

Molekularna dijagnostika alergije na kravlje mlijeko

Anica Džajić¹, Iva Topalušić², Asja Stipić Marković³

Alergija na kravlje mlijeko najčešća je alergijska bolest u ranom djetinjstvu. Oko 80% proteina prisutno je u krutoj frakciji (kazeini, kazeinski kompleks), a oko 20% u tekućoj frakciji (sirutki) mlijeka. Sirutka sadrži α -laktalbumin (Bos d 4) i β -laktoglobulin (Bos d 5), albumin goveđeg seruma (Bos d 6), imunoglobuline (Bos d 7) i laktoferin. Ukupni kazein (Bos d 8) čine četiri različite frakcije: α_{s1} -kazein (Bos d 9), α_{s2} -kazein (Bos d 10), β -kazein (Bos d 11) i κ -kazein (Bos d 12). Za određivanje tih pojedinačnih alergenskih molekula primjenjuje se tzv. komponentna dijagnostika (engl. Component Resolved Diagnosis, CRD), koja je omogućila identifikaciju glavnih (Bos d 4 i Bos d 5 i sve kazeinske molekule) i sporednih (Bos d 6, Bos d 7 i laktoferin), odnosno križno reaktivnih (Bos d 5 i Bos d 6) alergenskih molekula. Buduća istraživanja omogućit će određivanje dijagnostičke značajnosti otkrivanja pojedinačnih alergenskih molekula. Veliki napredak očekuje se i u području molekularne biologije, genomike, proteomike i bioinformatike.

Cljučne riječi: ALERGOLOGIJA I IMUNOLOGIJA; MLIJEKO; DIJETE; PATOLOGIJA, MOLEKULARNA

UVOD

Preosjetljivost na hranu posljednjih desetljeća bilježi znatan porast među stanovnicima zapadnog svijeta, a neki oblik kliničke reakcije na hranu u tijeku života prisutan je kod 20-25% stanovništva (1). Incidencija preosjetljivosti na hranu manja je u odraslih nego u djece, osobito one u najmlađoj dobi (2, 3). U namirnice koje mogu uzrokovati preosjetljivost ubrajaju se one animalnog (mlijeko, jaja, riba, račići) i biljnog podrijetla (npr. kikiriki, jabuka, breskva, celer, kivi, gorušica, sezam, soja, lješnjak, orah, pšenica). Preosjetljivost na hranu nastaje kao specifičan imunski odgovor nakon izlaganja određenoj vrsti namirnica, pri čemu moraju biti ispunjena dva preduvjeta: da je preosjetljivost rezultat imunskog odgovora i da se simptomi pojavljuju pri svakom unošenju određene namirnice (4). Preosjetljivosti na hranu mogu biti posredovane imunoglobulinom E (IgE), limfocitima T, a mogu biti i miješanog tipa (posredovane IgE-om i limfocitima T) (5, 6). U literaturi se spominju tri moguće hipoteze koje nastoje objasniti glavne rizike za pojavu preosjetljivosti u djece s atopijom. To su: hipoteza o nedostatku vitamina D, za koji je poznato da posjeduje imunomodulacijsko djelovanje, higijenska hipoteza, prema kojoj smanjenje okruženosti mikroorganizmima povećava rizik za alergijske bolesti, hipoteza dvostruke izloženosti alergenu, uteme-

ljena na podacima da senzitivacija na alergene hrane nastaje preko kože, a da rani unos hrane vodi oralnoj podnošljivosti (5). Preosjetljivost koja nije posredovana s IgE-om ne može se dijagnosticirati određivanjem koncentracije specifičnih IgG-a ni specifičnih IgA-a (7). Prisutnost specifičnih IgG-a u serumu upućuje na to da je bolesnik u prethodnom razdoblju pio mlijeko (8). Glavna metoda otkrivanja alergije na alergene hrane je kontrolirani provokacijski pokus *in vivo* (3, 5, 8).

