



# Alergologické vyšetření

---

Mgr. Julie Štíhová  
MUDr. Zita Chovancová, Ph.D

ÚKIA - FNUSA

Obor: Bioanalytik, jaro 2021

# Typy přecitlivělosti dle Coombse a Gella

---

1. **I. Typ přecitlivělosti s účastí IgE – atopická**
2. II. Typ - reakce s účastí IgG a IgM
  - Podtyp IIa - cytotoxická reakce – potransfuzní reakce, hemolytické onemocnění novorozence
  - Podtyp IIb – blokující a stimulující autoprotilátky (myasthenia gravis, thyreotoxikóza)
3. III. Typ – imunokomplexová reakce – sérová nemoc, SLE
4. IV. Typ – reakce oddálené přecitlivělosti
  - S převažující účastí Th1 + makrofágy → granulom (TBC, sarkoidóza)
  - **S Th1 s převažujícími (Th17) a CD8 cytotoxickými T-lymfocyty → kontaktní dermatitida**
5. Reakce na cizí těleso
6. Septický šok

# Alergie

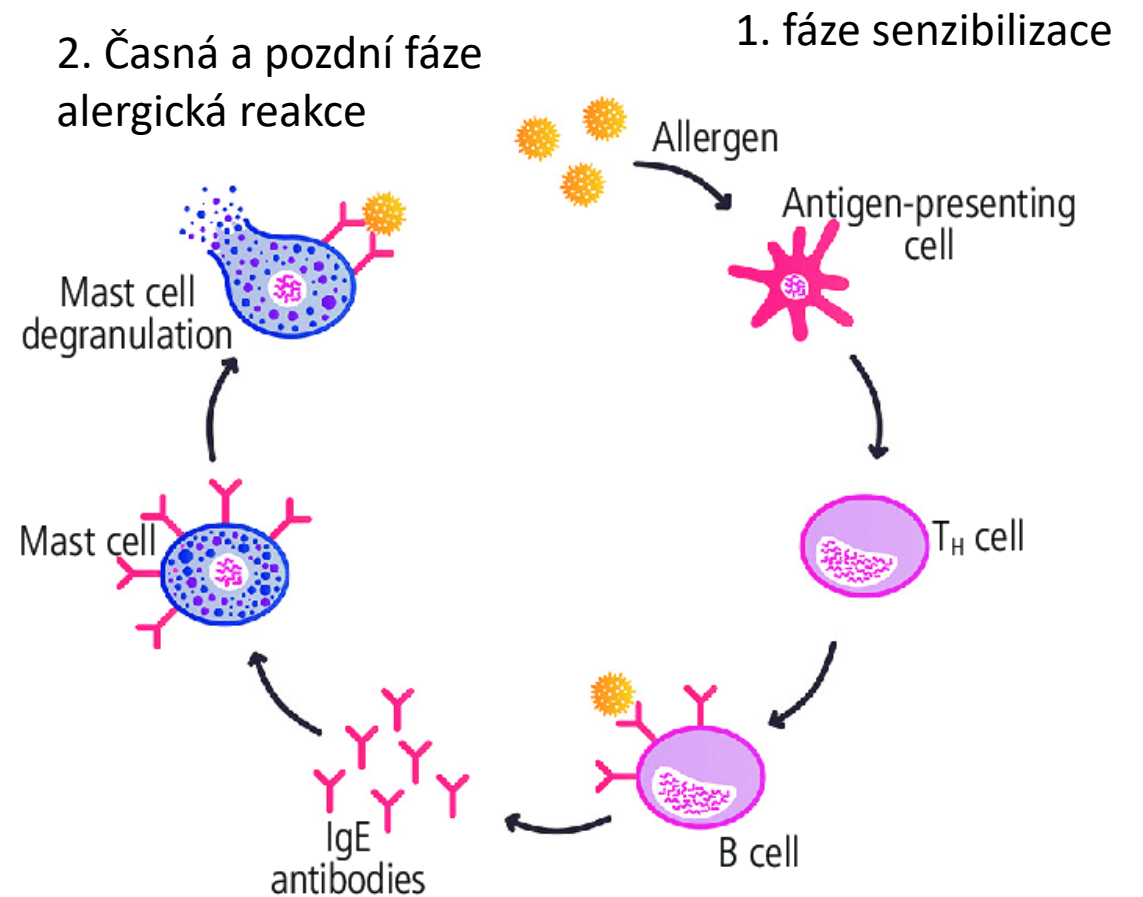
„Alergická onemocnění jsou způsobena nepřiměřenou reakcí imunitního systému na běžné neškodné antigeny pocházející z vnějšího prostředí.“

Tyto antigeny se nazývají alergeny.



# Přecitlivělost I. Typu

- Senná rýma (sezónní, celoroční)
- Konjunktivitida
- Astma bronchiale typ I (eozinofilní)
- Atopický exém
- Kopřivka
- Anafylaktický šok



# Přecitlivělost I. Typu

Probíhá ve 3 fázích:

## 1. fáze senzibilizace

- zpracování alergenu, indukce Th2 odpovědi → produkce IgE
- Vazba IgE na vysokoafinitní Fcε receptory žírných buněk

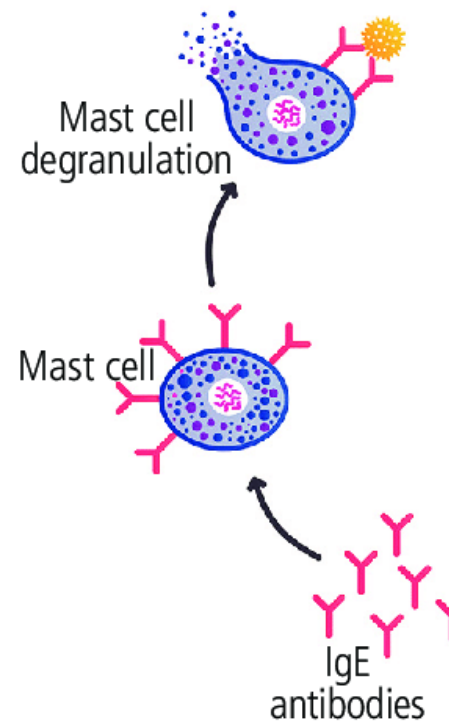
## 2. Časná fáze alergické reakce (minuty po styku)

