

LUCRARI ORIGINALE SI PROIECTE

Alergenele recombinante – metode de producere și utilitatea în diagnosticul molecular și în imunoterapia alergică

Recombinant Allergens – Production Methods and Use in Molecular Diagnosis and Allergen Immunotherapy

Maria Roxana Buzan (/reviste/search?author=Buzan+Maria Roxana),
Manuela Grijincu (/reviste/search?author=Grijincu+Manuela),
Lauriana-Eunice Zbîrcea (/reviste/search?author=Zbîrcea+Lauriana-Eunice),
Laura Haidar (/reviste/search?author=Haidar+ Laura),
Prof. Univ. Dr. Carmen Bunu-Panaitescu (/reviste/search?author=Bunu-Panaitescu+Carmen)

First published: 31 martie 2020

Editorial Group: MEDICHUB MEDIA

DOI: 10.26416/Aler.4.1.2020.2979

Abstract

Although allergen extracts show some disadvantages, they are widely used both for in vivo diagnosis and for allergen immunotherapy. One way to overcome allergen extracts' limitations is to use recombinant allergens. Selection of an appropriate expression system is dependent on the characteristics and intended application of the recombinant protein. The prokaryotic expression system is suitable for allergens that do not require post-translational modifications; however, there are allergens that need to be expressed in eukaryotic cells in order to acquire their biological activity. The use of these recombinant proteins ensures an increased specificity and sensitivity of the diagnosis and safer and more effective immunotherapy.

Keywords

recombinant allergens, prokaryotic expression system, eukaryotic expression system, molecular diagnosis, molecular allergen immunotherapy

Rezumat

Extractele alergenice sunt folosite pe scară largă atât în diagnosticul *in vivo*, cât și în terapia bolilor alergice, deși prezintă multiple dezavantaje. O soluție pentru a evita limitările extractelor este utilizarea de alergene recombinante. Selecția unui sistem de expresie proteică depinde de caracteristicile și aplicațiile proteinei recombinante. Alergenele care nu necesită modificări posttranslaționale pot fi obținute într-un sistem de expresie de tip procariot, dar există și alergene care trebuie exprimate în celule eucariote pentru a-și putea dobândi activitatea biologică. Utilizarea clinică a acestor proteine recombinante duce la creșterea specificității și sensibilității diagnosticului și asigură o imunoterapie mai sigură și mai eficientă.

Cuvinte cheie

alergene recombinante (/reviste/alergologia?tag=alergene recombinante)

sistem de expresie proteică de tip procariot (/reviste/alergologia?tag=sistem de expresie proteică de tip procariot)

sistem de expresie proteică de tip eucariot (/reviste/alergologia?tag=sistem de expresie proteică de tip eucariot)

diagnostic molecular (/reviste/alergologia?tag=diagnostic molecular)

imunoterapia alergică moleculară (/reviste/alergologia?tag=imunoterapia alergică moleculară)

Introducere

În prezent, diagnosticul *in vivo* al alergiilor și imunoterapia alergică se bazează în mare pe extracte alergenice obținute din surse naturale. Deși calitatea acestor extracte a crescut în ultimele decenii prin standardizarea procedurii de obținere, faptul că provin din surse naturale le face foarte eterogene, existând variații în ceea ce privește compoziția și cantitatea de molecule alergenice^(1,2). De asemenea, extractele pot fi contaminate cu alergene provenite din alte surse sau pot conține molecule bioactive care pot afecta stabilitatea acestora (enzime proteolitice care pot degrada alergenele)^(3,4).

Tehnologiile de obținere a alergenelor recombinante pot fi folosite pentru a înlătura neajunsurile extractelor alergenice. În ultimele decenii a fost produsă o mare varietate de alergene recombinante similare ca structură, funcție și răspuns imun cu omoloagele lor naturale, provenite de la plante, mușegaiuri, acarieni, insecte și mamifere, folosind atât sisteme de expresie de tip procariot, cât și de tip eucariot^(5,6). Utilizarea clinică a acestor produse ajută la creșterea specificității și sensibilității diagnosticului⁽⁷⁾ și asigură o imunoterapie mai sigură și mai eficientă⁽⁸⁾.