Preosjetljivost na kravlje mlijeko najčešća je alergija na hranu. Alergija na proteine kravljeg mlijeka posredovana IgE-om nastaje kao posljedica reakcije između IgE-a i linearnih i konformacijskih epitopa različitih proteinskih molekula mlijeka (9). Može se pojaviti u bilo kojoj dobi, čak i kod novorođenčadi koja se hrane majčinim mlijekom. U gotovo polovici djece nestaje u dobi između 5. i 10. godine života (5), a toleranciju na proteine kravljeg mlijeka može razviti oko

¹ Dječja bolnica Srebrnjak, Srebrnjak 100, Zagreb

² Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klaićeva 16, Zagreb

³ Specijalna bolnica za plućne bolesti, Rockefellerova 3, Zagreb

Adresa za dopisivanje:

Anica Džajić, mag. med. lab. diagn., Dječja bolnica Srebrnjak, Srebrnjak 100, Zagreb, e-mail: dzajicanica@yahoo.com

Primljeno/Received: 08. 11. 2020.; Prihvaćeno/Accepted: 11. 11. 2020.

80% djece u dobi do 16 godina (3). Većina istraživanja upućuje na to da se kod djece preosjetljive na kravlje mlijeko najčešće pojavljuju gastrointestinalni simptomi, potom respiratorni te kožni simptomi (9). Kod mnogih bolesnika različiti simptomi se preklapaju. Dojenčad s alergijom na kravlje mlijeko u velikom su riziku da poslije razviju preosjetljivost na druge alergene (5, 9, 10).

Početna laboratorijska dijagnostika alergija podrazumijeva probir osoba s atopijom, dakle utvrđivanje je li preosjetljivost kod bolesnika posredovana s IgE-om ili nije, što se potvrđuje određivanjem koncentracije ukupnog IgE-a (ulgE) u serumu (11, 12). Ako je riječ o IgE posredovanoj alergiji, sljedeći korak je otkrivanje mogućih alergena koji su pokrenuli alergijsku reakciju, određivanjem koncentracija specifičnih IgE-a (slgE) prema alergenima prirodnih izvora na koje su uputili kožno testiranje, anamneza i klinička slika bolesnika (13). Određivanjem slgE-a određuju se specifična antitijela prema alergenskim ekstraktima, koji sadrže nepročišćenu smjesu alergenskih, ali i ostalih proteina, polisaharida i lipida, a dobivaju se ekstrakcijom iz prirodnih alergenskih izvora (peluda, hrane, opnokrilaca, gljivica). Povećane vrijednosti slgE-a upućuju na alergiju, ali nisu konačan dokaz da je identificirani alergen uzrokovao simptome. Uzročno posljedična veza između alergena otkrivenog pomoću slgE-a i simptoma potvrđuje se kontroliranim provokacijskim postupkom (3, 5, 8, 9).

Posljednjih se godina za otkrivanje preosjetljivosti na pojedinačne alergenske molekule primjenjuje tzv. komponentna dijagnostika (engl. *Component Resolved Diagnosis*, CRD). U literaturi se upotrebljava i izraz molekularna dijagnostika alergija (engl. *Molecular Allergy Diagnosis*, MAD). Metoda podrazumijeva određivanje koncentracije slgE-a prema pročišćenim prirodnim i rekombinantnim alergenskim molekulama (14, 15, 16). Molekule prirodnih (engl. *natural*, n) alergena dobivaju se pročišćavanjem alergenskih ekstrakata kemijskim, kromatografskim, elektroforetskim i/ili imunoafinitetnim metodama. Tako se dobivaju npr. alergenske molekule proteina mlijeka (nBos d 4, nBos d 5, nBos d 6, nBos d 8), breze (Bet v1), ambrozije (nAmb a1), kikirikija (Ara h 8) itd. Proizvodnja rekombinantnih alergenskih molekula složen je proces koji obuhvaća cijeli niz postupaka, od ekstrakcije i izolacije glasnčkog RNA-a (engl. *messenger RNA*, mRNA) iz alergenskih izvora, preko sinteze komplementarnog DNA-a (engl. *complementary DNA*, cDNA), elektroforetskog razdvajanja pojedinih komponenti izvora alergena, pripreme početnica (engl. *primer*) za reakciju ulančavanja polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), umnažanja cDNA-a pojedinih alergenskih komponenti do ekspresije rekombinantnih (r) alergena, npr. breze (rBet v1, rBet v2, rBet v4, itd.), ose (rVes v 1, rVes v 3, rVes v 5), lateksa (rHev b 5) pčelinjeg otrova (rApi m1, rApi m2, rApi m10) u od-

govarajućim sustavima, najčešće u bakteriji *Echerichia coli* (17, 18).

