



UMF Victor Babeș Timișoara
Centrul OncoGen
www.oncogen.ro

Diagnosticul molecular

Un pas înainte spre medicina
personalizată în alergii

Prof. Dr. Carmen Panaiteescu

10 - 13 Aprilie, 2023



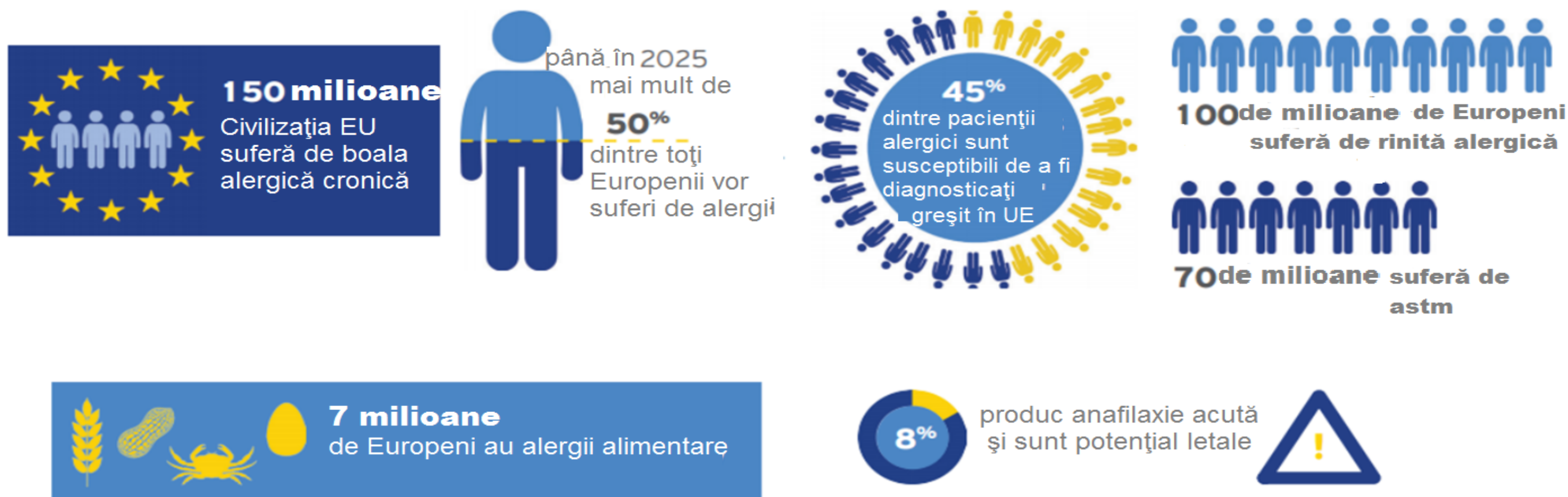


Agenda

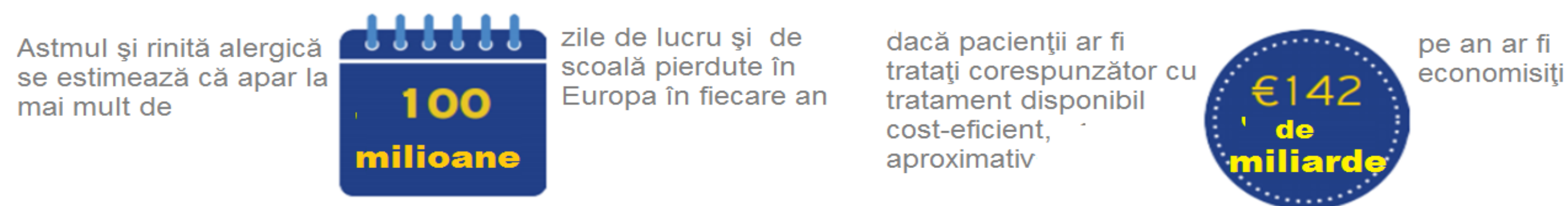
- Afecțiunile alergice - o provocare a secolului XXI
- Alergologia de precizie
- INSPIRED - către imunoterapii țintite

Prevalența și povara bolilor alergice la nivel global

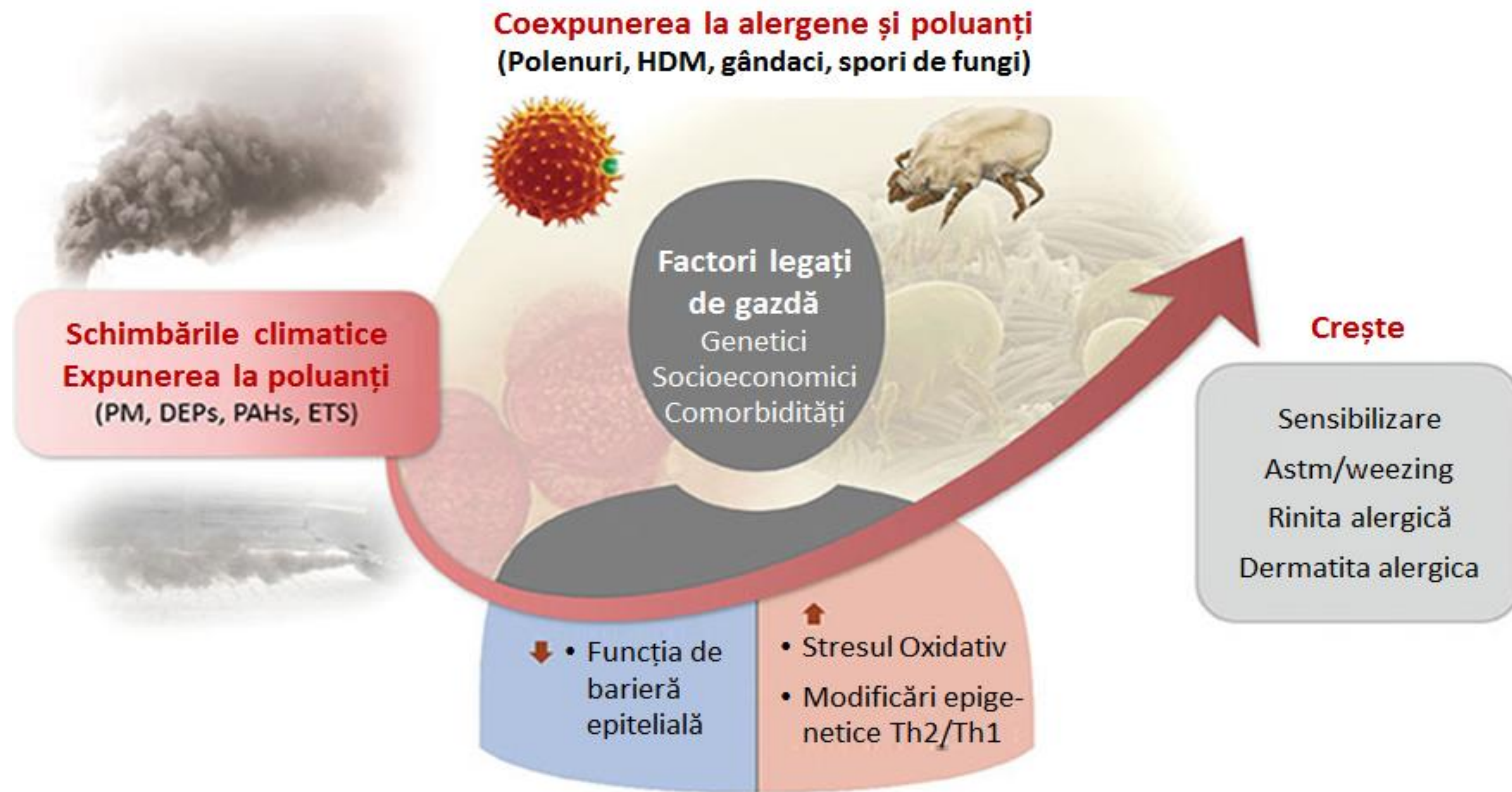
Epidemiologia Alergiei



GREUTATEA ȘI PRODUCTIVITATEA FIECĂREI ZI

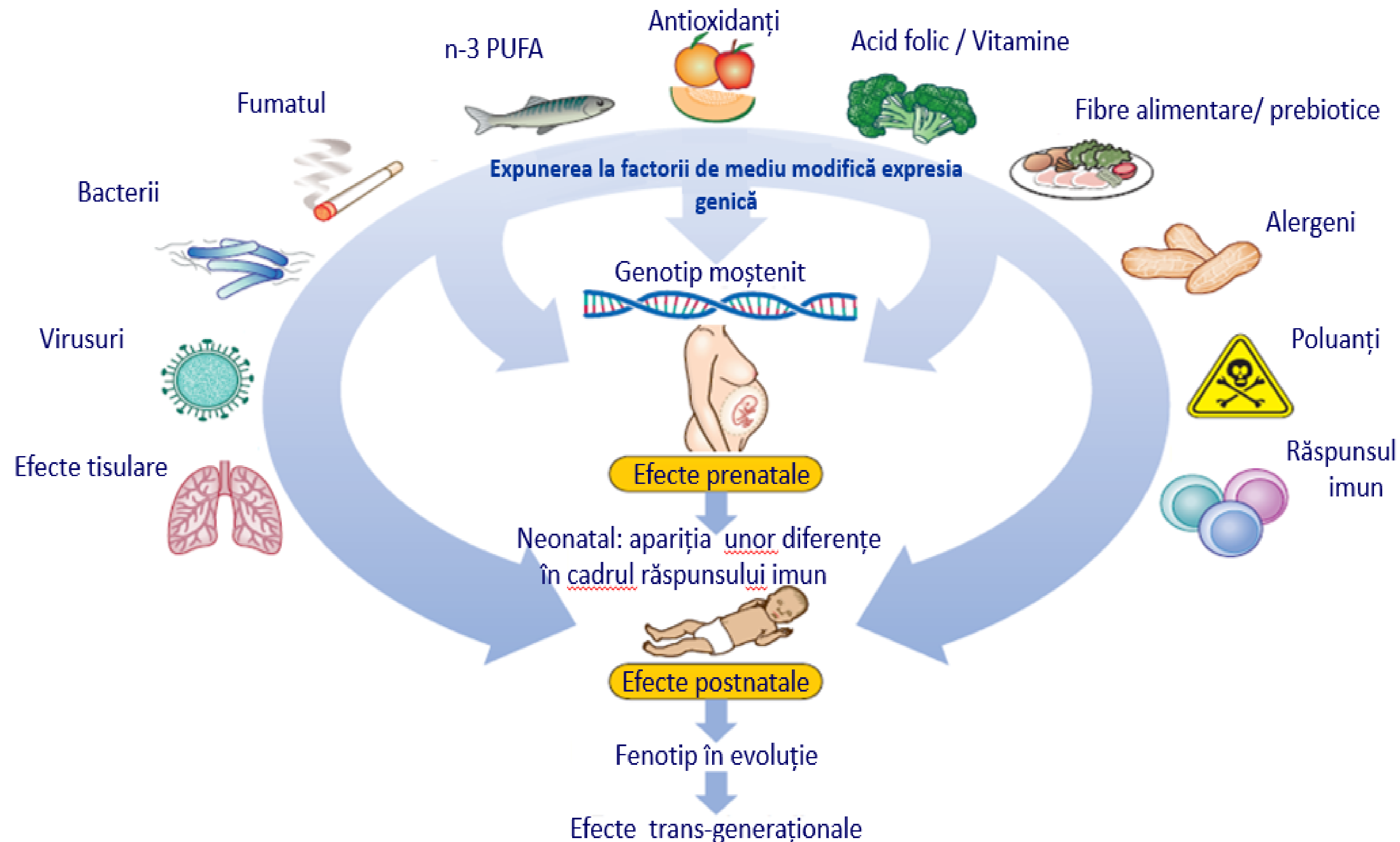


Impactul schimbărilor climatice și poluării în patogenizarea bolilor alergice



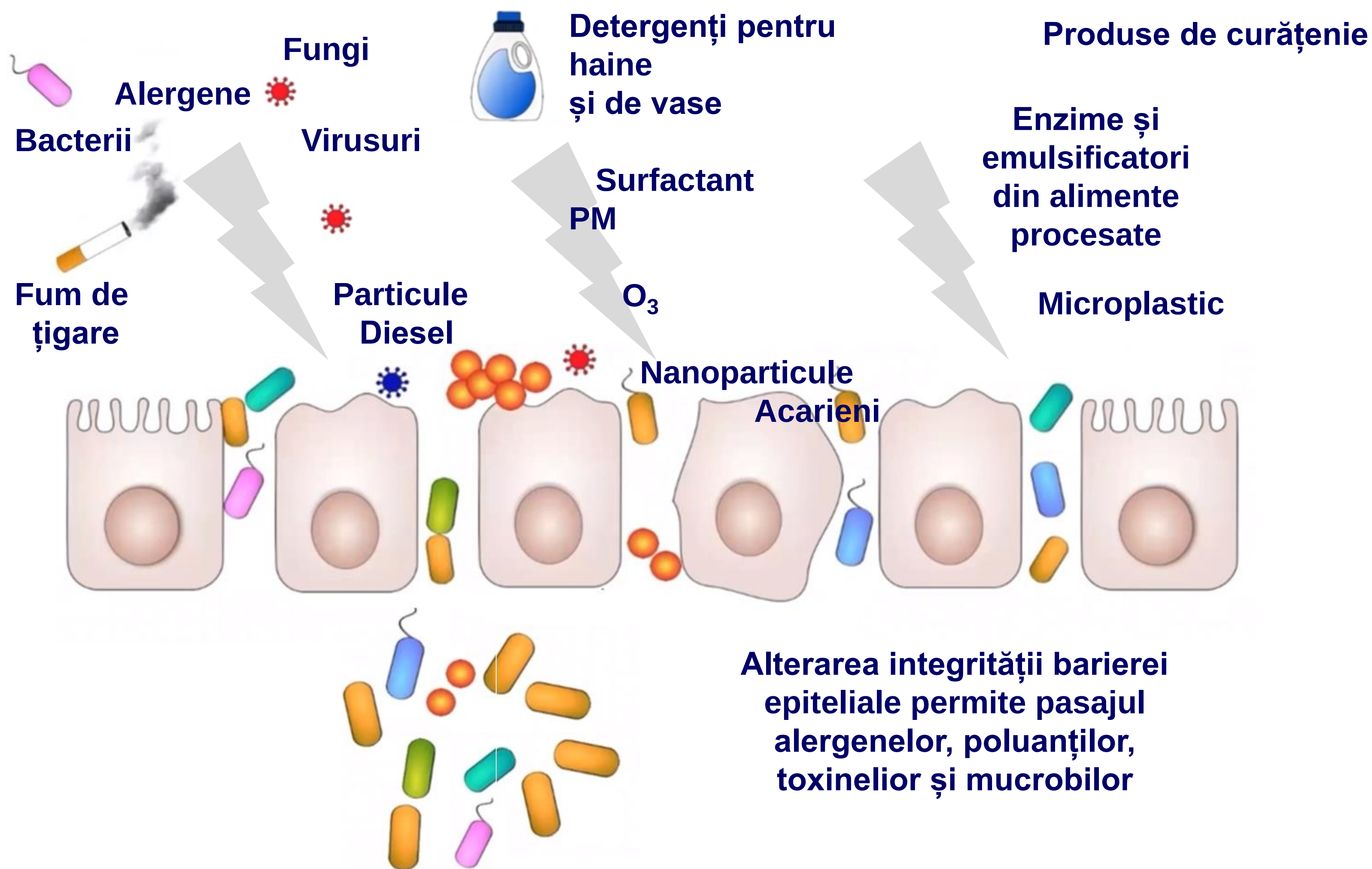
Mecanismele de producere a alergiilor

FACTORI EPIGENETICI



Impactul poluării în patogeneza bolilor alergice și autoimune

ALTERAREA BARIEREI EPITELIALE



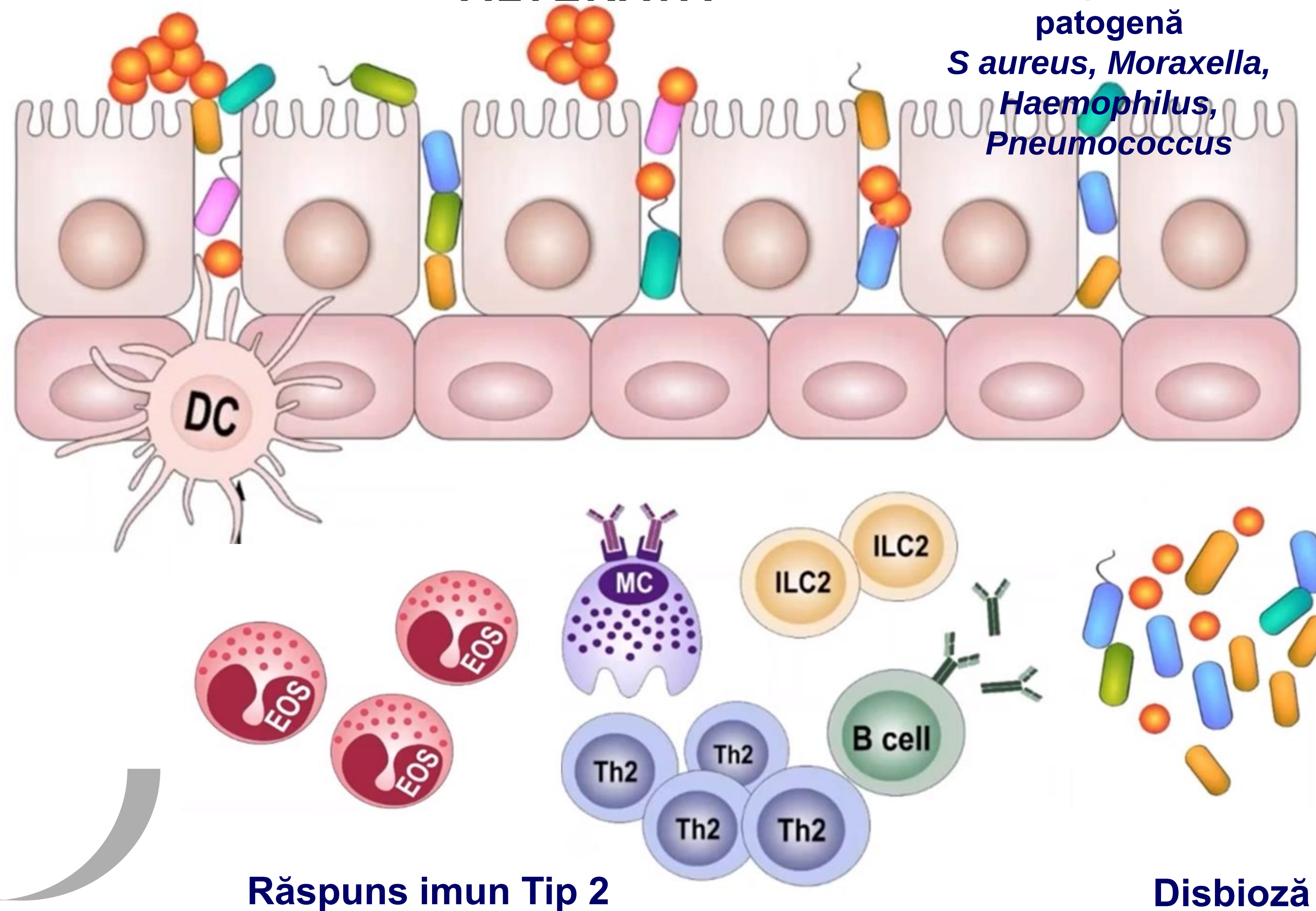
Impactul poluării în patogeneza bolilor alergice și autoimune

