

## Allergeniciteit in voedselallergie

Allergenicity in food allergy

**Auteur:** Y.M. Vissers

**Trefwoorden:** eiwitstructuur, IgE, immuunmodulatie, pinda-allergie, pollenallergie, probiotica, verhitten

**Keywords:** heating, IgE, immunomodulation, peanut allergy, pollen allergy, probiotics, protein structure

### Samenvatting

Op 10 juni 2011 promoveerde Yvonne M. Vissers aan de Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld *Allergeniciteit in voedselallergie: de invloed van behandeling en immuunmodulatie door melkzuurbacteriën*. Haar promotoren waren prof. dr. H.J. Wichers en prof. dr. H.F.J. Savelkoul en haar copromotor was prof. dr. E.N.C. Mills. In dit artikel wordt een samenvatting van het proefschrift gegeven.

(*Ned Tijdschr Allergie & Astma* 2012;12:185-187)

### Summary

On the 10<sup>th</sup> of June 2011, Yvonne M. Vissers defended her PhD thesis, entitled *Allergenicity in food allergy: Influence of food processing and immunomodulation by lactic acid bacteria* at Wageningen University. This work has been executed under the supervision of prof. dr. H.J. Wichers en prof. dr. H.F.J. Savelkoul and co-supervision by prof. dr. E.N.C. Mills. The most important findings are summarized in this report.

### Inleiding

Pinda-allergie is een veel voorkomende (~1% van de bevolking) en persistente voedselallergie, verantwoordelijk voor ernstige allergische reacties. Pinda's worden vaak gegeten na een thermische behandeling (bijvoorbeeld koken of roosteren) en deze behandeling kan de eiwitstructuur en daarbij de immuunreactiviteit en allergeniciteit veranderen. Diagnostische in-vitrotesten worden echter meestal uitgevoerd met native, onbehandelde eiwitten; meer kennis over het

effect van de behandeling van allergenen kan bijdragen aan de verbetering van diagnostische testen. Daarnaast kunnen specifieke behandelmethoden ook leiden tot een afname van de hoeveelheid allergeen in een product en daardoor een effectieve voedingstechnologische aanpak zijn voor het onder controle houden van allergie.

Een andere mogelijke aanpak om allergieën te monitoren is het gebruik van immuunmodulerende voe-

**Auteurs:** mw. dr. ir. Y.M. Vissers, onderzoeker, ten tijde van het onderzoek werkzaam bij de leerstoelgroepen Celbiologie en immunologie & Levensmiddelenchemie, Wageningen UR, nu: Nestlé Research Center, departement Nutrition and Health, Allergy group, Vers-chez-les-Blanc, Case Postale 44, 1000 Lausanne 26, Zwitserland; e-mailadres: yvonne.vissers@gmail.com

**Belangenconflict:** geen gemeld.

**Financiële ondersteuning:** het onderzoek in dit proefschrift was mede gefinancierd door het EuroPrevall project, kennisbasis programma 5 van LNV en FrieslandCampina.

dingsproducten zoals probiotica. Er zijn indicaties dat probiotica, bijvoorbeeld melkzuurbacteriën, een positief effect kunnen hebben op het immuunsysteem, onder andere bij allergie. Deze mogelijk positieve effecten op het immuunsysteem zijn nog zeer beperkt onderzocht bij volwassenen met hooikoorts.

