

Joanna Zgorzelska-Kowalik

Marta Wiszniewska

Damian Kowalik

Patrycja Krawczyk-Szulc

Ewa Nowakowska-Świrta

Cezary Palczyński

Jolanta Walusiak-Skorupa

## KRZYŻOWO REAGUJĄCE DETERMINANTY WĘGLOWODANOWE W DIAGNOSTYCE ALERGII ZAWODOWEJ

CROSS-REACTIVE CARBOHYDRATE DETERMINANTS IN DIAGNOSTICS OF OCCUPATIONAL ALLERGY

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Łódź

Klinika Chorób Zawodowych i Toksykologii, Oddział Chorób Zawodowych

### STRESZCZENIE

Diagnostyka alergii zawodowej typu natychmiastowego w większości przypadków jest bardzo złożona. W dużym stopniu spowodowane jest to znaczną różnorodnością alergenów zawodowych oraz brakiem wystandaryzowanych metod diagnostycznych. Komercyjnie dostępne odczynniki do punktowych testów skórnych różnych firm charakteryzują się różną zawartością białek działających alergizująco, a w niektórych nie ma najważniejszych alergenów. Także zestawy do oznaczania alergenowo swoistych IgE w surowicy charakteryzują się różną trafnością diagnostyczną. W niektórych przypadkach fałszywie dodatnie wyniki oznaczania asIgE są wynikiem alergii krzyżowej na pospolite alergeny środowiska. W tym ostatnim przypadku pomocne w wykluczeniu nadwrażliwości krzyżowej jest oznaczanie asIgE dla tzw. determinant węglowodanów reagujących krzyżowo (CCDs). W pracy omówiono strukturę biochemiczną determinant węglowodanowych, ich występowanie, możliwy wpływ na wyniki badań laboratoryjnych *in vitro* stosowanych w diagnostyce alergii, a także metody służące ich identyfikacji. Przedstawiono również próby wykorzystania CCDs w diagnostyce alergii zawodowej. Med. Pr. 2010;61(1):79–89

Słowa kluczowe: determinanty węglowodanów reagujących krzyżowo, diagnostyka, alergia zawodowa

### ABSTRACT

In most cases diagnosis of immediate-type occupational allergy is very complex. Mainly it is caused by diversity of occupational allergens and lack of standardized diagnostic methods. The content of allergic proteins in commercially available skin prick test reagents differs between companies and in some the most important allergens are not named. Also the evaluation of serum specific IgE (asIgE) is characterized by different diagnostic accuracy. In some cases, false-positive results of asIgE detection are the consequence of cross-reaction to common environmental allergens. In those cases it is helpful to determine asIgE for cross-reacting carbohydrate determinants (CCDs) to exclude cross-hypersensitivity. The presented paper reviews the structure of carbohydrate determinants, their prevalence and possible impact on laboratory *in vitro* tests used in allergy diagnostics, as well as the methods of their identification. Possible applications of CCDs in occupational allergy diagnostics are also discussed. Med Pr 2010;61(1):79–89

Key words: cross-reactive carbohydrate determinants, occupational allergy

Adres autorów: Oddział Chorób Zawodowych, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera,  
św. Teresy 8, 91-348 Łódź, e-mail: joannaz@imp.lodz.pl  
Nadesłano: 7 października 2009  
Zatwierdzono: 21 października 2009

## WPROWADZENIE

Diagnostyka alergii zawodowej typu natychmiastowego w większości przypadków jest bardzo złożona. Jest to spowodowane głównie znaczną różnorodnością alergenów zawodowych oraz brakiem wystandaryzo-

wanych metod diagnostycznych. Dotychczas opisano około 400 alergenów, które mogą powodować alergię pochodzenia zawodowego (1). Tradycyjnie dzielimy te czynniki na alergeny o dużej i małej masie cząsteczkowej. Do alergenów o dużej masie cząsteczkowej należą czynniki pochodzenia roślinnego (np. mąki, lateks

gumy naturalnej, enzymy, kalafonia) i pochodzenia zwierzęcego (alergeny zwierząt laboratoryjnych i hodowlanych). Są to proteiny lub glikoproteiny o masie cząsteczkowej od 7 do 70 kDa (2). Z kolei alergeny o małej masie cząsteczkowej są haptenami, które nabierają zdolności wywoływania reakcji immunologicznej dopiero po połączeniu z cząstkami białkowymi. Zaliczamy do nich czynniki pochodzenia organicznego (leki) i pochodzenia nieorganicznego (izocyjany, bezwodniki kwasowe, metale, akrylany, barwniki i środki odkażające).

## ALERGIA I ALERGENY

Klemens von Pirquet w 1906 roku wprowadził termin 'alergia', określając w ten sposób zmienioną odczynowość organizmu na antygen podany powtórnie (3). Z czasem zaczęto go używać w węższym znaczeniu — jako synonim nadwrażliwości (3). W najnowszej terminologii alergologicznej, zmodyfikowanej przez zespół ekspertów Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej (European Academy of Allergy and Clinical Immunology), zaproponowano, aby „alergia” nazywać reakcje nadwrażliwości zapoczątkowane przez mechanizmy immunologiczne, natomiast „nadwrażliwość” zdefiniowano jako obiektywnie powtarzalne objawy, wywoływane przez ekspozycję na określony bodziec obecny w dawce tolerowanej przez zdrowe osoby (4).

W środowisku komunalnym i zawodowym występuje wiele alergenów warunkujących alergię typu I według Gella i Coombsa (2). Alergeny, czyli antygeny wywołujące alergię, są to substancje, które organizm rozpoznaje jako obce, w związku z czym są one zdolne do wywoływania w ustroju reakcji immunologicznych i swoistego reagowania z przeciwciałami oraz receptorami uczulonych limfocytów (4,5). Istotnym elementem biorącym udział w rozpoznaniu przez układ immunologiczny danego alergenu są występujące na nim określone fragmenty zwane epitopami.

Epitopy, inaczej determinanty alergenowe, stanowią fragment łańcucha polipeptydowego o charakterystycznej sekwencji aminokwasów, za pomocą których alergen wiąże się z przeciwciałem lub receptorem limfocytów T (5). Epitop stanowi określoną sekwencję, co może prowadzić do występowania podobieństw pomiędzy epitopami zupełnie odmiennych i niespokrewnionych ze sobą alergenów. Gdy pojedynczy alergen zawiera od kilku do kilkudziesięciu epitopów, zjawisko to określamy jako wieloważność.