ALERGENI

Dugi niz godina definicija alergena svodila se na definiciju njegove osnovne funkcije, prema kojoj bi se alergeni mogli definirati kao oni antigeni koji su u osoba s atopijom sposobni stimulirati reakciju preosjetljivosti tipa I (8, 9). Budući da je riječ o izuzetno kompleksnoj skupini spojeva, kemijska je definicija alergena gotovo nemoguća, jer nema apsolutnoga kemijskog kriterija koji bi omogućio univerzalnu definiciju alergena (19). Nova tehnologija proizvodnje pročišćenih prirodnih i rekombinantnih alergenskih molekula pridonijela je približavanju kemijskoj definiciji alergena. Stoga bi se moglo reći da su alergeni proteini, glikoproteini, lipoproteini ili konjugati proteina i haptena, koji imaju jedinstvena molekularna i strukturna svojstva: npr. Mr 5 - 150, pl 4 - 7, s poznatim slijedom nukleotida i/ili aminokiselina i sastavom ugljikohidrata (16). Nova je tehnologija omogućila da se mogu preciznije definirati i identificirati prave (primarne, glavne) alergenske molekule koje su pokretači alergijske reakcije kod svakog pojedinog bolesnika. Pritom je za kliničku praksu važno znati kojoj skupini proteina pripada pojedina alergenska molekula, jer se temeljem tog podatka mogu predvidjeti (procijeniti rizik) jačina i trajanje simptoma alergije (križno-reaktivne ugljikohidratne determinante < nespecifični proteini koji prenose lipide < proteini povezani s patogenima < skladišni proteini) (8).

Također je moguće identificirati križno-reaktivne (homologne) alergenske molekule, koje imaju neke slične ili jednake epitope kao i prave alergenske molekule. Križna reaktivnost će se pojaviti ako je sličnost primarne strukture sa ciljom alergeničnom molekulom veća od 50-70% (15) ili ako nastane reakcija između IgE-a i križno-reaktivne ugljikohidratne determinante glikoproteinske molekule (20). Za svakog bolesnika važno je otkriti senzitivaciju na prave alergenske molekule te otkriti križno-reaktivne molekule.

ALERGENSKE MOLEKULE KRAVLJEG MLIJEKA

Sadržaj proteina u mlijeku je 30-35 g/L. Kod pH 4,6 proteini mlijeka razdvajaju se u dvije frakcije: krutu (kazeini, kazeinski kompleks) i tekuću (sirutka, laktoserum) (8). Svi proteini kravljeg mlijeka prisutni su i u humanom mlijeku s izuzetkom β -laktoglobulina. Kazeini sadrže veću količinu proteina (80%) nego sirutka. Kazeinski kompleks čine četiri različite kazeinske frakcije: α_{s1} -kazein, α_{s2} -kazein, β -kazein i κ -kazein, a sirutka sadrži α -laktalbumin i β -laktoglobulin, albumin goveđeg seruma, imunoglobuline i laktorferin (Tablica 2) (6, 9, 21). Proteini sirutke osjetljiviji su na toplinu nego kazeini i gube sposobnost vezanja na IgE nakon kuhanja 15 - 20 mi-

TABLICA 1. Klasifikacija imunosne preosjetljivosti na hranu. Prilagođeno prema ref. 1.

Imunosna preosjetljivost na hranu	
Imunosni mehanizam	Primjeri
IgE-posredovani mehanizam	Akutna urtikarija, rinokonjuktivitis, bronhospazam, oralni alergijski sindrom
Ne-IgE mehanizam	Enteropatija uzrokovana proteinima hrane, celijakija
Kombinirani mehanizam (IgE i ne-IgE)	Atopijski dermatitis, eozinofilni gastroenteritis
Stanični mehanizam (limfociti T)	Alergijski kontaktni dermatitis

nuta na temperaturi višoj od 90°C (8). Budući da su kazeini rezistentni na temperaturu, osobe alergične na proteine kazeina imat će teže i dugotrajnije simptome alergije.

Alfa-laktalbumin (Bos d 4)

Alfa-laktalbumin (Bos d 4) je kiseli (pI 4,2 - 4,5), monomerni protein sirutke, koji pripada proteinskoj lizosomskoj superporodici (8). Sadrži osam cisteinskih skupina međusobno povezanih disulfidnim vezovima, četiri triptofanska ostatka te visokoafinitetna mjesta za vezanje kalcija (9). Kao regulatorna podjedinica sintetaze laktoze sudjeluje u sintezi laktoze (8, 23).