- Aktivace žírných buněk alergenem → degranulace

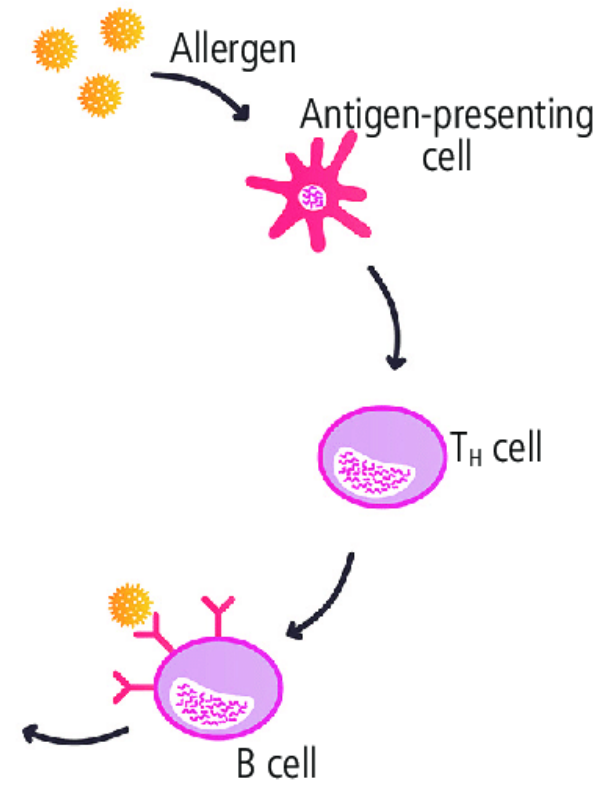
## 3. Pozdní fáze alergické reakce (hodiny po styku)

- Syntéza metabolitů kyseliny arachidonové – leukotrieny, tromboxany, prostaglandiny

## 2. Časná a pozdní fáze alergická reakce



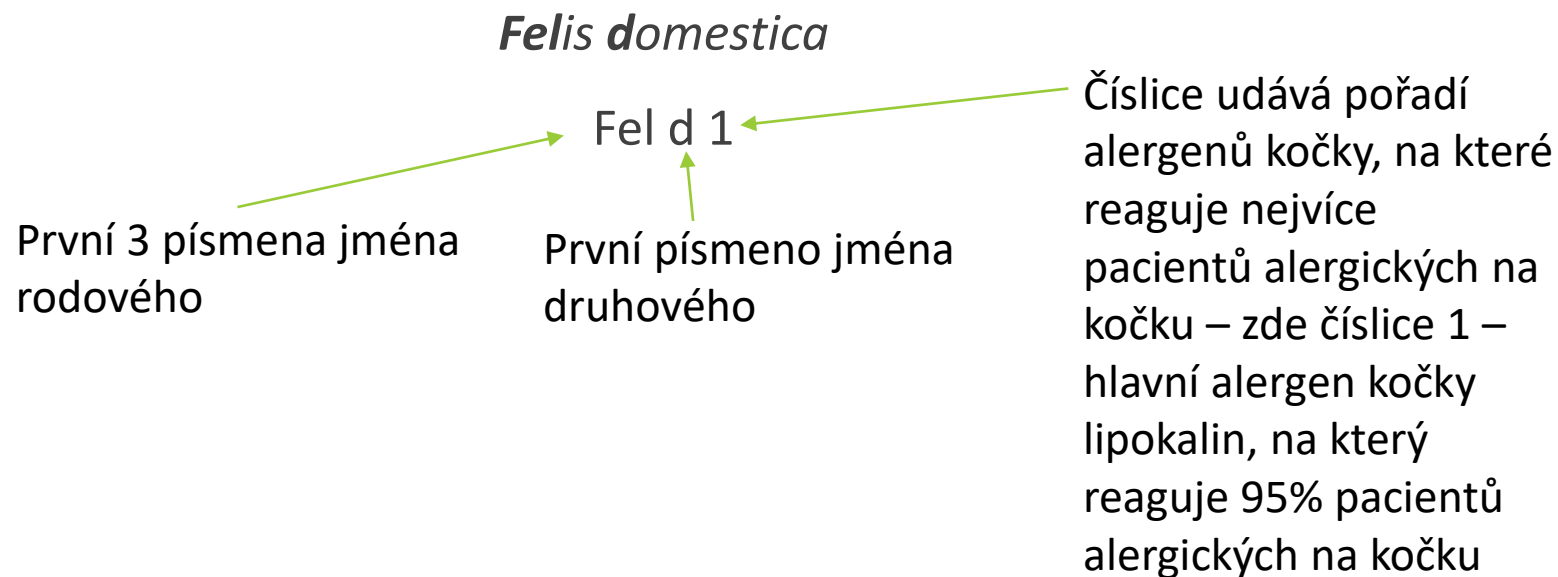
## 1. fáze senzibilizace



# Alergen

---

- Exogenní antigen, který u vnímavých jedinců vyvolá patologickou imunitní reakci
- Názvosloví alergenů: vychází z latiny, např. kočka domácí:



# Alergeny hlavní a vedlejší

---

- V současnosti je známo aminokyselinové složení většiny alergenů
- Rozlišení 2 skupin:
  - **Alergeny hlavní** – látka, na kterou reaguje 50-90 % jedinců přecitlivělých na daný alergen (IgE)  
např. Fel d1, Bet v 1, Ara h 1, 2, 3
  - **Alergeny vedlejší** – reaguje na ně menšina osob vnímavých na daný alergen (<10 %)

# Alergeny I. a II. třídy

---



## **Alergeny I. třídy** – alergenové potraviny, senzibilizace orální cestou

- Spouští se do pár minut od konzumace potraviny
- Klinické příznaky variabilní – od svědění dutiny ústní, rtů (orální alergický syndrom, OAS) až po život ohrožující anafylaxi

## **Alergeny II. Třídy** – alergenové inhalace

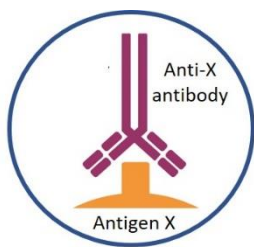
- Často proteiny rostlin s různou enzymatickou aktivitou, např.
- **Skladovací proteiny** – semena, ořechy
- **Inhibitory enzymů** (amyláz, antitrypsin) – brání štěpení škrobů a proteinů v obilných zrnech
- **Regulační proteiny** – podílí se na rozmnožování rostlin
- **Proteiny související s patogenezi** (obrana rostliny – hevaminy – funkce podobná lysozymu)