## Alergia krzyżowa

Specyficzne przeciwciała wytworzone w kontakcie z danym alergenem są zdolne do krzyżowej reakcji z innym na skutek wyżej wymienionych podobieństw (6). O reaktywności krzyżowej (cross-reactivity) mówimy, gdy jedno przeciwciało (lub receptor komórki T) reaguje z dwoma alergenami (5). Do wyindukowania krzyżowej reaktywności wymagane jest przynajmniej 70-procentowe podobieństwo sekwencji, natomiast białka, których podobieństwo jest mniejsze niż 50%, reagują krzyżowo bardzo rzadko (7,8).

Szerszym pojęciem, zawierającym w sobie również definicję krzyżowej reaktywności, jest współrozpoznanie (co-recognition). Termin ten może być używany w przypadkach, w których współnarażenie na wiele źródeł mających homologiczne molekuly uniemożliwia identyfikację czynnika uczulającego. Jeżeli znany jest czynnik uczulający, mówimy o reaktywności krzyżowej (cross-reactivity). Z kolei współuczulenie (co-sensitization) oznacza uczulenie na kilka różnych źródeł alergenów, które nie mają wspólnych antygenów (8).

Przykładem reaktywności krzyżowej występującej wśród alergenów są sezonowo występujące alergie pokarmowe, nasilające się w okresie pylenia niektórych roślin.

W zespole alergicznym jamy ustnej (oral allergy syndrom — OAS) u pacjentów uczulonych uprzednio na pyłki roślin pojawiają się objawy miejscowej anafilaksji jamy ustnej i gardła podczas kontaktu z alergenem pokarmowym. W strefie klimatu umiarkowanego zespół OAS jest poprzedzony najczęściej uczuleniem na pyłki brzozy (9). Podłożem takiej krzyżowej reaktywności mogą być zarówno epitopy o białkowej strukturze biochemicznej, jak i krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe.

Opisano także współwystępowanie alergii na lateks gumy naturalnej (LGN) z alergią na owoce południowe (przede wszystkim banana, awokado, kiwi i papaję). Zespół ten nazwano zespołem lateks-owoce (latex-fruit syndrom). W surowicy osób uczulonych na LGN stwierdzano obecność swoistych przeciwciał również dla innych alergenów pokarmowych, takich jak ananas, melon, mango, seler, ziemniak, różne gatunki orzechów, pomidor i marchew (10–13). Niektórzy autorzy podają, że ponad 50% pacjentów z alergią na LGN wykazuje jednocześnie objawy uczulenia na owoce egzotyczne (14). Badania przeprowadzone w populacji osób z alergią pokarmową ujawniły częstsze niż u osób bez takiej alergii występowanie alergii na lateks gumy naturalnej (10,4% vs 5,6%) (15).

Wykazano także, że alergia na grzyby pleśniowe może być przyczyną rozwinięcia się alergii na LGN — zaproponowano tu nazwę zespół lateks-pleśnie (latex-mould syndrome) (16). Zaobserwowano odczyny krzyżowe między alergenami LGN — Hev b 9 i Hev b 10 a homologicznymi proteinami z *Cladosporium herbarum* i *Aspergillus fumigatus*.

Reaktywność krzyżowa może dotyczyć jednej grupy alergenów, tj. spokrewnionych gatunkowo (np. drzewa należące do rzędu bukowatych czy różne gatunki traw) lub wielu alergenów, poprzez występowanie tzw. pa-

nalergenów. Panalergeny są to substancje o podobnej, a nawet jednakowej budowie, powszechnie występujące i odpowiedzialne za rozwój krzyżowej reaktywności u gatunków ze sobą niespokrewnionych (tab. 1) (5). Za reaktywność krzyżową odpowiedzialne są również białka PR (pathogenesis-related: PR-2, PR-3, PR-5, PR-10, PR-12 i PR-14), które powstają w komórkach roślin pod wpływem stresu — tzn. infekcji, zimna, promieniowania UV-B i innych czynników (np. białko PR-3 homologiczne z alergenami owoców, takich jak banany, awokado) (8).

**Tabela 1.** Przykłady panalergenów i najczęstsze reakcje krzyżowe\*  
**Table 1.** Examples of panallergens and the most frequent cross-reactions\*

Panalergen Panallergen	Funkcja Function	Alergeny dające reakcje krzyżowe Cross-reactive allergens	Objawy Symptoms
Profiliny / Profilins	białko wiążące aktynę / actin-binding protein	brzoza / birch [Bet v 2] oliwa / olive [Ole e 2] tymotka / timothy [Phl p 12] ambrozja / ambrosia [Amb a] seler / celery [Api g 4] lateks / latex [Hev b 8] orzec laskowy / hazel-nut [Ara h 5]	
Polkalcyny / Polcalcins	białko wiążące wapń / calcium-binding protein	brzoza / birch [Bet v 3, Bet v 4] oliwa / olive [Ole e 3] tymotka / timothy [Phl p 4] ambrozja / ambrosia [Amb a]	
Enolaza / Enolase	enzym biorący udział w procesie glikolizy / / glycolitic enzyme	lateks / latex [Hev b 9] <i>Alternaria alternata</i> [Alt a 11] <i>Cladosporium herbarum</i> [Cla h 6] <i>Aspergillus fumigatus</i> [Asp f]	zespół lateks-pleśnie / / latex-mould syndrome
Chitynaza / Chitinase	składnik ściany komórkowej grzybów i cytoskieletu insektów / / cell wall's element of the fungi and the insects cytoskeleton białko PR-3 / PR-3 protein	lateks / latex [Hev b 11, Hev b 6.02] rzepa / turnip [Bra r 2] kasztan jadalny / chestnut [Cas s 5] kiwi / kiwi [Act c] awokado / avocado [Pers a 1] winogrono / grape [Vit v]	zespół lateks-owoce / / latex-fruits syndrome
Tropomiozyna / / Tropomyosine	białko fibrylarne mięśni / / the muscles fibrillar protein	<i>D. farinae</i> [Der f 10] <i>D. pteronyssinus</i> [Der p 10] krab / crab [Cha f 1] ostryga wielka / oyster [Cra g 1] anisakis simplex [Ani s 3]	
LTP	lipidowe białka transferowe / / lipid transfer protein Białko PR-14 PR-14 protein	oliwa / olive [Ole e 7] orzeczki ziemne / hazel-nut [Ara h] kasztanowiec / chestnut [Cas s] jabłko / apple [Mal d 3] marchew / carrot [Dau c] kukurydza / corn [Zea m 14]	
Albuminy / Albumins	główne białko osocza / principal serum protein	DSA — dog serum albumin BSA — bovine serum albumin	zespół mięso wołowe-pies / / raw beef-dog epithelium syndrome (17)

\* Na podstawie: / Based on: Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N., Mari A.: Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004;59:243–267.