Primul pas în producerea alergenelor recombinante îl reprezintă obținerea secvenței de nucleotide care codifică proteina de interes. Folosind ARN mesager (ARNm) izolat din sursa alergică, se sintetizează prin reacția de polimerizare în lanț în timp real (RT-PCR)^(9,10) ADN complementar (ADNc), care mai apoi este clonat într-un vector specific sistemului de expresie care urmează să fie folosit.

În funcție de complexitatea structurală și funcțională a alergenelor, se pot folosi două sisteme de expresie, de tip bacterian și de tip eucariot. Sistemul de tip bacterian este utilizat cu succes și costuri reduse în cazul proteinelor cu structură simplă, care nu necesită modificări posttranslaționale. Alergenele mai complexe din punct de vedere

structural, cu glicozilări și punți disulfidice, sunt produse în sisteme de expresie de tip eucariot. Un avantaj al acestui sistem este purificarea simplă, redusă la o singură procedură, cromatografia de afinitate⁽¹⁾.

(/image/10514/0/tabel_1_10514.png)

Tabel 1. Caracteristicile diferitelor sisteme de expresie proteică. Prezentare educațională adaptată după Fernandez et al. (1999)⁽¹²⁾



(/image/10515/0/figura_1_10515.png)

Figura 1. Obținerea alergenelor recombinante în celulele de *E. coli*. Primul pas este reprezentat de clonarea secvenței de nucleotide în vectorul bacterian (plasmid), urmată de transformarea celulelor de *E. coli* competente. Acestea vor fi cultivate în mediu de cultură, urmând să se inducă sinteza proteică. Vor urma pașii de izolare, purificare și analiză a purității alergenului obținut

Acest articol analizează și compară diferite sisteme de expresie folosite pentru producerea alergenelor recombinante (tabelul 1), precum și utilizarea acestora în vederea îmbunătățirii diagnosticului și terapiei în bolile alergice.

Sistemul de expresie proteică de tip bacterian

Escherichia coli este una dintre cele mai utilizate gazde bacteriene pentru producerea cu randament ridicat de proteine recombinante. *E. coli* este un sistem convenabil și versatil de obținere a unei cantități mari de alergen recombinat, datorită ratei rapide de creștere într-un mediu de cultură ieftin și ușor de preparat (figura 1). Cu toate acestea, este un sistem procariot căruia îi lipsește mecanismul celular responsabil de procesele și modificările posttranslaționale, dezavantajul major fiind reprezentat de eșecul unor proteine recombinante de a dobândi structura secundară nativă, activă biologic. Adesea, supraproducția de proteine străine în citoplasma *E. coli* determină o agregare a acestora, formând incluziuni celulare insolubile, care necesită solubilizare cu agenți chatropici puternici, urmată de o reîmpachetare graduală pentru a deveni active funcțional⁽¹³⁾. Un astfel de exemplu îl reprezintă alergenul major din chiparos, Cup a 1.02, care a fost exprimat în *E. coli* și a necesitat solubilizare și reîmpachetare pentru a redobândi forma reactivă IgE a alergenului⁽¹³⁾.

Strategiile pentru creșterea calității și randamentului de producere a proteinelor recombinante în celule bacteriene s-au concentrat pe îmbunătățiri genetice, precum construirea unor vectori de expresie mai buni și prin eliminarea genelor codificatoare de proteaze din tulpinile bacteriene. De asemenea, au fost create tulpini bacteriene capabile să faciliteze formarea punților disulfidice. Alergenul Ara h 2, din alune, a fost produs prin expresia într-o tulpină de *E. coli* modificată, Origami (DE3), care conține în citoplasmă elemente oxidative care permit formarea punților disulfidice⁽¹⁴⁾.

(/image/10517/0/figura_2_10517.png)

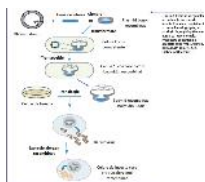


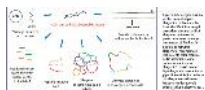
Figura 2. Expresia alergenelor recombinante în celule de insecte. Etapele expresiei sunt scrise cu litere îngroșate, iar produșii obținuți după fiecare etapă, cu litere normale. Prezentare educațională adaptată după <https://biotop.boku.ac.at/Projects/2015/Grabherr2015c.html>(25)

Sistemul de expresie procariot continuă să fie prima alegere când vine vorba despre producerea de alergene recombinante, numeroase alergene fiind produse în acest sistem (de exemplu, Ara h 1⁽¹⁵⁾, Bet v 1⁽¹⁶⁾, Fel d 1⁽¹⁷⁾, Cor a 1⁽¹⁸⁾).

