

Standaryzacja *in vitro* metodą hamowania FAST preparatów alergenowych pyłków traw

WIESŁAW SZYMAŃSKI, ANNA MARIA ROGALEWSKA, IRENA MICHALSKA, SABINA CHYREK-BOROWSKA, TERESA MICHNO, KATARZYNA DECHNIK *

Klinika Alergologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej, ul. Skłodowskiej - Curie 24a, 15-276 Białystok.
* Wytwórnia Surowic i Szczepionek Biomed, ul. Sosnowa 8, 30-224 Kraków

Jedną z uznanych metod standaryzacji służącą, do określania aktywności biologicznej alergenu jest test hamowania RAST. Celem pracy było określenie przydatności techniki hamowania FAST w standaryzacji wyciągów alergenowych pyłków traw Catalet T. Test hamowania FAST (*Fluorescence Allergosorbent Test*) przeprowadzono w opraciu o pulę surowic chorych uczulonych na pyłki traw, poddanych wcześniej procedurze standaryzacji biologicznej. Określenie swoistych IgE dla alergenów kostrzewy, życicy i tymotki w puli surowic dokonano techniką immunofluorescencji stosując odczynniki IgE FAST-Plus produkcji firmy Bio-Whittaker. Wartość 50% zahamowania FAST przeprowadzono przy użyciu wyciągu alergenowego pyłków traw Catalet T (IHR). Badania potwierdziły wysoki poziom swoistych IgE w puli surowic wobec badanych alergenów kostrzewy, życicy i tymotki. Test hamowania FAST pozwolił określić stężenie wyciągu alergenowego, które powoduje związanie połowy swoistych IgE w dostępnej puli surowic.

Autorzy uważają, że test zahamowania FAST jako mniej kosztowny, łatwiejszy w wykonaniu i przyjazny ekologicznie może być wykorzystany w standaryzacji *in vitro* wyciągów alergenowych do celów diagnostycznych i terapeutycznych.

Pomimo wieloletnich badań nie wypracowano idealnej metody standaryzacji alergenów *in vitro* [1,11, 15,16]. Równoczesne jednak użycie kilku technik immunobiochemicznych umożliwiło określanie składu aktywnych komponent konwencjonalnych preparatów alergenowych, które w większości zostały korzystnie zweryfikowane po uwzględnieniu standaryzacji biologicznej [3]. Współczesne wymogi standaryzacji stawiane producentom ekstraktów alergenowych polegają na zapewnieniu powtarzalności ilościowej i jakościowej preparatu każdej produkowanej serii. Producenci spełniają ten wymóg przez utworzenie tzw standardu wewnętrznego (IHR – *In House Reference standard*), który odpowiada składem i aktywnością wymaganiom klinicznym, a każda nowo wyprodukowana seria jest z nim tożsama. Standard wewnętrzny jest produktem końcowym standaryzacji immunobiochemicznej i biologicznej. Standaryzacja immunobiochemiczna polega na określeniu składu ilościowego i jakościowego antygenów, wchodzących w skład danego ekstraktu alergenowego, zwanego produktem pośrednim (IMP – *intermediate product*). Wytworzenie produktu pośredniego obejmuje najczęściej następujące postępowanie:

1. Określenie zawartości białka w wyciągu alergenowym w jednostkach PNU (*Protein Nitrogen Units*) oraz elektroforezę ogniskową (IEF – *Isoelectric Focusing*) alergenowo nieswoiste potwierdzenie obecności białka w określonym punkcie izoelektrycznym