## **Sectie 1: invloed van thermische behandeling op de allergeniciteit van eiwitten**

### **Invloed van koken en roosteren van pinda-allergenen**

De belangrijkste allergenen uit de pinda, Ara h 1 en Ara h 2/6, werden eerst gezuiverd en daarna verhit in een waterige omgeving (koken), in de aan- of afwezigheid van glucose. Ara h 1 en Ara h 2 en 6 werden ter vergelijking ook gezuiverd uit geroosterde pinda's. Veranderingen in de eiwitstructuur, de capaciteit om celdeling van T-cellen in perifere mononucleaire cellen uit bloed (PBMC's) te bewerkstelligen, cytokineproductie te induceren, IgE-antistoffen te binden en IgE-antistoffen te crosslinken werden geëvalueerd. De IgE-crosslinkingcapaciteit werd bepaald door het gebruik van zowel basofiele granulocyten van donoren als door gebruik van ratbasofiele leukemie (RBL)-cellen getransfecteerd met de humane IgE-receptor. Koken zorgde voor denaturatie en aggregatie van het eiwit Ara h 2/6. De IgE-binding en IgE-crosslinkingcapaciteit was na koken verminderd, terwijl het koken geen effect had op de T-celreactiviteit. Ondanks dat het koken zorgde voor denaturatie en aggregatie van Ara h 2/6, was de structuur van de oplosbare fractie van Ara h 2/6 dat uit geroosterde pinda was gezuiverd, onveranderd ten opzichte van het natieve eiwit. Ook de allergeniciteit van Ara h 2/6 gezuiverd uit geroosterde pinda was vergelijkbaar met die van het onverhitte, natieve eiwit.<sup>1</sup>

Onafhankelijk van de mate van glycosylering (de zogeheten maillardreactie), resulteerde het 'koken' van Ara h 1 in de vorming van aggregaten met een verminderde IgE-binding en IgE-crosslinkingcapaciteit, terwijl de T-celreactiviteit werd behouden. De oplosbare fractie van Ara h 1 uit geroosterde pinda's bleek in grote mate te zijn gedetermineerd, vormde rondere en kleinere aggregaten, en was niet geglycosyleerd. Deze kleinere, niet-geglycosyleerde aggregaten behielden echter wel de IgE-bindende capaciteit, in tegenstelling tot de aggregaten die gevormd werden

na verhitting en glycosylering van geïsoleerd Ara h 1.<sup>2</sup> Deze resultaten zouden een verklaring kunnen zijn voor de waargenomen verschillen tussen gekookte en geroosterde pinda's en suggereren dat andere veranderingen dan de maillardreactie de allergeniciteit van Ara h 1 beïnvloeden.

Aangezien vaak geroosterde pinda's worden geconsumeerd, werden de allergenen ook onder lage vochtigheid verhit wat resulteerde in ontleding van zowel Ara h 1 als Ara h 2/6. In tegenstelling tot Ara h 2/6 vormde Ara h 1 echter grote aggregaten. Hittebehandeld Ara h 2/6 vertoonde een verlaagde IgE-binding en degranulatiecapaciteit vergeleken met de natieve vorm. De aanwezigheid van glucose tijdens de verhitting werkte zowel de afname in IgE-binding als de afname in degranulatiecapaciteit tegen. De IgE-bindingscapaciteit van Ara h 1 werd ook verminderd na verhitten, maar de capaciteit om basofielen te degranuleren werd significant verhoogd.<sup>3</sup> Dit laat zien dat het zeer belangrijk is om een degranulatie-test naast de IgE-bindingstest mee te nemen bij het bepalen van het allergene potentieel van allergenen. Bovendien lijkt de mate van aggregatie van invloed te zijn op de IgE-crosslinkingcapaciteit van individuele allergenen. Zeer grote aggregaten, in dit geval van Ara h 1, bevatten een groot aantal epitopen en zouden hierdoor mogelijk efficiënter het IgE op de basofiel kunnen crosslinken.

Een ander hoofdstuk beschrijft het effect van glycosylering bij een lage vochtigheid op de basofieldegranulatiecapaciteit van Cor a 11, de Ara h 1-homoloog uit hazelnoot. Glycosylering bij 37 °C had geen invloed op de specifieke IgG- of IgE-binding, terwijl beide waren afgenomen bij 60 en 145 °C. Verhitting bij 145 °C in aan- of afwezigheid van glucose resulteerde echter in de vorming van aggregaten en vergrootte de basofieldegranulatiecapaciteit van Cor a 11 getest met sera met een hoog gehalte van Cor a 11-specifiek IgE. Bij gebruik van pinda-allergische patiëntensera met een laag gehalte van Cor a 11-specifiek IgE werd echter geen verschil in degranulatiecapaciteit waargenomen.<sup>4</sup> Deze studie laat, naast het belang van het gebruik van een combinatie van testen, ook het belang zien van het gebruik van goed gekarakteriseerde sera als bron van IgE.