Sistemul de expresie proteică de tip eucariot

Avantajul major al sistemelor de expresie de tip eucariot este reprezentat de capacitatea de a realiza modificări posttranslaționale, precum formarea legăturilor disulfidice, adăugarea de lipide și carbohidrați. Cele mai utilizate sisteme de expresie de tip eucariot sunt drojdiile, celulele de plante, celulele de insecte și celulele de mamifere.

Având o rată de înmulțire ridicată și necesități minime, **sistemul de expresie în drojdii** s-a dovedit util pentru producerea de alergene recombinante. Popularitatea crescută a acestui sistem se datorează procesului simplu și randamentului ridicat de obținere a proteinelor, precum și capacității de a efectua modificări posttranslaționale (formarea de legături disulfidice și glicozilări). Organismul cel mai utilizat este *Pichia pastoris*, primele alergene exprimate fiind Cyn d 1⁽¹⁹⁾, Alt a 1⁽²⁰⁾, Mus m 1⁽²¹⁾ și Bla g 4⁽²²⁾. Principalul dezavantaj al sistemului de expresie în drojdii este hiperglicozilarea proteinelor⁽²³⁾, modelele de glicozilare N- sau O-linkată putând fi diferite de cele ale proteinei native⁽²⁴⁾.



(/image/10513/0/figura_3_10513.png)

Figura 3. Strategiile posibile pentru imunoterapiile alergice moleculare. Pe baza identificării secvenței de nucleotide care codifică alergenul de interes se poate determina secvența de aminoacizi, fiind astfel posibilă construirea alergenelor recombinante (echivalente celor naturale de tip sălbatic) și a unor derivate cu activitate alergică redusă precum hipoalergenicele recombinante și peptidele sintetice derivate din alergenele de interes. Prezentare educațională adaptată după Zhernov et al. (2019)(43)

Sistemul de expresie în celule de insecte, asociat cu un vector baculovirus, devine tot mai des utilizat în domeniul producerii de alergene recombinante. Acest sistem se bazează pe capacitatea baculovirusului de a infecta celulele de insecte, având o specificitate ridicată în ceea ce privește tipul de gazdă infectată. Procesul de obținere a proteinelor recombinante presupune clonarea genei de interes într-un vector bacterian (plasmid helper), cu care sunt mai apoi transformate celulele de *E. coli* competente care conțin bacmidul (plasmid care conține baculovirusul fără gena de interes). Secvența de nucleotide care codifică alergenul de interes este apoi inserată în bacmid prin transpoziție, rezultând un bacmid recombinat care va fi utilizat în transfecția celulelor de insecte (figura 2) care vor asambla baculovirusul, continuându-se infecția. Alergenul

recombinat este secretat în mediul de cultură, de unde urmează a fi izolat și purificat după 36-96 de ore de la infecție. Baculovirusul distruge celulele de insecte, astfel că nu se poate realiza o producție continuă, neîntreruptă.

Printre alergenele obținute folosind sistemul cu baculovirus se numără: Api m 2⁽²⁶⁾, Fel d 1⁽²⁷⁾, Mal f 1⁽²⁸⁾. Toate aceste alergene recombinante prezintă o capacitate de legare a IgE și activitate biologică similare cu cele ale proteinelor native.

Deoarece necesită echipamente sofisticate și presupune costuri ridicate de producție, cu randament scăzut, **sistemul de expresie în celule de mamifere** este foarte rar folosit (Per a 1⁽²⁹⁾). Pentru expresie se mai pot utiliza și **plantele**, proteinele putându-se acumula în cantități ridicate în diferite organe ale acestora (s-au obținut Bet v 1 recombinat imunoreactiv și două alergene din latex – Hev b 1 și Hev b 3 –, folosind plante de tutun⁽³⁰⁾).

