6%)

don't use this terminology because it would remind us of its connection with making a decision. We are more interested in the role of species – specific and cross-reactive molecular components in the walnut/hazelnut allergy.

Regarding the kind of clinical reaction to hazelnuts, in patients with positive results to Cor a 1.0401 (PR – 10 protein) we observed mild oral allergy syndrome and pruritus with the worsening of atopic dermatitis in predilection sites such as in flexural involvement of the elbows and knees and on the face. In patients with positive results Cor a 8\* (Non-specific lipid transfer protein), we observed oral allergy syndrome and abdominal pain, pruritus and worsening of atopic dermatitis. In patients with positive results to Cor a 9 (Storage protein, 11S globulin), we recorded severe symptoms. Regarding the kind of clinical reaction to walnuts, in patients with positive results to Jug r 2 (Storage protein, 7S globulin) and Jug r 1 (Storage protein, 2S albumin), we observed abdominal pain, pruritus and worsening of atopic dermatitis. In patients with positive results to Jug r 3 (Lipid transfer protein), we observed oral allergy syndrome, pruritus and the worsening of atopic dermatitis.

In 8 patients (8%), we confirmed food allergy to walnuts and to hazelnuts; in another 35 patients (35%) we recorded clinical reactions to walnuts and to hazelnuts, but without and/or with the positive results to molecular components of walnuts and/or hazelnuts (Table 7). The level of specific IgE in ISU-E to molecular components of walnuts and hazelnuts is recorded in Table 7.

## Discussion

Despite their clinical importance, tree nut allergy epidemiology remains understudied and the prevalence of tree nut allergy in different regions of the world has not yet been well characterized (McWilliam et al. (2015)). Data are limited to largely European, US and UK studies using self-reported prevalence in children and adolescents. There is a need for further studies to determine tree nut allergy and differentiate between the primary and secondary tree nut allergy (McWilliam et al. (2015)).

In our study with atopic dermatitis patients, we confirmed the positive results of specific IgE to cross-reactive molecular component Cor a 1.0401 (PR – 10 protein) in majority of patients suffering from hazelnuts allergy, only minority of patients are allergic to specific molecular components of hazelnuts. On the other hand, in patients suffering from allergy to walnuts, the positivity to specific molecular components Jug r 1 and Jug r 2 predominates. In the case of positivity to cross-reacting components, the observed symptoms were mild (mild form of oral syndrome, itching of the skin and worsening

**Table 7.** The overview of patients suffering from clinical reactions to walnuts and hazelnuts at the same time.

Patient	Molecular components of walnuts – sIgE (ISU-E)			Molecular components of hazelnuts – sIgE (ISU-E)		
	Jug r 1	Jug r 2	Jug r 3	Cor a 1.0401	Cor a 8	Cor a 9
1				1.3		
2*			1.3	3.3		
3*	6.6			17		
4						
5				8.2		
6						
7						
8				3.5		
9						
10				2.2		
11				36		
12*			4.5	20	0.4	
13*			1.5	9.7		
14						
15				4.6		
16				18		
17				21		0.6
18				24		
19*		1.2		11		
20				16		
21						
22*			2.4	10	1.2	
23				0.8		
24						
25						
26						
27*		0.5		16		
28						
29						
30						
31		0.7				
32				0.8		
33	5.4	0.9				
34						
35						
36						
37		2				
38				4.6		
39			0.7			
40				1.4		
41				3.8		
42						
43*	1.6			2.1		

Food allergy (clinical reactions and positive results to molecular components) to walnuts and hazelnuts was confirmed in 8 patients (8%) at the same time – **shown extra bold\***. In another 35 patients (35%), we recorded clinical reactions to walnuts and hazelnuts at the same time without or with the positive results to some of molecular components of walnuts and/or hazelnuts. The level of specific IgE to molecular components of walnuts and hazelnuts (ISU – E) in ISAC Multiplex testing is recorded.