# Zkřížená reaktivita

- Velká část alergenů si je velmi podobná ve svém aminokyselinovém složení
- Alergeny s vyšší než 50% homologií vykazují zkříženou reaktivitu
- Je-li homologie vyšší než 80 % → **PANALERGENY** – obsahují fylogeneticky konzervativní sekvence AK
  - Způsobují potravinovou alergii asociovanou s pyly
  - 1. fáze – senzibilizace pacienta inhalačními alergeny
  - 2. fáze – zkřížená reaktivita mezi proteiny inhalačních alergenů a potravinami → potravinová alergie



Cross-reactivities



Shared epitopes

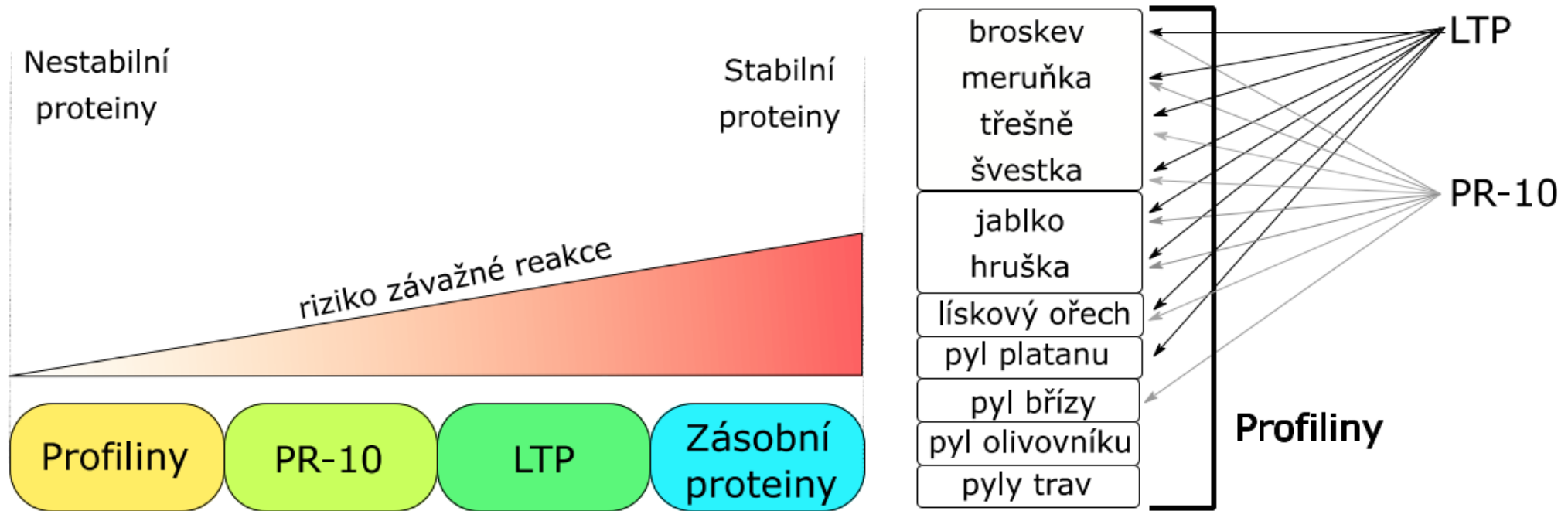


Similar epitopes

Research on Likely Cross-Reactions Between Foods(2):

If Allergic to:	Risk of Reaction to at Least One:	Risk:
<b>A legume*</b> peanut	<b>Other legumes</b> peas  lentils  beans	5%
<b>A tree nut</b> walnut	<b>Other tree nuts</b> brazil  cashew  hazelnut	37%
<b>A fish*</b> salmon	<b>Other fish</b> swordfish  sole	50%
<b>A shellfish</b> shrimp	<b>Other shellfish</b> crab  lobster	75%
<b>A grain*</b> wheat	<b>Other grains</b> barley  rye	20%
<b>Cow's milk*</b> 	<b>Beef</b> hamburger	10%
<b>Cow's milk*</b> 	<b>Goat's milk</b> goat	92%
<b>Cow's milk*</b> 	<b>Mare's milk</b> horse	4%
<b>Pollen</b> birch  ragweed	<b>Fruits/vegetables</b> apple  peach  honeydew	55%
<b>Peach*</b> 	<b>Other Rosaceae</b> apple  plum  cherry  pear	55%
<b>Melon*</b> cantaloupe	<b>Other fruits</b> watermelon  banana  avocado	92%
<b>Latex*</b> latex glove	<b>Fruits</b> kiwi  banana  avocado	35%
<b>Fruits</b> kiwi  avocado  banana	<b>Latex</b> latex glove	11%

# Panalergeny

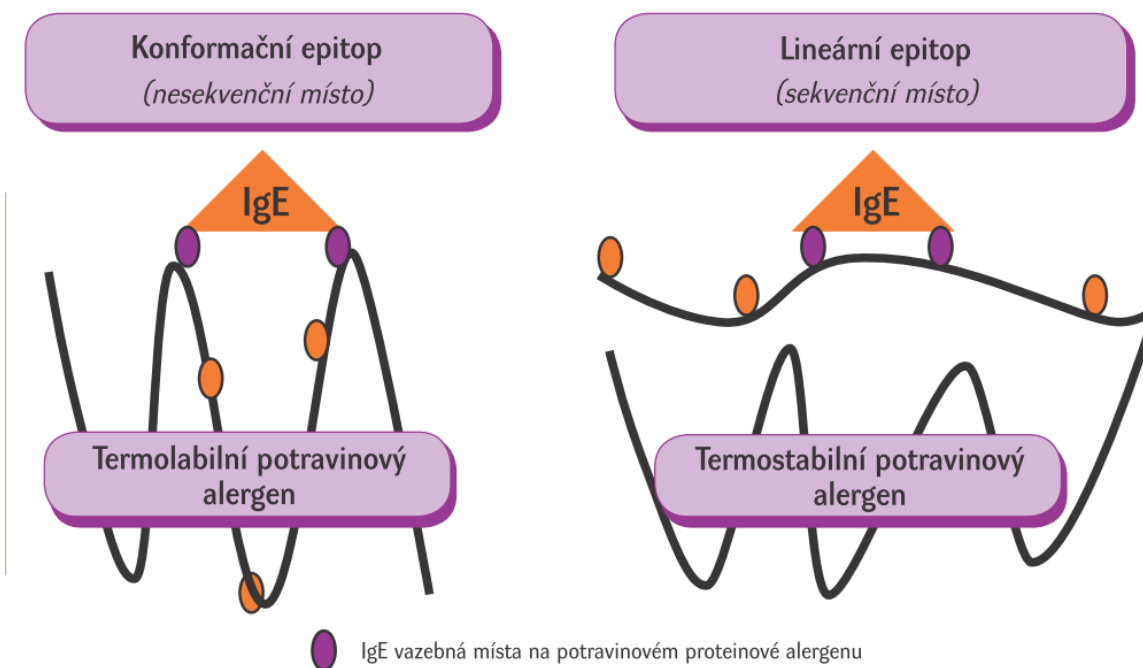


Obrázek č. 65: Základní skupiny panalergenů

# Panalergeny - stabilita

## Termolabilní alergeny:

- **Profilyny a PR-10 proteiny**
- V nativním stavu – alergenní potenciál, Povařením narušení 3D struktury molekuly → narušení epitopu → ztráta alergenicity
- Projevuje se většinou jen orálním syndromem