Indiferent de sistemul de expresie proteică folosit, alergenele recombinante obținute urmează numeroși pași de purificare cromatografică și, fiind apoi analizate din punctul de vedere al identității, calității, cantității și stabilității, prin metode precum electroforeza, spectrometria de masă și dicroism circular. De asemenea, vor fi comparate cu omoloagele naturale în ceea ce privește activitatea biologică (reactivitate IgE, teste de activare a bazofilelor).

În cadrul proiectului INSPIRED (Strategii inovative pentru prevenția, diagnosticul și terapia afecțiunilor respiratorii induse de polenul de ambrozie), echipa de cercetători de la centrul OncoGen, Timișoara, a reușit să producă alergene recombinante din polenul de *Ambrosia artemisiifolia*. Pentru alergenele mai simple din punct de vedere conformațional (Amb a 8, Amb a 9, Amb a 10) s-a folosit sistemul de expresie de tip procariot, iar pentru cele mai complexe (Amb a 1, Amb a 4, Amb a 6), sistemul de expresie în celule de insecte. De asemenea, pentru câteva alergene (Amb a 3, Amb a 5, Amb a 11, Amb a 12) s-a mers în paralel cu ambele sisteme, pentru a stabili care este cel mai potrivit pentru obținerea unei reactivități IgE comparabile cu cea a omologului natural.

(/image/10516/0/tabel_2_10516.png)

Mecanismele, avantajele și dezavantajele diferitelor molecule recombinante utilizate în AIT. Prezentare educațională adaptată după Zhernov et al. (2019)(43)

Utilizarea alergenelor recombinante în diagnosticul alergiilor

Deși testele diagnostice care conțin alergene recombinante se utilizează tot mai mult, cele bazate pe extracte naturale continuă să fie utilizate pe scară largă⁽³¹⁾. Compoziția unui extract alergic influențează puternic rezultatele oricărui test bazat pe acel extract. Din extractele disponibile comercial pot să lipsească alergene importante sau compoziția lor alergică poate varia considerabil de la un lot la altul, ceea ce poate da rezultate fals negative în cazul anumitor pacienți. Aceste variații de concentrație și

conținut alergic au fost demonstrate la soluțiile de testare cutanată prick (*skin prick test*, SPT) pentru extractul de acarian *Dermatophagoides pteronyssinus*⁽³²⁾, mușgai *Alternaria alternata*⁽³³⁾ și alun⁽³⁴⁾, precum și pentru produsele de imunoterapie alergică sublinguală (SLIT) pentru acarian⁽³⁵⁾ și polen de mesteacăn⁽³⁶⁾.

Alergenele recombinante bine caracterizate pot fi folosite ca marker în diagnostic pentru a realiza profilul de sensibilizare al pacienților alergici și pentru a selecta strategiile terapeutice potrivite. Reactivitatea IgE la alergenul cu o reacție încrucișată extrem de ridicată permite identificarea pacienților cu sensibilizare largă sau care sunt expuși riscului de a dezvolta simptome alergice la mai multe surse. Pe de altă parte, alergenul specific anumitor surse alergice pot fi folosite pentru a identifica pacienții cu sensibilizare reală⁽³⁷⁾. Pentru îmbunătățirea calității unor extracte alergice din latex⁽³⁸⁾, alun⁽³⁹⁾ și venin de viespe⁽⁴⁰⁾, utilizate în diagnostic, s-a folosit procesul de *spiking* (adică adăugarea de alergene recombinante). Mai mult decât atât, alergenul recombinat reprezintă o alternativă la alergenul natural pentru diagnosticul alergiilor, când alergenul natural poate fi izolat doar în cantități mici din sursa inițială⁽⁴¹⁾.

Utilizarea alergenelor recombinante în imunoterapia alergică moleculară

Izolarea primei secvențe codificatoare a unui alergen a deschis drumul dezvoltării diferitelor tipuri de imunoterapii alergice (AIT) moleculare⁽⁴²⁾ (figura 3). Printre acestea se numără alergenul recombinat de tip sălbatic (prezintă toate proprietățile alergenului natural); peptidele sintetice care conțin epitopi alergen-specfici pentru limfocitele T (LT) (fără reactivitate IgE); acizi nucleici care codifică alergene; hipoalergene recombinante și sintetice, cu alergenicitate scăzută și capacitate redusă de legare IgE, dar cu epitopi alergen-specfici pentru LT⁽⁴³⁾.