of atopic dermatitis). Eczema lesions appeared mainly in flexural involvement of the elbows and knees and on the face. In the case of positivity to species-specific components, we observed more pronounced symptoms – abdominal pain and severe oral allergy syndrome. Our results confirm that sensitization to Bet v 1 homologues and profilins are associated with mild symptoms (pollen food syndrome), on the other hand, nsLTPs and seed storage proteins are related to severe reactions. Interesting finding is the

confirmation of the late allergic reaction; all these patients observe the late skin reaction, such as new eczematous lesions and worsening of AD during 24–48 h after a casual ingestion of walnuts/hazelnuts. Generally, late eczematous reaction on the skin, in patients with a persistent moderate or severe form of AD, can be observed with difficulty. The worsening of AD occurs several hours after the ingestion of food allergen and other factors can contribute to the deterioration of AD at the same time also. The psychological stress and inhalant allergens, such as animal dander, trees and grass pollen, along with environmental stressors, such as reduced humidity and lower outdoor temperatures, are the other factors for the worsening of AD. The dysregulation of the skin barrier also predisposes individuals to colonization of microbial pathogens.

On the other hand, in some patients suffering from clinical symptoms after walnuts and/or hazelnuts ingestion, we did not confirm the positivity of specific IgE to molecular components of hazelnuts/walnuts. The explanation can be in the fact that these patients suffer from pollen food syndrome and/or other molecular components of walnuts and hazelnuts may play the role in these patients. In our last study (Celakovska et al. (2021 in press)), we evaluated the relation between the sensitization to molecular components of inhalant allergens and the occurrence of food reactions to peanuts, walnuts, hazelnuts, wheat, soy, celery, apple, peach and kiwi in atopic dermatitis patients (Celakovska et al. (2021 in press)). In patients suffering from food reaction to hazelnuts, the significant relation ( $p$ -value  $<0.05$ ) was confirmed to sensitization to molecular components Aln g1 (Alder, PR – 10 Protein), Bet v 1 (Birch, PR – 10 Proteins), Ole e 1 (Olive pollen, common olive group 1), Phl p 1, 2 (grass group 1, 2), Phl p 4 (Berberine bridge enzyme). The significantly higher occurrence of sensitization ( $p$ -value  $<0.05$ ) to molecular components Bet v 1 (Birch, PR 10 protein), Alt a 1 (Alternaria, Acidic glycoprotein), Ole e 9 (Olive pollen, Beta-1,3-glucanase), Phl p 1, 2, 5, 6 (Grass group 1, 2, 5, 6), Phl p 4 (Timothy, Berberine bridge enzyme) and Mer a 1 (Annual Mercury, profilin) was confirmed in patients suffering from food reaction to walnuts (Celakovska et al. (2021 in press)). Pathogenesis-related protein group 10 (PR-10) molecules (i.e. Bet v 1 and homologous allergens) are the major allergens in Fagales pollen and are recognized by virtually all allergic patients, thus representing the major cause of clinical allergy (Matricardi et al. (2016)). Sensitization to Phl p 1 usually precedes sensitization to other grass pollen allergen and it is the most prevalent component sensitization in grass pollen-allergic patients (Matricardi et al. (2016)). We recommend to examine other molecular components, such as Cor a 11 (7S globulin), Cor a 14 (2S albumin), Cor a 12 (Oleosin), Cor a 2 (Profilin), Jug r 4 (11S globulin), Jug r 5 (Profilin) and Jug r 6 (7S globulin), Jug r 7 (Profilin, Jug r 8 (Non-specific lipid transfer proteins)) in patients suffering from clinical reaction to walnuts and/or hazelnuts without positive results in ISAC Multiplex testing. Another possibility for the examination of specific IgE to molecular components is the examination with ALEX Multiplex testing (ALEX 2–Allergy Explorer). The macro-array nanotechnology-based immunoassay used as a molecular allergy explorer (ALEX<sup>®</sup>; MacroArray Diagnostics, Wien, Austria) is the latest launched *in vitro* multiplex tool for precision medicine in allergy diagnosis. It is based on a state-of-the-art proprietary nano-bead technology. This new array contains 295 allergen reagents (117 allergenic extracts and 178 molecular components), with a large majority of aeroallergen families and cross-reactive food allergens being represented. The molecular component, such as Cor a 11 (7 S globulin), Cor a 14 (2 S

