



# Improvement of *in vitro* food allergy diagnostics by identifying unique antibody traits

A.M. Ehlers

Op 18 februari 2021 promoveerde Anna Ehlers aan de Universiteit van Utrecht. De titel van haar proefschrift was "Improvement of *in vitro* food allergy diagnostics by identifying unique antibody traits". Haar promotor was prof. dr. A.C. Knulst en haar copromotor was dr. H.G. Otten.

In Europa heeft gemiddeld drie procent van de volwassenen bevolking last van een voedselallergie. In Nederland zijn dit vooral allergieën tegen pinda, hazelnoot, fruit (appel, perzik, kiwi) en schaaldieren. [1] De diagnose van voedselallergieën kan bestaan uit vier verschillende onderdelen: anamnese, huidtest (*skin prick test*), bloedonderzoek (meten van specifiek IgE) en de dubbelblinde voedselprovocatie. Hoewel de dubbelblinde voedselprovocatie als gouden standaard beschouwd wordt, zitten er nadelen aan zoals de tijdsinvestering, het risico dat de patiënt een allergische reactie ontwikkelt, en hoge kosten. Het meten van specifiek IgE is een minimaal invasief alternatief maar het kan resultaten opleveren die in tegenpraak zijn met de uitslag van een dubbelblinde provocatie:

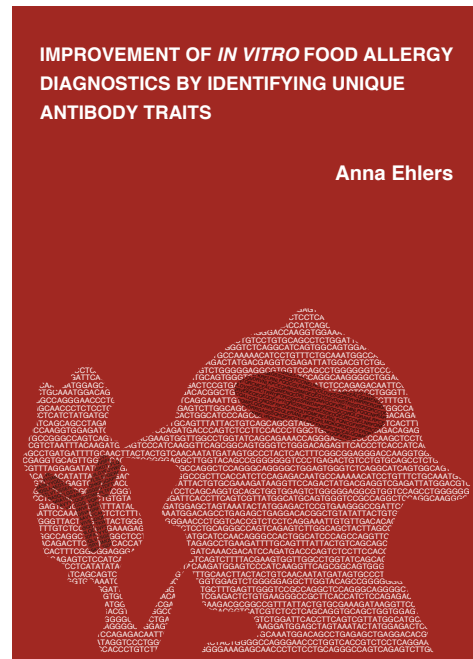
- a) De test toont geen specifieke IgE antilichamen, terwijl er wel sprake is van een bevestigde voedselallergie (**fout-negatieve test uitslag**)
- b) De test toont specifieke IgE antilichamen, terwijl er geen sprake is van een bevestigde voedselallergie (**fout-positieve test uitslag**)

Het doel van dit proefschrift was om de diagnose van een voedselallergie op basis van bloedtesten te verbeteren en daarmee in de toekomst het aantal benodigde voedselprovoCATIES te verminderen.

## FOUT-NEGATIEVE TEST UITSLAGEN

Een deel van de voedsel allergische patiënten – bijvoorbeeld 30% van de sesamzaad allergische patiënten [2] - heeft geen aantoonbaar specifiek IgE in het bloed. Fout-negatieve testresultaten kunnen worden verminderd door het identificeren van verantwoordelijke allergenen die nog niet beschikbaar zijn voor de huidige specifiek IgE diagnostiek. In dit proefschrift hebben we ons erop gericht om missende allergenen voor macadamia noten en sesamzaad te identificeren.

Momenteel is slechts een klein aantal patiënten met een voedselallergie allergisch voor macadamia noten; rond 1%



van de boomnoten allergische populatie. [3] Er wordt echter verwacht dat deze aantallen gaan stijgen, aangezien de consumptie van macadamia noten flink groeit. Met behulp van het onderzoek kon een nieuw macadamia noot allergeen aangetoond worden: Mac i 1 behorend tot een groep eiwitten genaamd vicilinen. Tot de viciline groep behoren ook belangrijke bekende allergenen van andere voedingsmiddelen (bijvoorbeeld Ara h 1 van pinda). Mac i 1 werd door specifiek IgE van 30% (3/10) macadamia noten allergische patiënten herkend. Dit waren vooral patiënten met matig tot ernstige klachten en Mac i 1 kan daarom belangrijk zijn bij het identificeren van allergische patiënten met een verhoogd risico op ernstige klachten.