## CHARAKTERYSTYKA KRZYŻOWO REAGUJĄCYCH DETERMINANT WĘGLOWODANOWYCH

Krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe (cross-reacting carbohydrate determinants — CCDs) są glikoproteinami, które zawierają różne ilości węglowodanów, przyłączonych jako krótkie lub długie (do 15 jednostek), rozgałęzione lub nierozgałęzione łańcuchy (18,19). Glikozylacja białek jest procesem istotnie zmieniającym ich właściwości. Prowadzi ona między innymi do zwiększenia hydrofilności białek, chroni je przed proteolizą oraz wzmacnia oporność na temperaturę (20,21). Łańcuchy glikanowe w glikoproteinach są przyłączone do białek w ściśle określonych miejscach. Wyróżnia się N-glikany z resztami cukrowymi powiązanymi z asparaginą oraz O-glikany z cukrami połączonymi z seryną, treoniną lub hydroksyproliną (6,22). W związku ze swoim powierzchniowym usytuowaniem w komórce struktury węglowodanowe mogą stanowić stronę immunogenną, a także element wiążący IgE (22,23). W odpowiedzi na kontakt z krzyżowo reagującymi determinantami węglowodanowymi wytwarzane są w organizmie specyficzne przeciwciała zwane anty-CCD IgE (24,6). Podkreśla się, że te specyficzne IgE mogą występować u każdego człowieka, a szczególnie u pacjentów uczulonych na pyłki roślin (25).

Krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe są w środowisku bardzo rozpowszechnione. Charakterystyczne cechy struktury biochemicznej poszczególnych CCDs odpowiadają za rozwój krzyżowej reaktywności. Cechą budowy N-glikanów pochodzenia roślinnego, a także występujących u owadów (np. *Apis mellifera*), jest obecność reszty alfa-1,3-fukozy. Podobne łańcuchy zostały opisane u robaków pasożytniczych (np. *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonica*) (26,27) oraz u ślimaków (28,29). Występowaniem reszty alfa-1,3-fukozowej tłumaczy się krzyżową reaktywność występującą między alergenami roślinnymi a pochodzącymi od owadów (6,30–32). Z kolei w N-glikanach ssaków występuje fukozylicacja w pozycji 1,6 i dlatego nie reagują one z alfa(1,3)-fukozo-N-glikanami i beta(1,2)-ksylozo-N-glikanami pochodzącymi od roślin i alfa(1,3)-fukozo-N-glikanami owadów (6,22,30,33).

### Częstość występowania CCD w populacjach

Wyniki badań epidemiologicznych oceniających występowanie krzyżowo reagujących determinant węglowodanowych w surowicy wykazują dość znaczną rozbieżność. Van Ree i Aalberse wykazali obecność anty-

CCD IgE u 10–15% pacjentów z alergią na pyłki traw (34). Z kolei w badaniach Mariego i wsp. aż u 41,7% pacjentów, którzy byli uczuleni przynajmniej na jeden gatunek pyłków, i 62,4% pacjentów uczulonych na kilka rodzajów pyłków wykazano obecność specyficznych przeciwciał przeciwko determinantom węglowodanowym (35). Kilka lat później Mari badał rozpowszechnienie występowania asIgE przeciwko CCDs w grupie 1831 pacjentów i otrzymał wyniki dodatnie u 23% osób (25). Rozpowszechnienie anty-CCD IgE różniło się w poszczególnych podgrupach pacjentów — wynik dodatni stwierdzono u:

- 5% osób bez choroby alergicznej,
- 31% osób uczulonych na jeden gatunek pyłków,
- 71% osób uczulonych na wiele gatunków pyłków,
- 10% osób uczulonych na alergeny inne niż pyłki.

W innej badanej grupie obecność anty-CCD IgE wykazano u 10–50% osób uczulonych na pomidory, marchew, seler lub cukinię (22,36). Tretter i wsp. (30) ocenili częstość występowania CCDs wśród pacjentów uczulonych na jady owadów błonkoskrzydłych na 28%. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Kochuyt wykazano obecność przeciwciał przeciwko determinantom węglowodanowym u jednego z 4 pacjentów uczulonych na jad pszczoły miodnej oraz u jednego z 10 pacjentów uczulonych na jad szerszeni (37).

Jin i wsp. objęli badaniem 174 pacjentów, wśród których 70 osób było uczulonych na jeden rodzaj alergenu i u 17 z nich (24%) wykryto przeciwciała przeciwko determinantom węglowodanowym. Pozostałe 104 osoby były uczulone na kilka rodzajów alergenów, a anty-CCD IgE były obecne u 43 osób (41%). Także poziom tych przeciwciał był wyższy niż w grupie uczulonych na jeden alergen (38).

U 7 z 40 pacjentów uczulonych na owady wykazano anty-CCD IgE, a 5 osób z tej grupy miało nieistotnie klinicznie IgE reagujące z lateksem (39).

Niewiele jest danych dotyczących częstości występowania CCDs wśród populacji z alergią zawodową. W badaniach Raulf-Heimsoth i wsp. (23) obecność determinant wodorowęglanowych stwierdzono u 11% pracowników służby zdrowia (u 12 pacjentów z 104-osobowej grupy badanej). Średnie stężenie CCDs wyniosło 0,67 kU/l, a zakres otrzymanych dodatnich wyników od 0,37 do 7,95 kU/l (23).

### Dotychczasowe badania dotyczące CCDs

Pierwsze doniesienie dotyczące glikanowej struktury roślin ukazało się w roku 1970 i obejmowało badania Yasuda i wsp. (40) nad proteazą pochodzącą z ananasa,



tw. bromeliną. Kolejni autorzy potwierdzili obecność glikoprotein niewystępujących u ssaków tj. alfa-1,3-fukozy i ksylozy (41). Z kolei za początek debaty nad krzyżowo reagującymi determinantami węglowodanowymi można przyjąć rok 1981, kiedy Aalberse i wsp. powiązali homologię budowy glikanów roślinnych i pochodzących od owadów w związku z obecnością wspólnej reszty alfa-1,3-fukozowej (24).

Van der Venn i wsp. jako jedni z pierwszych zbadali surowice pacjentów zawierające swoiste przeciwciała skierowane przeciwko orzeszkom ziemnym, którzy nie zgłaszali objawów chorobowych po kontakcie z tym alergenem (42). Wyniki badań pokazały, że wśród tych pacjentów tylko wysokie stężenie ekstraktu z orzeszków może wywołać aktywację komórek efektorowych (tj. bazofili i neutrofilii) w surowicy, podczas gdy u osób faktycznie uczulonych na orzeszki bardzo mała ilość alergenu jest wystarczająca do degranulacji komórek tucznych. Oznacza to, że anty-CCD IgE przeciwko orzeszkom ziemnym nie są związane z występowaniem objawów klinicznych uczulenia (42).