albumin), Jug r 4 (11 S globulin) and Jug r 6 (7 S globulin), are included in this ALEX 2 – Allergy explorer (Verweij et al. (2017)). Other components, such as Cor a 12 (Oleosin) and Cor a 2 (Profilin) and Jug r 5 (Profilin), are not included in multiplex testing examination. The sensitization to these molecular components can be examined in singleplex examination.

According to the literature, there is knowledge of sensitization to tree nuts and seeds in the general population and in patients suffering from atopic dermatitis. Most reports on tree nut and seed allergy are based on clinical cases (McWilliam et al. (2015)). McWilliam V. et al. aimed to systematically review the population prevalence of tree nut allergy in children and adults. The authors searched three electronic databases (OVID MEDLINE, EMBASE and PubMed) from January 1996 to December 2014 (McWilliam et al. (2015)). Eligible studies were categorized by age, region and method of assessment of tree nut allergy. Of the 36 studies identified most were in children ( $n = 24$ ) and from Europe ( $n = 18$ ), UK ( $n = 8$ ) or USA ( $n = 5$ ). Challenge-confirmed IgE-mediated tree nut allergy prevalence was less than 2% (although only seven studies used this gold standard), while probable tree nut allergy prevalence ranged from 0.05% to 4.9%. Prevalence estimates that included oral allergy syndrome (OAS) reactions to tree nut were significantly higher (8%–11.4%) and were predominantly from Europe. Prevalence of individual tree nut allergies varied significantly by region with hazelnut the most common tree nut allergy in Europe, walnut and cashew in the USA and Brazil nut, almond and walnut most commonly reported in the UK (McWilliam et al. (2015), Skypala et al. (2010), Datema et al. (2018), Masthoff et al. (2015), Maloney et al. (2008), Nwaru et al. (2014)). Patients, reporting hazelnut allergy ( $n = 423$ ) from 12 European cities, were tested for IgE against individual hazelnut allergens; a model, combining CRD with clinical background and extract-based serology, was superior to CRD alone in assessing the risk of severe reactions to hazelnut, particular in ruling out severe reactions (Datema et al. (2018 Mar)). Some studies show that sIgE to hazelnut storage proteins, Cor a 14 and Cor a 9, confers higher specificity in the diagnosis of hazelnut allergy in children compared with Cor a 1 or hazelnut extract, and could be used clinically to improve the identification of allergic children and reduce the number of confirmatory food challenges, (Nilsson et al. (2020 Feb)); according to the authors, future analyses of the contribution of additional hazelnut allergen components are needed, as well as evaluations in adult populations (Nilsson et al. (2020 Feb)). The sensitivity and specificity of both Cor a 9 and Cor a 14-sIgE were consistent across paediatric studies, and the diagnostic parameters calculated showed low data variation. This likely reflects the role of storage proteins as early sensitizers and markers of hazelnut allergy (Faber et al. (2014), Verweij et al. (2011), van Erp et al. (2019)). Storage protein 2S albumins have high accuracy in identifying children with allergies and objective symptoms (Flores Kim et al. (2018), Klemans et al. (2015), Sicherer et al. (2015), Lange et al. (2017), Sato et al. (2017)). Another study reflects the cross-reactive nature of Cor a 1-sIgE, where sensitization is driven by birch or birch-related tree pollen allergies (Valcour et al. (2016)) rather than primary hazelnut allergy. The diverse geographic locations of the studies as well as age differences may contribute to the data variation, as pollen cross-reactive sensitizations become increasingly common when children reach school age (Ballmer-Weber et al. (2015)). Cor a 8 is a common sensitizer in the Mediterranean area although LTP sensitization is also increasingly demonstrated in non-Mediterranean areas, but its clinical relevance is unclear

(Teuber et al. (2019)). The quality of an applied protein extract is important in both serological and *in vivo* diagnosis of allergy, and for allergen detection methods (Dooper et al. (2008)).