TRANSLOCAREA MICROBIOTEI & FLOREI OPORTUNISTE PRIN BARIERA EPITELIALĂ ALTERATĂ

Marșul atopic
Boli autoimune
Boala Parkinson
Boala Alzheimer
Autism, Depresie

Migrarea celulelor
proinflamatorii
spre organe țintă

Microinflamație
circulantă



Impactul poluării în patogeneza bolilor alergice și autoimune

**Boli neuropsihice
legate de alterarea
barierei intestinale și
disbioza microbiană**

↓
**Boala Parkinson
Boala Alzheimer
Autism
Depresie**

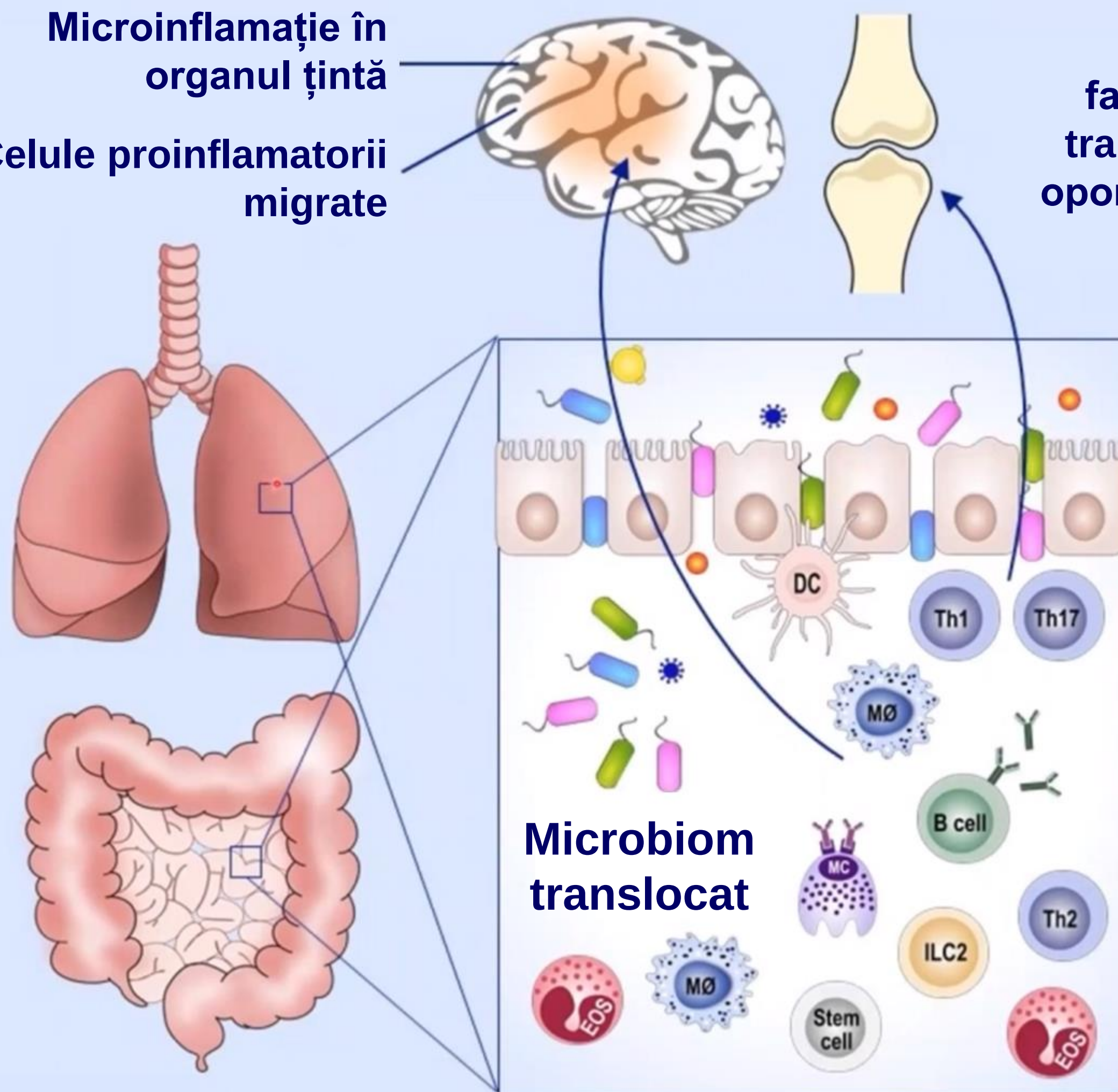
**Microinflamație în
organul țintă**

**celule proinflamatorii
migrate**

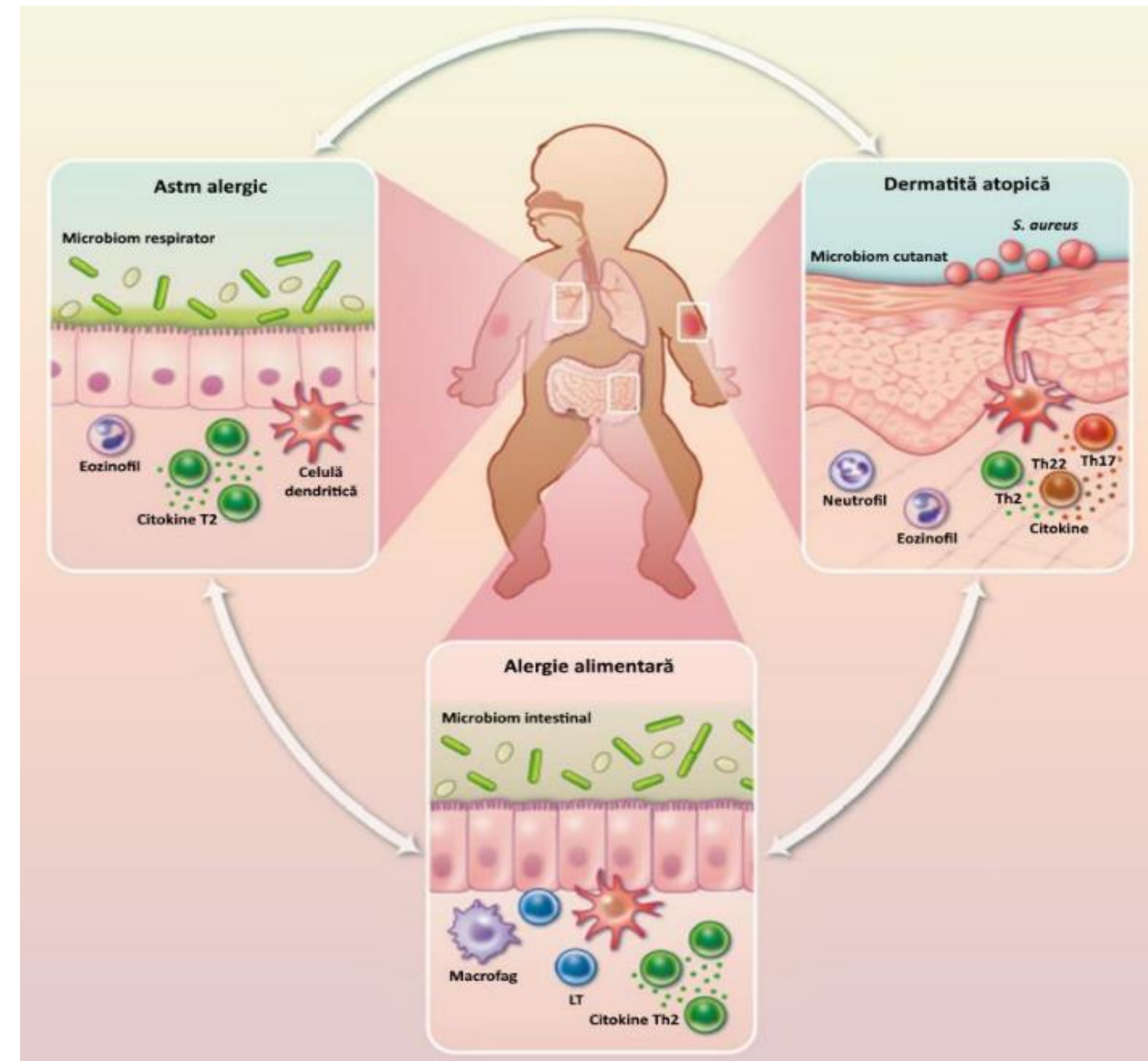
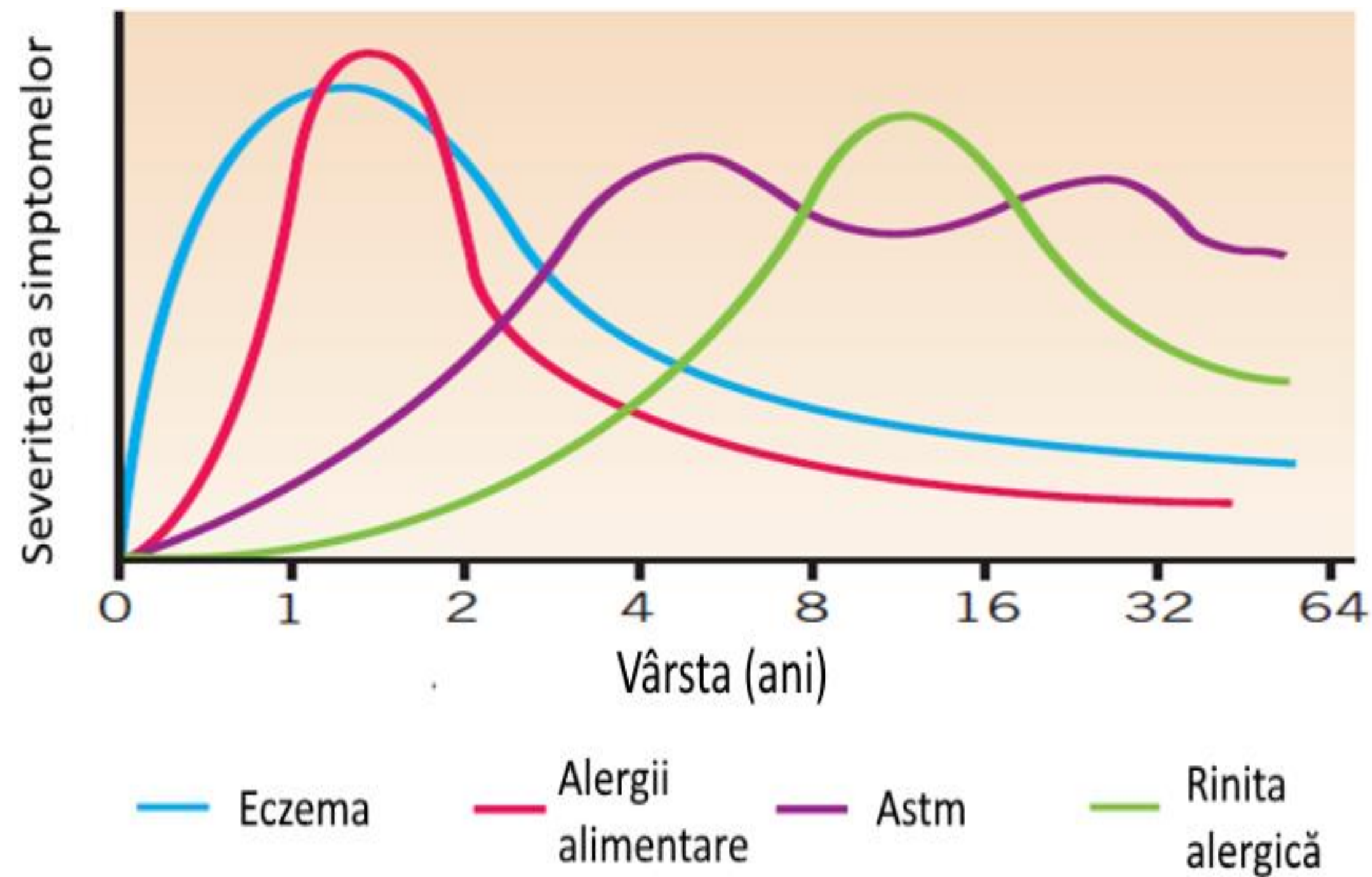
**Răspuns imun
față de microbiomul
translocat & patogenii
oportuniști și de celulele
imune activate**

**Boli autoimune legate
de alterarea barierei
intestinale și disbioza
microbiană**

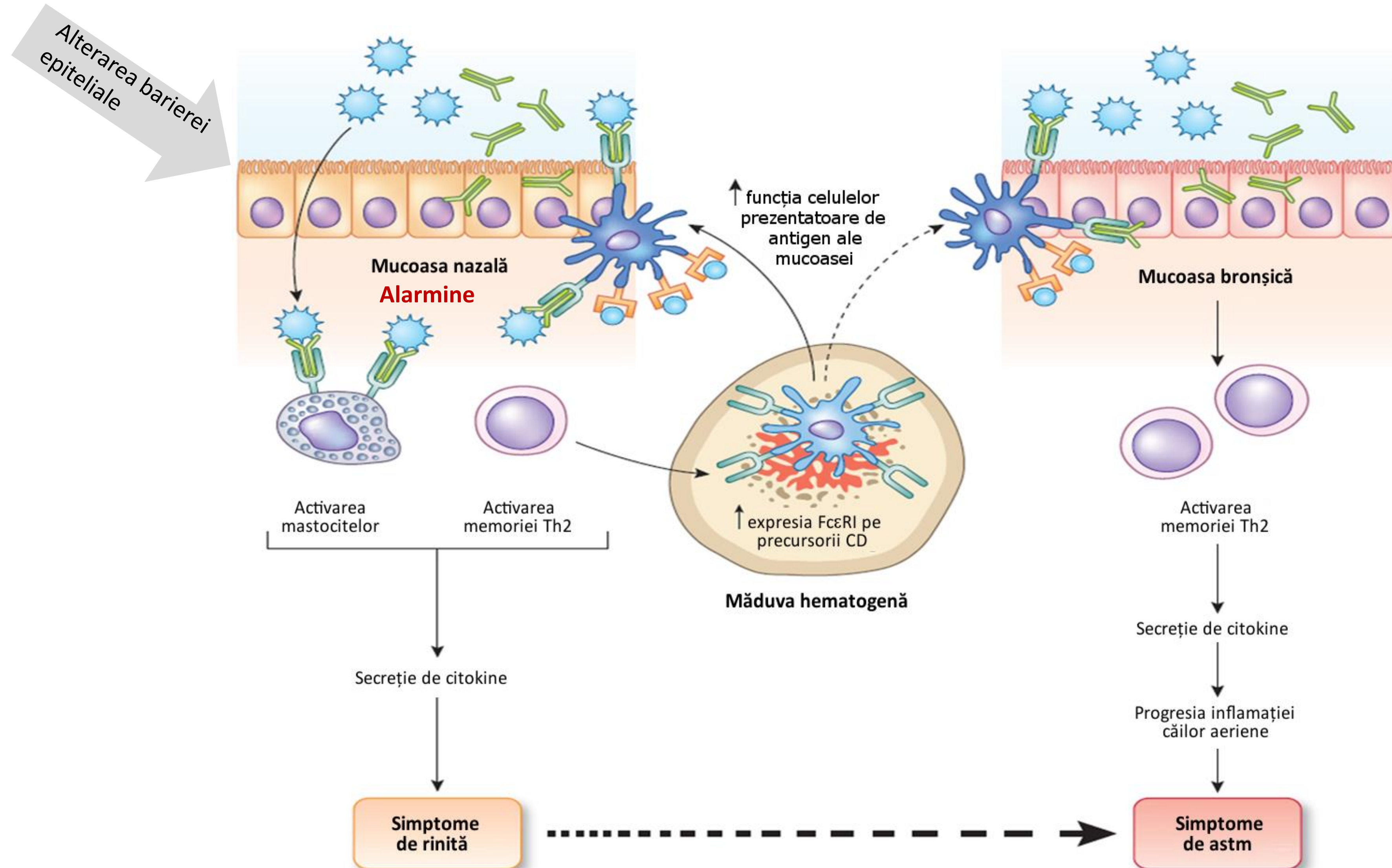
↓
**Artrita reumatoidă
Scleroza multiplă
Spondilita anchilozantă
LES
Hepatita & ciroza
Diabet**



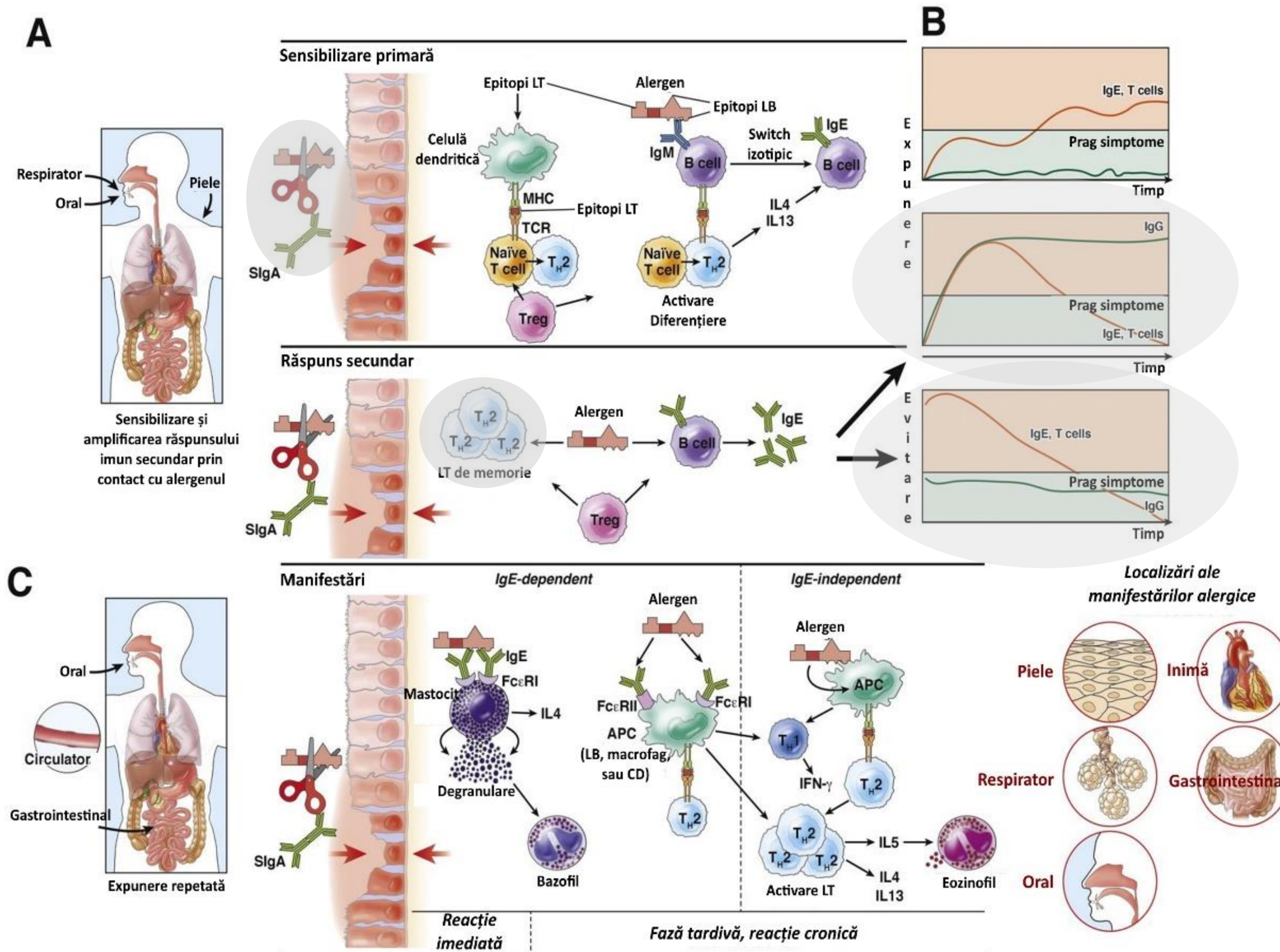
Marșul atopic



Progresia de la rinită la astm: IgE key player



Progresia spre alergii alimentare: IgE key player



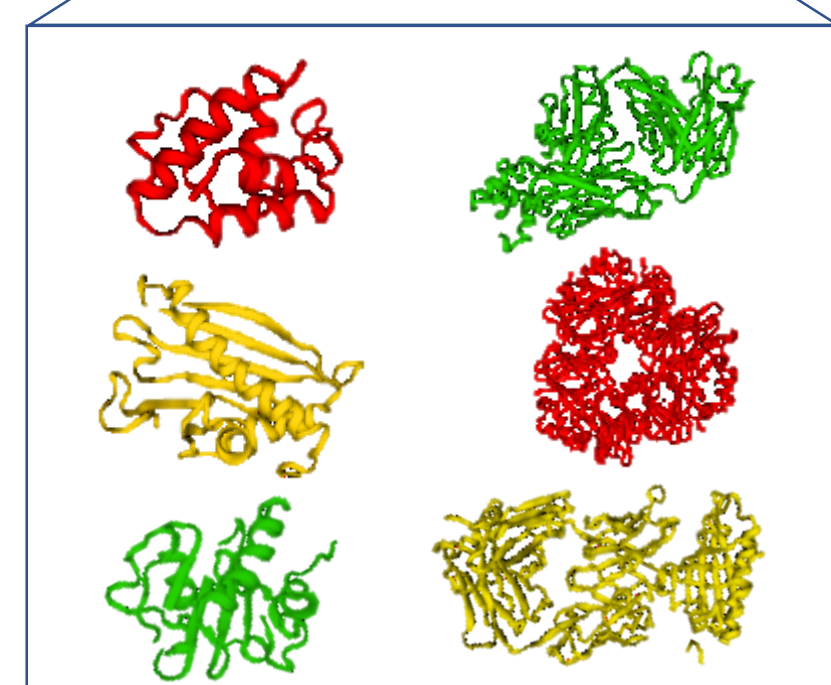
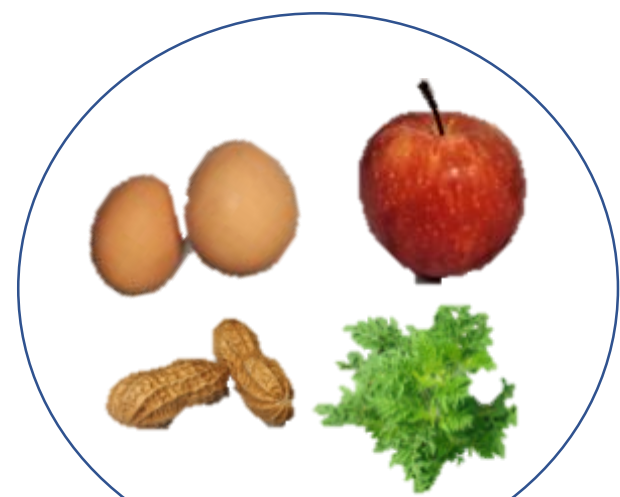


Alergologia

de precizie

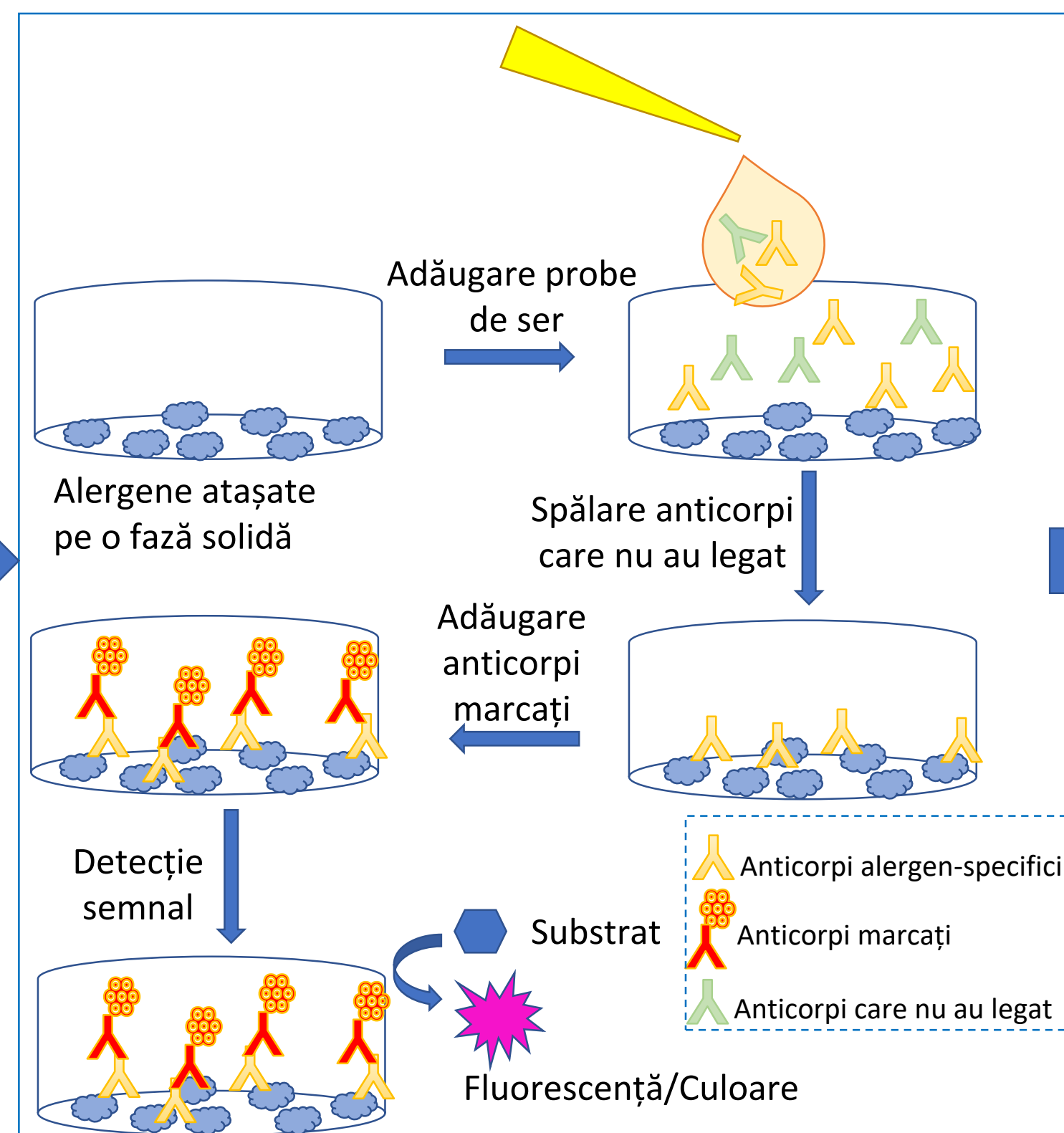
Diagnosticul molecular al alergiilor

Surse de alergene

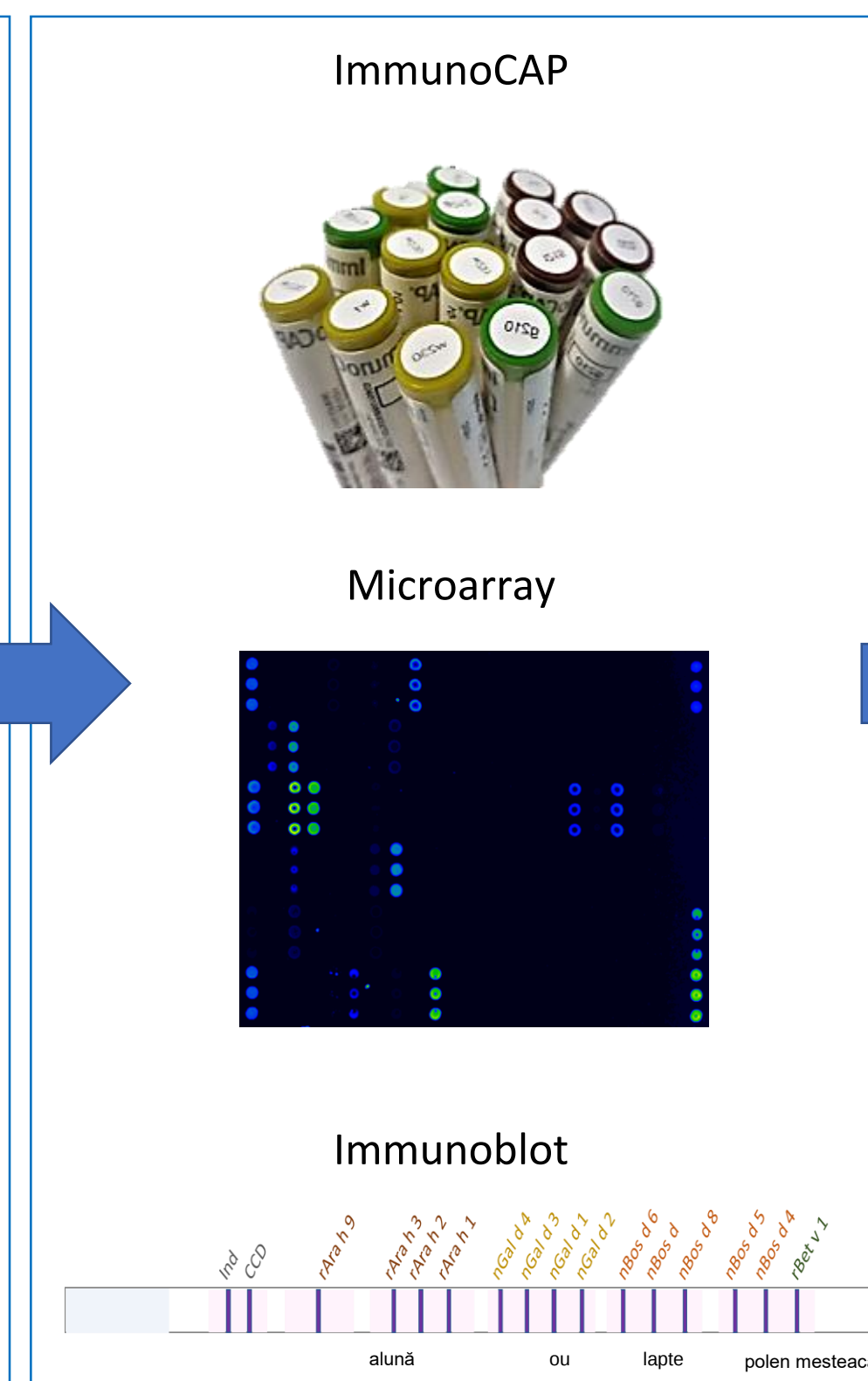


Alergene purificate
naturale și
recombinante

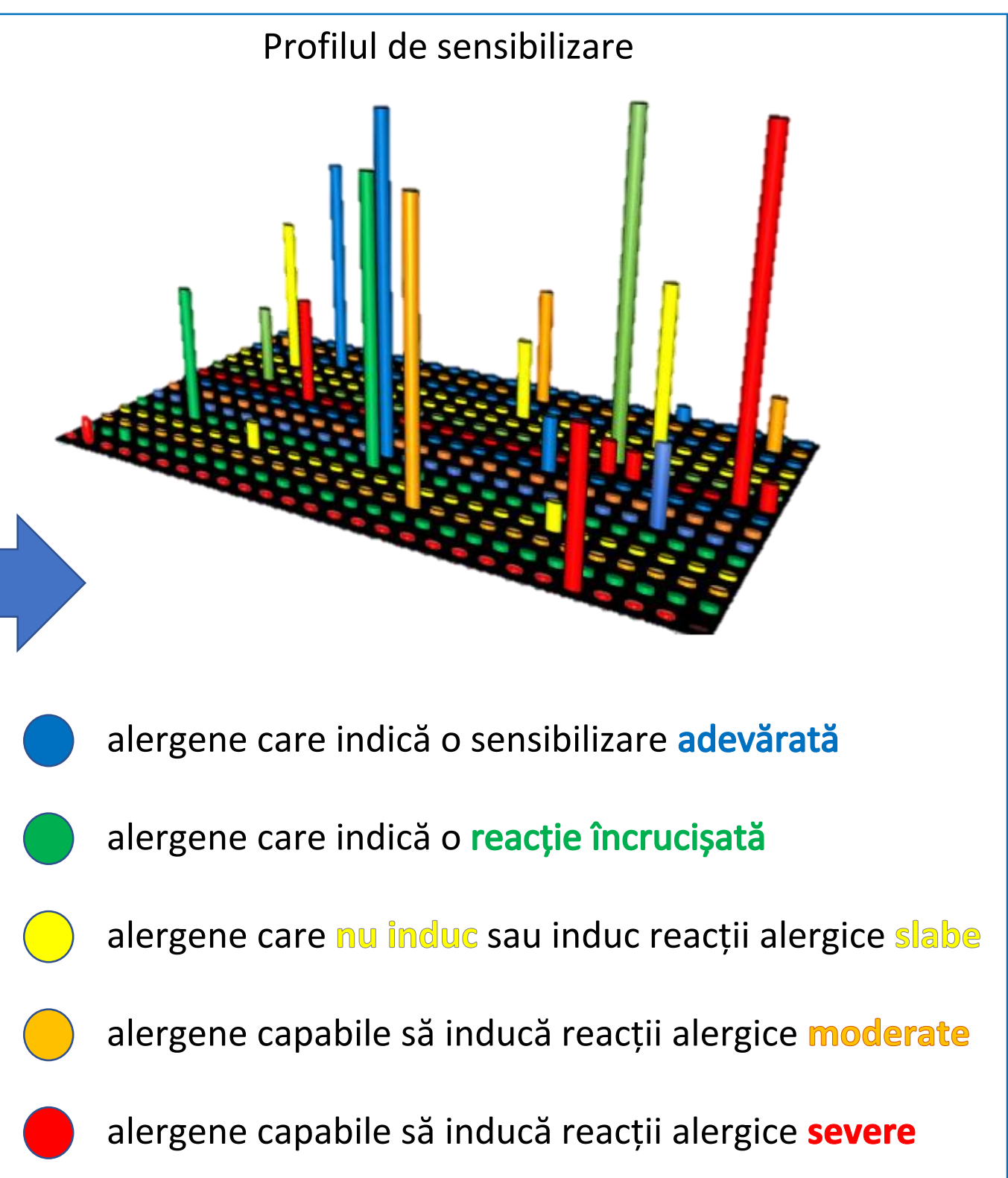
Principiile diagnosticului molecular (CRD)