Beta-laktoglobulin (Bos d 5)

Beta-laktoglobulin najzastupljeniji je protein sirutke. Ima ga u mlijeku mnogih sisavaca, ali ga humano mlijeko ne sadrži. Pripada lipokalinskoj skupini proteina, a sintetizira se u mliječnoj žlijezdi. Čine ga dva lanca od 162 aminokiselinska ostatka (9, 23). Intermolekularne veze tvori s hidrofobnim vezama ili disulfidnim mostovima; sadrži dva disulfidna veza i jednu slobodnu SH-skupinu. U fiziološkim uvjetima postoji kao smjesa monomera i dimera, ali zbog izoelektrične točke pI 5,1, može tvoriti oktamere.

Albumin goveđeg seruma (Bos d 6)

Albumin goveđeg seruma je globularni neglikozilirani protein, organiziran u tri homologne domene, ima devet petlji povezanih sa 17 kovalentnih disulfidnih vezova. Većina disulfidnih vezova dobro je zaštićena u jezgri proteina, što molekulu čini izuzetno stabilnom (9). Bos d 6 je križno-reaktivna molekula s drugim albuminima koji se mogu pronaći u epitelu životinja ili sirovom mesu (22).

Imunoglobulini (Bos d 7)

Imunoglobulini goveđeg mlijeka pripadaju razredu IgG, uglavnom podrazredima IgG1(200 - 500 mg/L) i IgG2. Na-

TABLICA 2. Svojstva alergenskih molekula kravljeg mlijeka. Prilagođeno prema ref. 8 i 22.

Protein	Ime alergena	Mr (kDa)	Broj AK	Koncentracija (g/L)	Alergeničnost*	Preosjetljivost među reaktivnima na KM (%)	Klinička križna reaktivnost	Laboratorijska križna reaktivnost
Sirutka	Bos d 4	14,2	122	1 - 1,5	Glavni	0 - 67		
	Bos d 5	18,3	162	3 - 4	Glavni	13 - 62	15-20% s	80% s
Albumin goveđeg seruma	Bos d 6	67	583	0,1 - 0,4	Sporedni	0 - 76	proteinima sirovog	proteinima
	Bos d 7	160	-	0,6 - 1,0	Sporedni	12 - 36	goveđeg mesa	goveđeg mesa
Laktoferin	-	76 - 80	703	0,1 - 1	Sporedni	≈ 35		
	Kazeinski kompleks							
Ukupni kazein	Bos d 8	20 - 30	-	30	Glavni	63	90% s mlijekom	
	Bos d 9	23,6	199	12 - 15	Glavni	65 - 100	sisavaca	85% s ovčjim i
α _{s1} -kazein	Bos d 10	25,2	207	3 - 4	Glavni	-	20% s kobiljim i	kozjim kazeinima
	Bos d 11	24	209	9 - 11	Glavni	35 - 44	magarećim	
κ-kazein	Bos d 12	19	169	3 - 4	Glavni	65 - 92	mlijekom	

AK - aminokiselina; KM - kravlje mlijeko; * - opisuju glavne i sporedne alergene

kon cijepjenja krave u mlijeku su prisutne povećane količine IgG1. Bos d 7 ima imunomodulatorna, antimikrobna i alergenična svojstva (24).

Laktoferin

Laktoferin je glikoprotein sačinjen iz dviju globularnih domena, krajevi kojih su povezani kratkom α -uzvojnicom. Budući da stupanj glikozilacije tih dviju domena može biti različit, Mr laktoferina varira između 76 i 80 kDa-a. Stabilnost molekule povezana je s velikim stupnjem glikozilacije. Laktoferin pripada skupini transferinskih proteina koji, prenoseći atome željeza u stanice, kontroliraju koncentraciju slobodnog željeza. Izoelektrična točka pl 8,7 definira ga kao bazični protein (8, 9). Osim željeza laktoferin reverzibilno veže cink, bakar i druge metale. Kao sastavnica urođenog imunskog odgovora laktoferin mlijeka djeluje baktericidno i fungicidno.