## Termostabilní alergeny:

- **LTP a zásobní proteiny**
- Alergenní epitop tvořen blízkými aminokyselinami ve struktuře molekuly
- Není ovlivněn varem → molekuly povařením neztrácí alergenicitu
- Může hrozit závažná alergická reakce!

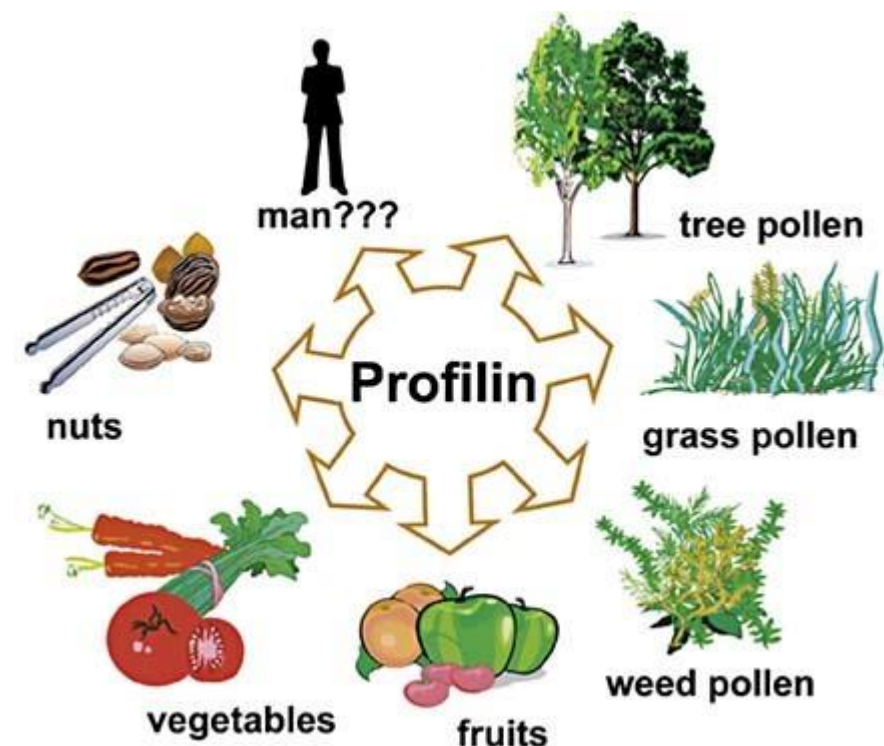
Pozn. Vzácně se vyšší teplotou může alergenicita potravin zvýšit → burské oříšky → pražení → změna konformace molekuly → vytvoření alergenního epitopu

# Panalergeny

## 1. Profiliny

- Cytoplazmatické bílkoviny v rostlinách vážící aktin  
Podílí se na rozmnožování rostlin
- **Jsou termolabilní**
- Hojně obsaženy v pylech trav, plevelů a stromů
- Patří sem např. vedlejší alergeny břízy
- U pacientů s alergií na profiliny zkřížená alergie:

Pyl → Ovoce (hruška, banán, pomeranč) →  
Zelenina (mrkev, paprika, rajče) → Ořechy

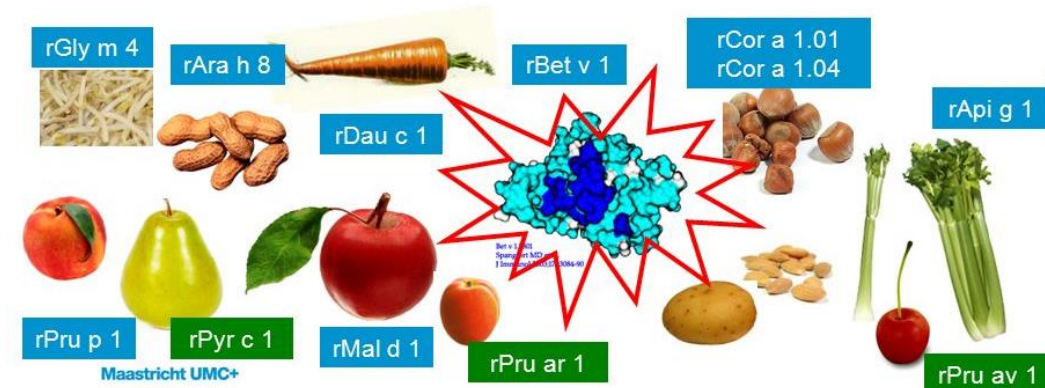


# Panalerdeny

## 2. PR-10 proteiny (pathogenesis related proteins 10)

- Termolabilní
- V dužině ovoce
- Funkce – ochrana rostliny proti bakteriím a plísním
- Proteiny homologní s hlavním alergenem břízy Bet v 1
- U pacientů pozorujeme zkříženou reaktivitu na:

Pyel břízy → ovoce (jablko, hruška) → zelenina (celer, mrkev)



## 3. LTP (lipid transfer proteiny)






- Bílkoviny transportující fosfolipidy v buněčných stěnách buněk rostlin
- Výskyt hlavně v ovoci (broskve, meruňky), arašidech (Ara h 9)
- Termostabilní
- Zde není asociace s alergií na pyl