Także Mari i wsp. prowadzili badania mające na celu identyfikację osób, u których prawdopodobieństwo występowania anty-CCD IgE jest wysokie. Obserwacji poddano grupę 4535 pacjentów, która obejmowała osoby uczulone na jeden lub kilka alergenów roślinnych, na alergeny inne niż roślinne, oraz osoby bez chorób alergicznych. U wszystkich badanych wykonano testy skórne z bromeliną (glikozylowany alergen z wyciągu z ananasa), które dały wynik dodatni tylko u 0,08% (tj. 4 pacjentów). Jednocześnie u 23% osób z ujemnymi wynikami testów skórnych z bromeliną stwierdzono obecność swoistych IgE dla bromeliny w surowicy krwi (25). Zjawisko to wytłumaczono występowaniem przeciwciał anty-CCD IgE rozpoznających tylko epitopy węglowodanowe, które reagują w testach *in vitro*, ale nie są one zdolne do degranulacji komórek tucznych. Z tego powodu u wspomnianych powyżej 4 pacjentów z dodatnim wynikiem testu skórniego z bromeliną musiało dojść do rozpoznania 2 epitopów w jej cząsteczce, np. glikanowego i peptydowego, co w rezultacie doprowadziło do krzyżowego wiązania receptorów i degranulacji komórek efektorowych (25).

Możliwość krzyżowej reakcji przeciwciał anty-CCD IgE prowadzi w niektórych przypadkach do błędów w diagnostyce *in vitro* (6,22). Na przykład jeżeli pacjent jest uczulony na pyłki roślin i/lub jady owadów błonkoskrzydłych i w jego surowicy obecne są swoiste przeciwciała IgE dla determinant węglowodanowych, to może się zdarzyć, że będą one reagowały z częścią in-

nych antygenów, z którymi pacjent nie miał styczności np. z lateksem. Wynik testu sugeruje wtedy uczulenie na lateks (35).

Mahler i wsp. (43) w badaniu 125 pacjentów z alergią na jady owadów (*Apis mellifera* i/lub *Vespula* sp.) u 17 pacjentów (13,6%) stwierdzili swoiste przeciwciała IgE przeciwko alergenom lateksu, bez wcześniejszego wywiadu w kierunku alergii po kontakcie z lateksem. Grupę kontrolną stanowiło 30 pacjentów z klinicznymi objawami alergii na lateks. U 21 osób (70%) z tej grupy stwierdzono dodatnie wyniki oznaczenia swoistych IgE w teście CAP FEIA przeciwko jadom pszczoł lub os mimo braku objawów i wcześniejszego wywiadu w kierunku alergii na jady i pyłki. Odpowiedzialne za te różnicę mogą być determinanty węglowodanowe, które dzielą wiązanie IgE na alergenach lateksu i jądów owadów.

W takich przypadkach ważna jest dokładna analiza wywiadu pacjenta oraz skonfrontowanie objawów klinicznych z wynikami testów *in vitro*. Ponadto, nakładanie się antyglikanowych IgE na antypeptydowe IgE w surowicy skierowanych do tego samego alergenu może prowadzić do błędnej oceny ciężkości uczulenia (23).

## ZASADY OZNACZANIA KRZYŻOWO REAGUJĄCYCH DETERMINANT WĘGLOWODANOWYCH

W celu identyfikacji alergii krzyżowej stosowane są różne metody. Na początku lat 80. XX wieku został opracowany tzw. test aktywacji bazofili (basophil activation test — BAT), który wykorzystuje zdolność granulocytów zasadochłonnych do ekspresji na swej powierzchni cząsteczki CD63 lub CD45 (44,45). Ebo i wsp. wykazali, że metoda ta jest przydatna w szerszej, dokładniejszej diagnostyce i weryfikacji rozpoznania alergii na lateks, ponieważ pobudzone bazofile CD63+ wykrywane przy użyciu cytometrii przepływowej stwierdzane są wyłącznie w przypadku istotnej klinicznie alergii na lateks (46).

Z kolei jedną z głównych i najpowszechniej stosowanych metod wykrywania specyficznych anty-CCD IgE przeciwciał w badanej surowicy jest test immunoCAP z użyciem determinanty MUXF3, otrzymywanej z trawienia bromeliny. Węglowodanowy łańcuch MUXF3 jest znajdowany w wielu innych białkach roślinnych, jednak ponieważ prawdziwa alergia na bromelię występuje w populacji generalnej bardzo rzadko, umożliwia to wykorzystanie ww. determinanty w teście. Dodatni wynik oznacza, że osocze pacjenta zawiera anty-CCD IgE.

Uprzednio wykorzystywaną determinantą była sama bromelina, jednak wraz z rozwojem metody zastosowano MUXF3 determinantę — dodatkowo wykluczając wiązanie przeciwciał z innymi epitopami na cząsteczce bromeliny i tym samym zwiększając wiarygodność testu. Wadą bromeliny jest małe spektrum glikanów, co nie oddaje wszystkich determinant węglowodanowych, zawartych np. w jadach owadów. Alternatywnie stosowano również wyciąg z pyłku rzepaku (47).

Do wykrywania specyficznych anty-CCD IgE przeciwciał w badanej surowicy można również użyć peroksydazy chrzanowej (horseradish peroxidase — HRP), która w odróżnieniu od bromeliny jest glikoproteiną „multiwalentną” — składa się z 7-cukrowego łańcucha (48).

W celu wyeliminowania interferencji krzyżowo reagujących determinant węglowodanowych możemy zastosować metodę wykrywania testem ImmunoCAP Phadia specyficznych przeciwciał IgE z użyciem rekombinowanych alergenów (np. lateksu). Alergeny połączone są z nieglikozyłowanym białkiem wiążącym maltozę (maltose binding protein — MBP), produkowanym w komórkach *E. coli*. Samo oznaczenie białka MBP jest kontrolą ujemną w tym teście.

W najnowszych badaniach Chardin i wsp. (49) użyli techniki jednowymiarowej (1-D blot) i dwuwymiarowej (2-D blot) analizy elektroforetycznej białek do wykrycia odpowiedzi IgE na peptydowe i węglowodanowe krzyżowo reagujące determinanty. Spośród 145 pacjentów uczulonych na kilka rodzajów pyłków przy pomocy techniki 1-D blot wyselekcjonowano 45 surowic, które dały wynik dodatni, tzn. krzyżowo reagowały z białkami rzepaku (50,51). Następnie surowice te poddano dalszej analizie w technice 2-D blot, co pozwoliło rozróżnić dwa typy surowic reagujących krzyżowo:

- wyłącznie z ograniczoną liczbą białek użytych w badaniu (rozpoznawanych na podstawie reakcji barwienia srebrem),
- z licznymi białkami o masie molekularnej powyżej 30 KDa (w ten sposób reagowało 25–30% surowic).