Onderzoeker, Divisie Laboratoria, Apotheek en Biomedische Genetica, Center for Translational Immunology, UMC Utrecht

De huidige test-kits voor de specifiek IgE diagnostiek (zowel serologie als SPT) bevatten vooral allergenen die in water oplosbaar zijn. Daarentegen zijn eiwitten die niet in water, maar in vet oplosbaar zijn meestal afwezig. Er is echter wel een groep vet oplosbare eiwitten, oleosinen genoemd, die als allergenen bekend zijn. [2,4] Om de rol van deze eiwitten beter in kaart te brengen, hebben we oleosinen uit sesamzaad (native en recombinant) en hun binding door specifiek IgE onderzocht. In tegenstelling tot onze verwachting was er alleen bij 17% sesam allergische patiënten specifiek IgE tegen sesam oleosinen aantoonbaar. Indien er wel specifiek IgE tegen sesam oleosinen aantoonbaar was, zaten de titer net boven de detectiegrens en hadden deze patiënten ook aantoonbaar specifiek IgE tegen bekende water oplosbare allergenen. Deze resultaten wijzen erop dat sesam oleosinen geen belangrijke bijdrage kunnen leveren aan verbetering van de huidige bloedtesten voor sesamzaad.

### FOUT-POSITIEVE TEST UITSLAGEN

Het aantal fout-positieve test uitslagen is afhankelijk van het allergeen waartegen specifiek IgE bepaald wordt. Fout-positieve specifiek IgE metingen tegen pinda extract - meestal gebruikt in de huidige bloedtesten - komen vaker voor (rond 30-35%) dan fout-positieve specifiek IgE metingen tegen het pinda allergeen Ara h 2. [5] Hoewel specifiek IgE tegen Ara h 2 in ongeveer 90% van de patiënten een pinda allergie aantoont, is ongeveer 10% van de patiënten met specifiek IgE tegen Ara h 2 pinda tolerant. [6] Het optreden van fout-positieve test uitslagen kan mogelijk deels verklaard worden door verschillen tussen specifieke IgE antilichamen van allergische en tolerante patiënten. In dit proefschrift hebben we vooral gekeken naar verschillen in hun IgE herkenningspatroon, met name aan zogenaamde lineaire epitopen. Lineaire epitopen bestaan uit aminozuren die in de aminozuur sequentie op elkaar volgen. Dit is uitgezocht voor de kippenei allergenen Gal d 1 en 3. Voor de pinda allergenen Ara h 2 en 6 werd ook naar verschillen op gen-niveau gekeken.

Kippenei allergie komt vaak voor bij kinderen en deze 'groeien er meestal overheen', ofwel er vindt spontane tolerantie plaats. Echter komt kippenei allergie in mindere mate ook voor bij volwassenen, namelijk wanneer er geen spontane tolerantie optreedt, en het kan ook pas op volwassen leeftijd ontstaan. Uit ons onderzoek is gebleken dat een aantal volwassenen niet allergisch is voor kippenei, ondanks dat er sprake is van een verhoogd specifiek IgE tegen kippenei extract en de hoofdallergenen Gal d 1 en 3. Dit is een aanwijzing dat specifiek IgE tegen het complete allergeen Gal d 1 en 3 niet gebruikt kan worden om een kippenallergie bij volwassenen goed te voorspellen, hoewel specifiek IgE tegen Gal d 1 wel een aanwijzing voor een kippenei allergie bij kinderen kan zijn. [7] Door het bestuderen van de IgE herkenningspatronen zijn drie lineaire epitopen van Gal d 1 (aa 30-41, aa 39-50 of aa 84-95) geïdentificeerd die vooral herkend worden door specifiek IgE van kippenei allergische patiënten met moderate tot ernstige klachten. Daarmee kan diagnostiek gericht op deze drie epitopen bijdragen aan het verminderen van fout-positieve testuitslagen bij kippenei allergie diagnostiek van volwassenen. Voor de implementatie van



Anna Ehlers

specifiek IgE metingen tegen lineaire epitopen in de routine diagnostiek moeten nog makkelijk uitvoerbare tools ontwikkeld worden.

Voor het identificeren van IgE herkenningspatronen worden normaliter patiënten sera gebruikt. Echter kan het door het gebruik van patiënten sera mogelijk zijn dat relevante epitopen niet duidelijk of zelfs helemaal niet geïdentificeerd kunnen worden. Dit kan veroorzaakt worden doordat [8]:

- Het serum van allergische patiënten zowel IgE antilichamen kan bevatten die epitopen herkennen die voor het veroorzaken van een allergische reactie relevant zijn, als IgE antilichamen die epitopen herkennen die daarvoor niet van belang zijn. Dit bemoeilijkt de identificatie van relevante epitopen.
- Het serum van tolerante patiënten IgE antilichamen kan bevatten die ogenschijnlijk relevante epitopen herkennen. Deze epitopen zijn echter toch niet relevant, omdat de binding door het antilichaam (affiniteit) waarschijnlijk niet sterk genoeg is om basofielen en mest cellen te activeren.
- Het serum van tolerante patiënten niet-IgE antilichamen kan bevatten die de binding van relevante IgE antilichamen kunnen blokkeren.