Kazeini (Bos d 8)

Kazeini pripadaju skupini fosfoproteina; fosfatne skupine esterificirane su na aminokiselinu serin. Sadrže velik broj prolinskih ostataka. Budući da nemaju disulfidnih mostova, imaju oskudnu tercijarnu strukturu. Tvore koloidne čestice nazvane kazeinske micelle. Više od 90% kalcija u obranom mlijeku nalazi se u kazeinskim micelama. Izoelektrična točka kazeina je 4,6, a pH = 6,6. To kazeinu daje negativan naboj u mlijeku. Kod pH 4,6 topivost kazeina je vrlo mala. Četiri kazeinske frakcije imaju malu sekvencijsku homologiju. Udio pojedinih frakcija je sljedeći: α_{s1} = 32%, α_{s2} = 10%, β = 28% i κ = 10% (ukupno 80%). Spominje se i γ -frakcija, koja nastaje kao posljedica proteolize kazeina i njen udio je neznan (9). α_{s1} -kazein je fosforilirana frakcija. Najzastupljeniji je protein kravljeg mlijeka. α_{s2} -kazein je također fosforilirana molekula. Pojavljuje se u četiri izoforme. β -kazein postoji u jednoj izoformi. Pod djelovanjem endogenih peptida (npr. plazmina) iz njega nastaju tri izoforme γ -kazeina. κ -kazein je jedina kazeinska molekula topiva u prisutnosti kalcija. U C-terminalnoj regiji posjeduje malu količinu fosfata. Jedini je od kazeina koji sadrži ugljikohidratni lanac.

Molekule Bos d 4 i Bos d 6 pripadaju skupini serumskih albumina, Bos d 5 imunoglobulinskoj porodici odnosno lipokalinima, Bos d 7 je IgG, a kazein pripada skupini skladišnih proteina (19). Skladišni proteini su najstabilnija skupina proteina i uzrokuju teže i dugotrajnije simptome alergije (8).

OTKRIVANJE ALERGENSKIH MOLEKULA

Metode MAD mogle su se razvijati pošto su znanstvenici uspjeli izolirati brojne pojedinačne molekule iz pročišćenih alergenskih izvora, odnosno ekstrakata, potom proizvesti

neke rekombinantne alergenske molekule, karakterizirati ih te proizvesti metodu koja će te pojedinačne molekule moći identificirati.

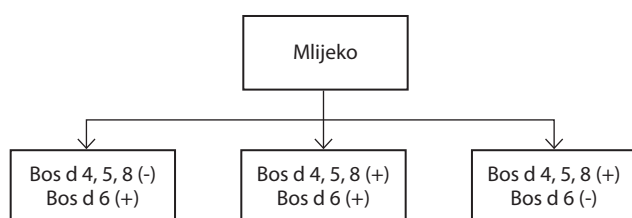
Metoda se temelji na načelu da se u serumu bolesnika određuje koncentracija slgE-a prema pojedinačnim alergenskim molekulama sadržanim na tvrdom nosaču u paketu reagensa. Postoji mogućnost detektiranja pojedinačne alergenske molekule ili istodobnog određivanja većeg broja njih na mikropostroju (19). Početna reakcija između bolesnikovog IgE-a i alergenske molekule obilježava se najprije monoklonskim, potom poliklonskim protutijelima; u završnoj, detekcijskoj reakciji može se mjeriti fluorescencija ili kemiluminiscencija, intenzitet koje je razmjern koncentraciji slgE-a u serumu. Prednost određivanja slgE-a prema alergenskim molekulama ogleda se u činjenici da se mogu razlikovati prave alergenske molekule od onih križnih.

Ako se određuje slgE prema pojedinačnim alergenskim molekulama, vrijednosti se izražavaju kvantitativno u međunarodnim jedinicama kU_A/L (engl. *kilo international units of allergen-specific-antibody/L* uzorka) (25). Prema sekundarnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije, 75/502 za IgE, $1 kU_A/L = 2,4 ng/mL$ (26). Metoda je osjetljiva i precizna u rasponu od 0,1-100 kU/L . Budući da ne postoji interferencija specifičnih antitijela IgG-a, metoda se smatra točnom. Zasad je moguće odrediti koncentraciju slgE-a prema glavnim molekulama – α -laktalbuminu, β -laktoglobulinu i kazeinu te prema sporednim alergenskim molekulama – albuminu goveđeg seruma i laktoferinu. U metodama na mikropostroju rezultati se izražavaju u semikvantitativnim jedinicama ISU (engl. *International Standard Units*), koje aproksimativno odgovaraju koncentraciji izraženoj kao kU_A/L (26).