2. Zdefiniowanie składu alergenowego ekstraktu poprzez:

- a. Skrzyżowaną (radio) immunoelektroforezę (CIE {radio} CRIE - *Crossed {radio-} radioimmuno-electrophoresis*), umożliwiającą identyfikację swoistych alergenów głównych (*major*) i komponent rzadko alergizujących (*minor*).
- b. Western blot (WB) pozwalający na ustalenie wzorca alergenowego ekstraktu
- c. Elektroforezę nośnikową na żelu polyacrylamidowym (SDS-PAGE - *Sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis*), umożliwiającą rozdział białek zgodnie z ich masą cząsteczkową.
- d. Chromatografię cienkowarstwową (HPTLC - *High-performance-liquid-chromatography*), umożliwia sprawdzanie skuteczności filtracji ekstraktu alergenowego.
- e. Test hamowania RAST (*Radio-allergosorbent test inhibition*), najczęściej stosowana metoda pomiaru aktywności alergenowej *in vitro*. Polega na konkurencyjnym wiązaniu swoistych IgE z puli surowic przez alergen fazy stałej oraz badany. Pozwala na określenie całkowitej aktywności alergenowej i sprawdzenie jednolitości ekstraktu z serii na serię w stosunku do ekstraktu referencyjnego (IHR) [1].

Praca przedstawia zastosowanie metody hamowania FAST do określenia aktywności alergenowej standardu wewnętrznego sporządzonego z pyłków traw oraz wykorzystania jej w przyszłości do kontrolowania zgodności potencji ekstraktów z serii na serię.

MATERIAŁ I METODYKA

Metodyka testu zahamowania FAST

Pula surowic chorych uczulonych na pyłki traw poddanych testowi Dreborga w I-szym etapie badań, bufor fosforanowy 0,1M, pH 7,4 z dodatkiem albuminy ludzkiej 0,03%, surowica referencyjna o znanej ilości IgE, wyciąg alergenowy (standard IHR) Catalet T (firma Biomed), speciment diluent - firmy BioWhittaker, Allergen-Specific IgE FAST-Plus TEST - firmy BioWhittaker, swoiste alergeny firmy BioWhittaker: 200-0G4 - *Festuca elatior* (Kostrzewa), 200-0G5 - *Lolium perenne* (Życica), 200-0G6 - *Phleum pratense* (Tymotka).

Ocenę aktywności biologicznej *in vitro* preparatu alergenowego pyłku traw Catalet T metodą zahamowania FAST (*Fluorescence Allergosorbent Test*) przeprowadzono w oparciu o pulę surowic uzyskaną od chorych poddanych testowi Dreborga – standaryzacja biologiczna [14].

Surowicę dwudziestu trzech, poddanych testowi Dreborga, chorych przechowywano w temperaturze minus 20°C. W dniu wykonywania testu zahamowania FAST surowice wszystkich chorych rozmrożono, odmierając po 1 ml celem utworzenia puli surowic. Wyciąg alergenowy IHR rozcieńczono 0,1M buforem fosforanowym o pH 7,4 z dodatkiem albuminy ludzkiej (0,03%) w następujący sposób:

Do rzędu probówek nanoszono kolejno po 200 ml buforu fosforanowego z albuminą ludzką. Następnie do probówki Nr 1 dodano 200 ml ekstraktu alergenowego Catalet T - IHR. Po wymieszaniu, 200 ml roztworu przenoszono do kolejnej probówki. Czynność powtarzano aż do osiągnięcia ostatniej probówki rzędu. Dla każdego alergenu próbę nastawiano podwójnie.

W ten sposób uzyskano kolejne rozcieńczenia ekstraktu: 1:2, 1:4, ..., 1:131072. W następnym etapie do 200 mg malejących stężeń roztworów alergenu dodawano równe objętości połączonej surowicy. Po wymieszaniu, próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 3 godzin, a stężenie alergenu oznaczano metodą FAST.

W celu określenia stężenia alergenu, które powoduje 50% zahamowania FAST przyjmowano wartości IgE dla poszczególnych alergenów traw znajdujące się w przedziale połowy wartości całkowitego poziomu IgE dla danego alergenu.

Do ścisłego wyznaczenia wartości 50% zahamowania FAST posłużono się modelem matematycznym procedury regresji liniowej według formuły: $y = a + b \cdot x$. Na osi y nanoszono określone empirycznie wartości zahamowania FAST, na osi x odpowiadające im rozcieńczenia wyciągu badanego.