Een mogelijke oplossing is om deze antilichamen afzonderlijk in kaart te brengen. Dit kan gedaan worden door de extractie van DNA van afzonderlijke B cellen, waarmee vervolgens de specifieke (monoclonale) antilichamen worden gemaakt. Om na te gaan of hiermee de diagnostiek kan worden verbe-

terd, zijn monoklonale antilichamen gericht tegen de allergenen Ara h 2 of 6 van pinda allergische en pinda tolerante patiënten gemaakt. Door het bestuderen van hun DNA-informatie zijn belangrijke verschillen tussen pinda allergische en tolerante patiënten aangetoond:

- Het variabele gedeelte van de zware antilichaam-keten dat belangrijk is voor het herkennen van het allergeen, werd veel vaker door één bepaalde groep V genen (VH3 familie genen) gevormd als ze afkomstig waren van allergische patiënten (89% pinda allergisch versus 54% pinda tolerant).
- Complementariteitsbepalende regio (CDR) 3 die meest belangrijk is voor het binden aan het allergeen, heeft in een deel van de specifieke antilichamen een unieke genetische opbouw als de antilichaam afkomstig is van een pinda allergische patiënt.

Deze resultaten wijzen erop dat er DNA-patronen bestaan die potentieel onderscheid kunnen maken tussen pinda allergische en pinda tolerante patiënten. Als er een eenvoudiger techniek ontwikkeld zou worden om deze verschillen te detecteren en deze resultaten in een grotere patiënten populatie bevestigd kan worden, kunnen bovenstaande resultaten bijdragen aan de ontwikkeling van een bloedtest die een beter onderscheid maakt tussen pinda allergische en niet pinda allergische patiënten.

De resultaten van dit proefschrift vormen een solide basis voor de ontwikkeling van verbeterde of nieuwe bloedtesten die fout-negatieve en fout-positieve test uitslagen kunnen verminderen of zelfs voorkomen. Afhankelijk van het allergeen bestaan er verschillende mogelijkheden om dit doel te bereiken: bijvoorbeeld de bepaling van specifiek IgE tegen lineaire epitopen (voor het kippenei allergeen Gal d 1) of het evalueren van antilichaam DNA-patronen (voor de pinda allergenen Ara

h 2 en 6). Daarnaast kan met het nieuwe macadamia noot allergeen en ook de lineaire epitopen van Gal d 1 een verhoogd risico op een ernstige reactie worden voorspeld.

## LITERATUUR

1. Lyons SA, et al. Food Allergy in Adults: Substantial Variation in Prevalence and Causative Foods Across Europe. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019. 7(6):1920-8.
2. Leduc V, et al. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy.* 2006. 61(3):349-56.
3. Sasaki M, et al. Prevalence of clinic-defined food allergy in early adolescence: The SchoolNuts study. *J Allergy Clin Immunol.* 2018. 141(1):391-8.e4.
4. Zuidmeer-Jongejan L, et al., Oil body-associated hazelnut allergens including oleosins are underrepresented in diagnostic extracts but associated with severe symptoms. *Clin Transl Allergy.* 2014;4:4.
5. Klemans RJB, et al., Diagnostic accuracy of specific IgE to components in diagnosing peanut allergy: a systematic review. *Clin Exp Allergy.* 2015. 45(4):720-30.
6. Blankestijn MA, et al. Specific IgE to peanut 2S albumin Ara h 7 has a discriminative ability comparable to Ara h 2 and 6. *Clin Exp Allergy.* 2018. 48(1):60-5.
7. Chokshi NY, Sicherer S. Molecular diagnosis of egg allergy: an update. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(7):895-906.
8. Ehlers AM, et al. Can alternative epitope mapping approaches increase the impact of B-cell epitopes in food allergy diagnostics? *Clin Exp Allergy.* 2019;49(1):17-26.

---

## CORRESPONDENTIEADRES

Anna Ehlers

E-mail: a.m.ehlers@umcutrecht.nl