Platforme de diagnostic molecular

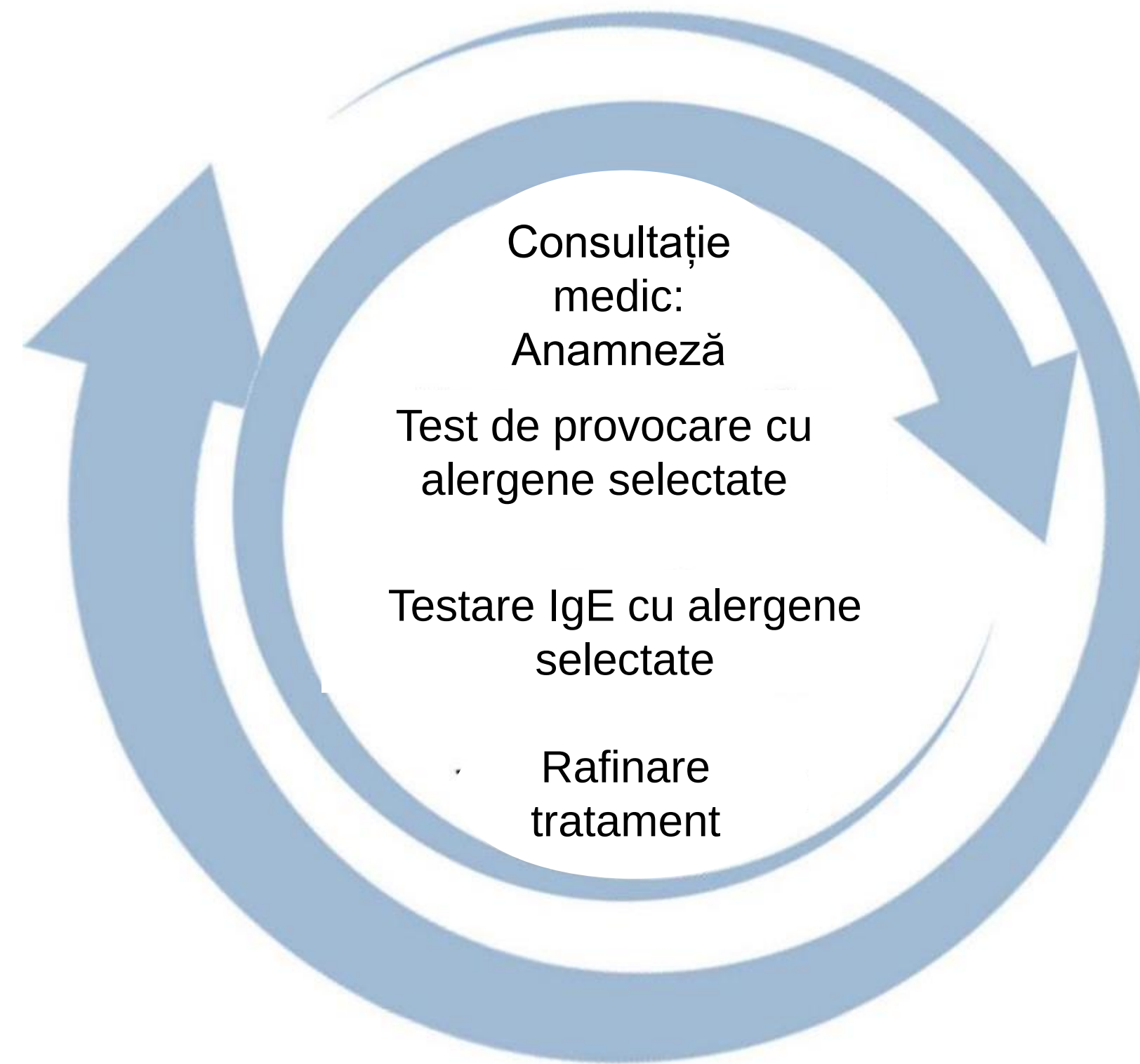


Rezultate diagnostic molecular



Diagnosticul tradițional vs. Diagnostic bazat pe microarray

Diagnostic tradițional



CICLURI MULTIPLE PÂNĂ
LA UN DIAGNOSTIC FINAL

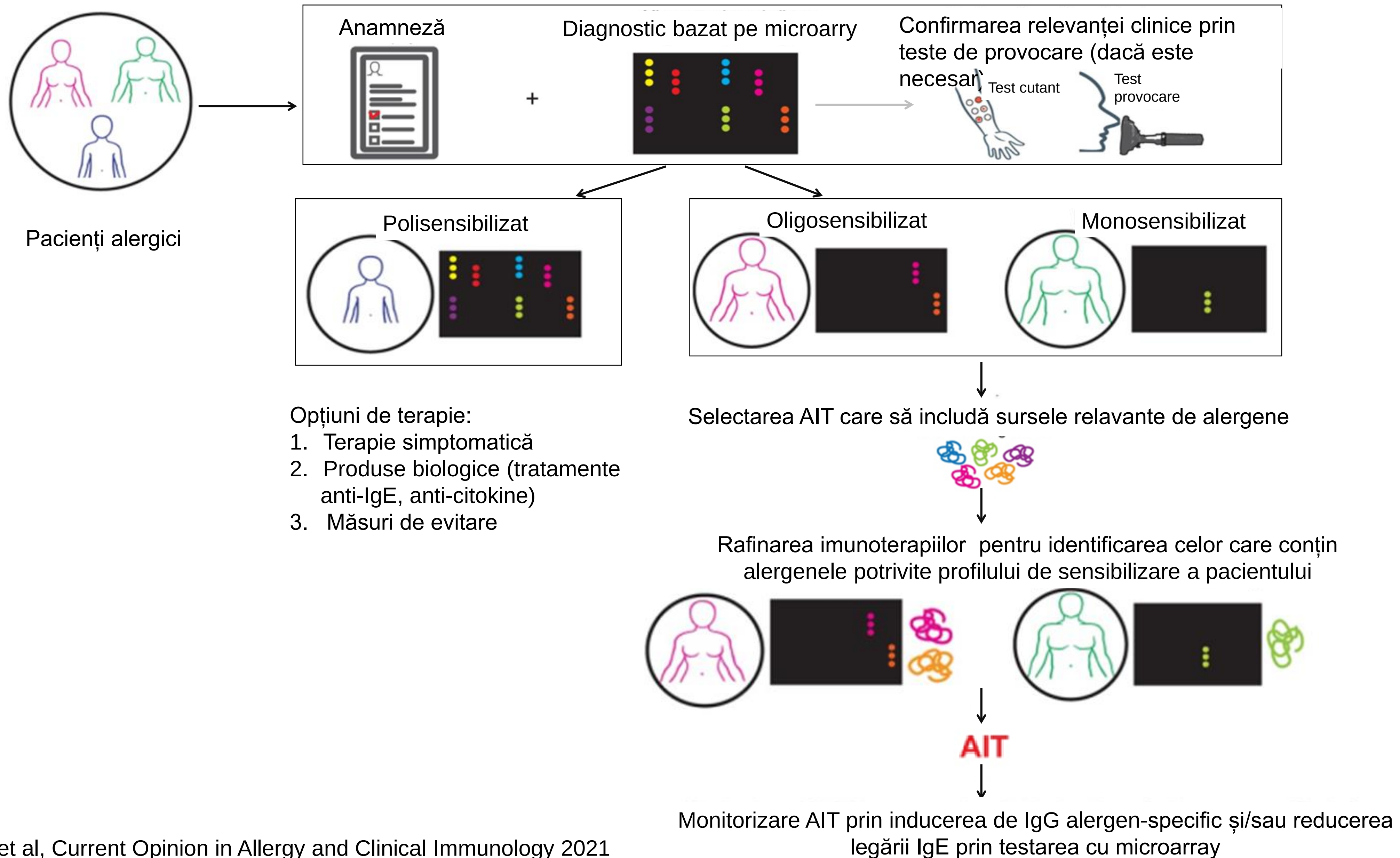
Diagnostic bazat pe microarray

Consultație medic
sau la distanță:
Anamneză + Profilul complet al
reactivității IgE
bazat pe
microarray

DIAGNOSTIC FINAL


Tratament

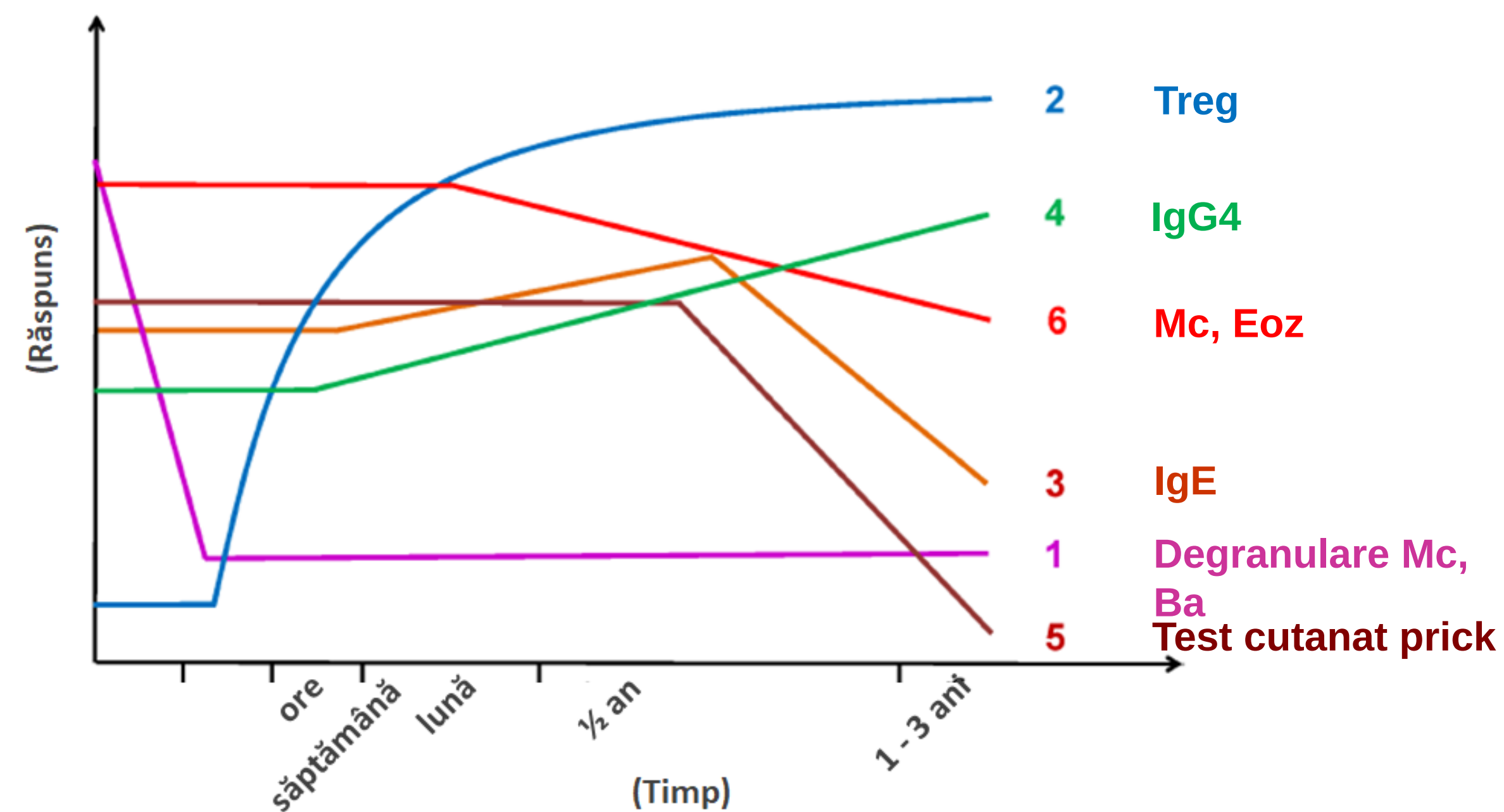
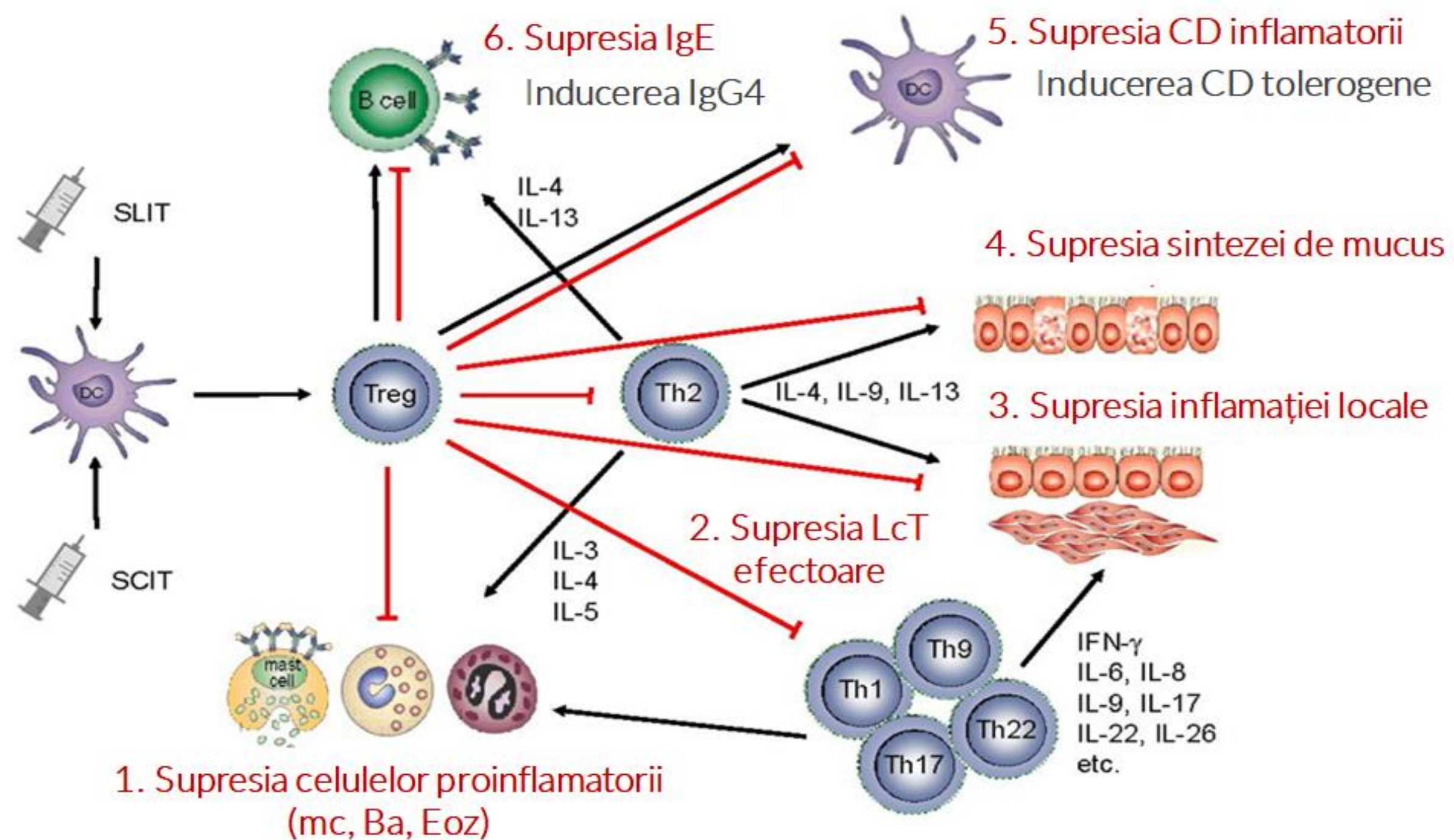
Etapele medicinei de precizie în bolile alergice



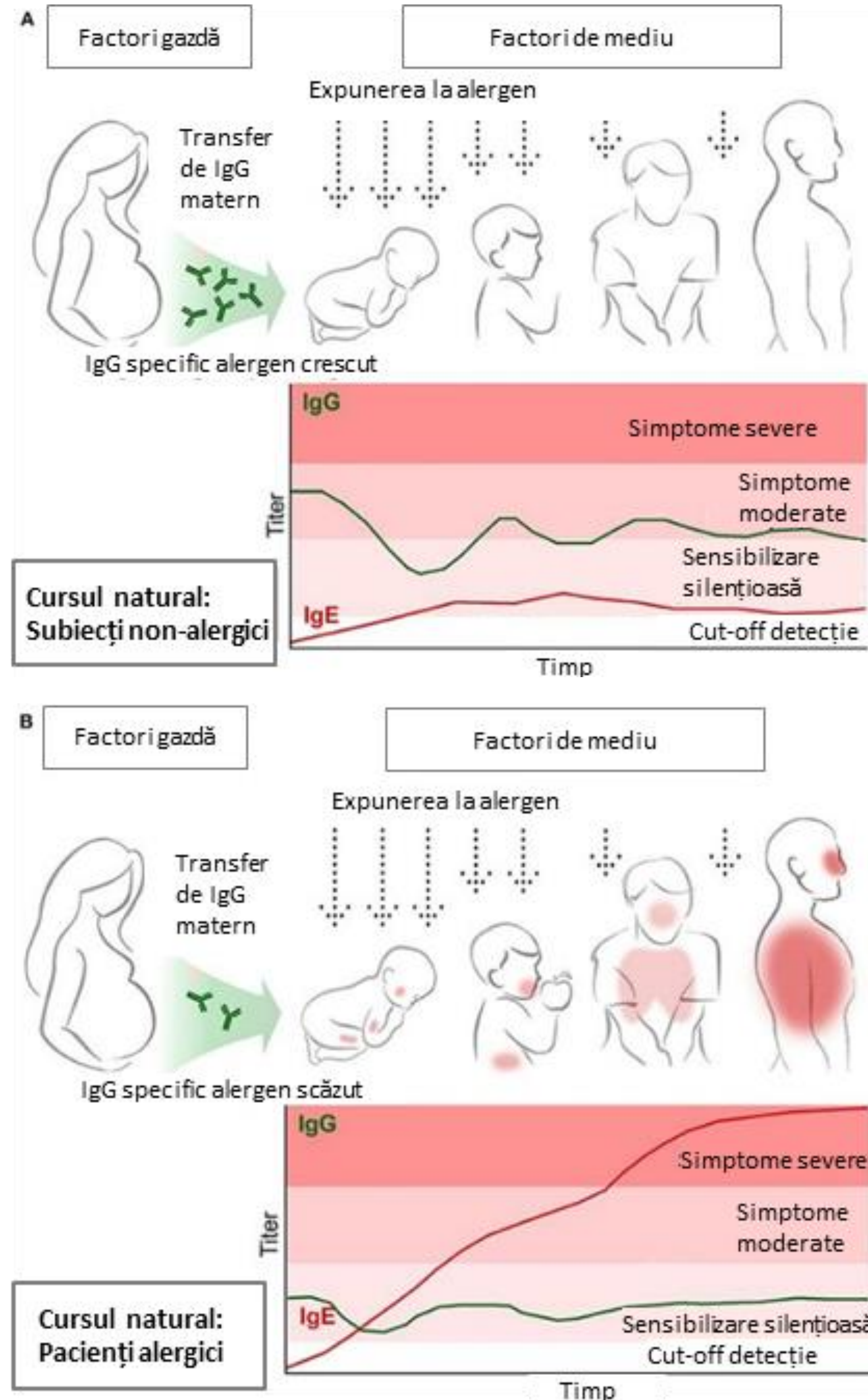
Perspective în profilaxia alergiilor

Mecanismul de acțiune al AIT

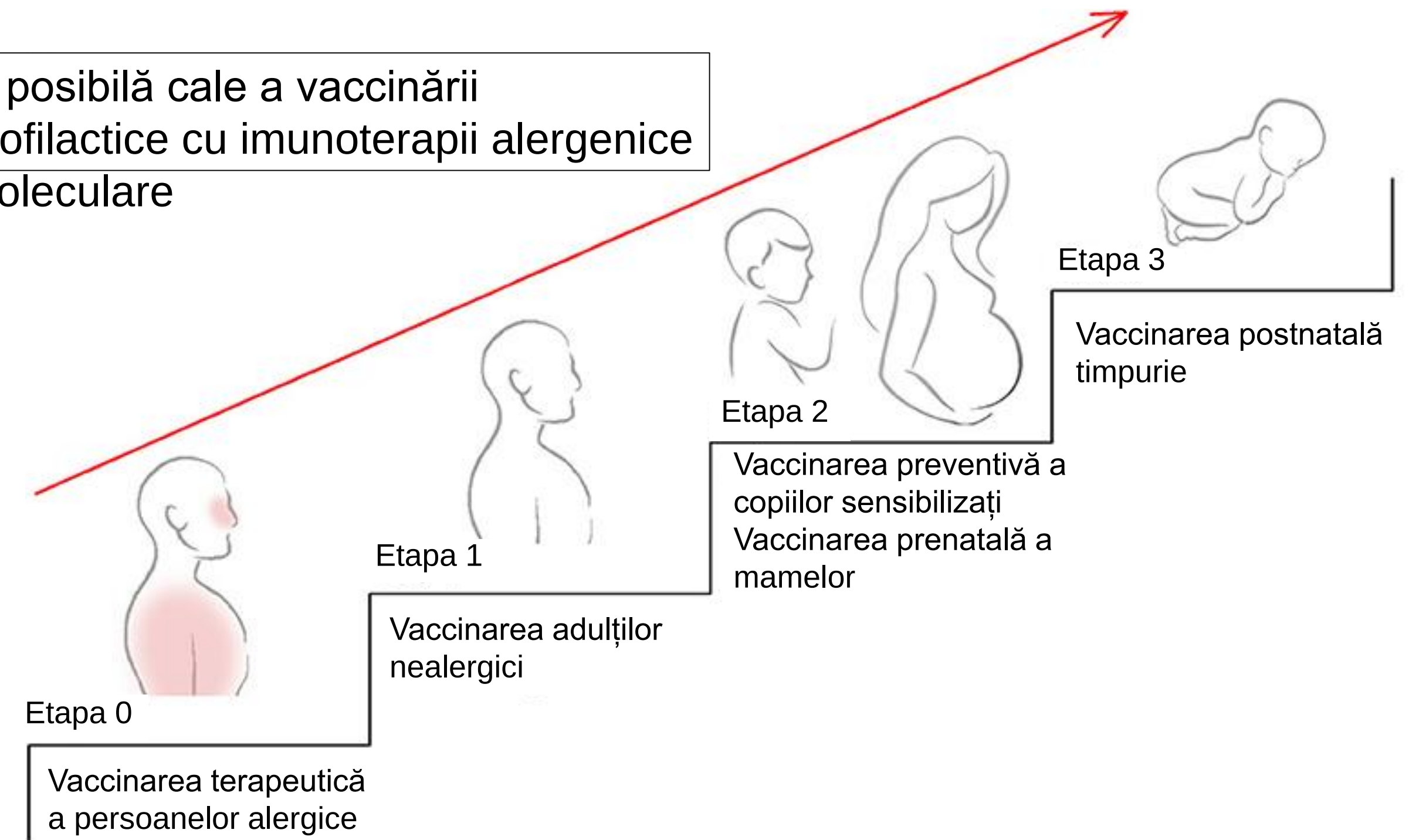
Singura terapie care modifică evoluția bolii alergice