Pomiar swoistych IgE

Oznaczenie swoistych IgE wobec alergenów kostrzewy (g4), życicy (g5) i tymotki (g6), wykonano wykorzystując gotowe zestawy odczynników "*fluorescence allergosorbent test for determination of allergen-specific IgE*" produkcji BioWhittaker (USA), stosując się ściśle do instrukcji zalecanej przez firmę. Do poszczególnych baseników polietylenowych (dla alergenu każdej trawy oddzielne) z powiązanymi kowalentnie alergenami pyłków trzech ww traw dodawano po 50ml badanych surowic w następującej kolejności: surowice standardowe (0,35 IU/ml, 0,8 IU/ml, 4,0 IU/ml i 20 IU/ml), surowica kontrolna (negatywna i pozytywna) - *Allergen-Specific IgE Control*, surowica puli w następujących rozcieńczeniach: 1:1, 1:2, 1:4 i 1:8 oraz po 50ml z każdej próby badanej. Wszystkie oznaczenia dla każdego alergenu g4, g5 i g6 wykonywano podwójnie. Po inkubacji trwającej 2 godziny usuwano niezwiązane produkty i nadmiar surowicy płucząc wszystkie baseniki, ułożone w dysku karuzelowym, buforem płuczającym. Do powstałego kompleksu alergen - swoiste IgE dodawano 100ml monoklonalnych anty-IgE znakowanych enzymem (fosfataza zasadowa). Po inkubacji trwającej 2 godziny powtarzano procedurę płukania dodając następnie substrat dla fosfatazy zasadowej (*fluorescence substrate-A*). Emitowana w czasie reakcji chemicznej fluorescencja była miarą ilości związanej badanej immunoglobuliny E. Natężenie fluorescencji badano automatycznie przy wykorzystaniu oryginalnego czytnika FluoroFAST 96 Fluorometer produkcji BioWhittaker. Pomiaru emisji fluorescencji dokonywano w przedziale 15 - 45 min. inkubacji gdy jej nasilenie osiągnęło wartość 1800 - 2600 FSU (*Fluorescence Signal Units*) dla standardu 20 IU/ml. Poziom swoistych alergenowo IgE odczytywano automatycznie wyrażając go w jednostkach międzynarodowych IU/ml. Opisany zestaw umożliwia określenie swoistych IgE w zakresie od 0,2 do 44 IU/ml.

WYNIKI

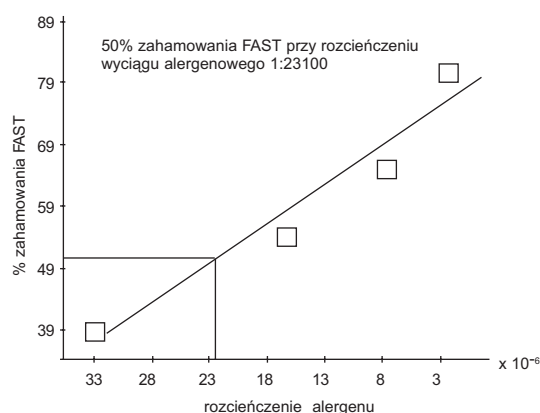
Stężenie swoistych IgE puli surowic wobec poszczególnych alergenów pyłków traw zestawiono w tabeli I.