# Panalergeny



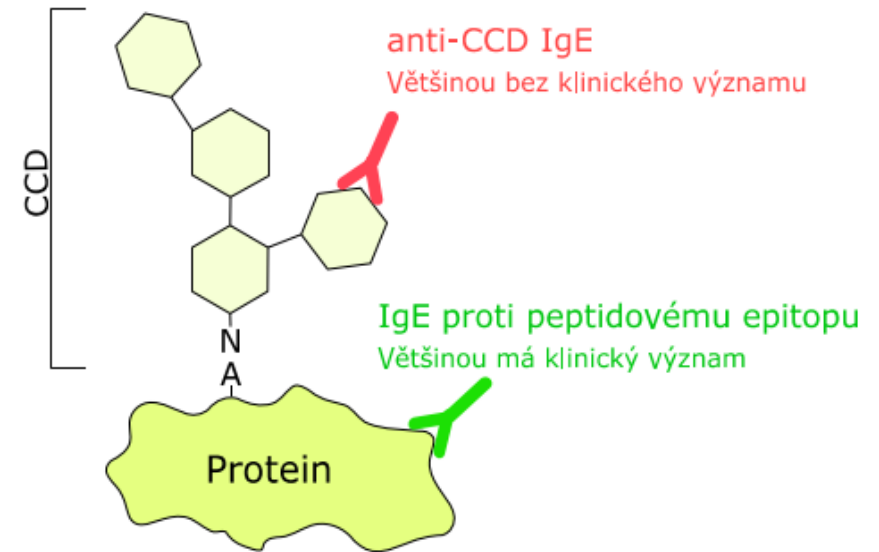
## 4. Zásobní proteiny

- Termostabilní
- Viciliny, leguminy, 2S albumin
- Vyskytují se hlavně v ořeších, semenech, peckách, **arašidech (Ara h)**, luštěninách
- Povaření potravin nezmění alergenicitu
- Hrozí vážná alergická reakce po pozření potravin

	CCD	PROFILIN	PR-10	LTP	STORAGE PROTEINS
 Peanut	MUXF3*	Bet v 2**	Ara h 8	Ara h 9	Ara h 1 Ara h 2 Ara h 3 Ara h 6
 Hazelnut			Cora 1	Cora 8	Cora 9 Cora 14
 Walnut				Jugr 3	Jugr 1
 Brazil Nut					Ber e 1
 Cashew					Ana o 3

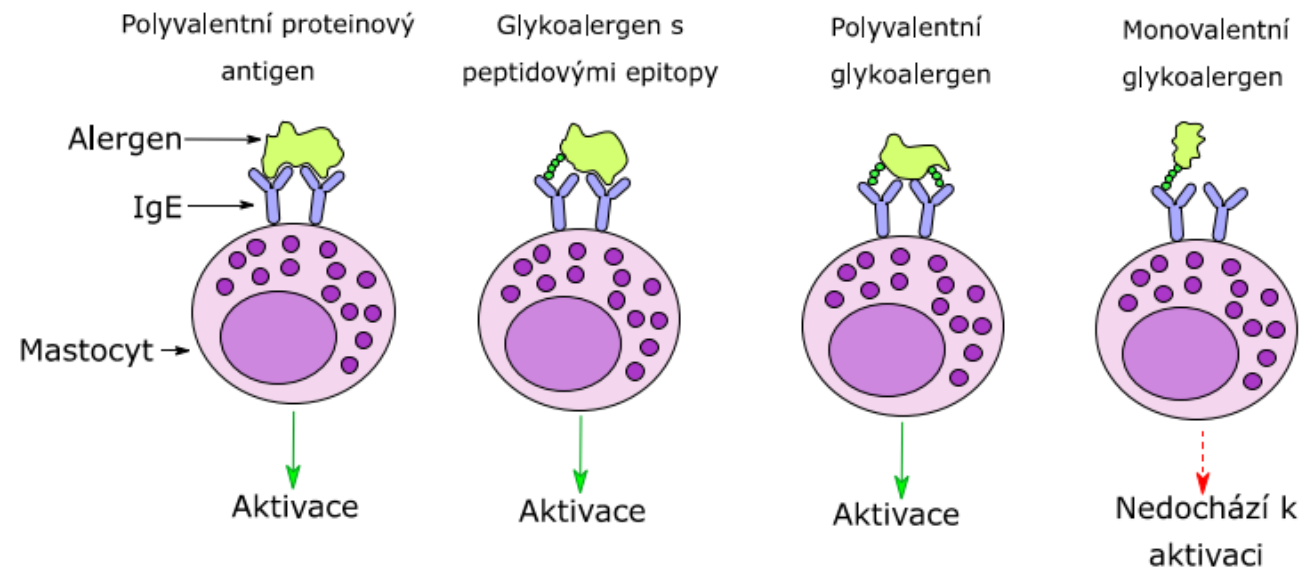
# CCD determinanty

- Většina alergenů jsou glykoproteiny – obsahují také sacharidové struktury
- Zkříženě reagující IgE protilátky se mohou tvořit i proti těmto sacharidovým strukturám (**Cross-reactive Carbohydrate Determinants**)
- Anti-CCD protilátky **většinou** nemají klinický význam
- Ale často v alergologických testech (kde se používají alergenové extrakty) způsobují **falešnou pozitivitu**
- Popsány byly např. u hrušky, mrkve, celeru, měkkýšů atd.



# CCD determinanty

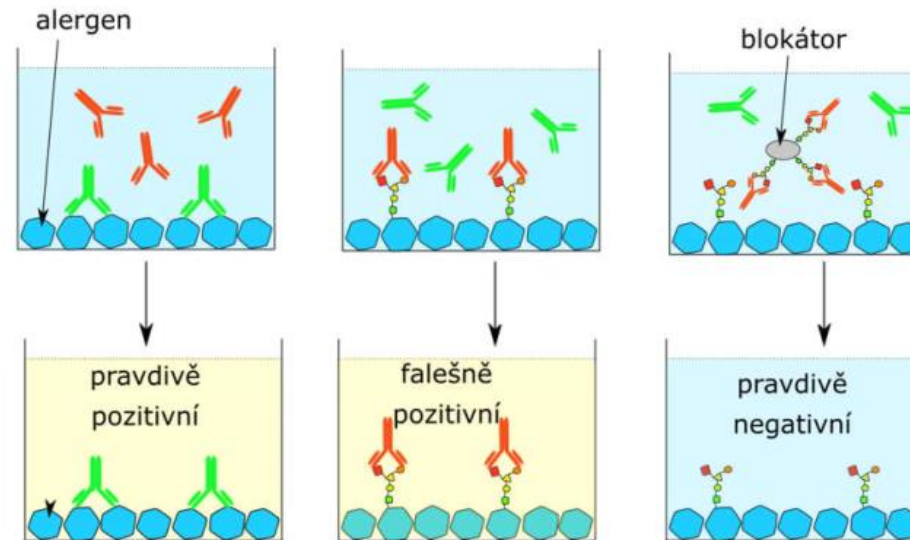
- Jestli bude mít vazba IgE se sacharidovou složkou klinický význam závisí na tom, zda se IgE váže na:
  - 1 epitop alergenu (**monovalentní glykoalergen**) → nedochází ke klinickým projevům
  - Více epitopů alergenu (**polyvalentní glykoalergen**) → dochází ke klinickým projevům → nutno určit přesný alergenní epitop