### **IgE-profiel 'component-resolved diagnostics (CRD)' bij patiënten met allergie voor pinda en soja**

Van klinisch goed gedefinieerde pinda- en soja-

allergische patiënten werd een uitgebreid IgE-profiel bepaald voor allergenen uit pinda, soja en berk. Sensibilisatie voor het soja-allergeen Gly m 4 (Bet v 1-homoloog) was een belangrijke indicator voor ernstige soja-allergie bij de soja-allergische patiënten. Gly m 4 blijkt relevanter voor de detectie van een klinisch relevante soja-allergie dan andere geteste soja-allergenen (nGly m 5 en 6 en soja 2S) of dan het soja-extract. Bij pinda-allergische patiënten kan een positieve Gly m 4-test klinisch niet relevant zijn (door kruisreactiviteit met Ara h 8/Bet v 1), waardoor een soja-provocatietest nodig is om soja-allergie vast te stellen bij pinda-allergische patiënten. Het merendeel van de pinda-allergische patiënten, niet allergisch voor soja, werd serologisch positief getest voor het soja-extract en voor allergenen uit een soja- of erwtexttract. Dit kwam waarschijnlijk door de aanwezigheid van klinisch niet-relevante kruisreactiviteit tussen pinda-specifiek IgE en homologe soja- en erwtextcomponenten. Hieruit werd geconcludeerd dat zowel een soja- als een erwtexttract, evenals de soja-allergenen Gly m 5 en 6 en soja 2S, een slechte diagnostische voorspellende waarde hebben.<sup>5</sup>

## Conclusies

Uit dit deel van het proefschrift kan worden geconcludeerd dat thermische behandeling van eiwitten belangrijke en eiwit-specifieke effecten kan hebben op zowel de structuur als de allergeniciteit van relevante allergenen. Om de allergeniciteit van eiwitten te kunnen testen is het echter niet voldoende om alleen IgE-bindingstesten te gebruiken. Ook basofielhistaminedegranulatietesten zijn hierbij van groot belang, in het bijzonder als men geaggregeerde eiwitten wil testen. Deze resultaten kunnen consequenties hebben voor het stellen van een goede diagnose van voedselallergie in de dagelijkse praktijk. Daarnaast lijkt de mate van eiwitaggregatie invloed te hebben op de allergeniciteit van een eiwit.

## Sectie 2: immuunmodulatie door lactobacillusstammen

In dit tweede deel is onderzocht of bepaalde lactobacillusstammen een positief effect hebben op het immuunsysteem van allergische patiënten. Twee in-vitrostudies zijn uitgevoerd, gevolgd door een in-vivo-screening waarbij de vijf meestbelovende stammen zijn getest.

In de eerste in-vitrostudie werden 51 lactobacillusstammen gescreend, waarvan er acht werden geselecteerd en getest op hun immuunmodulerende effecten op PBMC's van gezonde donoren. Alle geteste lactobacillusstammen induceerden de productie van IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$ . Duidelijke stamspecifieke effecten zoals een significant hogere productie van IFN- $\gamma$ , IL-12 en TNF- $\alpha$  werden geobserveerd wanneer de *L. plantarum* stammen werden vergeleken met *L. acidophilus* stammen.<sup>6</sup> Hieruit concludeerden we dat voornamelijk *L. plantarum* stammen veelbelovende kandidaatstammen zijn in IgE-gemedieerde allergieën door hun mogelijkheid om de T-celreactie in de richting van een potentiële Th1-reactie te stimuleren.