Tabela I. Poziom swoistych alergenowo IgE w puli surowic oraz wynik hamowania FAST z użyciem wyciągu alergenowego pyłków traw Catalet T

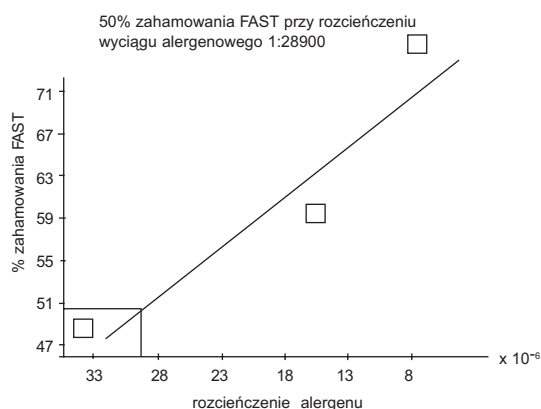
alergen pyłku traw	swoiste IgE IU/ml klasa FAST (1-6)	50% zahamowania FAST przy stężeniu alergenu Catalet T (IHR)
kostrzewa (g4)	84,78 (6 klasa FAST)	1 : 23 100
życica (g5)	49,38 (6 klasa FAST)	1 : 28 900
tymotka (g6)	38,86 (5 klasa FAST)	1 : 20 300

Poziom swoistych alergenowo IgE wobec poszczególnych alergenów pyłków trzech traw jest bardzo wysoki 5-6 klasa FAST, co potwierdza właściwy dobór chorych do procedury standaryzacji biologicznej oraz stwarza optymalne warunki do wykorzystania puli surowic w celu przeprowadzenia standaryzacji in vitro .

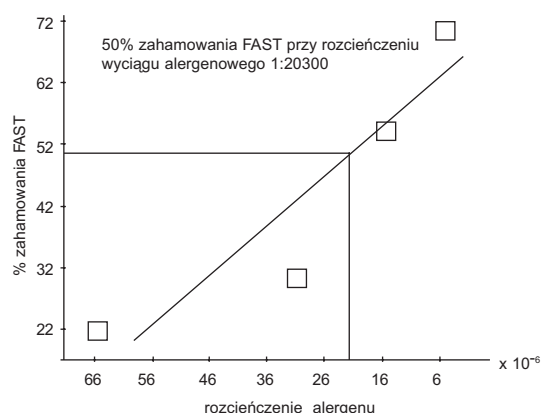
Na trzech kolejnych rycinach przedstawiono zakres rozcieńczeń standardu IHR, w jakich zachodzi 50% wiązanie swoistych IgE dla alergenów trzech badanych traw (ryc. 1, 2, 3).



Ryc. 1. Wynik testu hamowania FAST dla alergenu kostrzewy (*Festuca elatior*) g4



Ryc. 2. Wynik testu hamowania FAST dla alergenu życicy (*Lolium perenne*) g5



Ryc. 3. Wynik testu hamowania FAST dla alergenu tymotki (*Phleum pratense*) g6

Dla alergenu kostrzewy (g4) powyższe wartości znajdowały się w przedziale rozcieńczeń alergenu badanego 1: 4096 do 1: 32768.

Rozcieńczenia dla alergenów pyłku życicy (g5) powodujące 50 % zahamowanie FAST stwierdzono w przedziale 1: 8192 a 1: 32768.

Natomiast empirycznie wyznaczone wartości 50% zahamowania FAST dla alergenów pyłku tymotki (g6) znalazły się w przedziale rozcieńczeń badanego wyciągu alergenowego IHR od 1: 8192 do 1: 65536.

Jak uwidoczniło na rycinach, powyższa procedura pozwoliła na określenie stężenia badanego wyciągu alergenowego IHR Catalet T, które powoduje 50% zahamowania FAST dla wybranych alergenów pyłków traw. Jak przedstawiono w tabeli I rozcieńczenie ekstraktu 23100-krotne wiąże 50% swoistych IgE dla alergenów pyłku kostrzewy - g4 zawartych w puli surowic (ryc.1). Zdolność hamowania FAST w 50% przez badany preparat alergenowy Catalet T wobec swoistych IgE dla alergenów pyłku życicy - g5 zachodzi przy rozcieńczeniu 28900-krotnym (ryc.2). Natomiast powyższy ekstrakt należy rozcieńczyć 20300-krotnie, aby zahamować o połowę FAST w puli surowic określając swoiste IgE wobec alergenów tymotki - g6 (ryc.3).