Perspective în profilaxia alergiilor

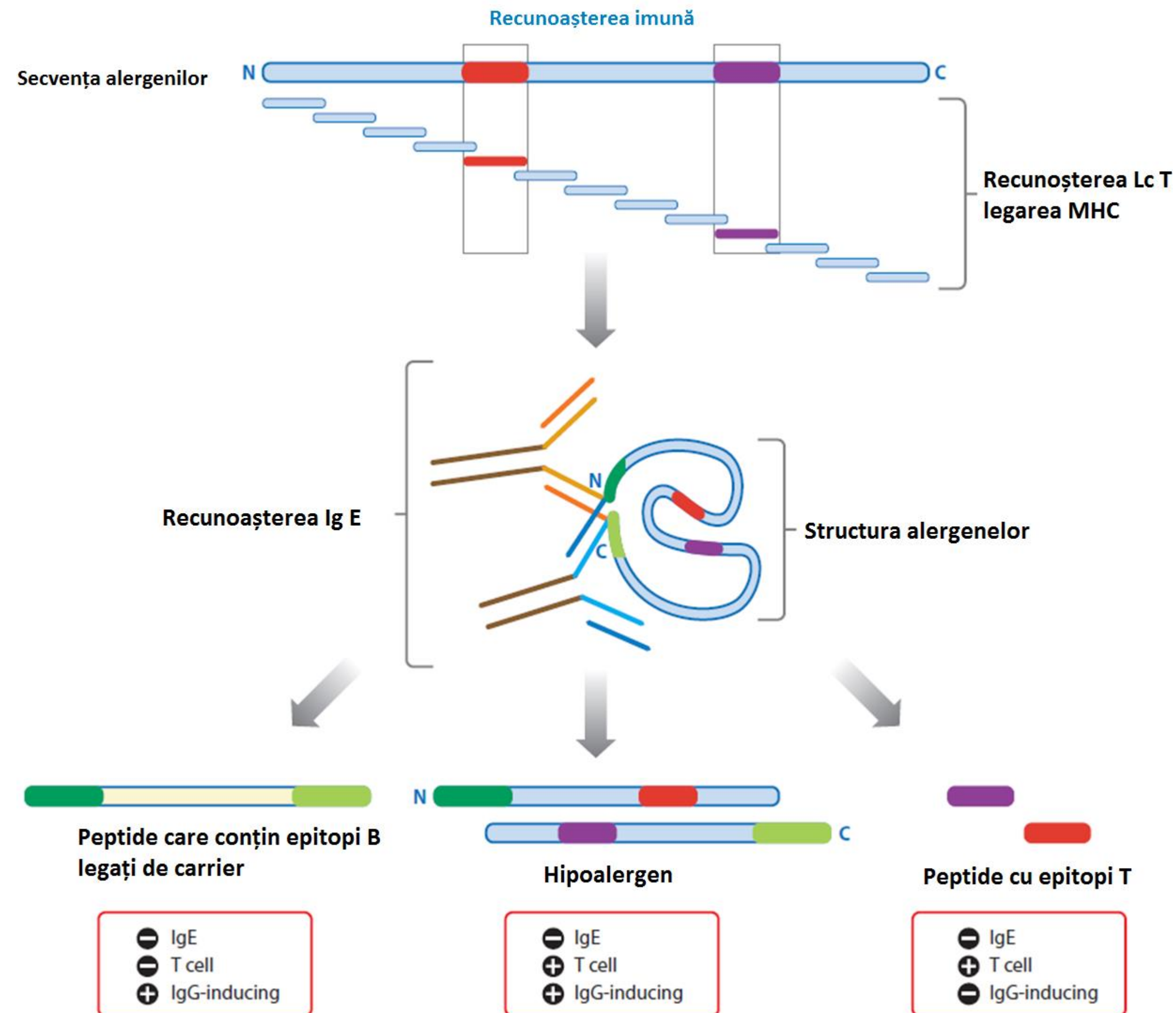


O posibilă cale a vaccinării
profilactice cu imunoterapii alergice
moleculare



Perspective în profilaxia alergiilor

Design-ul de vaccinuri pentru AIT





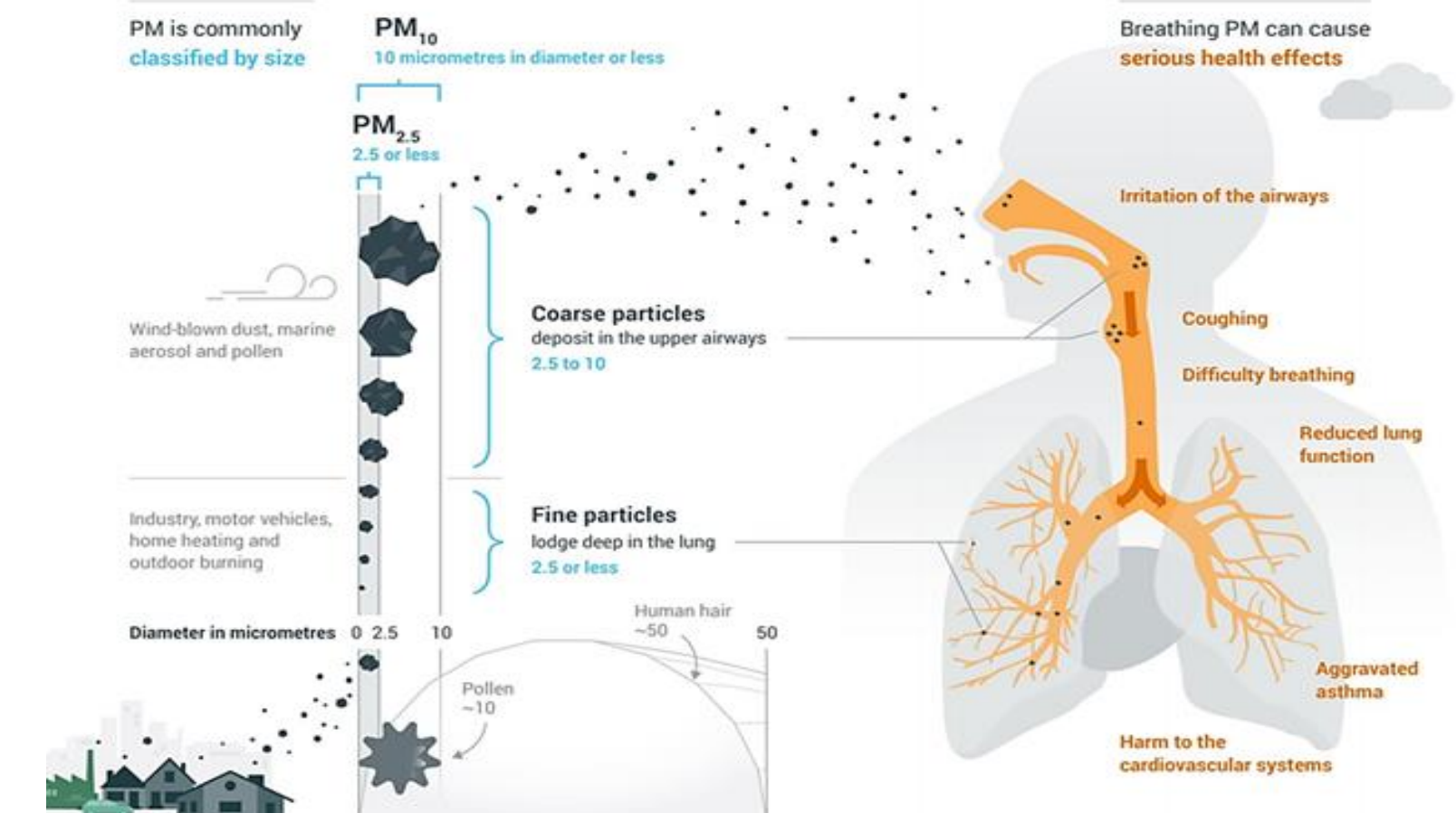
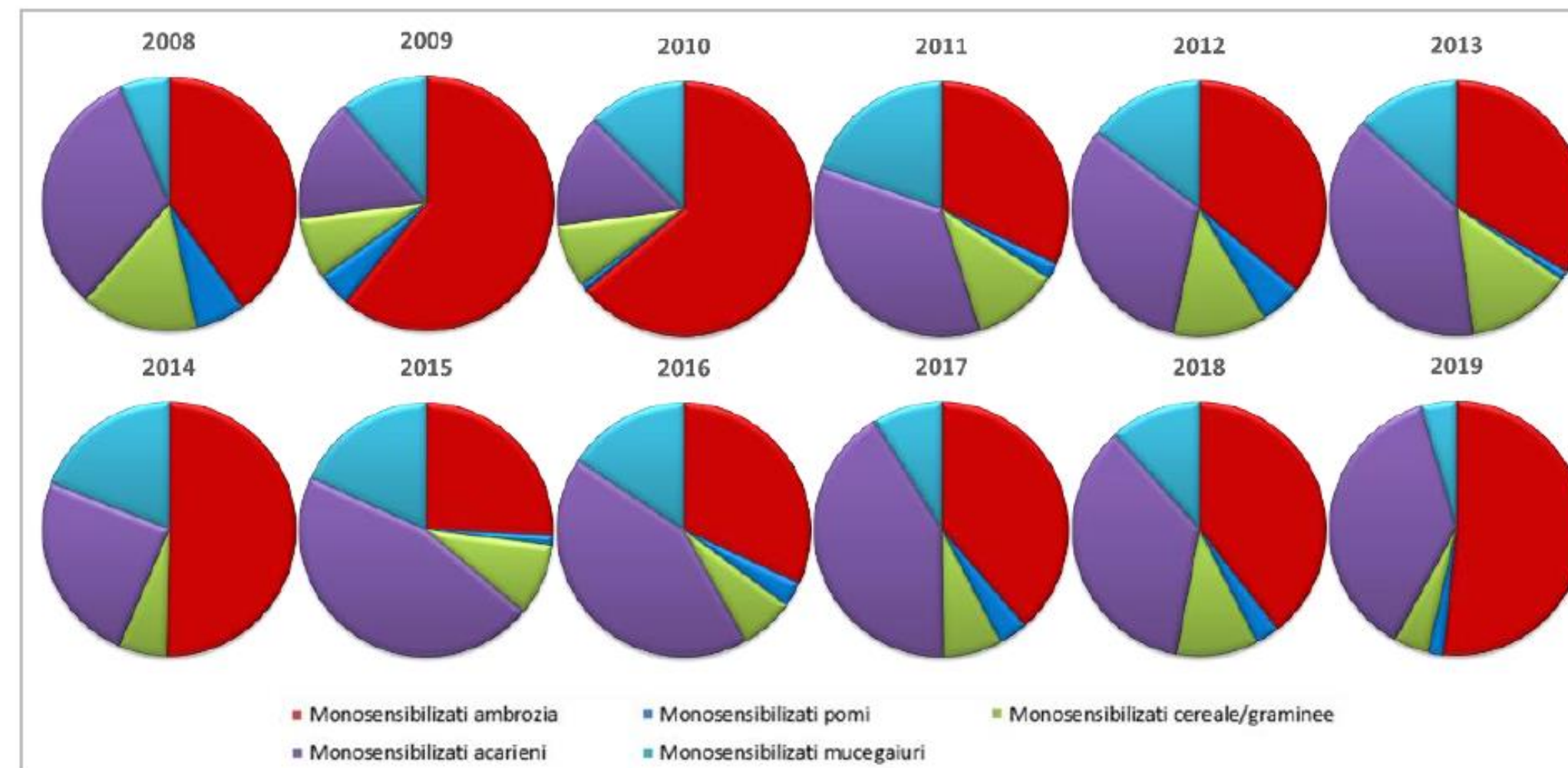
INSPIRED

Către imunoterapii
țintite

INSPIRED

Proiectul INSPIRED

Prevalența sensibilizării la ambrozia în zona de Vest a României.



➤ Exp Ther Med. 2021 May;21(5):525. doi: 10.3892/etm.2021.9957. Epub 2021 Mar 22.

Symptom patterns and comparison of diagnostic methods in ragweed pollen allergy

Laura Haidar^{1 2 3}, Tudor-Paul Tamas^{1 2}, Frank Stolz⁴, Raul Florian Petrisor Patrascu¹,
Kuan-Wei Chen², Carmen Panaitescu^{1 2 3}

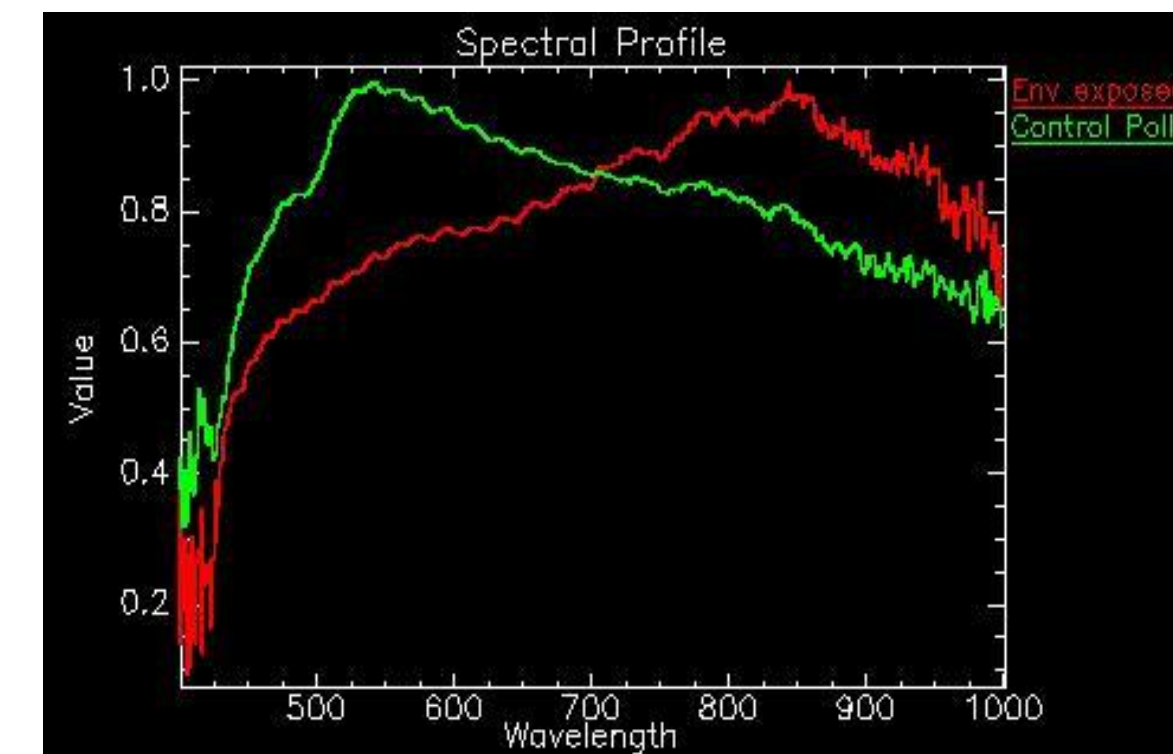
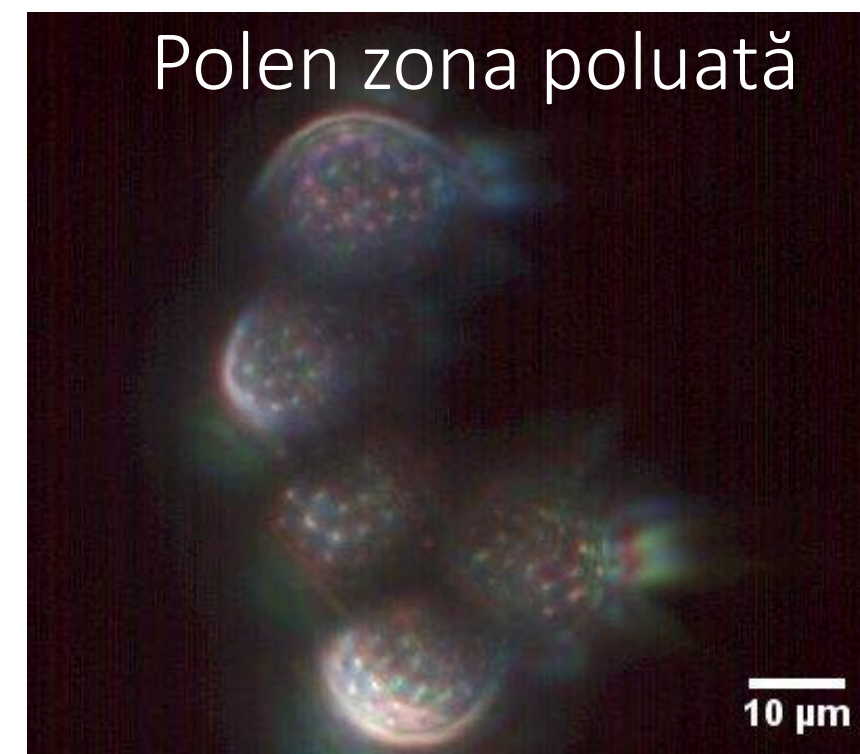
INSPIRED

Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

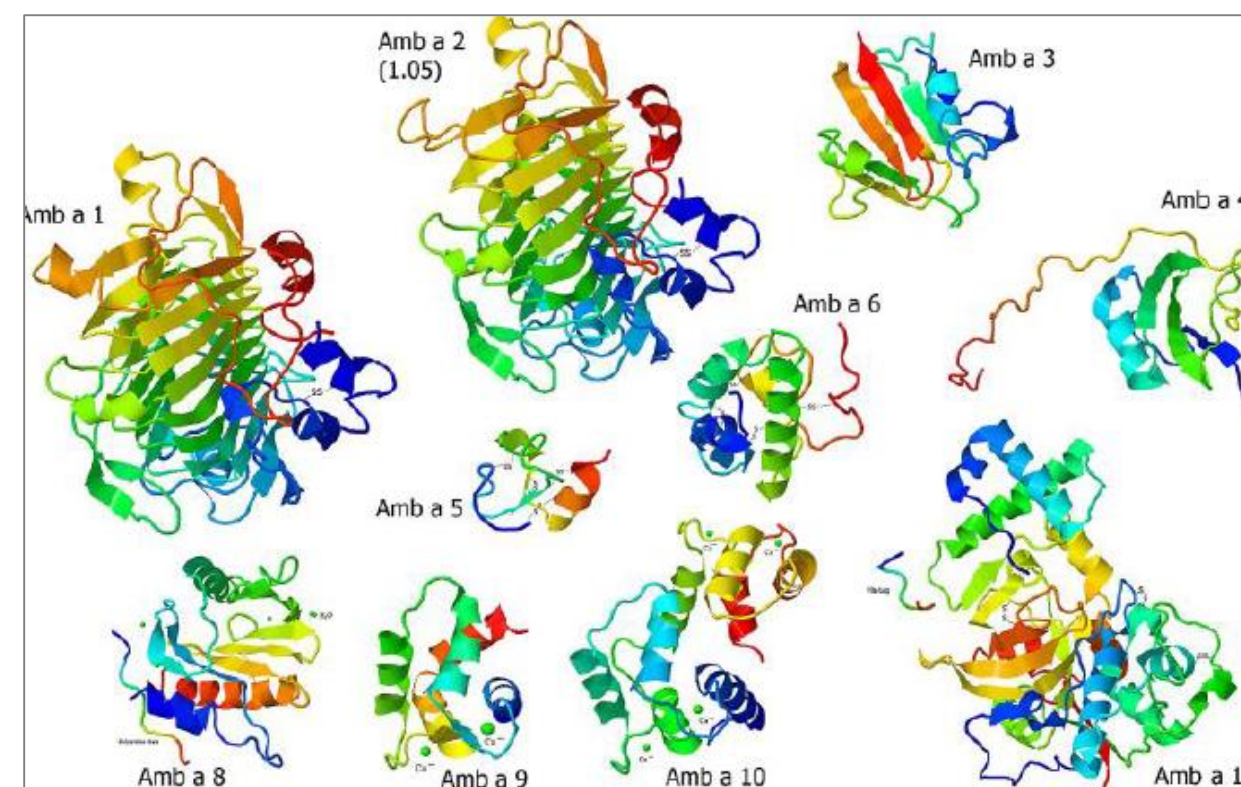
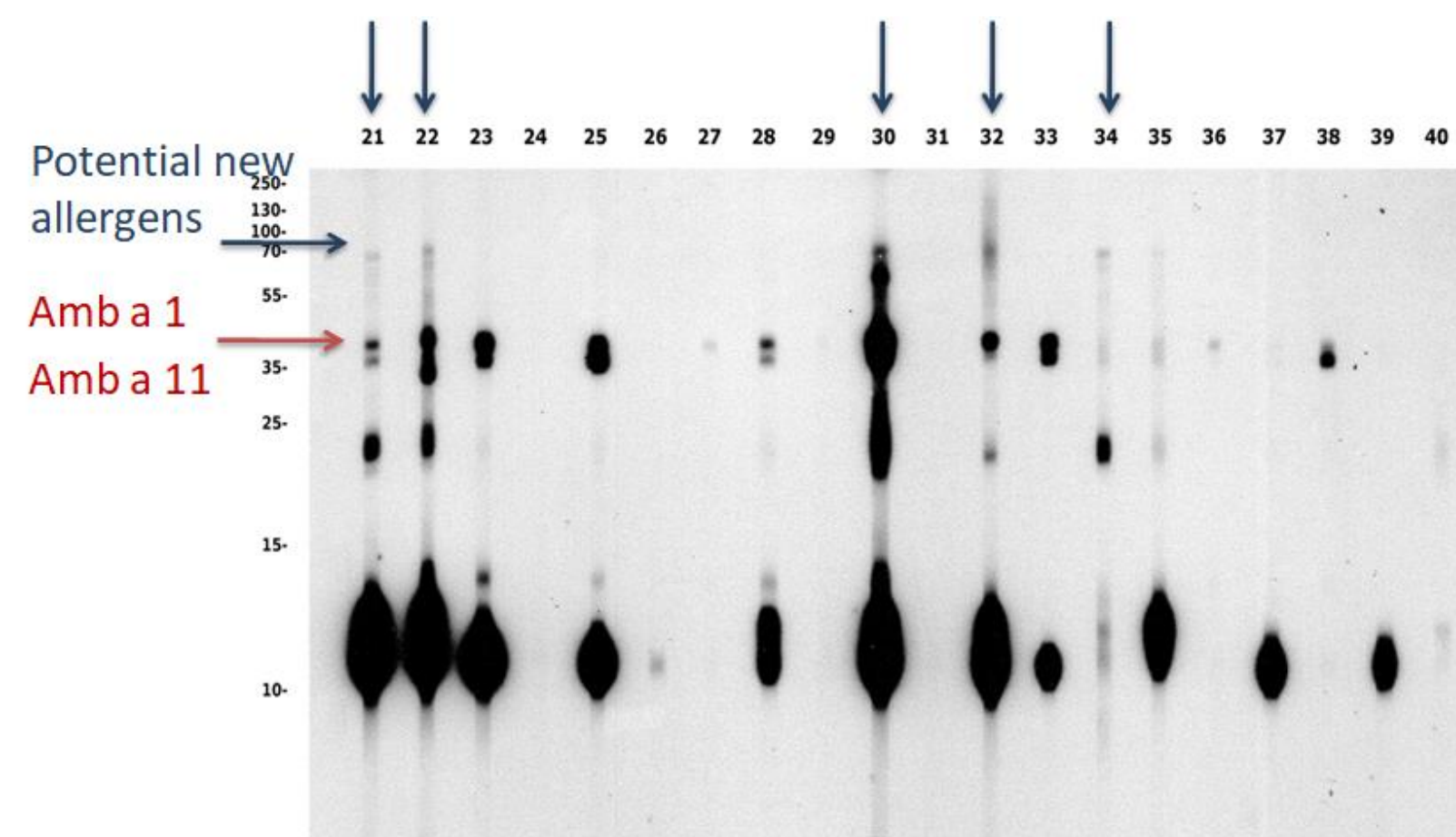
Caracterizarea structurilor alergenice din polenul de ambrozia