In een hierop aansluitende studie werden immuunmodulerende effecten van zes geselecteerde lactobacillusstammen onderzocht op PBMC's van pollenallergische patiënten. Alle stammen waren in staat om de 'innate' cytokineproductie door PBMC's te stimuleren en daarnaast waren alle stammen ook in staat om de IL-13-productie te onderdrukken. Ook hier was een stamspecifiek effect waarneembaar wat betreft IFN- $\gamma$ - en IL-12-inductie. Eén stam was in staat om anti-CD3/anti-CD28-geïnduceerde celdeling te onderdrukken.<sup>7</sup> De specifieke stammen die de Th2-cytokineproductie verminderden, en daarnaast Th1-cytokines versterkten, zouden mogelijk heilzaam kunnen zijn voor allergische patiënten. Effecten die verkregen zijn met in-vitrotesten kunnen niet direct worden vertaald naar de in-vivosituatie. Daarom hebben we een in-vivoscreening uitgevoerd met vijf lactobacillusstammen. Bloedmonsters van 62 berkenpollenallergische patiënten werden zowel vóór als na een vier weken durende interventie verzameld. Interventie met vier van de vijf stammen, en niet met de placebo, zorgde voor een afname in berkenpollenspecifiek IgE en voor één specifieke stam ging dit samen met een significante afname in IL-5 en IL-13 en een toename in IL-10-productie in anti-CD3/anti-CD28 gestimuleerde PBMC-kweken.<sup>8</sup> Deze stam zou hierdoor geschikt kunnen zijn om seizoensgebonden allergische symptomen te verlichten.

## Conclusies

Gezien de aangetoonde stamspecifieke effecten van melkzuurbacteriën is een goede voorselectie van potentiële stammen van groot belang alvorens de meest veelbelovende stammen te kiezen voor een klinische

studie. In onze in-vivoscreening werd *L. plantarum* CBS125632 gezien als de meest veelbelovende stam vanwege de gewenste immuunmodulerende effecten ervan. Deze stam zou daarom getest kunnen worden in een follow-uptrial voor symptoomvermindering bij patiënten die lijden aan berkenpollenallergie.

## Referenties

1. Vissers YM, Blanc F, Skov PS, et al. Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from peanut. *PLoS ONE* 2011;6:e23998.
2. Blanc F, Vissers YM, Adel-Patient K, et al. Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:1887-94.
3. Vissers YM, Iwan M, Adel-Patient K, et al. Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: the necessity of degranulation assays. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1631-42.
4. Iwan M, Vissers YM, Fiedorowicz E, et al. Impact of maillard

reaction on immunoreactivity and allergenicity of the hazelnut allergen cor a 11. *J Agric Food Chem* 2011;59:7163-71.

5. Vissers YM, Jansen APH, Ruinemans-Koerts J, et al. IgE component-resolved allergen profile and clinical symptoms in soy and peanut allergic patients. *Allergy* 2011;66:1125-7.
6. Vissers YM, Snel J, Zuurendonk PF, et al. Differential effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* strains on cytokine induction in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;59:60-70.
7. Vissers YM, Snel J, Zuurendonk PF, et al. *Lactobacillus* strains differentially modulate cytokine production by hPBMC from pollen-allergic patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;61:28-40.
8. Snel J, Vissers YM, Smit BA, et al. Strain-specific immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* strains on birch-pollen-allergic subjects out of season. *Clin Exp Allergy* 2011;41:232-42.

Ontvangen 10 oktober 2011, geaccepteerd 14 mei 2012.

## Allergovit<sup>®</sup> SCIT verkorte bijsluiter

Allergopharma 

**Samenstelling:** Allergoïde van pollenallergenen voor de specifieke immunotherapie gestandaardiseerd in Therapeutische Eenheden (TE), aan aluminiumhydroxide geadsorbeerd, met 0,4% fenol geconserveerd in een fysiologische zoutoplossing gesuspenderd. Concentratie A bevat 1.000 TE/ml, concentratie B bevat 10.000 TE/ml.

**Indicatie:** Allergovit<sup>®</sup> is geïndiceerd voor de behandeling van IgE-gemedieerde allergie voor boom- en graspollen bij patiënten met allergisch rhinitis, conjunctivitis, en/of astma. Diagnose dient gebaseerd te zijn op zorgvuldige anamnese en bepaling van de allergie door middel van huidtest of RAST-onderzoek.