DIJAGNOSTIČKA ZNAČAJNOST

U većine djece sa simptomima alergije na mlijeko može se dokazati preosjetljivost na barem jednu alergensku molekulu koja pripada skupini glavnih alergenskih molekula. Kod 35-50% bolesnika može se dokazati preosjetljivost na sporedne alergenske molekule (8). *Li J. i sur.* pokazali su da polovica djece s alergijom na mlijeko ima povećanu koncentraciju slgE-a prema Bos d 5, Bos d 9, Bos d 11 i Bos d 12 (27).

Važno je odrediti graničnu vrijednost slgE-a koja definira bolesnike s alergijom. Dvije skupine autora odredili su granične vrijednosti slgE-a prema alergenima ekstrakta mlijeka (28, 29). *Cuomo B. i sur.* su u skupini od 471-og djeteta preosjetljivog na kravlje mlijeko definirali graničnu vrijednost $\geq 5 kU_A/L$ (28), a *Castro AP. i sur.* su kod 123-je djece odredili graničnu vrijednost od 3,06 kU_A/L . *Castro AP. i sur.* su ujedno odredili granične vrijednosti slgE-a prema pojedinim molekulama: prema α -laktalbuminu (2,06 kU_A/L), β -laktoglobulinu (1,85 kU_A/L) te kazeinu (1,47 kU_A/L). Za te alergenske mole-



SLIKA 1. Interpretacija križne reaktivnosti alergenskih molekula mlijeka (prema ref. 8)

kule dijagnostička specifičnost iznosila je 98%, što je dovelo do zaključka da bolju dijagnostičku specifičnost ima određivanje slgE-a prema molekulama u ekstraktu mlijeka (29).

Alergija na molekule kazeina (kompleks ili pojedinačne molekule) upućuje na rizik perzistentne alergije, bez obzira na to pije li bolesnik termički obrađeno ili neobrađeno mlijeko. Tijekom kuhanja mlijeka dolazi do progresivne denaturacije proteina sirutke Bos d 4, Bos d 5 i Bos d 6. Istodobno kazeini Bos d 9, Bos d 10, Bos d 11 i Bos d 12 su termostabilni, jer nemaju sekundarnu, tercijarnu i kvaternarnu strukturu koja bi se uništila pod djelovanjem povišene temperature (30). Zbog toga izlaganje mlijeka povišenim temperaturama samo djelomično može smanjiti alergeničnost mlijeka. Ako je koncentracija slgE-a prema Bos d 8 mala ili nemjerljiva, a istodobno povećana prema Bos d 4 ili Bos d 5 ili Bos d 6 ili laktoferinu, kod bolesnika postoji rizik od alergije na nekuhanu mlijeko, uz toleranciju prema onom termički obrađenom (8).

Pod djelovanjem bakterija iz skupine *Lactobacillus* (npr. *L. delbrueckii* supsp. *bulgaricus*) dolazi do hidrolize proteina mlijeka, uglavnom Bos d 4 i Bos d 5, što smanjuje njihovu antigeničnost. Na antigeničnost alergenskih molekula ne djeluju jednako sve bakterije iz skupine *Lactobacillus*. Neke bakterije (*L. fermentum*, *L. helveticus*) mogu smanjiti antigeničnost inače stabilnih proteinskih molekula Bos d 9 i Bos d 11.

Molekularna dijagnostika na proteinske molekule mlijeka može pomoći u procjeni reaktivnosti na termostabilne molekule kazeina, ali ne može zamijeniti kontrolirani provokacijski test *in vivo* (8, 31).

Poznate su križno-reaktivne reakcije između proteinskih molekula kravljeg mlijeka i mlijeka drugih sisavaca te između kravljeg mlijeka i goveđeg mesa, jer pripadaju istim proteinskim porodicama. Skupini lipokalina, osim Bos d 5 pripadaju alergenske molekule epitela životinja (konja, goveda, psa, mačke). Bos d 6 iz skupine serumskih albumina je križno-reaktivan s alergenskim molekulama epitela ovce, koze, kunića, hrčka i ostalih sisavaca (8). Preosjetljivost na Bos d 5 i Bos d 6 može izazvati respiratorne simptome. Pravi alergeni kazeina i β -laktoglobulina su homologni s alergenima mlijeka ostalih sisavaca (Slika 1). Oko 13-20% djece preosjetljive na kazeinske molekule također pokazuje alergiju na alerge-

ne goveđeg mesa (8). Budući da je Bos d 6 termolabilna molekula, mnogi bolesnici podnose dobro pečeno meso.