# CCD determinanty

- Pokud existuje rozpor mezi klinikou pacienta a výsledky stanovení specifických IgE protilátek, je třeba zvážit možnou falešnou pozitivitu testů způsobenou anti-CCD IgE
- Moderní testy používají postupy, které anti-CCD IgE blokují – přídavek **blokátoru** (např. ALEX)



**Obrázek č. 78: Blokování anti-CCD protilátek:** zeleně jsou značeny IgE protilátky proti peptidovým epitopům daného alergenu a červeně IgE protilátky proti sacharidovým komponentám alergenu

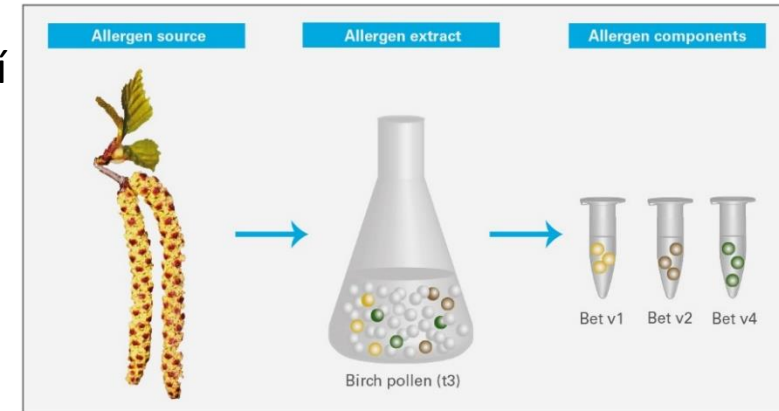
# Alergeny pro laboratorní diagnostiku

## Standardizované alergenové extrakty

- Purifikace z přírodních zdrojů
- Výrobce stanoví obsah hlavních alergenů kvantitativně (ELISA)
- Množství a aktivita alergenu se srovná se standardem
- Kromě alergenu obsahují extrakty také nealergenní složky (proteiny, sacharidy...)
- Ty mohou vést k falešné pozitivitě testů

## Rekombinantní alergen

- Ze zdroje alergenu izolována RNA
- Přepis do DNA
- Vložení DNA bakteriofága
- Hostitelem bakteriofága *E.Coli*
- *E.Coli* produkuje alergen v čisté formě
- Rekombinantní alergen umožňuje **komponentovou diagnostiku**



# Komponentová diagnostika

---

- Určí u pacienta konkrétní molekulu, která vyvolává senzibilizaci
- Např. třídy panalergenů – profiliny, PR-10, LTP, zásobní proteiny →
- Dokážeme rozlišit, zda u pacienta po podání určité potraviny hrozí **závažná reakce** → význam pro **alergenovou imunoterapii** (složení alergenů, zda má význam je pacientovi podávat)
- Dále např. reakce na včelu a vosu
  - U klasického stanovení specifického IgE na včelu a vosu bývá často přítomna zkřížená reaktivita – pacient falešně pozitivní na obojí
  - Komponentová diagnostika dokáže odlišit, zda je pacient opravdu alergický na včelu nebo vosu



# Včela nebo vosu?

21-letá studentka medicíny byla vyšetřena 3 roky po anafylaktické reakci

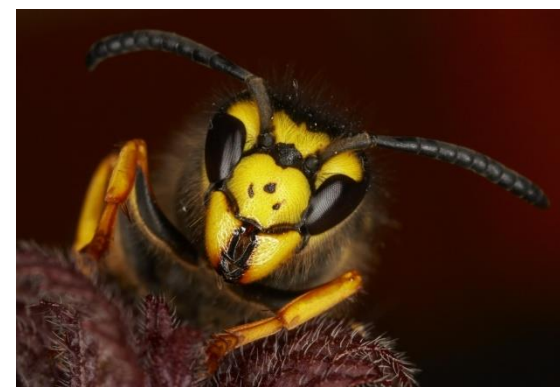
**... způsobené bodnutím neznámým hmyzem ...**

Jednalo se pravděpodobně o ...

... včelu



... VOSU



## sIgE

A. mellifera	4.30 kU/l	(class III)
V. spp.	15.20 kU/l	(class III)
P. spp.	5.34 kU/l	(class III)
V. crabro	15.10 kU/l	(class III)

## Test aktivace basofilů

	CD63	CD203c
Negativní kontrola	1 %	1 %
Pozitivní kontrola	60 %	55 %
A. mellifera	24 %	25 %
V. spp.	83 %	85 %

IgG 9,800 g/l (7,510 – 15,600)

IgA 1,180 g/l (0,820 – 4,530)

IgM 0,763 g/l (0,460 – 3,040)

**IgE 594 U/ml (0 – 100)**

ANA negativní

Tryptáza 3.07 µg/l (0.00 – 13.50)

**ALERGENOVÉ  
EXTRAKTY**

**ZKŘÍŽENÁ  
REAKTIVITA  
nebo  
DVOJÍ POZITIVITA ...**

**... THAT is the  
question!**

... THAT is the question!

## REKOMBINANTNÍ ALERGENY



**rApi m 1: 0.01 kU/l (třída 0)**



**rVes v 1: 1.28 kU/l (třída II)**  
**rVes v 5: 12.8 kU/l (třída III)**

Laboratorní diagnostika zahrnující kombinaci vyšetření specifických IgE protilátek proti alergickým extraktům a rekombinantním alergickým pomohla postavit správně diagnózu u naší pacientky. Pacientka potom podstoupila alergickou imunoterapii proti vose. Vyšetřování koncentrace specifických IgE protilátek proti alergickým extraktům není někdy v diagnostice alergií dostačující.

# Alergologické vyšetření

---

## 1. Anamnéza

- Rodinná – výskyt alergií u členů rodiny
- Osobní
  - Výskyt klinických obtíží po kontaktu s určitými alergeny
  - Inhalační alergeny, potravinové, léky, hmyz, údaje o domácím a pracovním prostředí, zvířatech
  - Jaké klinické příznaky, jak rychle se vyvíjí, jaká závažnost, jak dlouho trvají, v jakých periodách se opakují
  - Vyvíjí se vyrážka na kůži po kontaktu se šperky, pásky apod.?