W trakcie badania obydwie typy surowic poddano preinkubacji z resztami cukrowymi i obserwowano, jak ten proces wpłynie na reakcję barwienia srebrem. Okazało się, że w typie pierwszym nie doszło do modyfikacji barwienia, co sugeruje, że specyficzne IgE tych surowic rozpoznają tylko epitopy peptydowe. Z kolei w przypadku surowic typu drugiego barwienie było całkowicie zniesione, tzn. że te surowice rozpoznały

alergeny rzepaku tylko przez krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe. Wykazano, że surowice, które zawierają anty-CCD IgE, dają charakterystyczny obraz w technice 2-D blot, a mianowicie uwidaczniają liczne punkty izoelektryczne o szerokim zakresie, co odpowiada głównie białkom o masie molekularnej powyżej 30 KDa (50,51).

## DIAGNOSTYKA ALERGII ZAWODOWEJ

Pierwszą, istotną częścią procesu diagnostycznego chorób alergicznych, w tym również tych pochodzenia zawodowego, jest wywiad przeprowadzany zazwyczaj w formie kwestionariusza. Malo i wsp. (52) wykazali, że pozytywna wartość predykcyjna badania kwestionariuszowego wynosi 63%, a negatywna — 83%. Warto podkreślić, że do tej pory nie ma powszechnie akceptowanego kwestionariusza do badań epidemiologicznych czy klinicznych w astmie zawodowej.

Kolejnym etapem diagnostyki uczulenia zawodowego jest oznaczenie alergenowo swoistych przeciwciał IgE (asIgE) w skórze i surowicy. Aby rozpoznanie alergii zawodowej było wiarygodne, wymagana jest standaryzacja zarówno używanych alergenów, jak i wykonywania danej metody diagnostycznej. Punktowe testy skórne (PTS), oparte na zjawisku nadwrażliwości natychmiastowej, są używane do stwierdzenia IgE-zależnej reakcji w obrębie skóry. Są one badaniem łatwo dostępnym, często „pierwszego rzutu” w przypadkach podejrzenia alergii zawodowej. Należy jednak pamiętać, że komercyjnie dostępne odczynniki do punktowych testów skórnych różnych firm charakteryzują się różną zawartością białek działających alergizująco, a w niektórych brak najważniejszych alergenów.

Na przykład w badaniu Walusiak i wsp. (53) czułość PTS z mąką pszenną wynosiła 36,6% i 41,2% w rozpoznawaniu odpowiednio alergicznego nieżytu nosa i astmy zawodowej. Swoistość tego testu była znacznie wyższa i wynosiła około 90%. Także Sander i wsp. (54) stwierdzili niską czułość PTS z mąką pszenną — odpowiednio 50% i 40%, dla ekstraktów ALK Abello i Bencard oraz z mąką żytnią — odpowiednio 67% i 45%. Co więcej, autorzy ci wykazali, że czułość testów z poszczególnymi ekstraktami mąki zależy od zawartości białka i jest tym wyższa, im więcej białek o różnych masach cząsteczkowych zawartych jest w danym odczynniku użytym do PTS.

W badaniach van Kampen i wsp. obejmujących piekarzy z różnymi objawami alergicznymi wykonane testy skórne firmy Bencard (Munich, Germany) z aler-

genami mąki pszennej charakteryzowały się 68-procentową czułością i 74-procentową swoistością, a z alergenami mąki żytniej odpowiednio 78-procentową czułością i 84-procentową swoistością przy przyjętej wielkości powstałego bąbla  $\geq 2$  mm. Z kolei przy wielkości bąbla  $\geq 5,0$  mm dla testów wykonanych z mąką pszenną czułość badania wynosiła zaledwie 22% przy 100-procentowej swoistości. Podobnie 100-procentową swoistość testów z mąką żytnią uzyskano przy bąblu wielkości  $\geq 4,5$  mm, ale czułość tego badania wynosiła tylko 38% (55).

Blanco i wsp. wykazali 98-procentową czułość i 100-procentową swoistość punktowych testów skórnych z użyciem naturalnego ekstraktu lateksu u 50 pracowników służby zdrowia z objawami sugerującymi uczulenie na lateks (56).

Z kolei w diagnostyce *in vitro* oznacza się stężenie całkowitego IgE oraz stężenie swoistych IgE w surowicy za pomocą technik wykorzystujących znakowane izotopowo lub enzymatycznie przeciwciała przeciwko IgE. Wyniki wyraża się jako całkowitą liczbę zliczonych impulsów radioaktywnych (cpm) lub w jednostkach IgE (IU/ml, kU/l) (57). Badania te mają na celu stwierdzenie wolnych lub związanych na powierzchni komórek przeciwciał IgE.

Podobnie jak w przypadku PTS także zestawy do oznaczania alergenowo swoistych IgE (asIgE) w surowicy charakteryzują się różną trafnością diagnostyczną. Na przykład w większości przypadków oznaczenie asIgE metodą EIA jest metodą bardzo czułą, ale jednocześnie mało swoistą w porównaniu z metodą EIA-CAP. W badaniu Walusiak i wsp.(53) oznaczenia asIgE w surowicy charakteryzowało się jedynie nieco wyższą czułością w diagnostyce zawodowego nieżyty nosa i astmy (odpowiednio 43,6% i 46,2%) oraz nieznacznie niższą swoistością (odpowiednio 83,8% i 88,7%).

Van Kampen i wsp. wykazali 87-procentową czułość i 68-procentową swoistość testów *in vitro* firmy ImmunoCap (Phadia, Uppsala, Sweden) z alergenami mąki pszennej oraz 87-procentową czułość i 62-procentową swoistość dla alergenów mąki żytniej przy przyjętej wartości granicznej  $\geq 0,35$  kU/l (55). Testy wykazywały 100-procentową swoistość, gdy wartość graniczna wynosiła  $\geq 2,32$  kU/l dla mąki pszennej (czułość: 51%) i  $\geq 9,64$  kU/l dla mąki żytniej (czułość: 30%). W pracy Blanco i wsp. czułość testów *in vitro* z alergenami lateksu wynosiła 86% dla Cap system i 84% dla metody AlaSTAT (56). Z kolei Smith i wsp. wykazali czułość 54% i swoistość 87,5%

w badaniu *in vitro* z alergenami lateksu, oraz odpowiednio 77-procentową i 75-procentową czułość i swoistość z użyciem rekombinowanego alergenu rHev b 5 przy użyciu metody ImmunoCap (Phadia, Uppsala, Sweden) (13).