ZAKLJUČAK

Primjena molekularne dijagnostike alergije na mlijeko napredak je u dijagnostici alergijskih bolesti, jer je omogućila da se osim pravih, glavnih alergenskih molekula mogu identificirati sporedne i križno - reaktivne molekule. Dijagnostička značajnost molekularne dijagnostike alergije na pojedinačne alergenske molekule bit će predmet istraživanja u budućim godinama, s glavnim ciljem da se usporedi dijagnostička vrijednost rezultata CRD-a s rezultatima provokacijskih testova te da se u konačnici preventivne mjere i terapija prilagode svakom pojedinom bolesniku. Napredak u području genomike, proteomike, molekularne biologije i bioinformatike značajno će pridonijeti identifikaciji pojedinih epitopa alergenske molekule te razumijevanju strukture alergenskih molekula i njihove alergeničnosti.

LITERATURA

1. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:594-602. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.044.
2. Penard-Morand C, Raheison C, Kopferschmitt C i sur. Prevalence of food allergy and its relationship to asthma and allergic rhinitis in schoolchildren. *Allergy*. 2005;60:1165-71. doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00860.x.
3. Turkalj M, Mrkić I. Alergijske reakcije na hranu. *Lijec Vjesn*. 2012;134:168-73.
4. Food Allergy. Practical Diagnosis and Management. Sicherer SH, ur. CRC Press, Taylor&Francis Group, Florida, SAD, 2014.
5. Kljaić Bukvić B. Alergija na hranu. *Paed Croat*. 2019;63 (Supl 1):185-93.
6. Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, Spitzauer S, Valenta R. Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*. 2014;66:22-33. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.08.005.
7. Linhart B, Freidl R, Elisyutina O, Khaïtov M, Karaulov A, Valenta R. Molecular approaches for diagnosis, therapy and prevention of cow's milk allergy. *Nutrients*. 2019;11:1492. doi: 10.3390/nu11071492.
8. EAACI. Molekularna alergologija. User's guide. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Ollert M, ur. EAACI. Zürich, Švicarska, 2016.
9. Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H i sur. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *World Allergy Organ J*. 2010;3:57-161. doi: 10.1111/j.1399-3038.2010.01068.x.
10. Henneman P, Petrus NCM, Venema A i sur. Genetic susceptibility for cow's milk allergy in Dutch children: the start of the allergic march? *Clin Transl Allergy*. 2016;6:7. doi: 0.1186/s13601-016-0096-9.
11. Hamilton RG. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125 (2 Suppl 2):S284-96. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.055.
12. Stipić Marković A, Ivković-Jureković I, Dodig S i sur. Hrvatske smjernice za *in vitro* dijagnostiku preosjetljivosti posredovane IgE protutijelima. *Acta Med Croatica*. 2015;69:75-96.
13. Johanson SGO. ImmunoCAP. Specific IgE test; an objective tool for research and routine allergy diagnosis. *Apert Rev Mol Diagn*. 2004;4:273-9.
14. Gadisseur R, Chapelle JP, Cavalier E. A new tool in the field of *in-vitro* diagnosis of allergy: preliminary results in the comparison of ImmunoCAP® 250 with the ImmunoCAP® ISAC. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:277-80.

15. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R i sur. A WAO-ARIA-GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J.* 2013;6:1-17. doi: 10.1186/1939-4551-6-17.
16. Dodig S, Čepelak I. The potential of component-resolved diagnosis in laboratory diagnostics of allergy. *Biochem Med (Zagreb).* 2018;28:020501. doi: 10.11613/BM.2018.020501.
17. Liu C, Willison LN, Sathe SK. Recombinant allergen production in *E. coli*. *Methods Mol Biol.* 2017;1592:23-45. doi: 10.1007/978-1-4939-6925-8_3.
18. Kleine-Tebbe J, Jakob T, ur. *Molecular Allergy Diagnostics. Innovation for a Better Patient Management.* Springer, Cham, Švicarska; 2017.
19. Dodig S. *Imunokemija.* Medicinska naklada; Zagreb; 2015.
20. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:155-61. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.008.
21. Lee JM, Yoon JS, Jeon SA, Lee SY. Sensitization patterns of cow's milk and major components in young children with atopic dermatitis. *Asia Pac Allergy.* 2013;3:179-85. doi: 10.5415/apallergy.2013.3.3.179.
22. Reese I, Lange L. Cow's milk and hen's egg allergy: what do molecular-based allergy diagnostics have to offer? U: Kleine-Tebbe J, Jakob T, ur. *Molecular Allergy Diagnostics. Innovation for a Better Patient Management.* Springer, Cham, Švicarska; 2017.
23. Herceg Z, Lelas V, Režek A. Funkcionalna svojstva α -laktalbumina i β -laktoglobulina. *Mljekarstvo.* 2004;54:195-208.
24. Ulfman LH, Leusen JHW, Savelkoul HFJ, Warner JO, van Neerven J. Effects of bovine immunoglobulins on immune function, allergy, and infection. *Front Nutr.* 2018;22. doi: 10.3389/fnut.2018.00052.
25. van Hage M, Hamsten C, Valenta R. Methods of allergy and immunology. ImmunoCAP assays: pros and cons in allergology. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:974-7. doi: 10.1016/j.jaci.2017.05.008.
26. Westwood M, Ramaekers B, Lang S i sur. ImmunoCAP® ISAC and Microtest for multiplex allergen testing in people with difficult to manage allergic disease: a systematic review and cost analysis. Southampton (UK): NIHR Journals Library; 2016 Sep. (Health Technology Assessment, No. 20.67.) Chapter 2, Background and definition of the decision problem(s). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK384702/>
27. Li J, Zhang J, Qiong C, She T, Bian Y, Lin S, Li H. Component resolved diagnostic study of cow's milk allergy in infants and young children in northern China. *Int Immunopharmacol.* 2018;61:126-31. doi: 10.1016/j.intimp.2018.05.027.
28. Cuomo B, Indirli GC, Bianchi A i sur. Specific IgE and skin prick tests to diagnose allergy to fresh and baked cow's milk according to age: a systematic review. *Ital J Pediatr.* 2017;43:93. doi: 10.1186/s13052-017-0410-8.
29. Castro AP, Pastorino AC, Gushken AK, Kokron CM, Filho UD, Jacob CM. Establishing a cut-off for the serum levels of specific IgE to milk and its components for cow's milk allergy: results from a specific population. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2015;43:67-72. doi: 10.1016/j.aller.2013.09.012.
30. Bu G, Luo Y, Chen F, Liu K, Zhu T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Sci Technol.* 2013;93:211-23. doi: 10.1007/s13594-013-0113.x.
31. Houmann Petersen T, Mortz CG, Bindslev-Jensen C, Eller E. Cow's milk allergic children – can component-resolved diagnostics predict duration and severity? *Ped Allergy Immunol.* 2018;29:194-9. doi: 10.1111/pai.12854.

SUMMARY

Molecular diagnosis of cow's milk allergy

Anica Džajić, Iva Topalušić, Asja Stipić Marković

Cow's milk allergy is the most common allergic disease in infancy. About 80% of protein is present in the solid milk fraction (caseins, casein complex), and about 20% in the liquid milk fraction (whey). Whey contains α -lactalbumin (Bos d 4), β -lactoglobulin (Bos d 5), bovine serum albumin (Bos d 6), immunoglobulins (Bos d 7) and lactoferrin. Total casein (Bos d 8) consists of four different fractions: α_{s1} -casein (Bos d 9), α_{s2} -casein (Bos d 10), β -casein (Bos d 11) and κ -casein (Bos d 12). Determination of these individual allergen molecules is carried out using the so-called component resolved diagnostics (CRD), which allows identification of major (Bos d 4 and Bos d 5 and all casein molecules), minor (Bos d 6, Bos d 7 and lactoferrin), as well as cross-reactive (Bos d 5 and Bos d 6) allergen molecules. Future research will make it possible to assess diagnostic role of detecting individual allergen molecules. Progress is also expected in the field of molecular biology, genomics, proteomics and bioinformatics.

Key words: ALLERGY AND IMMUNOLOGY; MILK; CHILD; PATHOLOGY, MOLECULAR