- Identificarea alergenelor relevante prin abordare proteomică
- Identificarea alergenelor importante prin tehnici de clonare moleculară



Observații de microscopie hiperspectrală

Profil spectral comparativ



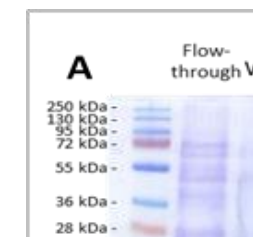
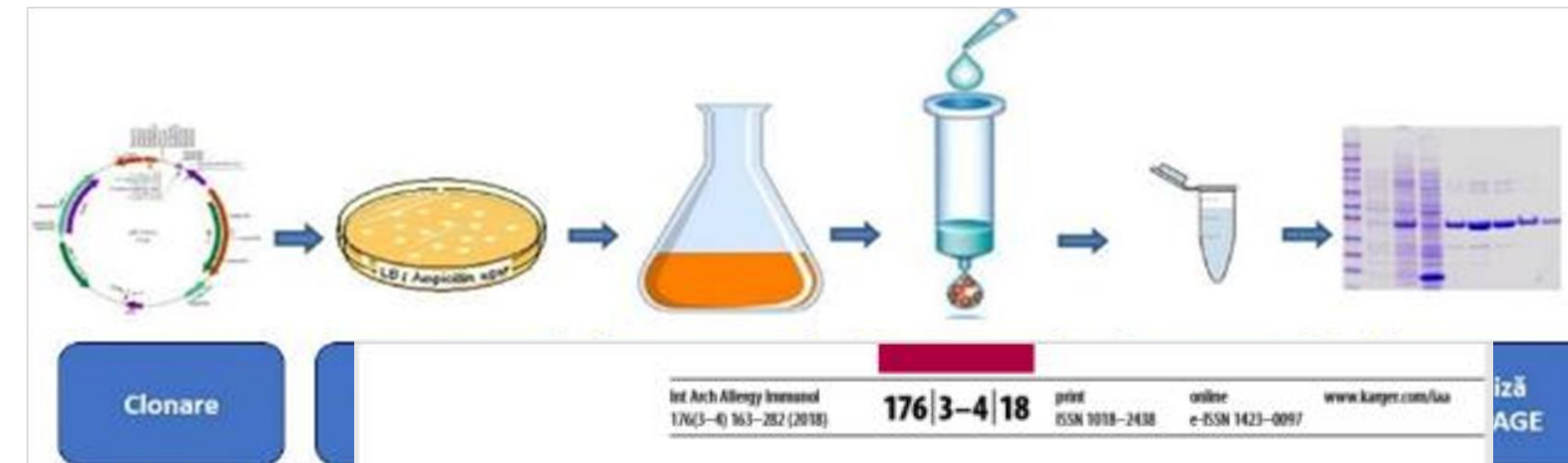
Structura alergenelor de Ambrosia
(SWISS-MODEL)

ALERGEN	REACTIVITATE IgE	GR. MOLEC. (kDa)
Amb a 1	> 90%	38
Amb a 2	70%	38
Amb a 3	30-50%	11
Amb a 4	20-40%	18
Amb a 5	10-20%	5
Amb a 6	20-35%	10
Amb a 7	20%	12
Amb a 8	20-35%	14
Amb a 9	10-15%	10
Amb a 10	10-15%	18
Amb a 11	50-66%	37
Amb a 12	40-45%	48

INSPIRED

Proiectul INSPIRED Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

Expresia și caracterizarea alergenelor
din polenul de ambrozia



International Archives of
Allergy and Immunology



Review

International Archives of
Allergy and Immunology

Int Arch Allergy Immunol
DOI: 10.1159/000487997

Receive
Accepted
Published

Ragweed Pollen Allergy: Burden, Characteristics, and Management of an Imported Allergen Source in Europe

Kuan-Wei Chen^{a, b} Laura Marusciac^{a, c} Paul Tudor Tamas^{a, c} Rudolf Valent^{a, b}
Carmen Panaitescu^{a, c}

^aOncoGen Center, Pius Brinzeu County Clinical Emergency Hospital, Timisoara, Romania; ^bDivision of Immunopathology, Department of Pathophysiology and Allergy Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; ^cVictor Babes University of Medicine and Pharmacy, Timisoara, Romania

> Biomolecules. 2023 Jan 16;13(1):182. doi: 10.3390/biom13010182.

Ragweed Major Allergen Amb a 11 Recombinant Production and Clinical Implications

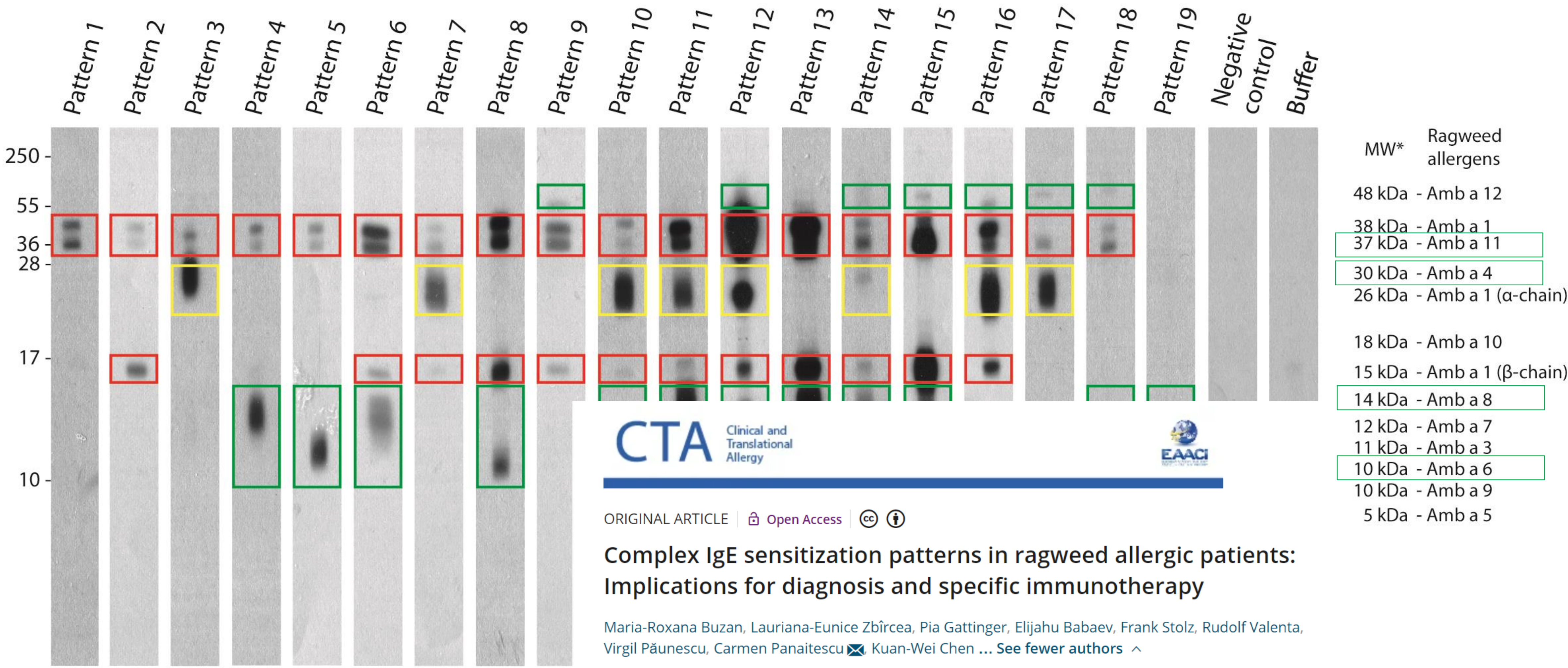
Tudor-Paul Tamaș^{1 2}, Maria-Roxana Buzan^{1 2}, Lauriana-Eunice Zbîrcea^{1 2},
Monica-Daniela Cotarcă^{1 2}, Manuela Grijincu^{1 2}, Virgil Păunescu^{1 2}, Carmen Panaitescu^{1 2},
Kuan-Wei Chen²

S. Karger
Medical and Scientific Publishers
Basel · Freiburg · Paris ·
London · New York · Chennai ·
Hong Kong · Beijing ·
Shanghai · Tokyo · Kuala Lumpur ·
Singapore · Sydney

Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

Profilul de sensibilizare IgE al pacienților alergici la polenul de ambrozia

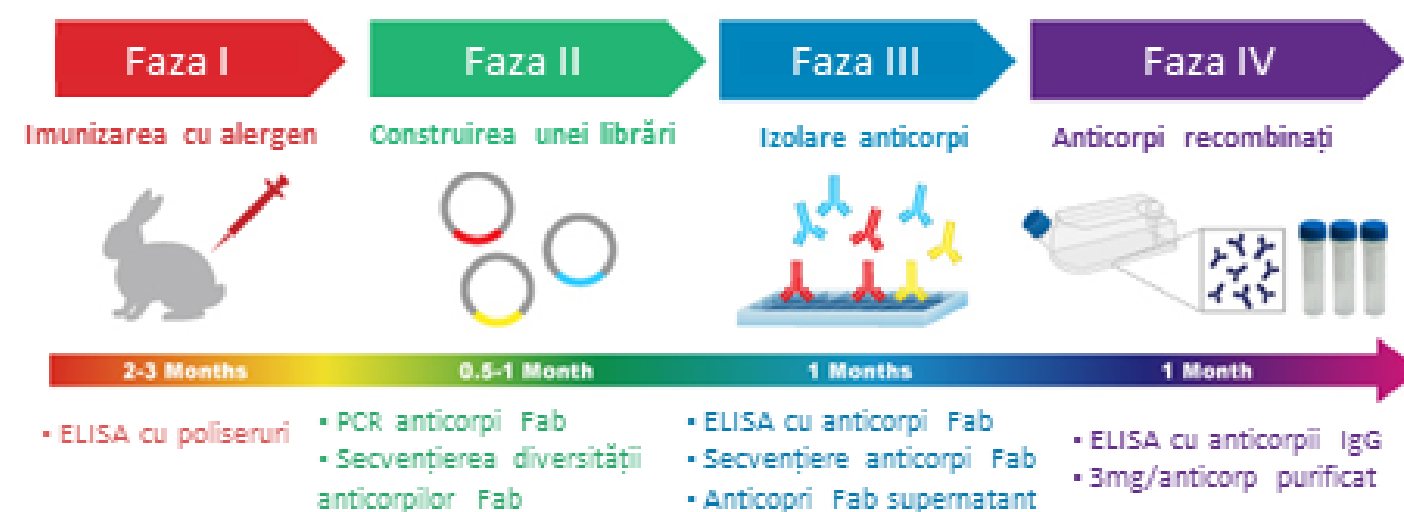


First published: 05 July 2022 | <https://doi.org/10.1002/clt2.12179>

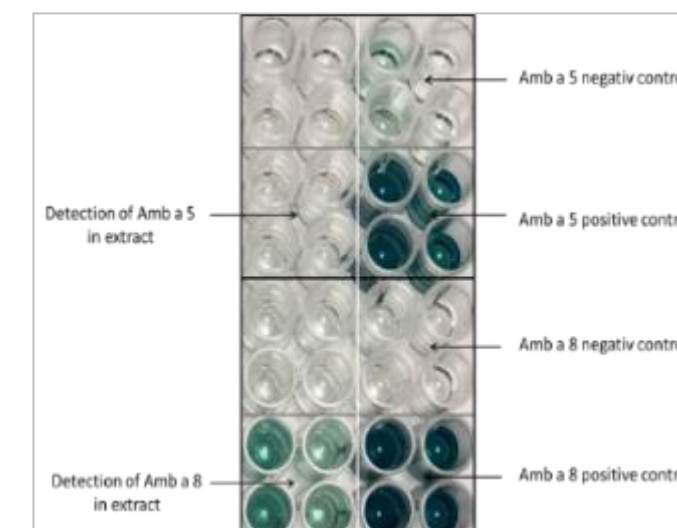
INSPIRED

Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea de teste evaluare a prezenței atmosferice a
alergenelor din polenul de bazate pe alergene recombinante



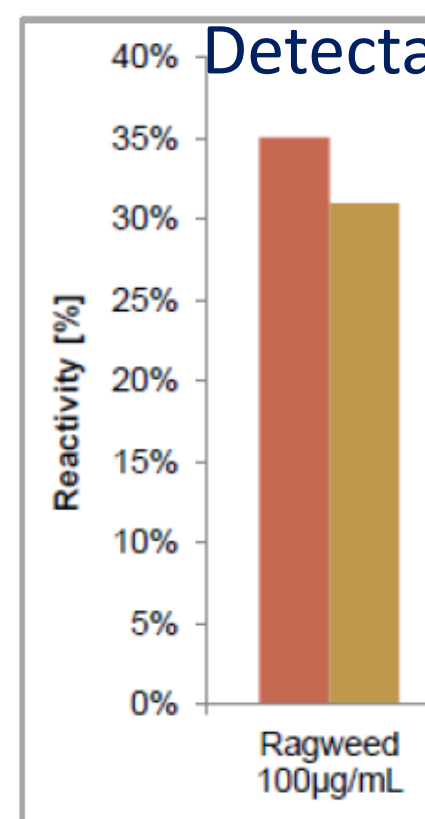
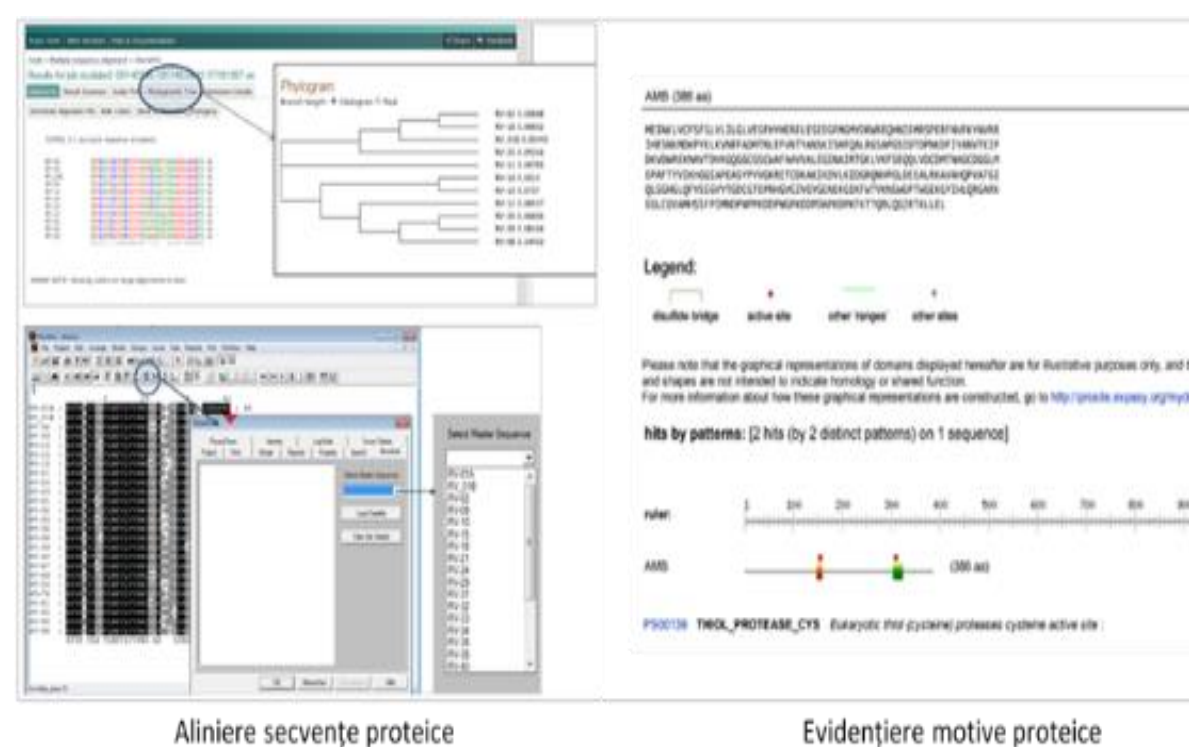
Generarea de Ab IgG alergen-specifici



Test ELISA sandwich

Pat code	Amb a 8 (KUA/L)	Bet v 2 (KUA/L)	Inhib Bet v 2 with Amb a 8 (KUA/L)	% inhib Bet v 2	Phi p 12 (KUA/L)	Inhib Phi p 12 with Amb a 8 (KUA/L)	% inhib Phi p 12
38F	6,76	2,25	0,11	95%	2,48	0,07	97%
58A	1,36	1,68	0,05	97%	1,21	0,04	97%
6TS	0,47	0,38	0,01	97%	0,5	0,01	97%
7TC	4,27	4,69	0,37	92%	3,4	0,18	95%
18SL	0,36	0,81	0,20	75%	0,53	0,09	82%
28NL	5,14	6,01	1,74	71%	4,48	0,74	83%
31MA	0,54	0,49	0,00	100%	0,45	0,01	99%
37MLM	2,22	3,63	0,42	88%	2,77	0,14	95%
39TA	0,5	0,71	0,07	90%	0,4	0,05	87%
41MS	22,6	41,2	11,59	72%	20	3,67	82%
47BD	13,7	6,88	0,29	96%	8,38	0,12	99%
53JA	0,54	0,88	0,14	84%	0,41	0,03	93%
55CC	1,21	1,14	0,05	96%	0,93	0,02	98%
59VM	6,19	6,79	1,24	82%	4,26	0,44	90%
63CG	3,47	2,33	0,32	86%	2,31	0,19	92%
64SS	78,4	33,3	0,48	99%	43,2	0,87	98%
71SI	0,63	0,6	0,12	81%	0,71	0,11	85%
74BA	38,7	37,5	3,15	92%	34,9	1,11	97%
78NB	14,7	14	0,11	99%	15,4	0,09	99%
85HB	12	12,8	1,69	87%	10,1	0,78	92%
106TCM	15,1	11	0,21	98%	9,01	0,22	98%
116DD	3,3	3,73	0,60	84%	2,57	0,34	87%
119SRZ	4,71	4,98	0,18	96%	3,5	0,06	98%
121HS	6,26	6,03	0,08	99%	5,25	0,06	99%
122MD	0,84	0,51	0,00	100%	0,75	0,01	99%
125AMS	0,72	0,63	0,01	99%	0,67	0,02	97%
136KM	3,68	3,32	0,28	92%	3,09	0,10	97%
148DRC	1,46	1,5	0,08	94%	1,19	0,05	96%
152ZPV	1,34	1,22	0,10	92%	1,2	0,09	92%

Teste de inhibiție în ImmunoCAP



Reactivitatea relativă a Ig polen din surse comune

Int J Mol Sci. 2023 Feb 17;24(4):4040. doi: 10.3390/ijms24044040.

Relationship between IgE Levels Specific for Ragweed Pollen Extract, Amb a 1 and Cross-Reactive Allergen Molecules

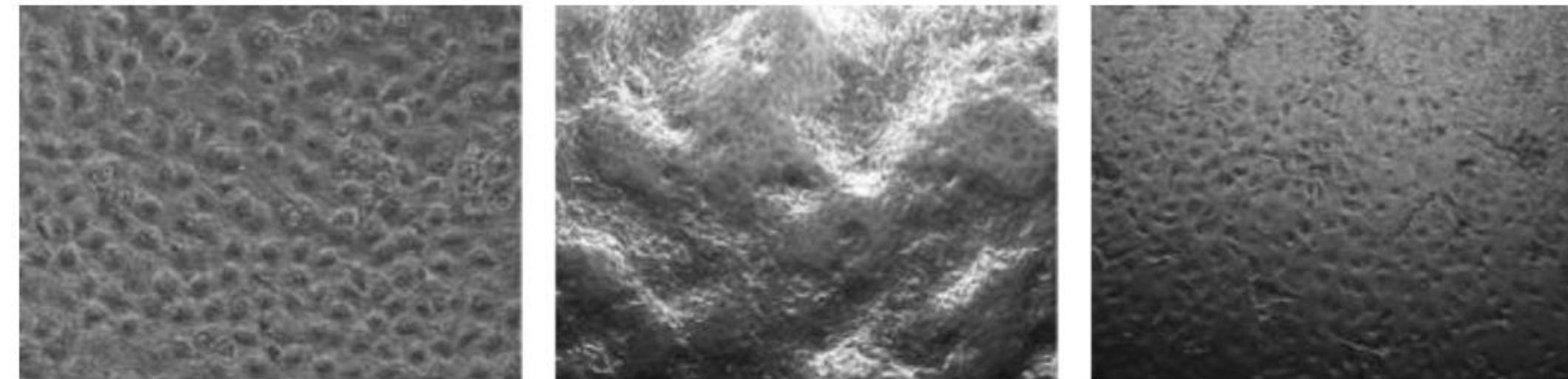
Lauriana-Eunice Zbîrcea^{1 2}, Maria-Roxana Buzan^{1 2}, Manuela Grijincu^{1 2}, Elijahu Babaev³, Frank Stolz³, Rudolf Valenta^{4 5 6 7}, Virgil Păunescu^{1 2}, Carmen Panaitescu^{1 2}, Kuan-Wei Chen²