Imunoterapiile personalizate bazate pe profilul de sensibilizare al fiecărui pacient sunt posibile, în teorie. Cu toate acestea, conform ghidurilor actuale, trebuie dovedită siguranța și eficiența clinică pentru fiecare moleculă separat și pentru posibilele combinații, ceea ce face această abordare imposibilă. De aceea imunoterapiile moleculare ar trebui să conțină un panel de alergene relevante clinic provenite de la sursa de interes.

Avantajele și dezavantajele diferitelor molecule recombinante folosite în AIT sunt prezentate în tabelul 2.

Concluzii

Pentru a determina sistemul optim de expresie a unui anumit alergen trebuie să se țină cont de resursele disponibile, de timpul necesar, de calificarea personalului din laborator și de natura alergenului. Există o experiență vastă în ceea ce privește sistemul de expresie procariot, iar kiturile disponibile pe piață sunt mai variate, mai rapide și mai puțin costisitoare decât cele pentru sistemele eucariote. Cu toate acestea, prezintă dezavantajul de a nu putea produce modificările posttranslaționale necesare pentru proteinele complexe structural și funcțional. Mai mult, aproape toate alergenul provin din surse eucariote și este de preferat, în cazul în care activitatea biologică a alergenului recombinat depinde de conformația și/sau de modificările posttranslaționale, să se utilizeze sistemele eucariote de expresie proteică.

Tehnologia proteinelor recombinante permite atât producția nelimitată a alergenului de interes, cât și posibilitatea de a modifica structura și proprietățile intrinseci ale acestuia, devenind o alternativă din ce în ce mai atractivă pentru diagnosticul și imunoterapia bolilor alergice.

Acest articol a fost elaborat în cadrul proiectului INSPIRED (Strategii inovative pentru prevenția, diagnosticul și terapia afecțiunilor respiratorii induse de polenul de ambrozia), cod SMIS 103662.

Bibliografie

1. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomés A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(3):409-418.
2. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation. *Immunol Rev.* 2001;179(1):119-127.
3. van der Veen MJ, Mulderb M, Witterman AM, et al. False-positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(6):1028-1034.
4. Nelson HS, Iklé D, Buchmeier A. Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(2):382-388.
5. Scheiner O, Kraft D. Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy.* 1995;50(5):384-391.
6. Schmid-Grendelmeier P, Cramer R. Recombinant allergens for skin testing. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;125(2):96-111.
7. Bousquet J. In vivo and in vitro use of recombinant allergens. *Allergy Clin Immunol News.* 1994:54-59.
8. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, et al. Special features – Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for Allergic Diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998;81(5):401-405.
9. Schmidt M, Zargari A, Holt P, et al. The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of *Malassezia furfur*, Mal f 1. *Eur J Biochem.* 1997;246(1):181-185.
10. Schmidt M, Walker RB, Hoffman DR, McConnell TJ. Nucleotide sequence of cDNA encoding the fire ant venom protein Sol i II. *FEBS Lett.* 1993;319(1-2):138-140.
11. Schmidt M, Hoffman DR. Expression systems for production of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;128(4):264-270.
12. Fernandez JM, Hoeffler JP. *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression.* Elsevier; 1998.
13. Rea G, Iacovacci P, Ferrante P, et al. Refolding of the *Cupressus arizonica* major pollen allergen Cup a1.02 overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2004;37(2):419-425. doi:https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.06.034
14. Lehmann K, Hoffmann S, Neudecker P, Suhr M, Becker W-M, Rösch P. High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. *Protein Expr Purif.* 2003;31(2):250-259.
15. Kleber-Janke T, Becker W-M. Use of modified BL21 (DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr Purif.* 2000;19(3):419-424.
16. Swoboda I, Jilek A, Ferreira F, et al. Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J Biol Chem.* 1995;270(6):2607-2613.
17. van Ree R, van Leeuwen WA, Bulder I, Bond J, Aalberse RC. Purified natural and recombinant Fel d 1 and cat albumin in in vitro diagnostics for cat allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(6):1223-1230.
18. Schenk S, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H, et al. Four recombinant isoforms of Cor a 1, the major allergen of hazel pollen, show different reactivities with allergen-specific T-lymphocyte clones. *Eur J Biochem.* 1994;224(2):717-722.
19. Smith PM, Suphioglu C, Griffith IJ, Theriault K, Knox RB, Singh MB. Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(2):331-343.
20. De Vouge MW, Thaker AJ, Curran IH, et al. Isolation and expression of a cDNA clone encoding an *Alternaria alternata* Alt a 1 subunit. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996;111(4):385-395. doi:10.1159/000237397
21. Ferrari E, Lodi T, Sorbi RT, Tirindelli R, Cavaggioni A, Spisni A. Expression of a lipocalin in *Pichia pastoris*: secretion, purification and binding activity of a recombinant mouse major urinary protein. *FEBS Lett.* 1997;401(1):73-77.
22. Vailes LD, Kinter MT, Arruda LK, Chapman MD. High-level expression of cockroach allergen, Bla g 4, in *Pichia pastoris*. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101(2):274-280.
23. Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, et al. Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology.* 2004;14(9):757-766.
24. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(1):45-66.
25. <https://biotop.boku.ac.at/Projects/2015/Grabherr2015c.html>.
26. Soldatova LN, Cramer R, Gmachl M, et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101(5):691-698.