In the research project MeDALL, IgE reactivities towards a large number of microarrayed allergen molecules have been determined in several European birth cohorts using the MeDALL allergen chip (Melioli et al. (2011)). Data obtained in the MeDALL project seem to confirm that patients with atopic dermatitis are often polysensitized towards a large number of different allergen molecules and thus exhibit extremely complex IgE sensitization profiles (Anto et al. (2017), Bousquet et al. (2015)).

## Conclusion

The food allergy to hazelnuts was confirmed in 25% of atopic dermatitis patients; these patients are majorly allergic to PR 10 proteins (Cora1.0401), minorly to Cor a 9 (Storage protein, 11S globulin). The food allergy to walnuts was confirmed in 14% of atopic dermatitis patients; these patients are in 8% allergic to storage proteins (Jug r 2 and Jug r 1) and in 6% to nsLTP (Jug r 3). The positive results of specific IgE to molecular components of hazelnuts (walnuts) with no clinical reaction were confirmed in another 18%, resp. 2% of patients. In the case of positivity to cross-reacting components, the symptoms are milder (mild form of oral syndrome, itching of the skin and worsening of atopic dermatitis). In the case of positivity to species-specific components, more pronounced symptoms were observed. We recommend to examine other molecular components, such as Cor a 11 (7S globulin), Cor a 14 (2S albumin), Cor a 12 (Oleosin), Cor a 2 (Profilin), Jug r 4 (11S globulin), Jug r 5, Jug r 7 (Profilin) and Jug r 6 (7S globulin), Jug r 8 (nsLTP), in patients suffering from clinical reaction to walnuts and/or hazelnuts without positive results in ISAC Multiplex testing.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

This work was supported by Charles University Progres [grant number Q 40/N]; Charles University [grant number Q40/N]; Univerzita Karlova v Praze [grant number Q40/N].

## References

- Anto, J. M., Bousquet, J., Akdis, M., Auffray, C., Keil, T., Momas, I., Postma, D. S., Valenta, R., Wickman, M., Cambon-Thomsen, A., Haahtela, T., Lambrecht, B. N., Lodrup Carlsen, K. C., Koppelman, G. H., Sunyer, J., Zuberbier, T., Annesi-Maesano, I., Arno, A., Bindslev-Jensen, C., ... Guerra, S. (2017). Mechanisms of the development of allergy (MeDALL): introducing novel concepts in allergy phenotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(2), 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.940>
- Ballmer-Weber, B. K., Lidholm, J., Fernández-Rivas, M., Seneviratne, S., Hanschmann, K.-M., Vogel, L., Bures, P., Fritsche, P., Summers, C., Knulst, A. C., Le, T.-M., Reig, I., Papadopoulos, N. G., Sinaniotis, A., Belohlavkova, S., Popov, T., Kralimarkova, T., de Blay, F., Purohit, A., ... Dubakiene, R. (2015). Ige recognition patterns in peanut allergy are age