de ori mai mari comparativ cu alergenele recombinante

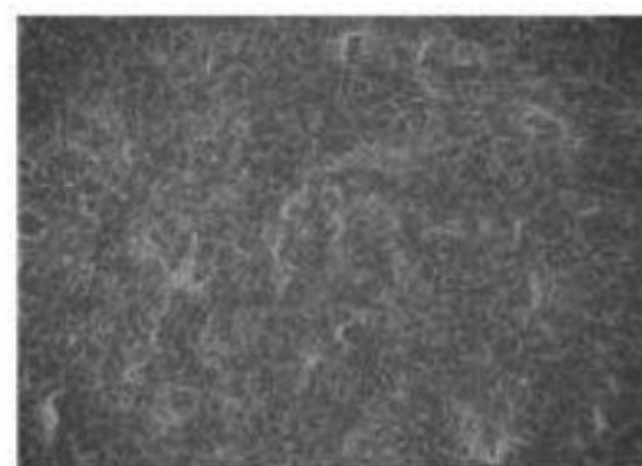
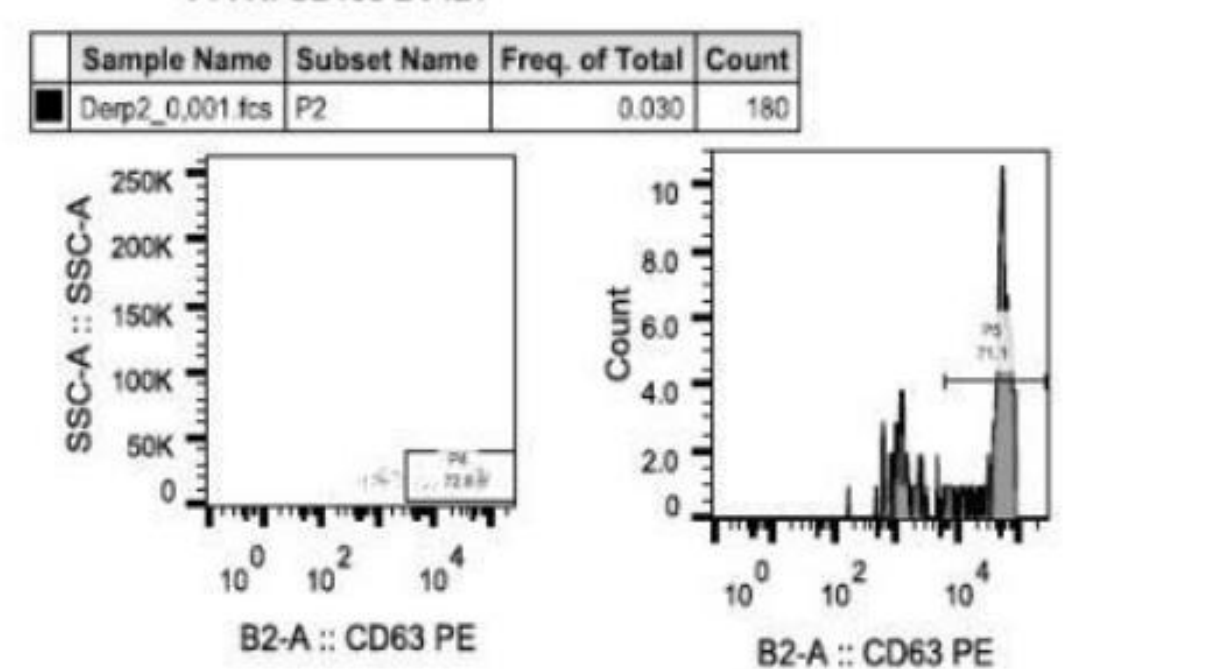
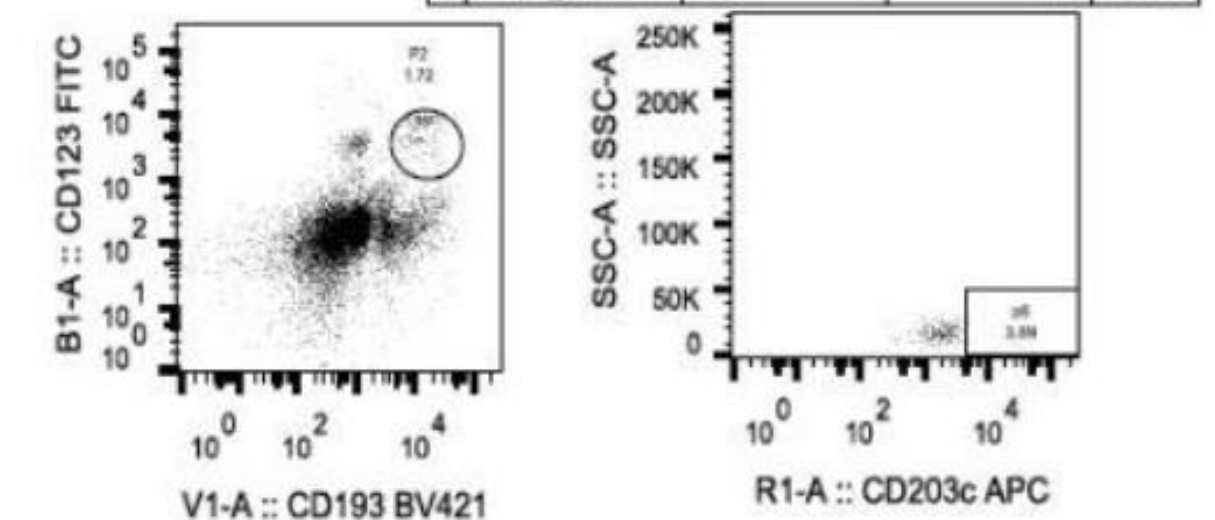
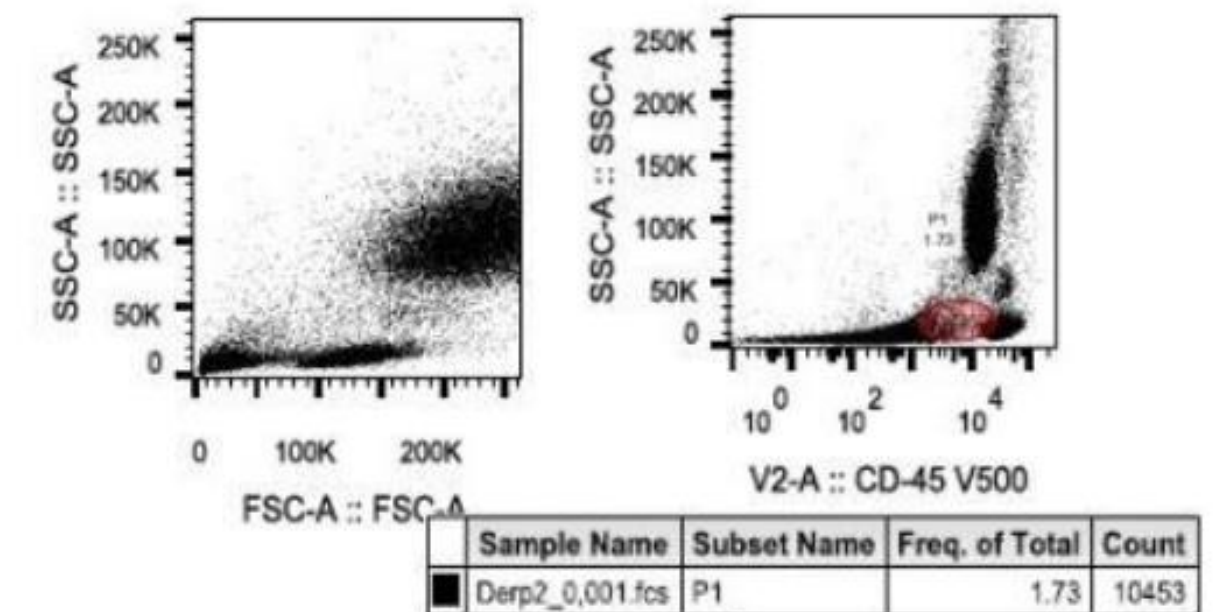
INSPIRED

Proiectul INSPIRED

Studierea efectului cosensibilizării la alergene din acarieni asupra alergiei la polenul de ambrozia



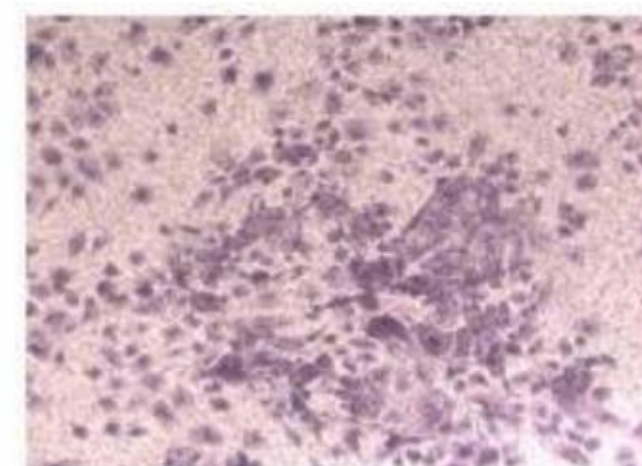
Celule epiteliale bronșice în cultură la 2 zile (stânga), o săptămână (mijloc) și 2 săptămâni (dreapta) după expunerea regiunii apicale la aer în cultivarea de tip ALI



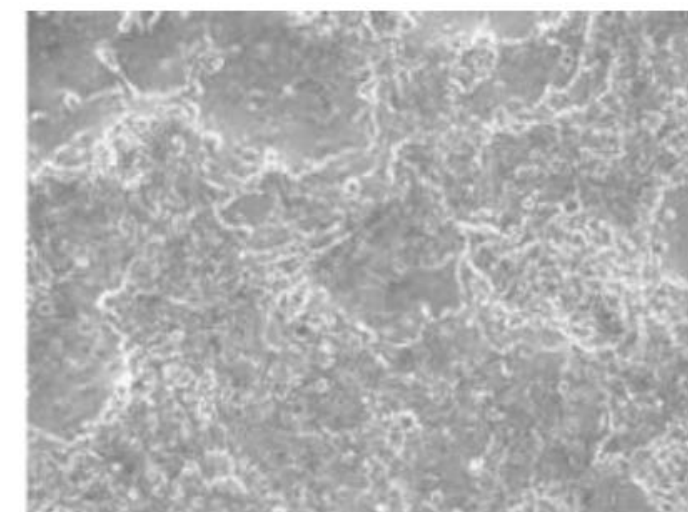
NHBE cells, ALI day 13, Ob. 5x



Cross-section with microtome, H&E, Ob. 20x



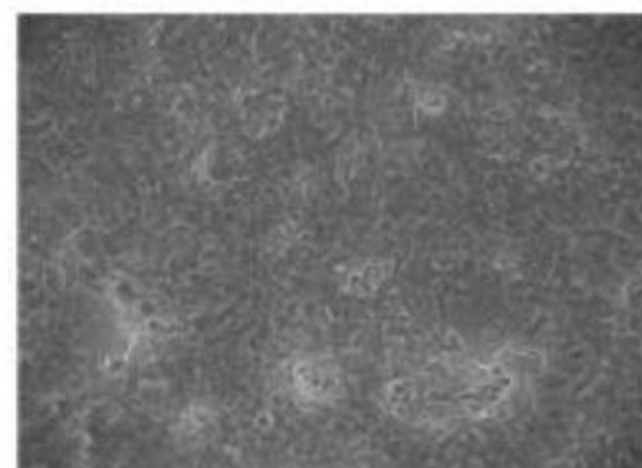
NHBE cells, H&E, Ob. 10x



Celule epiteliale bronșice în cultură ALI (o săptămână)



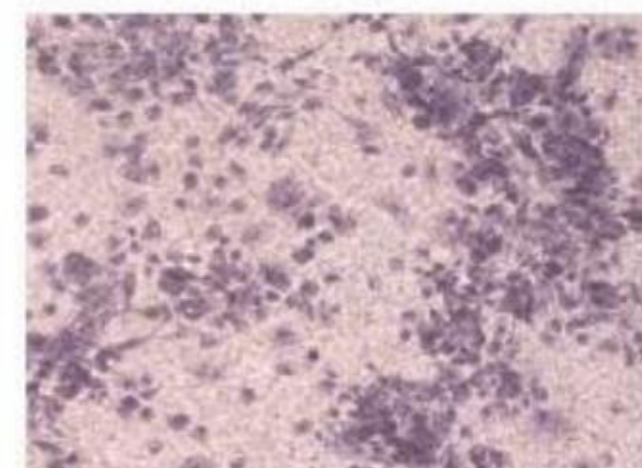
Voltohmmetru folosit pentru evaluarea rezistenței electrice trans-epiteliale



NHBE cells, ALI day 21, Ob. 5x



Cross-section with microtome, H&E, Ob. 20x



NHBE cells, H&E, Ob. 10x

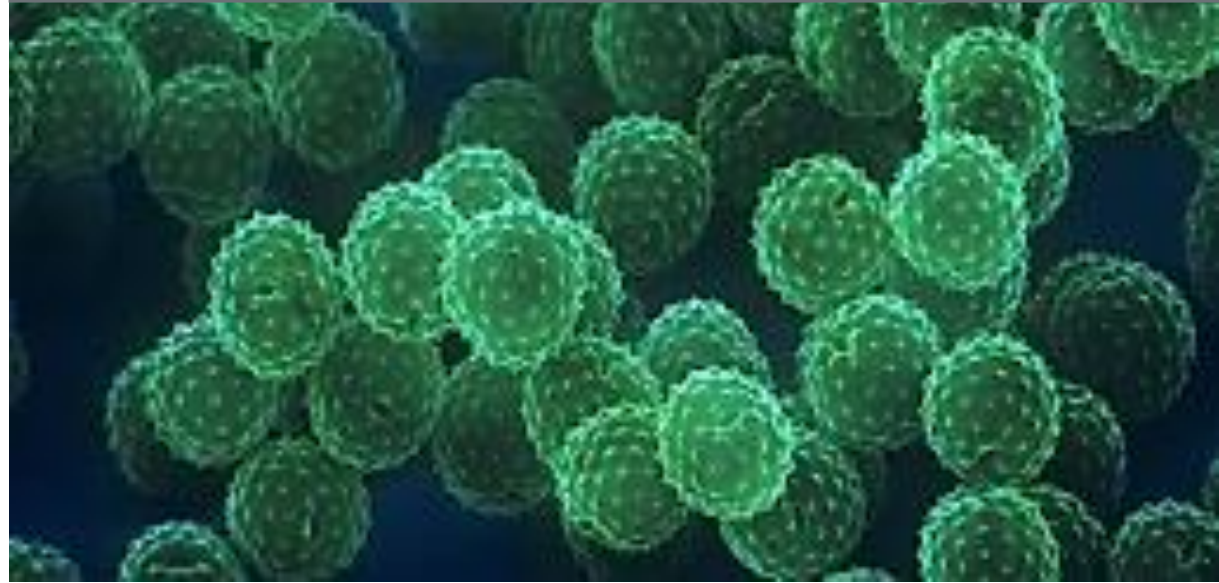
Evaluarea impactului alergenelor HDM asupra permeabilității stratului de celule epiteliale față de alergene din ambrozia

Test BAT: pacient Der p 1
stimulat cu polen de ambrozia

Culturi de celule epiteliale bronșice evaluate histologic la 13 zile (rândul de sus), respectiv la 21 de zile (rândul de jos). În stânga, imagini la microscopul optic în lumină inversată; în centru, aspectul în secțiune transversală al stratului celular după prelucrare la microtom; în dreapta, piese fixate și colorate HE



INSPIRED



Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

Concepte inovatoare pentru vaccinarea terapeutică și prevenția alergen specifică

Testarea reactivității unor produse imunoterapeutice față de alergenele recombinante din Ambrosia produse în proiectul INSPIRED

Obținerea de peptide candidate pentru un AIT inovativ



Imagini din timpul derulării protocolului de lucru

Pentru alergenele majore peptide cu rol de hipoalergene	
Alergen	Peptide
Amb a 1.01	A1-1 AEDLQEILPVNETRRLTTS
	A1-2 DGCWRGKADWAENRKALADCAQGFKGKTVG
	A1-3 AQGFGKGTVGKGDGIYTVTSELDDVANPK
	A1-4 ELDDDVANPKEGTLRFGAAQNR
	A1-5 VIRLDKEMVNSDKTIDGRGAKV
	A1-6 MHDVKVNPGLIKSNDGPAAPRAGSDG
	A1-7 TFTDNVDQRMPCRHRGFFQVNNNDKWGSY
	A1-8 GNRFCAPDERSKKNVLGRHGEEAAESMK
	A1-9 NVLGRHGEEAAESMKWNWRTNKDVLE
Amb a 4	A4-1 KLCEKPSVTWSGCKVKQTDKCDKRCIEW
	A4-2 DKCDKRCIEWEGAKHGACHKRDskATCFYFDCDP
	A4-3 FDCDPTKNPGPPGAPKAPAPSPSGGGAPPPS
	A4-4 PPSGGGAPPPSGGGGDP PPPPEGGGGGGGGGG
	A4-5 GGEGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGER
Amb a 6	A6-1 ASPTCDTVQNILAP
	A6-2 GFLTGQEPSKACCTGVNNLNNSRKTADRV
	A6-3 IKELTKSIAYDPKRMPLLSKCGVKPD
	A6-4 LSTKCGVKPDFPAVDKNLDCSKLPV
Amb a 8	A8-1 MSWQTYVDEHLMCDIEGTGOHLASAAI
	A8-2 FGTDGNVWAKSSSFPEFKPDEINAIKEFSEPGAL
	A8-3 GAKYMIQGEPGA VIRGKKGAGGICKKTG
	A8-4 GAGGICIKKTQAMVFGIYEPPVNPQCNMVW
	A8-5 EPVNPGQCNMVVERLGDYLVQDQM

Nume alergen	Prezența în imunoterapiile testate
rAmb a 1.01	Crescută în 2/4 imunoterapii, scăzută în 2/4
rAmb a 3	Scăzută în toate cele 4 imunoterapii
rAmb a 4	Moderată în 1/4 imunoterapii, scăzută în 3/4
rAmb a 5	Crescută în 3/4 imunoterapii, moderată în 1/4
rAmb a 6	Moderată în 2/4 imunoterapii, scăzută în 2/4
rAmb a 8	Crescută în 2/4 imunoterapii, scăzută în 2/4
rAmb a 9	Moderată în 1/4 imunoterapii, scăzută în 3/4
rAmb a 10	Moderată în 1/4 imunoterapii, scăzută în 3/4
rAmb a 11	Crescută în 1/4 imunoterapii, scăzută în 3/4
rAmb a 12	Scăzută în toate cele 4 imunoterapii

	Models	Active	View	ITScorePeP
	Model 1		View	-190.2
	Model 2		View	-188.6
	Model 3		View	-181.1
	Model 4		View	-179.4
	Model 5		View	-178.9
	Model 6		View	-177.9
	Model 7		View	-177.7
	Model 8		View	-177.5
	Model 9		View	-176.8
	Model 10		View	-175.9

Generarea de peptide prin predicție *in silico*

Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

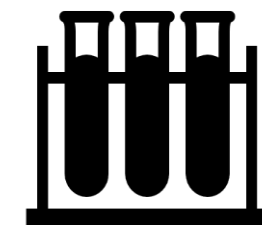
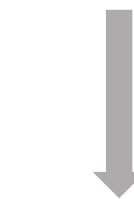
Detecția alergenelor din ambrozia în produsele AIT disponibile pe piață



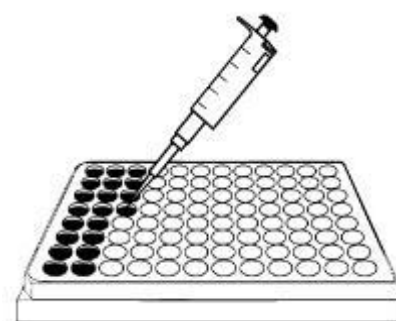
1. Selecția iepurilor care nu au reacționat la ambrozia, 2 iepuri/alergen



2. Administrarea AIT conform protocolului oferit de producător



3. Recoltarea sângelui de iepure la fiecare 4 săptămâni și recoltarea finală la 4 săptămâni de la ultima imunizare



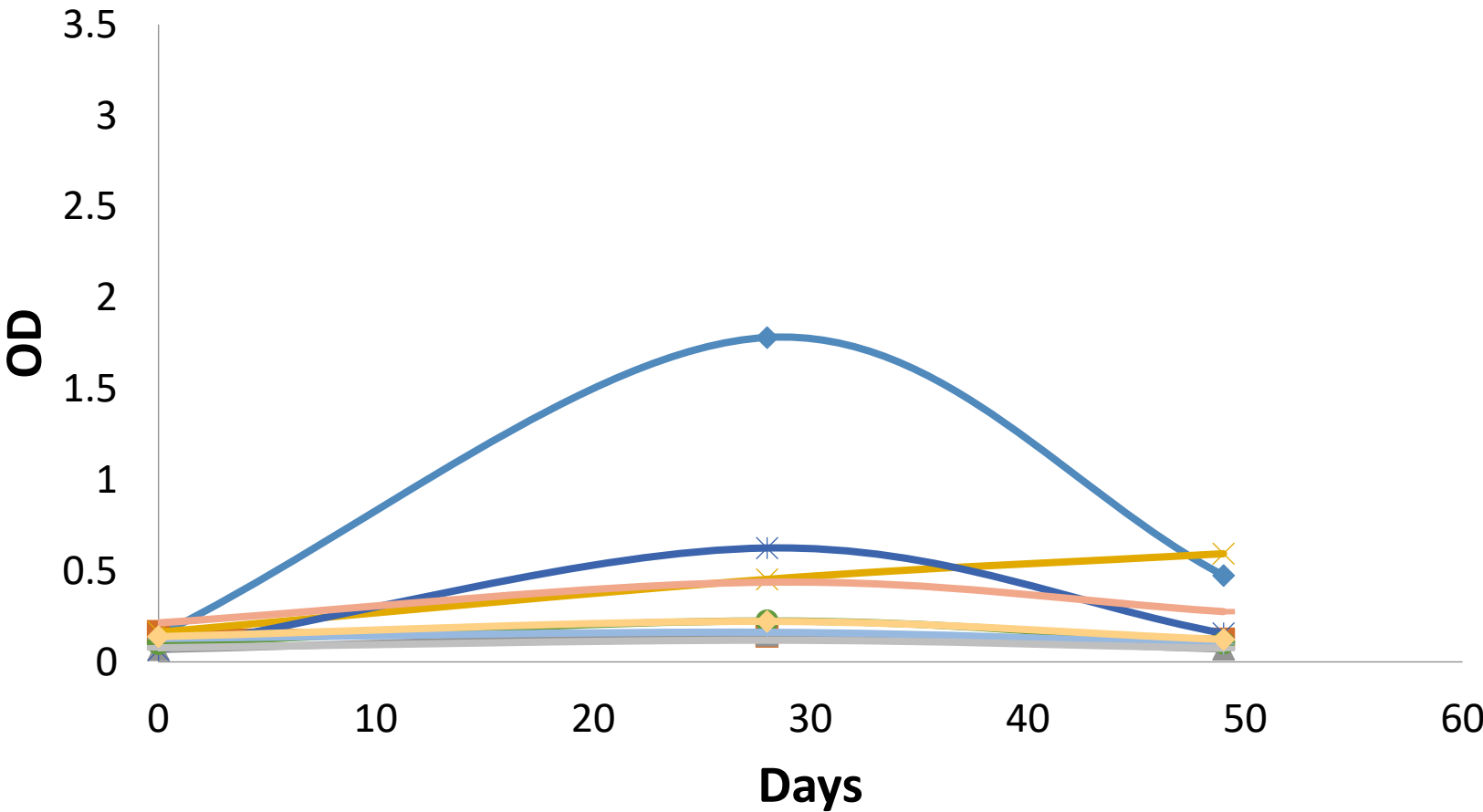
4. Testarea anticorpilor de iepure în ELISA folosind alergenele de ambrozia:
Amb a 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12

Proiectul INSPIRED

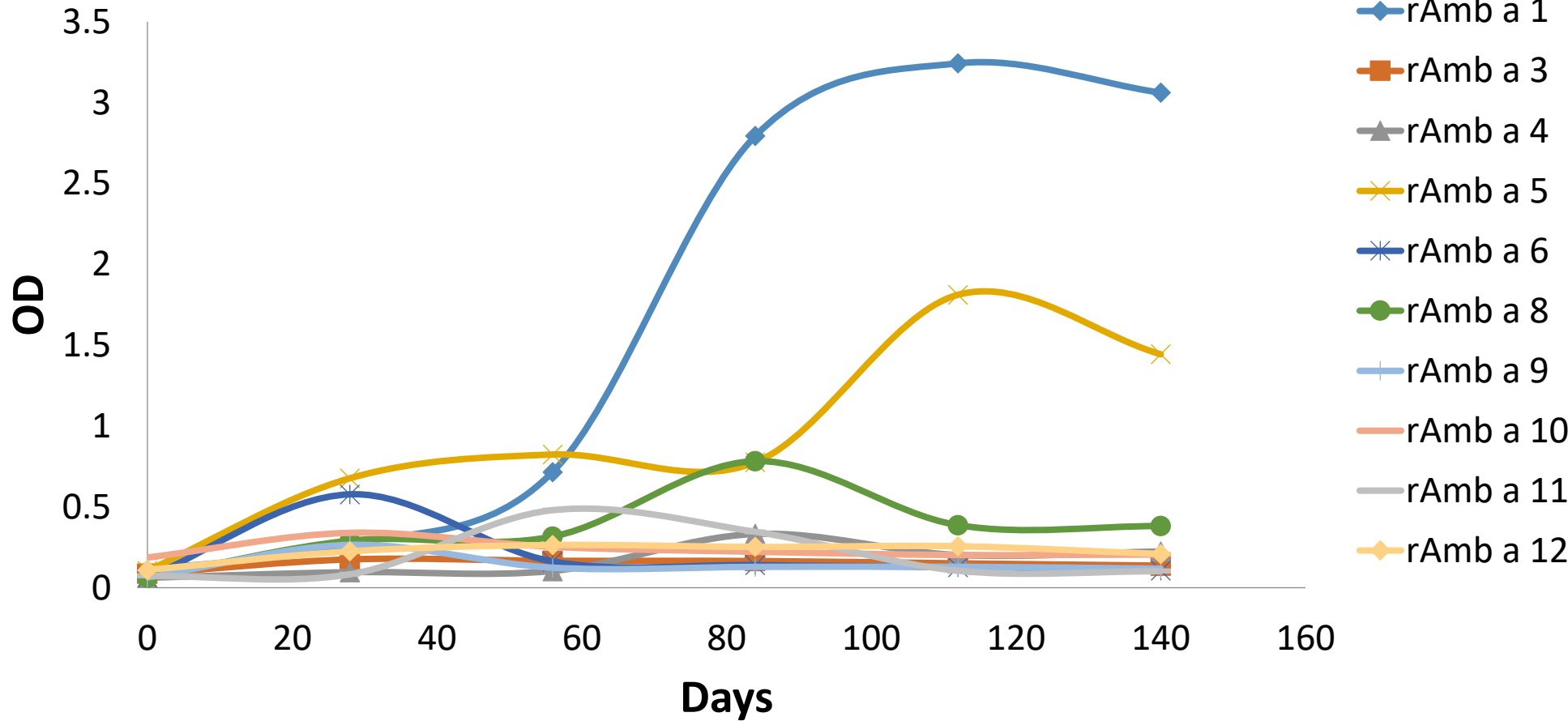
Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