W niektórych przypadkach fałszywie dodatnie wyniki oznaczania asIgE są wynikiem alergii krzyżowej na pospolite alergeny środowiska. Wówczas pomocne w wykluczeniu nadwrażliwości krzyżowej jest oznaczanie asIgE dla determinant węglowodanów reagujących krzyżowo.

Generalnie uważa się, że oznaczenia asIgE *in vitro* są badaniem bardziej czułym, ale mniej swoistym niż punktowe testy skórne (58), a dodatkowo wyniki zdarzają się również u pacjentów nieuczulonych na badany alergen (59).

Złotym standardem w diagnostyce zawodowej alergii dróg oddechowych pozostaje test swoistej prowokacji wziewnej (58). Ponieważ trafność diagnostyczna poszczególnych metod stosowanych w diagnostyce zawodowej alergii układu oddechowego jest niska, to przy braku przeciwwskazań każdorazowo powinna być przeprowadzona swoista próba prowokacyjna z alergenami zawodowymi. Testy prowokacyjne mają zwykle charakter wziewny (inhalacyjny). Próba prowokacyjna może być przeprowadzona na stanowisku pracy lub w odtworzonych w laboratorium warunkach odpowiadających środowisku pracy.

U niektórych pacjentów, z wyjściową prawidłową reaktywnością oskrzeli, izolowanym objawem astmy zawodowej w teście prowokacyjnym jest wzrost nadreaktywności oskrzeli (60). Problemem są fałszywie dodatnie i ujemne wyniki prób prowokacyjnych. Fałszywie dodatni wynik testu swoistej prowokacji wziewnej można uzyskać u osoby z ciężką astmą, której na czas testu odstawiono leki przeciwastmatyczne. W przypadkach wysokich stężeń pyłu prawdopodobne jest wywołanie efektu drażniącego, zwłaszcza u osób wykazujących cechy nadreaktywności oskrzeli. Także wśród chorych na astmę atopową, wywołaną przez pospolite alergeny środowiska, bez alergii na czynniki środowiska pracy, test prowokacyjny może spowodować skurcz oskrzeli i objawy nieżyty nosa. W takich przypadkach konieczne jest użycie obiektywnych metod diagnostycznych.

Wyniki fałszywie ujemne testu prowokacyjnego możemy uzyskać w grupie pacjentów przyjmujących leki rozszerzające oskrzela czy glikokortykosteroidy. Są jednak też tacy chorzy, u których doszło do wygaszenia nadreaktywności oskrzeli w wyniku zaprzestania

ekspozycji zawodowej. Alergiczne procesy zapalne toczące się w drogach oddechowych można monitorować, oceniając skład popłuczyn nosowych lub płwociny indukowanej. Skutkiem prowokacji alergenem, zarówno donosowej, jak i dooskrzelowej, jest uogólniony proces zapalny w drogach oddechowych. Typowy obraz reakcji alergicznej to długotrwały wzrost całkowitej liczby komórek, liczby i odsetka eozynofili oraz wzrost wartości wskaźnika przepuszczalności naczyń, utrzymujące się do 24 godziny, z towarzyszącą znamienne wyższą wartością noty objawów klinicznych (61).

### ZNACZENIE CCDs W ALERII ZAWODOWEJ

Znaczenie kliniczne krzyżowo reagujących determinant węglowodanowych w diagnostyce alergii, w tym pochodzenia zawodowego, nie zostało dotychczas określone. Wyniki badań Van der Veena i wsp. (42) oraz Mariego (25) są przytaczane jako dowód przeciwko istotności klinicznej determinant węglowodanowych. Z innej strony dostępne są wstępne dane akcentujące istotną rolę CCDs wśród pacjentów uczulonych na alergeny pokarmowe (22).

Warte podkreślenia jest to, że CCDs są przyczyną błędnych wyników testów diagnostycznych opartych na diagnostyce *in vitro* (6). Przeciwciała te mogą powodować wystąpienie fałszywie pozytywnych wyników w powszechnie stosowanych testach komercyjnych, co znacznie utrudnia diagnostykę alergii zawodowej typu I. Na przykład wśród pacjentów uczulonych na pyłki roślin i/lub jady owadów błonkoskrzydłych możemy spodziewać się pozytywnych wyników w badaniu *in vitro*, sugerujących uczulenie na lateks w związku z obecnością asIgE dla determinant węglowodanowych (23,35,43,62).

Szacuje się, że 13,6% osób uczulonych na jady pszczoły miodnej i szerszeni ma dodatni wynik w testach *in vitro* z lateksem bez klinicznych objawów po kontakcie z tym alergenem. U 7 z 40 pacjentów uczulonych na jady owadów wykazano anty-CCD IgE, a 5 osób z tej grupy miało nieistotne klinicznie IgE reagujące z lateksem (39). Uważa się, że za reakcje krzyżowe między tymi alergenami odpowiedzialne są epitopy węglowodanowe zawarte w alergenach lateksu Hev b2 (beta-1,3-glukaza) oraz jadu owadów błonkoskrzydłych (fosfolipaza A2, hialuronidaza i kwaśna fosfataza). Zaobserwowano że w surowicy osób z izolowanym uczuleniem na lateks, przebiegającym z objawami klinicznymi, nie stwierdza się na ogół anty-CCD IgE, ponieważ główne alergeny lateksu Hev b5 i Hev b6 nie zawierają reszt cukrowych (39).

Pilotażowe wyniki uzyskane w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi pokazują, że anty-CCD IgE występują u 10% pacjentów z podejrzeniem alergii zawodowej i nie dotyczą w większym stopniu tych chorych, u których nie ma podstaw do rozpoznania choroby zawodowej. Określenie przydatności identyfikacji tych determinant w diagnostyce różnicowej alergii zawodowej wymaga dalszych badań w większych grupach pacjentów narażonych na różne alergeny zawodowe (63).

Ważnym aspektem diagnostyki alergii typu I jest takie ulepszenie metody *in vitro*, które wyeliminuje interferencję krzyżowo reagujących anty-CCD IgE (64). Pierwszym krokiem w tym kierunku jest umiejętne wykrycie fałszywie dodatnich wyników testów, tzn. takich, które zawierają anty-CCD IgE, a następnym — podjęcie próby zapobiegania wiązaniu tej frakcji IgE do alergenu. Wskazuje się, że porównawcze użycie oczyszczonych lub glikozyzowanych rekombinowanych alergenów i ich rekombinowanych nieglikozyzowanych odpowiedników produkowanych przez komórki *E. coli* mogłoby podnieść specyficzność i czułość zarówno testów *in vitro*, jak i *in vivo* (35).