- dependent: Perspectives of the EuroPrevall study. *Allergy*, 70(4), 391–407. <https://doi.org/10.1111/all.12574>
- Bousquet, J., Anto, J. M., Wickman, M., Keil, T., Valenta, R., Haahtela, T., Lodrup Carlsen, K., van Hage, M., Akdis, C., Bachert, C., Akdis, M., Auffray, C., Annesi-Maesano, I., Bindslev-Jensen, C., Cambon-Thomsen, A., Carlsen, K. H., Chatzi, L., Forastiere, F., Garcia-Aymerich, J., ... Guerra, S. (2015). Are allergic multimorbidities and IgE polysensitization associated with the persistence or re-occurrence of foetal type 2 signalling? The MeDALL hypothesis. *Allergy*, 70(9), 1062–1078. <https://doi.org/10.1111/all.12637>
- Burney, P. G. J., Potts, J., Kummeling, I., Mills, E. N. C., Clausen, M., Dubakiene, R., Barreales, L., Fernandez-Perez, C., Fernandez-Rivas, M., Le, T. M., Knulst, A. C., Kowalski, M. L., Lidholm, J., Ballmer-Weber, B. K., Braun-Fahlander, C., Mustakov, T., Kralimarkova, T., Popov, T., Sakellariou, A., ... van Ree, R. (2014). The prevalence and distribution of food sensitization in European adults. *Allergy*, 69(3), 365–371. <https://doi.org/10.1111/all.12341>
- Čelakovská, J., & Bukač, J. (2011). Food adverse reactions in patients over 14 years of age suffering from atopic eczema. *Food and Agricultural Immunology*, 22(2), 105–114. <https://doi.org/10.1080/09540105.2010.533751>
- Čelakovská, J., & Bukač, J. (2017). Severity of atopic dermatitis in relation to food and inhalant allergy in adults and adolescents. *Food and Agricultural Immunology*, 28(1), 121–133. <https://doi.org/10.1080/09540105.2016.1228838>
- Čelakovská, J., Bukač, J., Ettler, K., Vaneckova, J., & Ettlerova, K. (2018). Allergy to peanuts in atopic dermatitis patients 14 year or older and the Association with food Hypersensitivity, inhalant allergens, asthma bronchiale and rhinitis. *Indian Journal of Dermatology*, 63(4), 317–322. PMID: 30078876; PMCID: PMC6052752. [https://doi.org/10.4103/ijd.IJD\\_576\\_17](https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_576_17)
- Celakovska, J., Vankova, R., Bukac, J., Krejsek, J., & Andrys, C. (2021). The relation between the sensitisation to molecular components of inhalant allergens and food reactions in patients suffering from atopic dermatitis. *Food and Agricultural Immunology*, 32(1), 33–53. <https://doi.org/10.1080/09540105.2020.1865281>
- Clark, A. T., & Ewan, P. W. (2003). Interpretation of tests for nut allergy in one thousand patients, in relation to allergy or tolerance. *Clinical and Experimental Allergy*, 33(8), 1041–1045. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.01624.x>
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., & Oliveira, M. B. (2016). Hazelnut allergens: Molecular characterization, detection, and clinical relevance. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(15), 2579–2605. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.826173>
- Datema, M. R., van Ree, R., Asero, R., Barreales, L., Belohlavkova, S., de Blay, F., Clausen, M., Dubakiene, R., Fernández-Perez, C., Fritsche, P., Gislason, D., Hoffmann-Sommergruber, K., Jedrzejczak-Czechowicz M, M., & Ballmer-Weber, B. (2018 Mar). Component-resolved diagnosis and beyond: Multivariable regression models to predict severity of hazelnut allergy. *Allergy*, 73(3), 549–559. Epub 2017 Nov 24. Erratum in: *Allergy*. 2020 Aug;75(8):2145-2145. PMID: 28986984. <https://doi.org/10.1111/all.13328>
- Dooper, M. M. B. W., Plassen, C., Holden, L., Moen, L. H., Namork, E., & Egaas, E. (2008). Antibody binding to hazelnut (*Corylus avellana*) proteins: The effects of extraction procedure and hazelnut source. *Food and Agricultural Immunology*, 19(3), 229–240. <https://doi.org/10.1080/09540100802243325>
- Ebo, D. G., Verweij, M. M., Sabato, V., Hagendorens, M. M., Bridts, C. H., & De Clerck, L. S. (2012). Hazelnut allergy: A multi-faced condition with demographic and geographic characteristics. *Acta Clinica Belgica*, 67, 317–321. <https://doi.org/10.2143/ACB.67.5.2062683>. PMID: 23189537.
- European Task Force on Atopic Dermatitis. (1993). Severity scoring of atopic dermatitis: The SCORAD index (consensus report of the European Task Force on atopic dermatitis). *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 186(1), 23–31. <https://doi.org/10.1159/000247298>
- Faber, M. A., De Graag, M., Van Der Heijden, C., Sabato, V., Hagendorens, M. M., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., & Ebo, D. G. (2014). Cor a 14: Missing link in the molecular diagnosis of hazelnut allergy? *International Archives of Allergy and Immunology*, 164(3), 200–206. <https://doi.org/10.1159/000365050>