DYSKUSJA

Wyższość preparatów alergenowych standaryzowanych nad ich formą konwencjonalną została udokumentowana zarówno w postępowaniu diagnostycznym, jak też w procesie immunoterapii swoistej [4,5,16]. W odróżnieniu od leków farmaceutycznych nie można zastosować procedur farmakopei do preparatów alergenowych [6,7]. Aktywność biologiczna ekstraktów alergenowych zależy od profilu immunologicznego chorego oraz od składu produktu wyjściowego z jednej strony, jak też użytych metod pozyskiwania, oczyszczania i standaryzacji z drugiej [7]. Trwają wysiłki połączonych

Komitetów IUIS/IAACI w celu zharmonizowania metod i zasad standaryzacji alergenów, ujednoczenia procedur standardów referencyjnych i ustalenia międzynarodowej jednostki potencji wyciągów alergenowych [6,8,16]. W związku z powyższym Europejska Komisja Farmakopei (*European Pharmacopoeia Commission*) dopuściła możliwość tworzenia standardów przez poszczególnych producentów ekstraktów alergenowych – *In-House Reference Preparation* (IHRP) [8,9]. Standard wewnętrzny pozwala na ustalenie siły alergogennej i wyrażenie jej w jednostkach arbitralnych, zapewnia poza tym powtarzalność produkcji z serii na serię spełniając wymogi farmakopei, marketingu oraz oczekiwania lekarzy alergologów [6,8,9].

Dostępność współczesnych metod immunobiochemicznych umożliwia stosunkowo łatwo wyprodukowanie standardu wewnętrznego tym bardziej, że większość alergenów stanowią białka lub glikoproteidy o masie cząsteczkowej od 15000 do 40000 daltonów [10,11,15]. Standaryzacja podraża jednak koszty uzyskania preparatu alergenowego, jej procedura biologiczna naraża chorych na niedogodności związane z wykonywaniem testów skórnych [10,11,14]. Dlatego do oceny zgodności potencji alergenowej nowych serii

zaleca się metodę hamowania RAST, ze względu na jej powtarzalność i swoistość [3, 11, 16]. Kordash T.R. i wsp. zalecają wykorzystanie testu uwalniania histaminy w celu standaryzacji wyciągów alergenowych [12]. Autorzy wcześniej wykazali przydatność techniki oznaczania swoistych IgE metodą fluorometryczną FAST [13]. Wykorzystanie testu hamowania FAST okazało się pomocne w standaryzacji wyciągu alergenowego pyłków traw i istnieją podstawy do prowadzenia dalszych badań w celu oceny zgodności potencji alergenowej z serii na serię w stosunku do standardu wewnętrznego IHR.

Optymalną metodą standaryzacji preparatu Catalet T mogłaby być technika określania głównych alergenów przy użyciu przeciwciał monoklonalnych [15]. Szerokie jednak wykorzystanie tej metody utrudnia różnorodność szczepionek alergenowych poszczególnych producentów [15].

Autorzy postulują zatem stosowanie testu hamowania FAST w celu standaryzacji szczepionki alergenowej pyłków roślin Catalet. Standaryzacja dalszych serii preparatu Catalet T potwierdziła powtarzalność metody i zgodność alergenową ze standardem wewnętrznym.