Snaha vytipovat potenciální alergeny, na které bude provedeno vyšetření



# Alergologické vyšetření

---

## 2. Odběr krve

- Pro zhodnocení celkového zdravotního stavu pacienta se odebírá krev kromě alergologických parametrů také na:
  - Biochemie – základní biochemické parametry (glukóza, triacylglyceroly, cholesterol, hormony štítné žlázy...)
  - Hematologie – krevní obraz
  - Imunologie – základní screening autoprotilátek (ANA), komplement, subpopulace lymfocytů
- Pacient nemusí trpět pouze alergickým onemocněním ale i dalšími komorbiditami ...



### 3. Alergologické vyšetření *-in vivo* testy

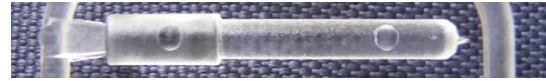
---

Lze je provést přímo v ordinaci alergologa

1. Prick testy – inhalační, potravní a zvířecí alergeny
2. Intradermální testy – blanokřídlý hmyz, léky
3. Epikutánní testy – kontaktní alergie (IV. Typ)



## 2. Narušení kůže plastovým kopíčkem



## 3. Inkubace cca 20 min



## 4. Odečet velikost pupene



## 1. Aplikace kapky alergenu

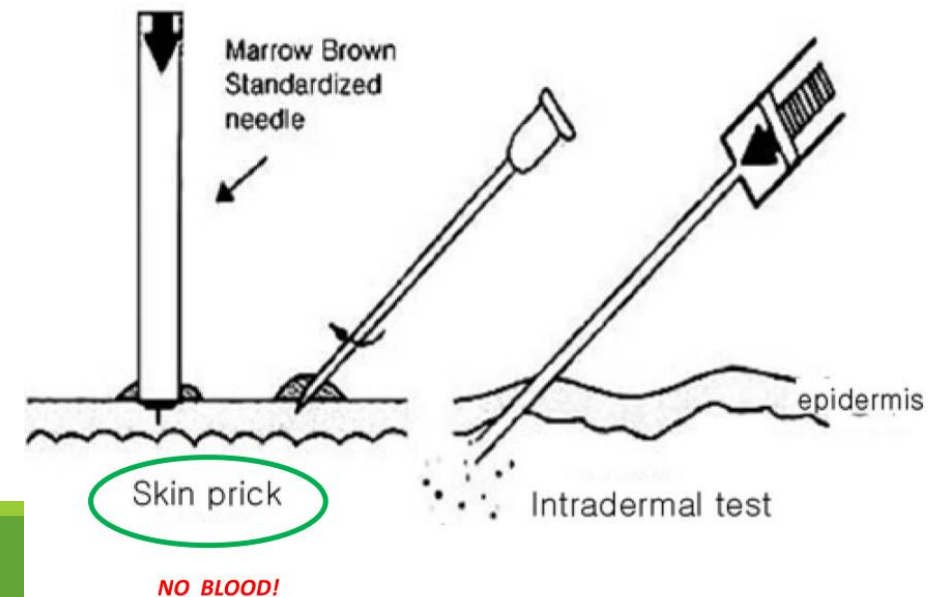


## 1. Prick testy

- Preamalytická fáze – pacient cca týden před provedením testu vyloučí léčbu antihistaminiky/kortikoidy
- Aplikace standardizovaných alergenů na volární stranu předloktí
- Součástí je také negativní kontrola (fyziol.roztok) a pozitivní kontrola (histamin)
- Kontraindikace: nespolupracující pacient, pacient co má kožní onemocnění v místě provedení testu a lidé, kterým není možné vysadit léčbu

# Intradermální test

- IV. Typ přecitlivělosti
- Alergie na léky, jedy blanokřídlého hmyzu
- Aplikace alergenu do podkoží pomocí injekční jehly
- Nevýhoda – výsledky testu závisí na hloubce vpichu – závislé na zkušenosti zdravotní sestry (příliš hluboký vpich – může být falešná negativita testu)
- Existuje nízké riziko vážné reakce (léky jsou ale výrazně naředěny, proto je riziko závažné reakce sníženo na minimum)
- Podráždění kůže může přetrvávat až 36h po provedení testu



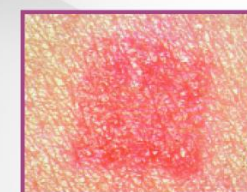


# Epikutánní test

- Diagnostika kontaktní alergie (IV.typ) – nízkomolekulární chemické látky
- Princip – aplikace podezřelých látek ve formě náplasti na zdravou kůži zad → odečet za 48, 72 a 96h
  - Pozitivní výsledek – exém v místě kontaktu
- Kontraindikace:
  - Kožní onemocnění v místě aplikace testů (záda)
  - Gravidita
  - Příliš opálená kůže
  - Imunosupresivní/immunostimulační terapie
- Nelze testovat látky toxické a s extrémními hodnotami pH



## ALLERGY PATCH TEST Positive Reactions



Weak Positive



Strong Positive



Extreme Positive

## 4. Vyšetření dýchacích cest

---

- **Měření FeNO** (frakční expirační NO) – měření oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu
  - Při eozinofilním zánětu dýchacích cest se ve vyšší míře tvoří NO
  - Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu koreluje se závažností eozinofilního zánětu
  - Výsledky se vyjadřují v ppb (parts per bilion)
- **Spirometrie**
  - Vyšetření funkčních parametrů dýchacích cest, diagnostika **obstrukce**
- **Bronchomotorické testy**
  - **Bronchodilatační test** – podání bronchodilatancia → sleduje se reverzibilita obstrukce dýchacích cest (reverzibilita ukazuje na astma)
  - **Bronchokonstrikční test** – podání metacholinu (nebo fyzická zátěž) → sleduje se, zda jsou průdušky schopny konstrikce pod vlivem vyvolávající látky (svědčí pro zánět průduškové stěny)