Detecția alergenelor din ambrozia în produsele AIT disponibile pe piață

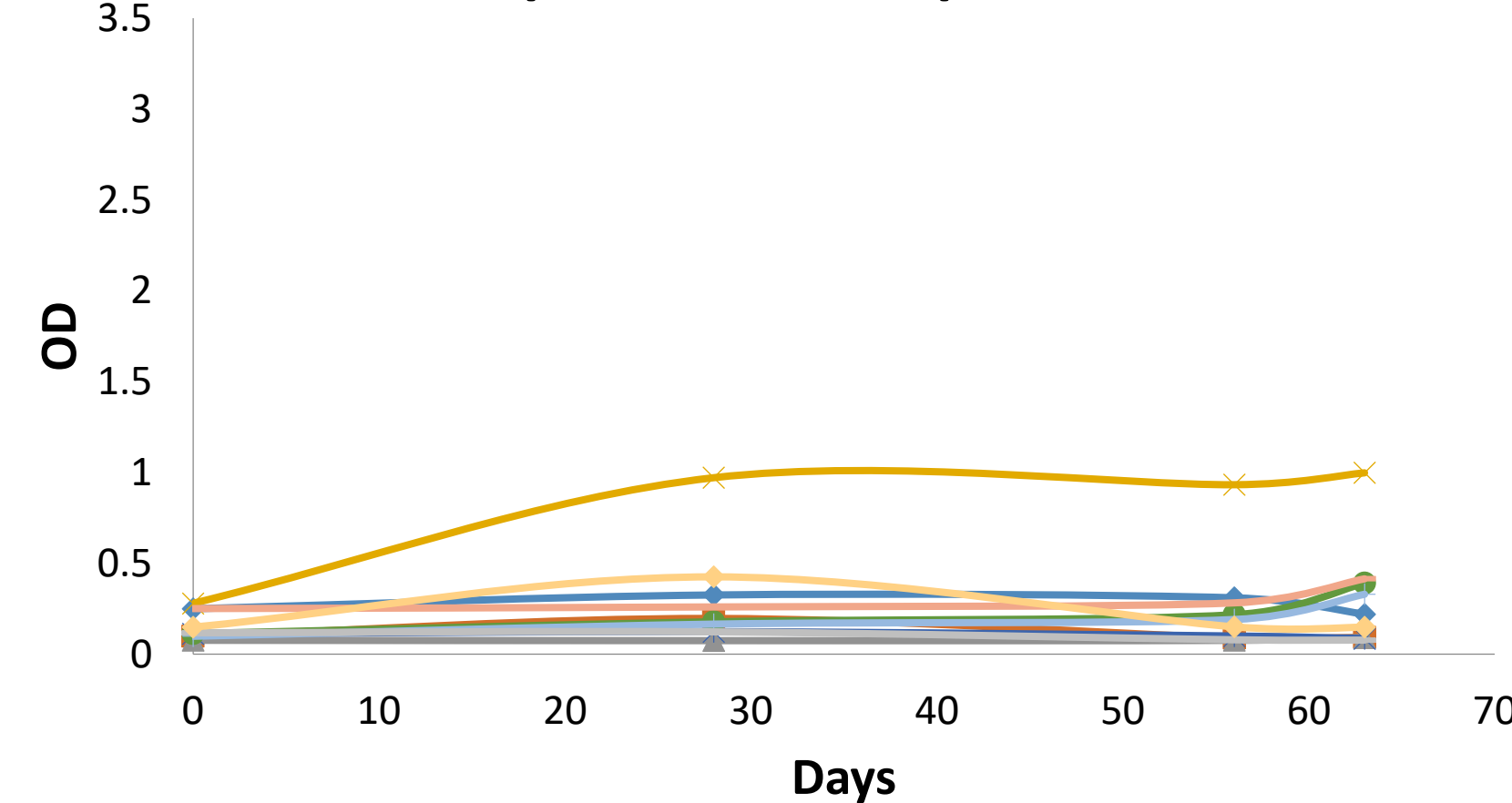
Imunoterapia 1 – alergoid ambrozia



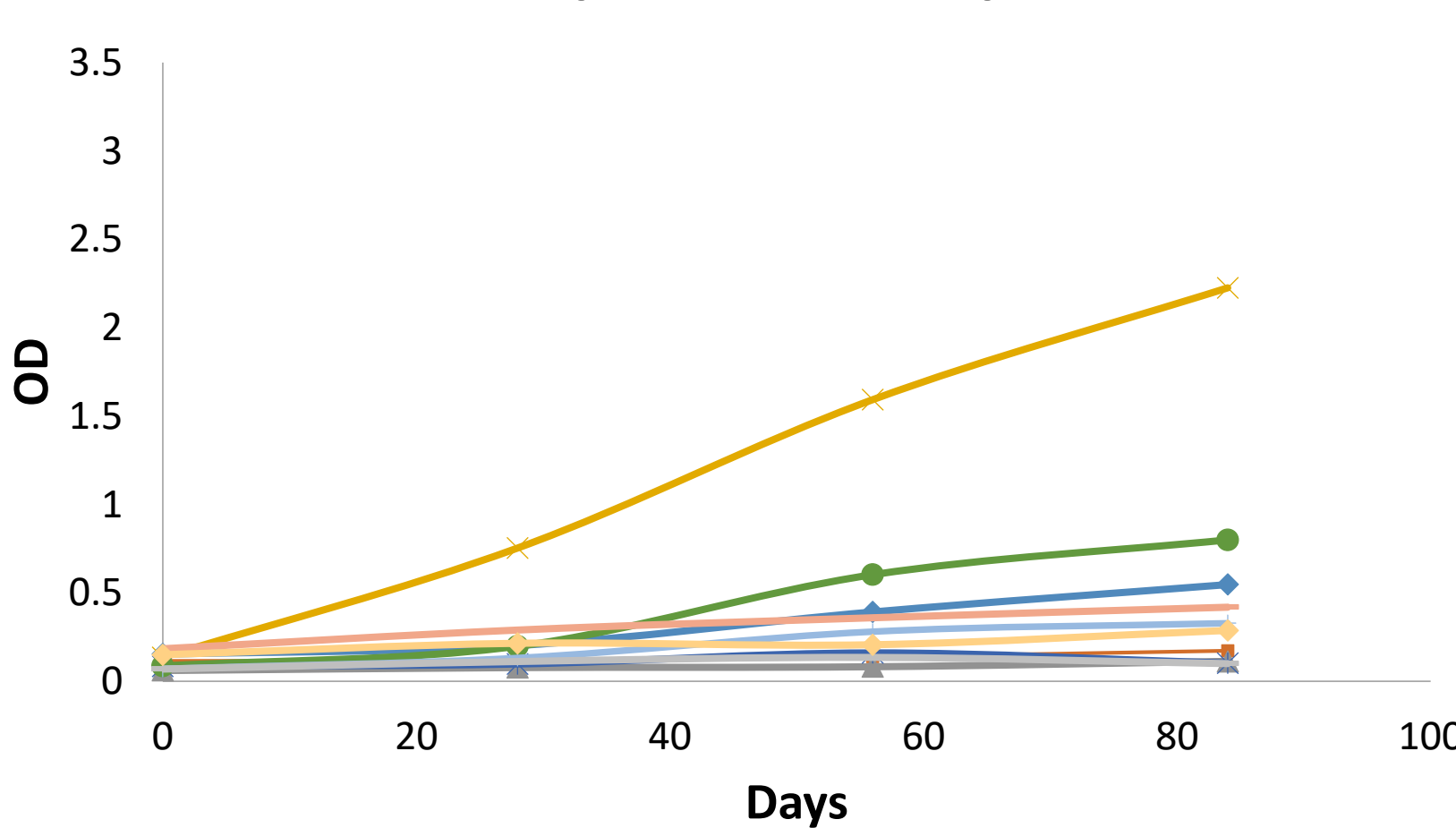
Imunoterapia 2 – extract polen ambrozia



Imunoterapia 3 – extract polen ambrozia

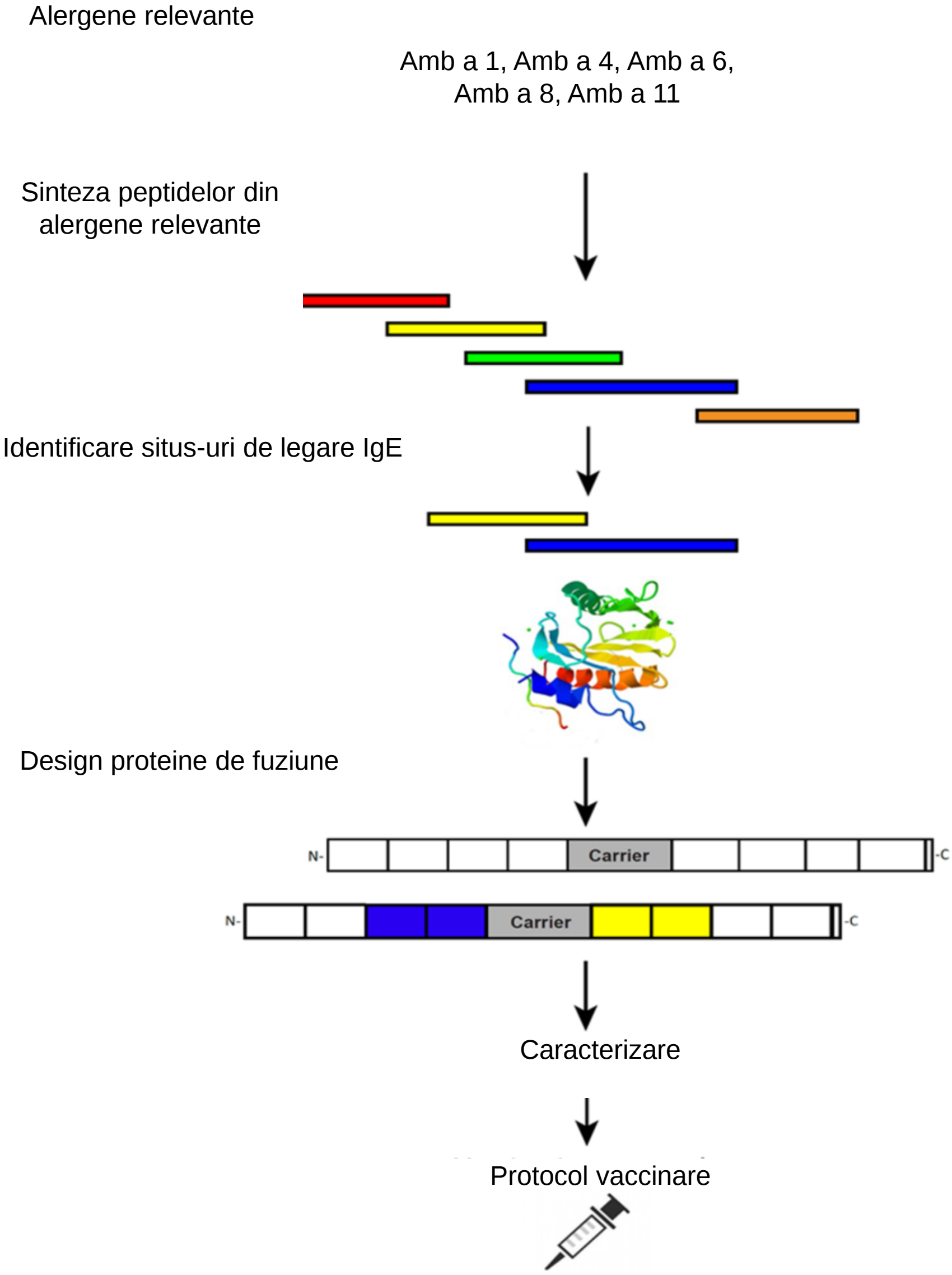


Imunoterapia 4 – extract polen ambrozia



Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea unui vaccin bazat pe peptide pentru alergia la polenul de ambrozia



Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

Design de peptide suprapuse pentru determinarea epitopilor pentru limfocitele B

Amb a 8

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
MSWQTYVDEHLMCDIEGTGQHLASAAIFGT DGNVWAKSSSFPEFKPDEINAIKEFSEPGALAPTGLFLAGAKYMPIQGEPGA VIRGKKGAGGICIKKTGQAMVFGIYE EPVNPGQCNMVVERLGDYLV DQGM

MSWQTYVDEHLMCDIEGTGQHLASAAI

1 – 27 (26aa)

FGTDGNVWAKSSSFPEFKPDEINAIKEFSEPGAL

28 – 62 (35aa)

GAKYMPIQGEPGA VIRGKKGAGGICIKKTG

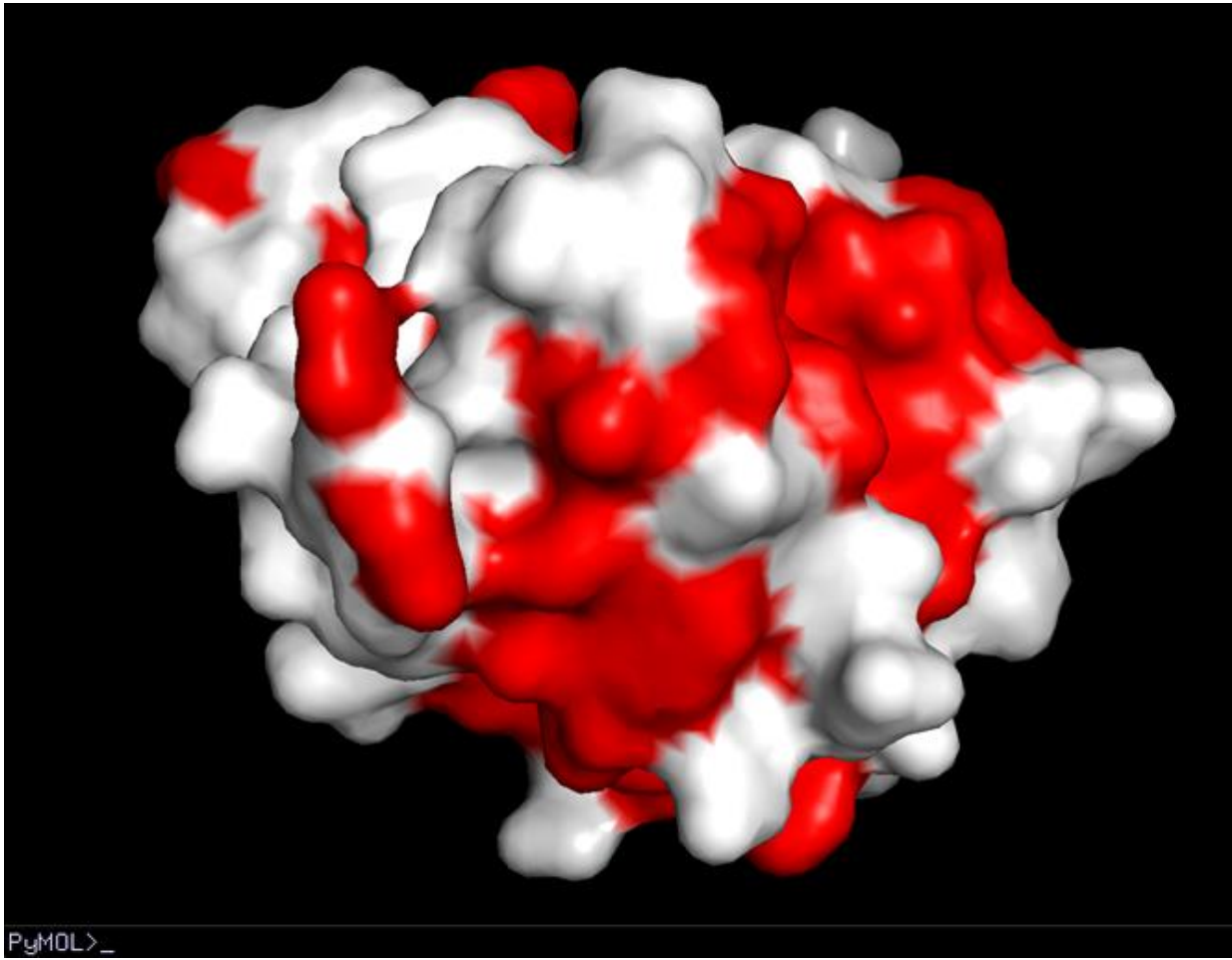
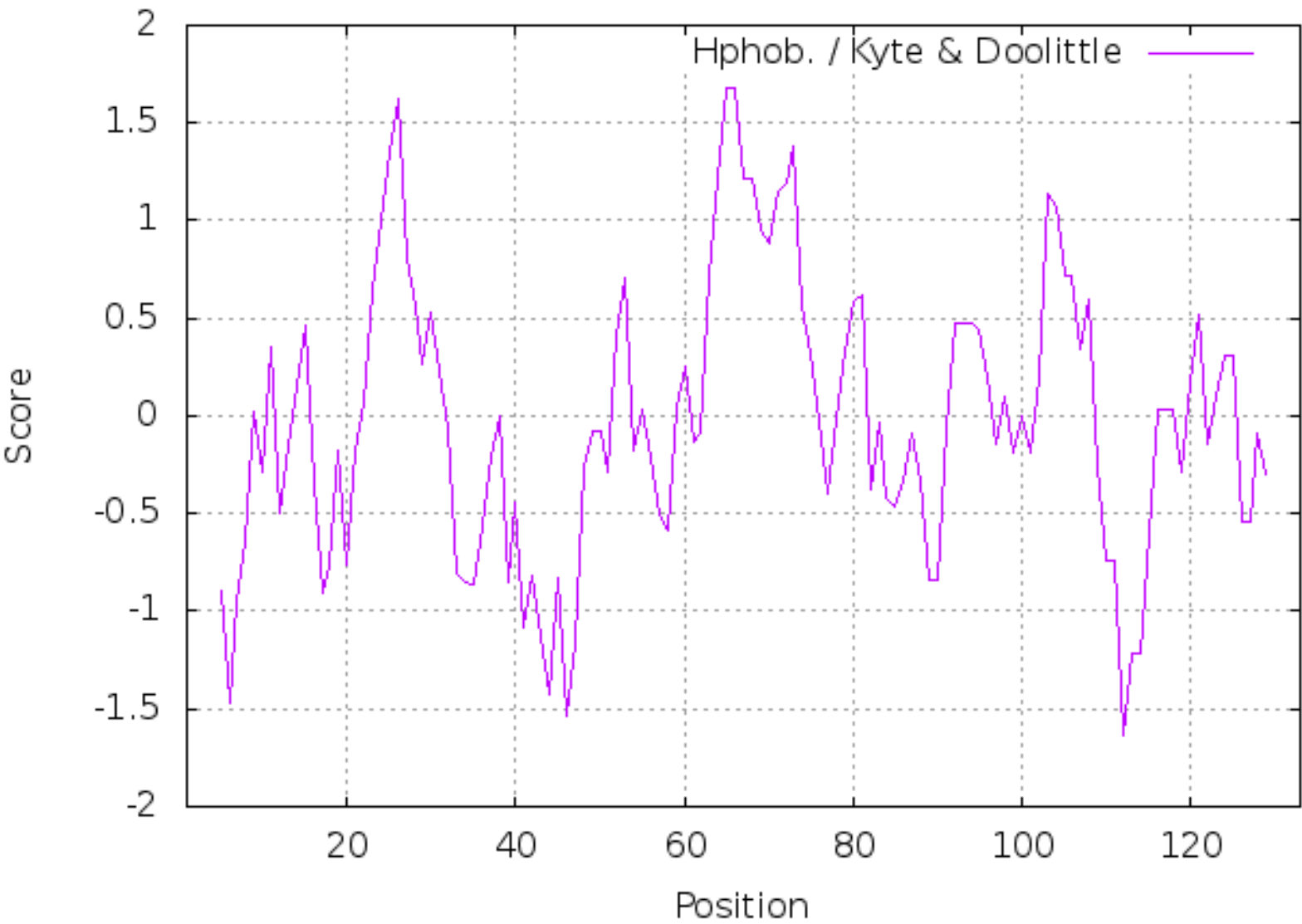
71 – 100 (30aa)

GAGGICIKKTGQAMVFGIYE EPVNPGQCNMVV

90 – 121 (32aa)

EPVNPGQCNMVVERLGDYLV DQGM

110 – 133
(24aa)

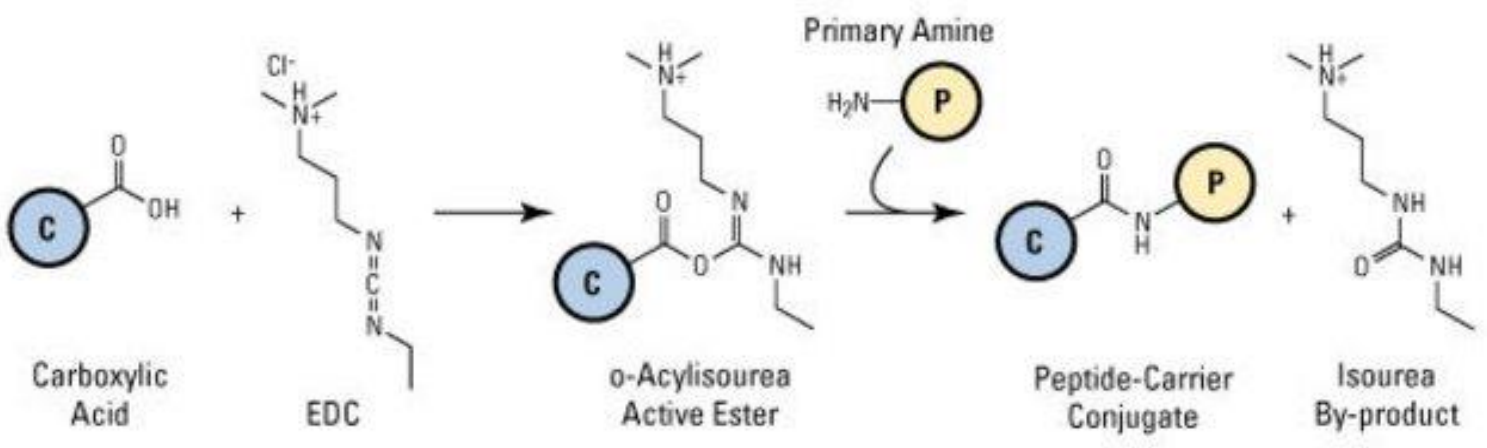


Peptidele au fost construite pe baza hidrofobicității/hidrofilicității (Kyte & Doolittle).

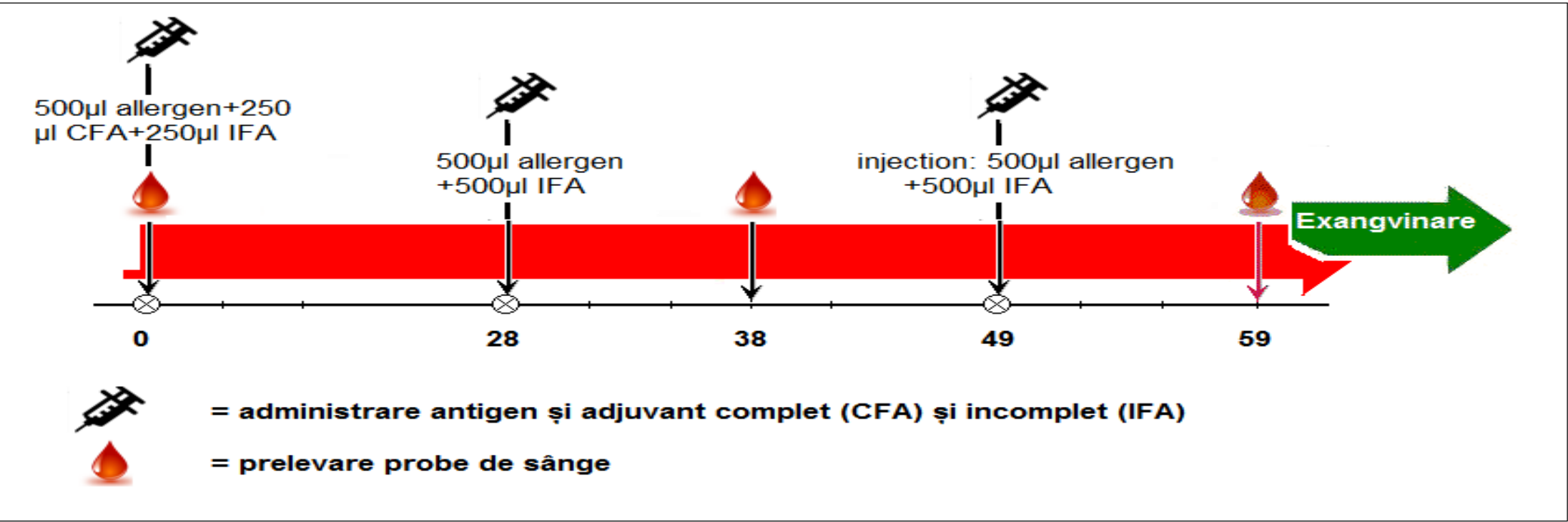
Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

Identificarea situsurilor de legare

Sinteză peptide (Genscript)