Piśmiennictwo

1. Maassch H.J., Wahl R. und Peckmann-Kapp/ler U.: In-vitro-Methoden zur Standardisierung und Charakterisierung von Allergenextrakten. *Allergologie* 1988, 11: 1-9.
2. Gleich G.J., Leiferman K.M., Jones R.T. et al.: Analysis of the potency of extracts of June grass by their inhibitory capacities in the radioallergosorbent test. *J.Allergy Clin Immunol.* 1976, 58: 31-8.
3. Levins B.J., Dolen W.K., Nelson H.S. et al.: Use of standardized and conventional allergen extracts in prick skin testing. *J.Allergy Clin Immunol.* 1992, 89: 658-66.
4. Lund F.L., Bonini S., Cocco G. et al.: Allergen extracts. Standardization of preparations for bronchial provocation tests. A position paper. (EAAACI Sub-committee on Bronchial Provocation Tests). *Clin. Exp. Allergy* 1993, 23: 702-8.
5. Zenner H.P., Baumgarten C., Rasp G. et al.: Short-term immunotherapy: a prospective randomized double-blind placebo-controlled multicenter study of molecular standardized grass and rye allergens in patients with grass pollen-induced allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997, 100: 23-9.
6. De Weck A.L.: Allergen Standardization at a crossroads ?. *ACI International* 1997; 9: 25-30.
7. Guerin B.: Purification and standardization of allergens. *Rev. Med. Suisse Romande* 1994, 114: 251-254.
8. Rooke M.B.: Regulation of allergen products in Europe: What now? Where next? . *ACI International* 1996, 8: 62-66.
9. Sjöholm I.: Standardization of allergens in Europe. *Arb Paul Ehrlich Inst. Bundesamt Sera Impfstoffe. Frankf A M* 1997, 91:107-110.
10. Lehrer S.B., Salvaggio J.E.: Allergens: standardization and impact of biotechnology. *Allergy Proc.*, 1990, 11: 197-208.
11. Maasch H.J., Schultze-Werninghaus G., Geissler W. et al.: Standardisierung von Gräserpollen-Extrakten mit Haut-Prick-Test, immunochemischer Charakterisierung und RAST-Hemmtest. *Allergologie* 1986, 9: 75-77.
12. Kordash T.R., Freshwater L.L. and Amend M.J.: Standardization of allergenic extracts by basophil histamine release. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1995, 75: 101-6.
13. Szymański W., Chyrek-Borowska S.: Metoda CAP-System versus metoda FAST w immunologicznym monitorowaniu swoistej immunoterapii w alergii pyłkowej. *Peum. Alerg. Pol. Supl.* 1995, 63: 52-59.
14. Szymański W., Rogalewska A., Chyrek-Borowska S., Złotnik Z., Lenczewska D.: Standaryzacja biologiczna preparatów alergenowych pyłków traw. (w druku).
15. Weber B., Fiebig H. und Cromwell O.: Die Quantifizierung von Hauptallergenen als Teil der Qualitätsprüfung industriell hergestellter Allergenpräparate. *Allergologie* 1998, 21: 116-124.
16. Bousquet J., Lockey R.F., Malling H. -J.: WHO Position Paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998, 53, Suppl. 44: 2-42.

FAST inhibition method for *in vitro* standardization of grass pollen extracts

WIESŁAW SZYMAŃSKI, ANNA MARIA ROGALEWSKA, IRENA MICHALSKA, SABINA CHYREK-BOROWSKA,
TERESA MICHNO, KATARZYNA DECHNIK

Summary

One of the recognized methods of standardization used for determination of biological activity of a allergen is RAST inhibition test. The purpose of this study was to evaluate a usefulness of the FAST (Fluorescence Allergosorbent Test) inhibition technique in standardization of grass pollen extracts - Catalet T (Biomed). FAST inhibition test was carried out using a serum pool collected from allergic patients sensitized to grass pollen, who underwent procedure of the biological standardization before. The determination of specific IgE to *Festuca elatior*, *Lolium perenne* and *Phelum pratense* in the serum pool was performed according to the IgE FAST-Plus method by BioWhittaker. The value of 50% of FAST inhibition was defined with the allergen extract of grass pollen - Catalet T (IHR). The study confirmed a high level of specific IgE to evaluated allergens of *Festuca elatior*, *Lolium perenne* and *Phelum pratense* in the examined serum pool. The FAST inhibition test was useful in the determination of concentration of allergenic extract which caused a bound of half of specific IgE in the examined serum pool.

The authors suggest that FAST inhibition test is more costly effective, easier to perform, ecologically friendly and can be used for a standardization *in vitro* of diagnostic and therapeutic extracts.