**Contra-indicaties:** Aandoeningen die de werking van het afweersysteem beïnvloeden (bijv. immunodeficiënties), maligniteit en auto-immuunziekten. Ernstige hart- en vaatandoeningen (coronaire ziekten, ernstige hypertensie). Aandoeningen die de therapietrouw negatief beïnvloeden. Leeftijd onder de 5 jaar of boven de 60 jaar Medicamenteus moeilijk te behandelen astma, met name bij een FEV1 < 70% van de voorspelde waarde ondanks optimale therapie en bij steroidafhankelijkheid. Gebruik van bètablokkers of immunosuppressiva. Zwangerschap. Een reeds aangevangen behandeling kan eventueel in overleg met de patiënte worden gecontinueerd. Overgevoeligheid voor een der hulpstoffen en waar relevant: overgevoeligheid voor aluminiumhydroxide. Patiënten met ernstige nierfunctiestoornissen (voor aluminiumhydroxide bevattende producten). Omdat adrenaline voor de behandeling van allergische bijwerkingen wordt aanbevolen, moet men rekening houden met eventuele contra-indicaties voor adrenaline.

**Bijwerkingen:** Lokale reacties zoals zwelling, roodheid en/of gevoeligheid rondom de injectieplaats kunnen zich voordoen. Systemische reacties, zoals conjunctivitis, rhinitis, urticaria, Quincke-oedeem, bronchoconstrictie, vermoeidheid, larynx oedeem en/of anafylactische shock kunnen optreden. Bij een zorgvuldige uitvoering en adequate individuele dosistijging zijn allergische bijwerkingen zeldzaam en meestal mild van aard.

**Waarschuwingen en voorzorgen:** Na de injectie moet de patiënt 30 minuten onder controle van de arts blijven. Bijwerkingen kunnen ook enkele uren na toediening van de injectie optreden.

**Instelbehandeling:**  
2 flesjes Concentratie A 3 ml  
Concentratie B 3 ml

**Onderhoudsbehandeling:**  
1 flesje Concentratie B 3 ml

**Uitvoering:** De behandeling dient in principe individueel te worden ingesteld, een adviesdoseringsschema wordt meegeleverd.

**Instelbehandeling:** Tijdens de instelbehandeling wordt de dosering wekelijks verhoogd tot maximaal 0,6 ml concentratie B.

**Onderhoudsbehandeling:** Als het nog enkele weken of maanden duurt voor dat het pollenseizoen begint, kan er doorbehandeld worden met een maandelijks onderhoudsdosering. Maximale dosering is 0,6 ml concentratie B. Tijdens het pollenseizoen worden geen injecties toegediend. Na het pollenseizoen wordt de behandeling met een nieuwe instelbehandeling voortgezet.

**Bewaring:** Allergovit<sup>®</sup> moet tussen de +2°C en +8°C worden bewaard. Niet invriezen.

1. Eng PA, Borer-Reinhold M, Heijnen IA, Gnehm HP. Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass-pollen immunotherapy in childhood. *Allergy* 2006;61:198-201. 2. Corrigan CJ for the Study Group, Kettner J, Doerner C, Cromwell O, Narkus A. Efficacy and Safety of preseasonal-specific immunotherapy with an aluminium-adsorbed six grass-pollen allergoid. *Allergy* 2005;60: 801-8. 3. Eng PA, Reinhold M, Gnehm HP. Long term efficacy of preseasonal grass-pollen immunotherapy in childhood. *Allergy* 2002;57:306-12. 4. Ranjbar A, Pizzulli A, Marashi MJ, Nayebeh Aghai Kashi M. Short term preseasonal pollen allergoid immunotherapy in the causal therapy of allergic asthma in children, a prospective, randomized controlled trial. *EAACI 2004, poster session 911, p 269*. 5. IB-tekst Allergovit<sup>®</sup>. 6. Thum-Oltmer S, Ulrich D, Meyer H, Müller-Scheven D. Kurzzeitimmuntherapie mit Allergoiden. *Allergologie* 2005;10:391-400.



Allergovit<sup>®</sup> SCIT 7 weken therapie

Allergopharma B.V. | Postbus 229, 3700 AE Zeist | tel. (030) 696 06 07  
fax (030) 696 23 25 | e-mail: info@allergopharma.nl | www.allergopharma.nl