Tak długo jak nie zostanie wykazana istotność CCDs *in vivo*, obecność tych epitopów powinna być rozpatrywana przy ocenie wyników badań alergologicznych w surowicy krwi. Wpływ obecności CCDs na wynik badania należy podejrzewać szczególnie w przypadku uczulenia na produkty pochodzenia roślinnego zawierające IgE reaktywne glikoepitopy, takie jak pyłki, żywość, lateks, glikozyzowane alergeny ssaków (np. owomukoid w jajach czy sierść kota), alergeny ryb, skorupiaków, mięczaków, roztoczy czy grzybów pleśniowych (22).

Choć rola CCDs w codziennej praktyce klinicznej ma mniejszą wartość, to ich obecność musi być rozważana w diagnostyce chorób alergicznych o etiologii zawodowej. Oznaczanie asIgE dla CCDs może być szczególnie przydatne w przypadkach, gdy wyniki alergenowo swoistych przeciwciał w surowicy krwi nie odpowiadają objawom klinicznym. Proces diagnostyczny w przypadku podejrzenia alergii zawodowej ma wyjątkowy charakter, gdyż zachodzi konieczność udowodnienia lub wykazania z przeważającym prawdopodobieństwem, że choroba jest spowodowana nadwrażliwością na alergen specyficzny dla środowiska pracy. W związku z tym w toku procesu orzeczniczego dąży się do wykazania uczulenia na alergeny zawodowe i w jak największym stopniu wykluczenia krzyżowej reaktywności między powszechnie występującymi alergenami środowiska komunalnego.



## PIŚMIENNICTWO

- Bernstein I.L., Chan-Yeung M., Malo J.L., Bernstein D.I.: Asthma in the workplace. Taylor & Francis Group, New York 2006
- Pałczyński C., Kieć-Świerczyńska M., Walusiak J.: Alergologia zawodowa. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 2008
- Stanworth D.R.: The discovery of IgE. *Allergy* 1993;48: 67–71
- Johansson S., Hourihane J., Bousquet J., Brujnzeel-Koomen C., DrFsensitirg S., Haahtela T., i wsp.: A revised nomenclature for allergy. *Allergy* 2001;56:813–824
- Rapiejko P.: Alergeny i preparaty alergenowe. W: Kowalski M. [red.]. Immunoterapia alergenowa. Mediton, Łódź 2003
- Altmann F.: The role of protein glycosylation in allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007;142:99–115. DOI:10.1159/000096114
- Aalberse R.C., Akkerdaas J.H., van Ree R.: Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 2001;56:478–490
- Ferreira F., Hawranek T., Gruber P., Wopfner N., Mari A.: Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004;59:243–267
- Rudzki E.: Zespół alergii jamy ustnej (OAS): Obraz kliniczny, alergeny wziewne i pokarmowe oraz profilaktyka i leczenie. *Przegl. Dermatol.* 1998;86:205–214
- Brehler R., Theissen U., Mohr C., Luger T.: „Latex-fruit syndrome”: frequency of cross-reacting IgE antibodies. *Allergy* 1997;52:404–410
- Kim K.T., Hussain H.: Prevalence of food allergy in 137 latex-allergic patients. *Allergy Asthma Proc.* 1999; 20:95–97
- Reche M., Pascual C., Vicente J., Caballero T., Muñoz F.M., Sanchez S. i wsp.: Tomato allergy in children and young adults: cross-reactivity with latex and potato. *Allergy* 2001;56:1197–1201
- Schmidt M.H., Raulf-Heimsoth M., Posch A.: Evaluation of patatin as a major cross-reactive allergen in latex-induced potato allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002;89:613–618
- Levy D.A., Mounedji N., Noirot C., Leynadier F.: Allergic sensitization and clinical reactions to latex, food and pollen in adult patients. *Clin. Exp. Allergy* 2000;30:270–275
- Kanny G., Moneret-Vautrin D.A., Flabbee J., Baudouin E., Morisset M., Thevenin F.: Population study of food allergy in France. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001;108:133–140
- Wagner S., Wagner B., Niggemann B., Scheiner O., Breiteneder H.: Sensitisation of mould allergic patients to latex allergens indicate a latex-mould syndrome. *Allergy* 2003;58:36
- San-Juan S., Lezaun A., Caballero M.L., Moneo I.: Occupational allergy to raw beef due to cross-reactivity with dog epithelium. *Allergy* 2005;60:839–840
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001
- Stryer L.: *Biochemia*. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2000
- Helenius A., Aebi M.: Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001;291:2364–2369
- Trombetta E.S., Parodi A.J.: N-glycan processing and glycoprotein folding. *Adv. Protein Chem.* 2001;59: 303–344
- Malandain H.: IgE reactive carbohydrate epitopes-classification, cross-reactivity and clinical impact. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2005;37:122–128, 247–256
- Raulf-Heimsoth M., Rihs H.P., Rozynek P., Cremer R., Gaspar A., Pires G. i wsp.: Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *Clin. Exp. Allergy* 2007;37(11):1657–1667. DOI:10.1111/j.1365-2222.2007.02833.x
- Aalberse R.C., Koshte V., Clemens J.G.: Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen and Hymenoptera venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1981;68:356–364
- Mari A.: IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: analysis of the distribution and appraisal of the *in vivo* and *in vitro* reactivity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002;129:286–295. DOI: 10.1159/000067591
- Khoo K.H., Chatterjee D., Caulfield J.P., Morris H.R., Dell A.: Structural characterization of glycopingolipids from the eggs of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Glucobiology* 1997;7:653–661
- Van Die I., Gomord V., Kooyman F.N., van den Berg T.K., Cummings R.D., Vervelde L.: Core  $\alpha$ -3-fucose is a common modification of N-glycans in parasitic helminthes and constitutes an important epitope for IgE from *Haemonchus contortus* infected sheep. *FEBS Lett.* 1999;463:189–193
- Van Tetering A., Schiphorst W.E., van den Eijnden D.H., van Die I.: Characterization of a core  $\alpha$ -3-fucoyltransferase from the snail *Lymnaea stagnalis* that is involved in the synthesis of complex-type N-glycans. *FEBS Lett.* 1999;461:311–314
- Guttering M., Ahrer K., Grabher-Meier H., Burgmayr S., Staudacher E.: Neutral N-glycans of the gastropod *Arion lusitanicus*. *Eur. J. Biochem.* 2004;271:1348–1356