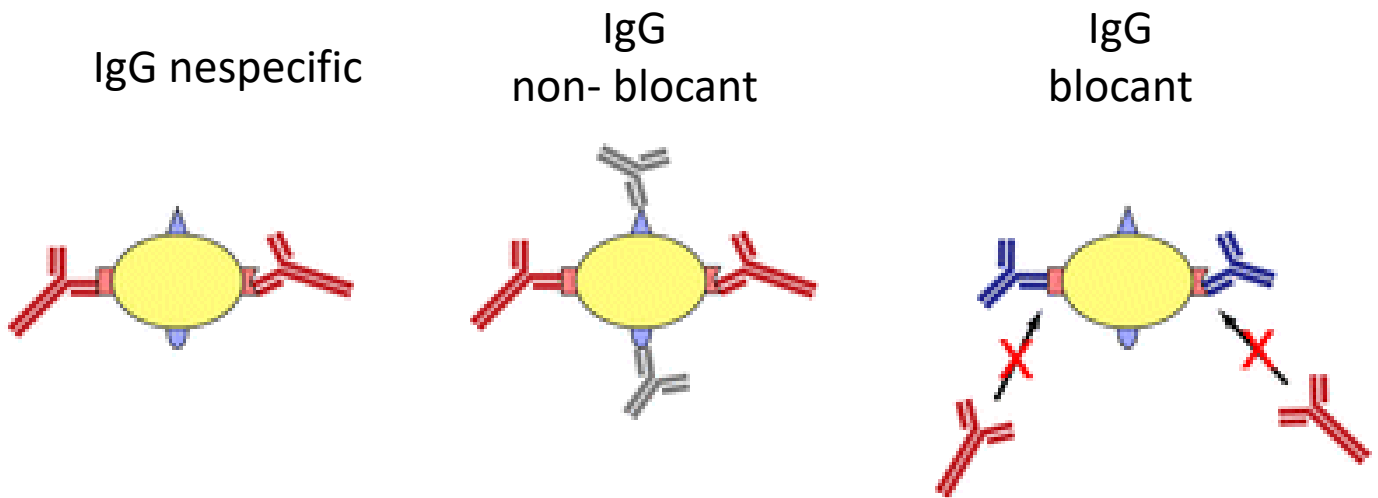
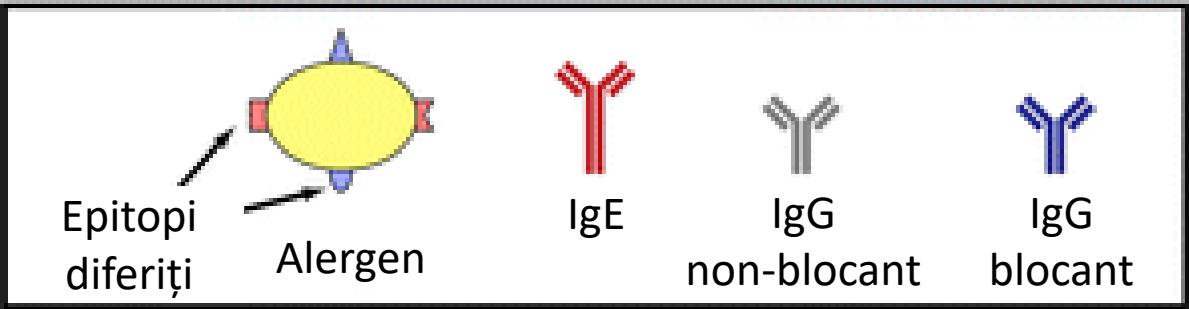
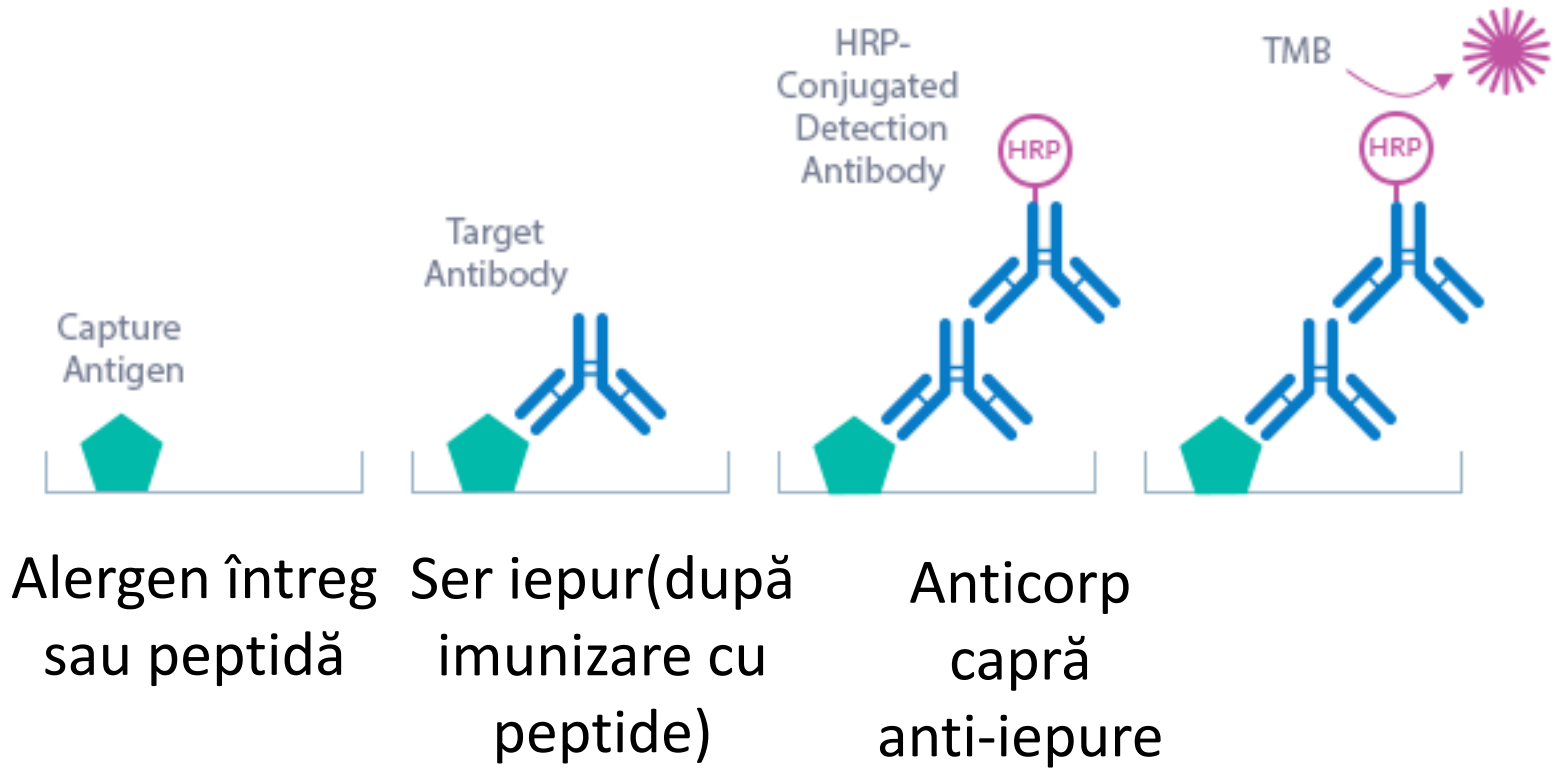


Conjugare peptide cu proteină carrier (KLH)



Imunizare iepuri cu peptidele conjugate
(protocol cu adjuvant Freund adjuvant)

Evaluarea titrului IgG și a eficienței de blocare
(ELISA)

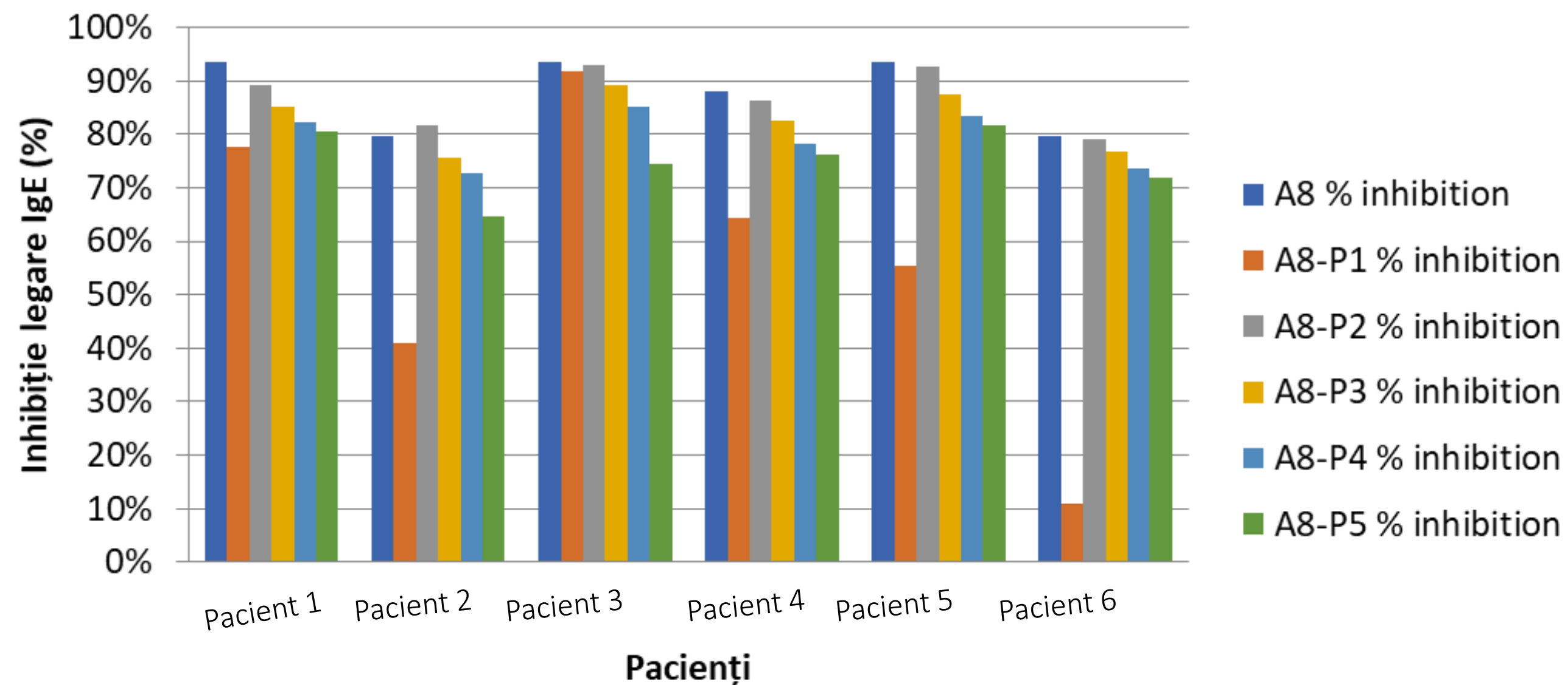


Proiectul INSPIRED

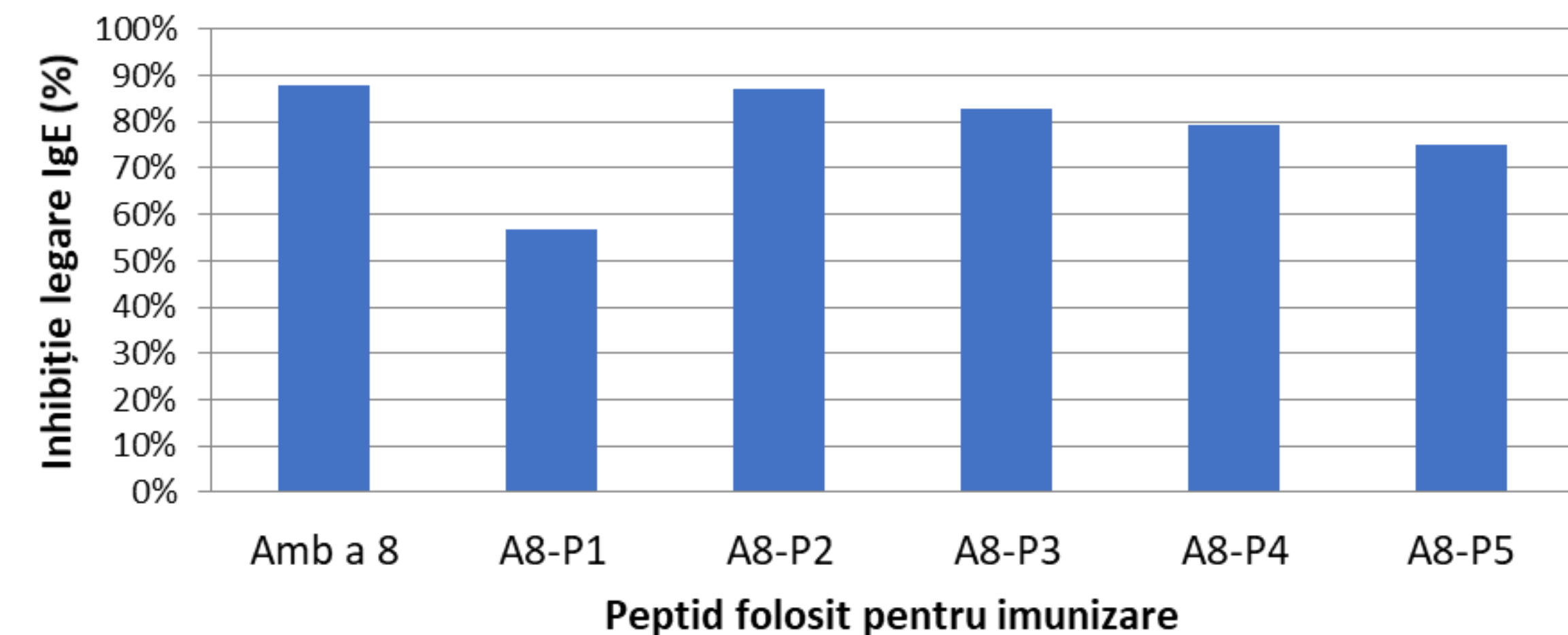
Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

Inhibiția legării IgE folosind anticorpi IgG de iepuri (specifici pentru Amb a 8)

Blocarea legării anticorpilor IgE ai pacienților de Amb a 8 în prezența serului imun



Blocarea legării anticorpilor IgE ai pacienților de Amb a 8 în prezența serului imun



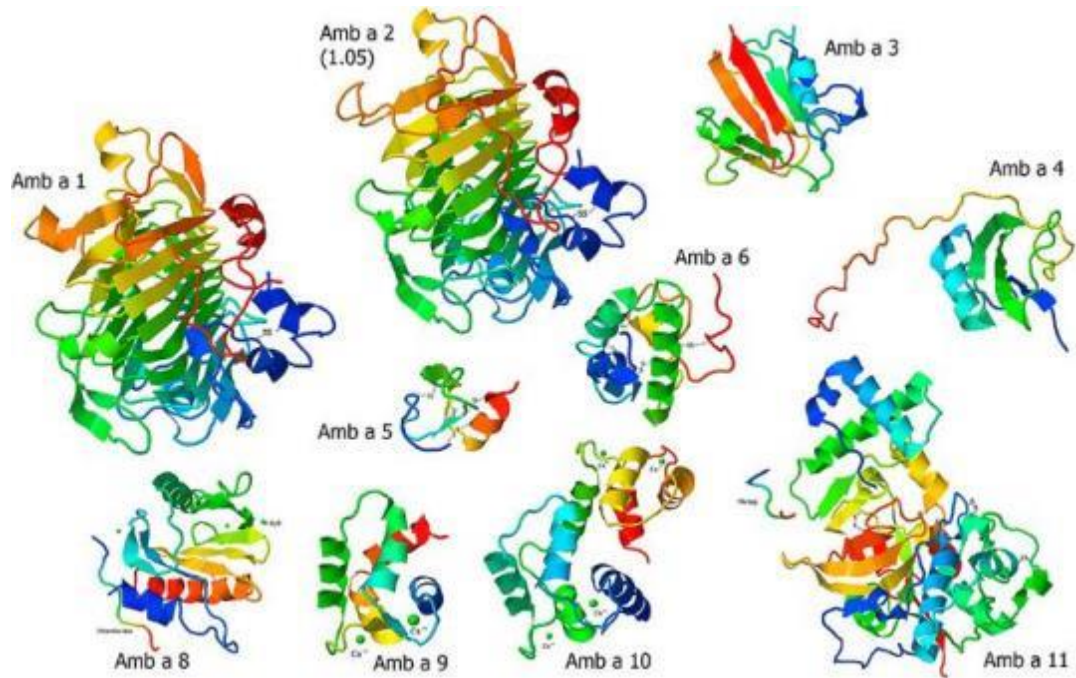
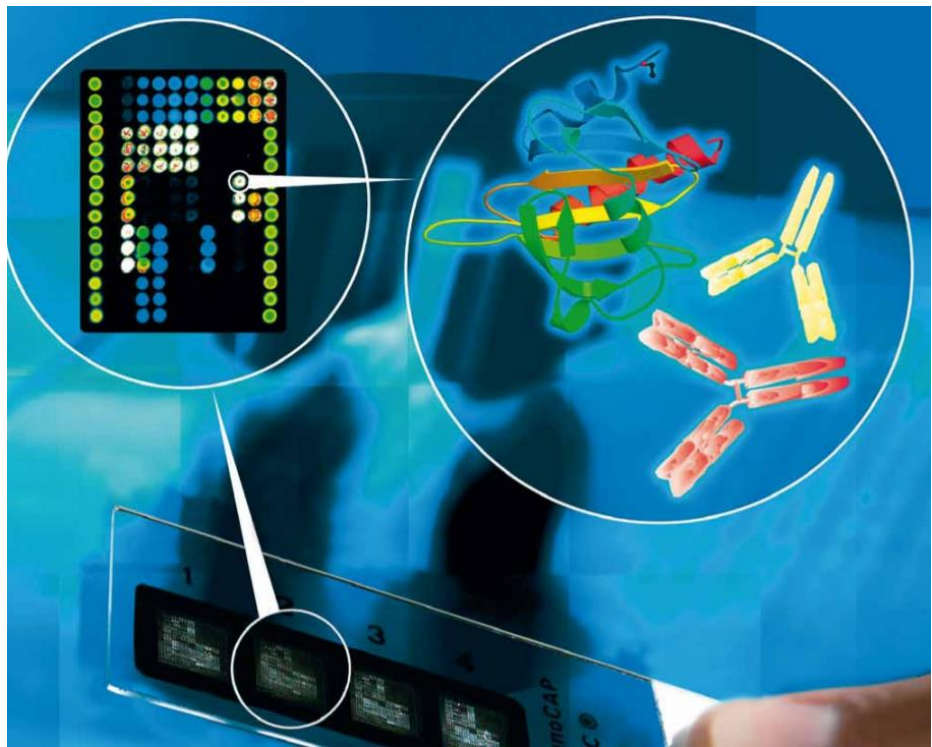
Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea unui vaccin pentru alergia la polenul de ambrozia

- Patente

Autori	Titlu	Înregistrare OSIM
Panaiteescu C, Chen KW, Buzan MR, Paunescu V	Kit și metodă de utilizare pentru diagnosticul alergiei la ambrozia	Nr. A/00615/2020, din 30/09/2020
Panaiteescu C, Chen KW, Buzan MR, Grijincu M, Zbircea LE, Tamas TP, Cotarca M, Haidar L, Tanasie G, Hutu I	Kit de testare cu anticorpi alergen-specifici pentru detecția și cuantificarea alergenelor din polenul de ambrozia din mediu și din extracte alergenic	Nr. A/00759/2020, din 19/11/2020

- Colaborare internațională cu Universitatea de Medicină din Viena pentru un chip microarray îmbunătățit.



Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea alergologiei moleculare în România

- Pentru prima dată în regim de decontare CNAS a investigațiilor de alergologie moleculară în România - 2

IgE specifice serice pentru alergene moleculare individuale importante prin teste singleplex

Molecule alergenice din aeroalergene	Der p 1, Der p 2, Der p 23 (acarieni din praf de casă); Alt a 1, Asp f 1, Asp f 2 (fungi); Fel d 1 (epitelii pisică); Can f 1, Can f 2, Can f 5 (epitelii câine); Bet v 1 (polen mestecan), Phl p 1, Phl p 5 (polen graminee), Art v 1 (polen Artemisia vulgaris), Amb a 1 (polen Ambrosia artemisiifolia var elatior);
Molecule alergenice din alimente	alfa-lactalbumina Bos d 4, beta-lactoglobulina Bos d 5, albumina serica Bos d 6, cazeina Bos d 8 (lapte de vacă); alfa-Gal (bovin); ovomucoid Gal d 1, ovalbumina Gal d 2, conalbumina Gal d 3, lizozim Gal d 4 (ou găina); Gly m 5, Gly m 6 (soia); Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 9 (arahide); Cor a 9, Cor a 14 (alune de pădure); Jug r 1 (nuci), Ana o 3 (caju), Tri a 14, omega-5 gliadina Tri a 19 (grâu); Pru p 3, Pru p 7 (piersică); Pen m 1/Pen a 1, Gad c 1 (crevete și pește cod),
Molecule alergenice din veninuri de himenoptere	Api m 1, Api m 3, Api m 4, Api m 10 (venin albină), Ves v 1, Ves v 5 (venin viespe);
Molecule alergenice latex	Hev b 5, Hev b 6 (latex natural);
Molecule si determinanti antigenici peniciline	peniciloil G, peniciloil V, ampiciloil/ampicilina, amoxiciloil/amoxicilina

Proiectul INSPIRED- EVALRO

- Scopul proiectului: identificarea profilului de sensibilizare al pacienților alergici și non-alergici din România

- ## Activități:
- Evaluarea profilului de sensibilizare a 800 se subiecți (400 alergici și 400 non-alergici) (AU) folosind:
 1. Chestionare validate pentru simptomele alergice
 2. Examinări clinice și paraclinice
 3. sIgE determinat prin ImmunoCAP ISAC
 4. Profilul citokinelor serice
 - Evaluarea statusului imun folosind tehnicile de analiză a unei singure celule (single-cell analysis)(UK)



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CLUJ-NAPOCA



TIMIȘOARA

IASI



GRIGORE T. POPA UNIVERSITY OF
MEDICINE AND PHARMACY IASI

BRAȘOV



THERAMEDHEALTHCARE

BUCHAREST



ThermoFisher
SCIENTIFIC

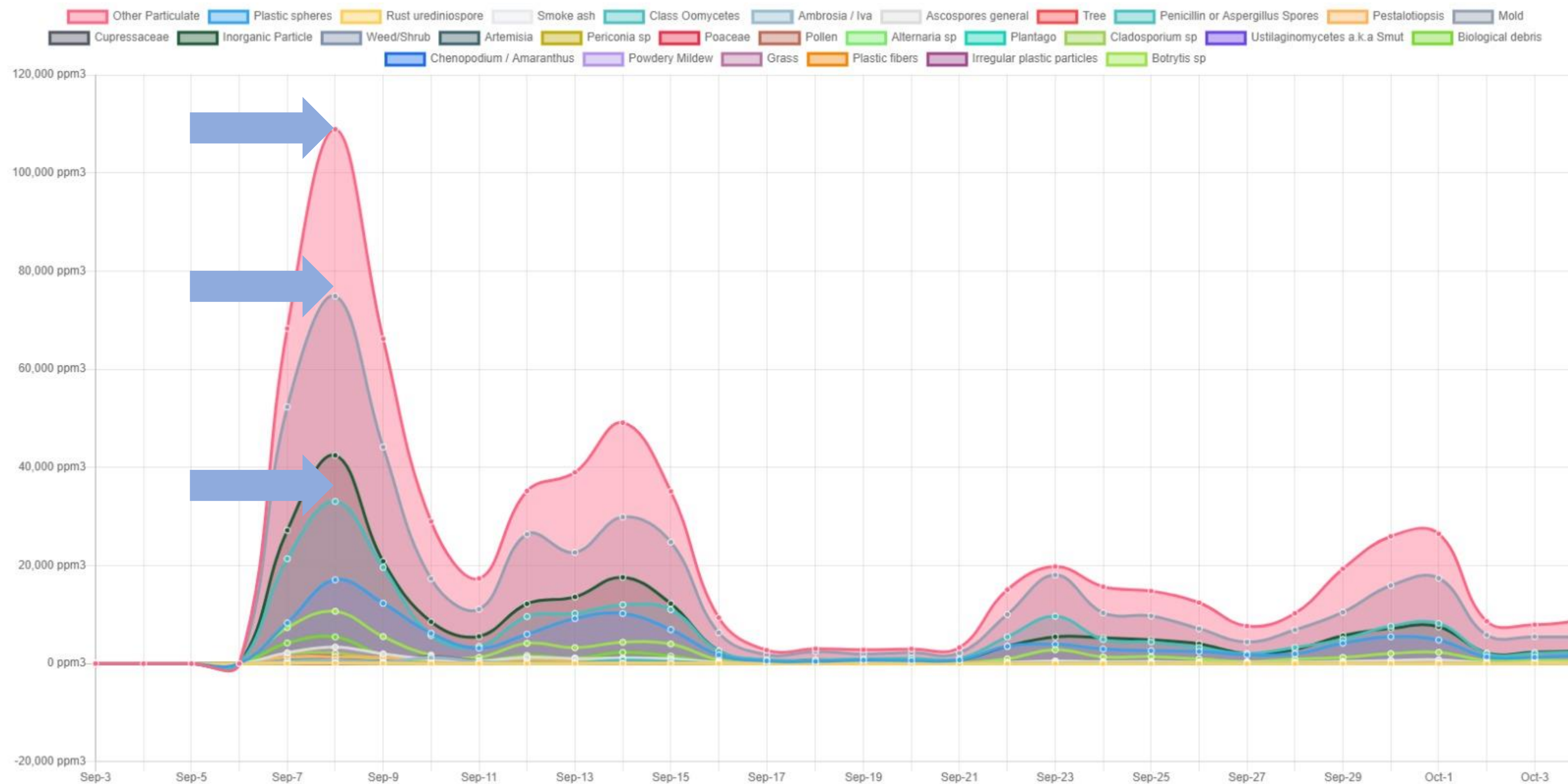
VIENNA



Proiectul INSPIRED

Dezvoltarea unui sistem de monitorizare a alergenelor atmosferice în România

- Pentru prima dată în România – 2022, în colaborare cu USAMVB





ROMANIAN SOCIETY
OF ALLERGOLOGY AND
CLINICAL IMMUNOLOGY

Congress of the Romanian Society OF ALLERGOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY

└ Allergomics – Extending the Frontiers of Knowledge ┐

4-6 May 2023, Crowne Plaza Hotel,
Bucharest