27. Guyre P, Goldstein J, Wu Z, Sun A. Recombinant cat allergen, Fel d1, expressed in baculovirus for diagnosis and treatment of cat allergy. November 2002.
28. Zargari A, Schmidt M, Lundberg M, Scheynius A, Whitley P. Immunologic characterization of natural and recombinant Mal f 1 yeast allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(5):877-884.
29. Wu CH, Lee MF, Wang NM. Expression of the American cockroach Per a 1 allergen in mammalian cells. *Allergy*. 2000;55(12):1179-1183.
30. Breiteneder H, Krebitz M, Wiedermann U, et al. Rapid production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana* and their impact on diagnosis and therapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124(1-3):48-50.
31. Tscheppe A, Breiteneder H. Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;172(4):187-202. doi:10.1159/000464104
32. Casset A, Mari A, Purohit A, et al. Varying allergen composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(3):253-262.
33. Kespohl S, Maryska S, Zahradnik E, Sander I, Brüning T, Raulf-Heimsoth M. Biochemical and immunological analysis of mould skin prick test solution: current status of standardization. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(11):1286-1296.
34. Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, Aalberse RC, Hefle SL. In vitro and in vivo characterization of hazelnut skin prick test extracts. *Arb aus dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) zu Frankfurt aM*. 2003;(94):87-95.
35. van Ree R. Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(2):270-277.
36. Moreno Benítez F, Espinazo Romeu M, Letrán Camacho A, Mas S, García-Cózar FJ, Tabar AI. Variation in allergen content in sublingual allergen immunotherapy with house dust mites. *Allergy*. 2015;70(11):1413-1420.
37. Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant Marker Allergens: Diagnostic Gatekeepers for the Treatment of Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(4):259-268. doi:10.1159/000057742
38. Lundberg M, Chen Z, Rihs H, Wrangsjö K. Recombinant spiked allergen extract. *Allergy*. 2001;56(8):794-795.
39. Andersson K, Ballmer-Weber BK, Cistero-Bahima A, et al. Enhancement of hazelnut extract for IgE testing by recombinant allergen spiking. *Allergy*. 2007;62(8):897-904.
40. Yoshida N, Hirata H, Watanabe M, et al. Improved sensitivity to venom specific-immunoglobulin E by spiking with the allergen component in Japanese patients suspected of Hymenoptera venom allergy. *Allergol Int*. 2015;64(3):248-252.
41. Mas S, Boissy P, Monsalve RI, et al. A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic allergen from *Salsola kali* pollen for allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2015;167(2):83-93.
42. Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, et al. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu Rev Immunol*. 2009;28:211-241.
43. Zhernov Y, Curin M, Khaitov M, Karaulov A, Valenta R. Recombinant allergens for immunotherapy: state of the art. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019;19(4):402-414.

Articole din aceeași ediție

EDUCATIE MEDICALA CONTINUA

Diagnosticul molecular în bolile alergice respiratorii induse de alergene perene (/reviste/alergologia/diagnosticul-molecular-in-bolile-alergice-respiratorii-induse-de-alergene-perene-id-2982-cmsid-99)

Domnul doctor Wargha Enayati (foto), medic specialist în Cardiologie și antreprenor de succes, a răspuns întrebărilor...