30. Tretter V., Altmann F., Kubelka V., Marz L., Becker W.M.: Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein in N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993;102:259–266
31. Fötisch K., Vieths S.: N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconj. J.* 2001;18:373–390
32. Bencúrová M., Hemmer W., Focke-Tejkl M., Wilson I.B.H., Altmann F.: Specificity of IgG and IgE antibodies against plant and insect glycoprotein glycans determined with artificial glycoforms of human transferrin. *Glycobiology* 2004;14:457–466
33. Prenner C., Mach L., Glossl J., März L.: The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein, honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of alpha 1,3-fucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine. *Biochem. J.* 1992;284(Cz. 2):377–380
34. Van Ree R., Aalberse R.C.: Pollen — vegetable food cross-reactivity: serological and clinical relevance of cross-reactive IgE. *J. Clin. Immunoassay* 1993;16:124–130
35. Mari A., Iacovacci P., Afferni C., Barletta B., Tinghino R., di Felice G. i wsp.: Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the *in vitro* diagnosis of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999;103:1005–1011
36. Thomas W.R., Smith W.: How good are carbohydrates as allergens? *Clin. Exp. Allergy* 2002;32(5):658–661
37. Kochuyt A.M.: Insect venom anaphylaxis: from diagnosis to therapy. Thesis. Medical Faculty, University Leuven, Belgium 2000
38. Jin C., Nitsch S., Hemmer W., Altman F.: Improving allergy diagnosis by removal of CCD-specific IgE from patients' sera. *Allergy* 2009;64(Supl. 90):30
39. Ebo D., Hagendorens M., Bridts C., de Clerck L., Stevens W.: Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profiling: mimickers of allergy. *Clin. Exp. Allergy* 2004;34:137–144
40. Yasuda Y., Takahashi N., Murachi T.: The composition and structure of carbohydrate moiety of stem bromelain. *Biochemistry* 1970;9:25–32
41. Van Kuik J., Hoffman R., Mutsaers J., van Halbeek H., Vliegthart J.: A 500-MHz H-NMR study on the N-linked carbohydrate of bromelain. *Glycoconj. J.* 1986;3:27–34
42. Van der Veen M.J., van Ree R., Aalberse R.C., Akkerdaas J., Koppelman S.J., Jansen H.M. i wsp.: Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997;100:327–334
43. Mahler V., Gutgesell C., Valenta R., Fuchs T.: Natural rubber latex and hymenoptera venoms share Immunoglobulin E-epitopes accounting for cross-reactive carbohydrate determinants. *Clinical and Experimental Allergy* 2006;36:1446–1456
44. Leynadier F., Luce H., Abrego A., Dry J.: Automated measurement of human basophil degranulation. *Allergy* 1981;36:239–244
45. Benveniste J.: The human basophil degranulation test as an *in vitro* method for the diagnosis of allergies. *Clin. Allergy* 1981;11:1–11
46. Ebo D., Lechkar B., Schuerwegh A., Bridts C., de Clerk L., Stevens W.: Validation of two-color flow cytometric assay detecting *in vitro* basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy. *Allergy* 2002;57:706–712
47. Hemmer W., Focke M., Kolarich D., Dalik I., Götz M., Jarisch R.: Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clin. Exp. Allergy* 2004;34:460–469
48. Batanero E., Villalba M., Monsalve R.I., Rodriguez R.: Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996;97:1264–1271
49. Chardin H., Sénéchal H., Wal J.M., Desvaux F.X., Godfrin D., Peltre G.: Characterization of peptidic and carbohydrate cross-reactive determinants in pollen polysensitization. *Clin. Exp. Allergy* 2008;38(4):680–685
50. Chardin H., Mayer C., Senechal H., Tepfer M., Desvaux F.X., Peltre G.: Characterization of high-molecular-mass allergens in oilseed rape pollen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001;125:128–134
51. Chardin H., Mayer C., Senechal H., Poncet P., Clément G., Wal J.M. i wsp.: Polygalactouronase (pectinase), a new oilseed rape allergen. *Allergy* 2003;58:407–411
52. Malo J.-L., Ghezzi H., L'Archeveque J., Lagier F., Perrin B., Cartier A.: Is clinical history a satisfactory means for diagnosing occupational asthma? *Am. Rev. Respir. J.* 1991;143:528–532
53. Walusiak J., Hanke W., Górski P., Pańczyński C.: Respiratory allergy in apprentice bakers: do occupational allergies follow the allergic march? *Allergy* 2004;59:442–450
54. Sander I., Merget R., Degens P.O., Golschei N., Brüning T., Raulf-Heimsoth M.: Comparison of wheat and rye flour skin prick test solutions for diagnosis of baker's asthma. *Allergy* 2004;59:95–98
55. Van Kampen V., Rabstein S., Sander I., Merget R., Brüning T., Broding H.C. i wsp.: Prediction of challenge

- test results by flour-specific IgE and skin prick test in symptomatic bakers. *Allergy* 2008;63:897–902
56. Blanco C., Carrillo T., Ortega N., Alvarez M., Dominguez C., Castillo R.: Comparison of skin-prick test and specific serum IgE determination for the diagnosis of latex allergy. *Clin. Exp. Allergy* 1998;28:971–976
57. Brozek J.L., Baena-Cagnani C.E., Bonini S., Canonica G.W., Rasi G., van Wijk R.G. i wsp.: Methodology for development of the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma Guideline 2008 update. *Allergy* 2008;63(1): 38–46
58. Moscato G., Malo J.-L., Bernstein D.: Diagnosing occupational asthma: how, how much, how far? *Eur. Respir. J.* 2003;21:879–885
59. Dolen W.K.: IgE antibody in the serum — detection and diagnostic significance. *Allergy* 2003;58:717–723
60. Tarlo S.: Laboratory challenge testing for occupational asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111(4):692–694
61. Passalacqua G., Ciprandi G., Canonica G.W.: The nose-lung interaction in allergic rhinitis and asthma: united airways disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2001;1:7–13
62. Jappe U., Raulf-Heimsoth M., Hoffman M., Burow G., Hubsh-Muller C., Enk A.: *In vitro* hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006;61:1220–1229
63. Wiszniewska M., Zgorzelska-Kowalik J., Nowakowska-Świrta E., Pałczyński C., Walusiak-Skorupa J.: Cross-reactive carbohydrate determinants in diagnostics of occupational allergy-preliminary results. *Allergy w druku* 2010
64. Malandain H., Giroux F., Cano Y.: The influence of carbohydrate structures present in common allergen sources on specific IgE results. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2007;39:216–220