- Flores Kim, J., McCleary, N., Nwaru, B. I., Stoddart, A., & Sheikh, A. (2018). Diagnostic accuracy, risk assessment, and cost-effectiveness of component-resolved diagnostics for food allergy: A systematic review. *Allergy*, *73*(8), 1609–1621. <https://doi.org/10.1111/all.13399>
- Hanifin, J., & Rajka, G. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, *92*, 44–47.
- Klemans, R. J., van Os-Medendorp, H., Blankestijn, M., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Knol, E. F., & Knulst, A. C. (2015). Diagnostic accuracy of specific IgE to components in diagnosing peanut allergy: A systematic review. *Clinical Experimental Allergy*, *45*(4), 720–730. <https://doi.org/10.1111/cea.12412>
- Lange, L., Lasota, L., Finger, A., Vlajnic, D., Büsing, S., Meister, J., Broekaert, I., Pfannenstiel, C., Friedrichs, F., Price, M., Trendelenburg, V., Niggemann, B., & Beyer, K. (2017). Ana o 3-specific IgE is a good predictor for clinically relevant cashew allergy in children. *Allergy*, *72*(4), 598–603. <https://doi.org/10.1111/all.13050>
- Maloney, J. M., Rudengren, M., Ahlstedt, S., Bock, S. A., & Sampson, H. A. (2008). The use of serum specific IgE measurements for the diagnosis of peanut, tree nut, and seed allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(1), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.014>
- Manam, S., Tsakok, T., Till, S., & Flohr, C. (2014). The association between atopic dermatitis and food allergy in adults. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, *14*(5), 423–429. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000095>
- Masthoff, L. J. N., Mattsson, L., Zuidmeer-Jongejan, L., Lidholm, J., Andersson, K., Akkerdaas, J. H., Versteeg, S. A., Garino, C., Meijer, Y., Kentie, P., Versluis, A., den Hartog Jager, C. F., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Knulst, A. C., van Ree, R., van Hoffen, E., & Pasmans, S. G. M. A. (2013). Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(2), 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.024>
- Masthoff, L. J., Pasmans, S. G., Hoffen, E., Knol, M. J., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Flinterman, A. E., Kentie, P., Knulst, A. C., & Meijer, Y. (2012). Diagnostic value of hazelnut allergy tests including rCor a 1 spiking in double-blind challenged children. *Allergy*, *67*(4), 521–527. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02766.x>
- Masthoff, L. J., van Hoffen, E., Mattsson, L., Lidholm, J., Andersson, K., Zuidmeer-Jongejan, L., Versteeg, S. A., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Knulst, A. C., Pasmans, S. G., & van Ree, R. (2015). Peanut allergy is common among hazelnut-sensitized subjects but is not primarily the result of IgE cross-reactivity. *Allergy*, *70*(3), 265–274. <https://doi.org/10.1111/all.12554>
- Matricardi, P. M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H. J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., Aalberse, R. C., Agache, I., Asero, R., Ballmer-Weber, B., Barber, D., Beyer, K., Biedermann, T., Bilò, M. B., Blank, S., Bohle, B., Bosshard, P. P., Breiteneder, H., Brough, H. A., ... Lopata, A. L. (2016). EAACI molecular Allergology User's guide. *Pediatric Allergy and Immunology*, *27*(Suppl 23), 1–250. <https://doi.org/10.1111/pai.12563>
- McWilliam, V., Koplin, J., Lodge, C., Tang, M., Dharmage, S., & Allen, K. (2015). The prevalence of tree Nut allergy: A Systematic review. *Current Allergy and Asthma Reports*, *15*(9), 54. <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0555-8>. PMID: 26233427.
- Melioli, G., Bonifazi, F., Bonini, S., Maggi, E., Mussap, M., Passalacqua, G., Rossi, E. R., Vacca, A., & Canonica, G. W. (2011). The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clinical Biochemistry*, *44*(12), 1005–1011. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.05.007>
- Nilsson, C., Berthold, M., Mascialino, B., Orme, M., Sjölander, S., & Hamilton, R. (2020 Feb). Allergen components in diagnosing childhood hazelnut allergy: Systematic literature review and meta-analysis. *xx*, *31*(2), 186–196. Epub 2020 Jan 1. PMID: 31301691. <https://doi.org/10.1111/pai.13110>
- Nwaru, B. I., Hickstein, L., Panesar, S. S., Roberts, G., Muraro, A., & Sheikh, A. (2014). Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*, *69*(8), 992–1007. <https://doi.org/10.1111/all.12423>

- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Robino, A. M., Scibilia, J., Fortunato, D., Conti, A., Borgonovo, L., Bengtsson, A., & Ortolani, C. (2004). Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(4), 908–914. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.06.020>
- Sato, S., Yamamoto, M., Yanagida, N., Ito, K., Ohya, Y., Imai, T., Nagao, M., Borres, M. P., Movérare, R., Ebisawa, M. (2017). Jug r 1 sensitization is important in walnut-allergic children and youth. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 5(6), 1784–1786.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.04.025>
- Sicherer, S. H., Muñoz-Furlong, A., Godbold, J. H., & Sampson, H. A. (2010). US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6), 1322–1326. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.03.029>
- Skypala, I. J., Cecchi, L., Shamji, M. H., Scala, E., & Till, S. (2019 Jul). Lipid transfer protein allergy in the United Kingdom: Characterization and comparison with a matched Italian cohort., 74(7), 1340–1351. <https://doi.org/10.1111/all.13747>. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30762886; PMCID: PMC6767535
- Teuber, S. S., Dandekar, A. M., Peterson, W. R., & Sellers, C. L. (1998). Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(6), 807–814. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70308-2](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70308-2)
- Tuano, K. S., & Davis, C. M. (2015). Utility of component-resolved diagnostics in food allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(6), 32. <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0534-0>
- Uotila, R., Kukkonen, A. K., Pelkonen, A. S., & Makela, M. J. (2016). Cross-sensitization profiles of edible nuts in a birch-endemic area. *Allergy*, 71(4), 514–521. <https://doi.org/10.1111/all.12826>
- Valcour, A., Lidholm, J., Borres, M. P., & Hamilton, R. G. (2019). Sensitization profiles to hazelnut allergens across the United States. *Annals of Allergy, Asthma Immunology*, 122(1), 111–116.e1. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.09.466>
- van Erp, F. C., Klemans, R. J., Meijer, Y., van der Ent, C. K., & Knulst, A. C. (2016). Using component-resolved diagnostics in the management of peanut-allergic patients. *Current Treatment Options in Allergy*, 3(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s40521-016-0080-6>
- van Hage, M., Hamsten, C., & Valenta, R. (2017). ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), 974–977. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.008>
- Verweij, M. M., Hagendorens, M. M., De Knop, K. J., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., Stevens, W. J., & Ebo, D. G. (2011). Young infants with atopic dermatitis can display sensitization to Cor a 9, an 11S legumin-like seed-storage protein from hazelnut (*Corylus avellana*). *Pediatric Allergy and Immunology*, 22(2), 196–201. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01088.x>
- Verweij, M. M., Hagendorens, M. M., Trashin, S., et al. (2012). Age-dependent sensitization to the 7S-vicilin-like protein Cor a 11 from hazelnut (*Corylus avellana*) in a birch-endemic region. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 22, 245–251.
- Weidinger, S., & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis. *The Lancet*, 387(10023), 1109–1122. doi:10.1016/S0140-6736(15)00149-X