# 5. Alergologické testy *in vitro* - přehled

---

## Serologické testy

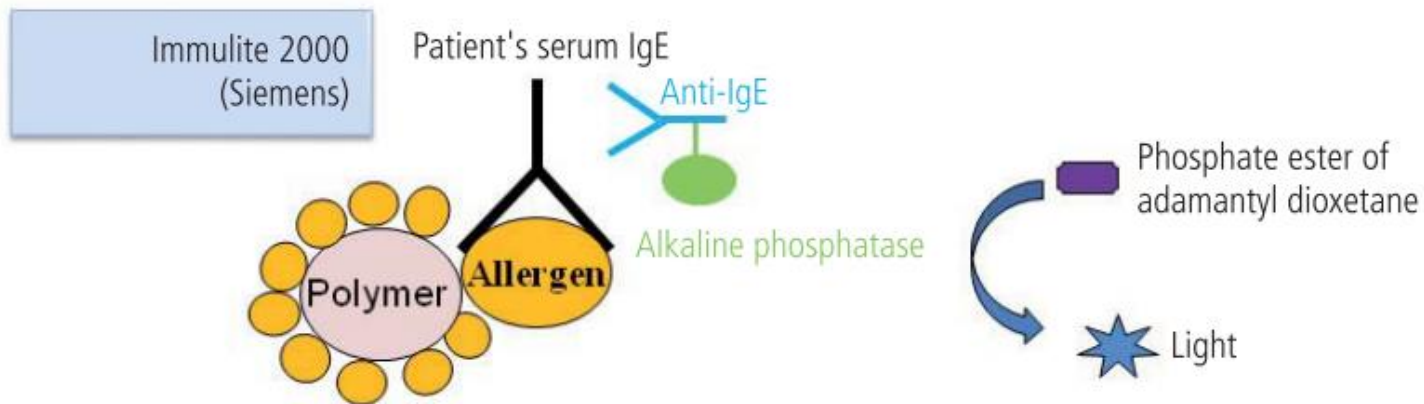
1. Nefelometrie – stanovení celkového IgE
2. Immulite 2000 – stanovení specifického IgE, eozinofilní kationický protein (ECP)
3. AlaSTAT – stanovení specifického IgE
4. ImmunoCap Phadia – stanovení tryptázy a vybraných rekombinantních alergenů
5. MADx Allergy Explorer, Immuncap ISAC – multiplex metody - stanovení až 280 alergenů

## Buněčné testy

1. Stanovení počtu eozinofilů
2. Test aktivace bazofilů (BAT)
3. Proliferace lymfocytů

# Immulate 2000 – specifické IgE

- Enzymově zesílená chemiluminiscence
- Pevná fáze – 1 velká plastová kulička potažená biotinem
- Přidáme antigen konjugovaný se streptavidinem → naváže se na kuličku
- Přidáme pacientovo sérum → vazba alergen specifického IgE
- V dalším kroku – přidáme anti-IgE protilátku značenou alkalickou fosfatázou → po přidavku **dioxetan-adamantyl-fosfátu** odštěpí enzym fosfát → vzniká nestabilní aniont, který při rozkladu uvolní emisi fotonů – zaznamená se počet záblesků

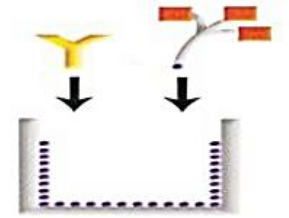


Celkové IgE hranice positivity:  
**100 IU/ml**

# AlaSTAT

- Jamky destičky potaženy biotinem
- Do jamek se přidá alergen značený biotinem + pacientovo sérum
- Protilátky IgE reagují v tekutém prostředí s alergenem
- Přídavek avidinu → vazba komplexu alergen-IgE na stěnu jamky
- Promytí
- Přídavek anti-IgE značeného enzymem → inkubace → promytí
- Přídavek substrátu → přeměna na barevný produkt
- **Kolorimetrická detekce**

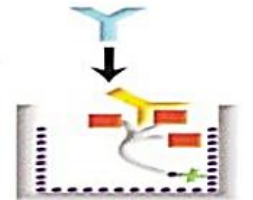
## AlaSTAT



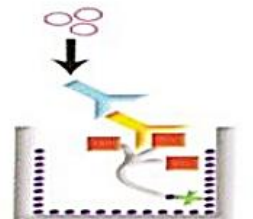
Serum and allergens incubate in liquid phase.



Liquid allergens bind to serum antibodies and to the coated well via added ligand.



Antibody conjugate binds to serum IgE.

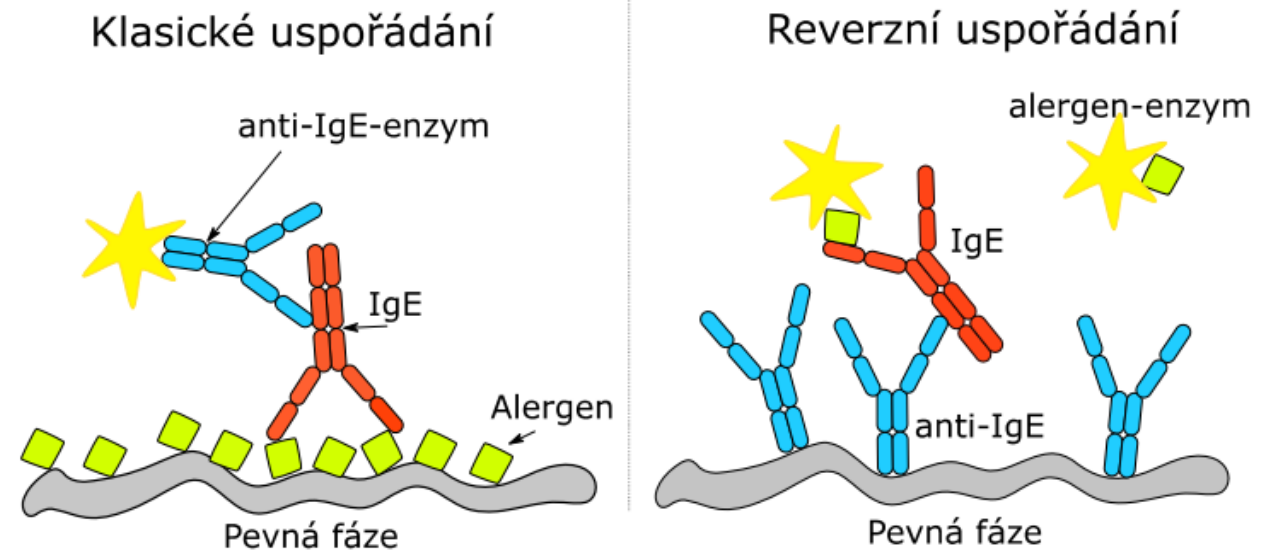


Substrate initiates colorimetric reaction.



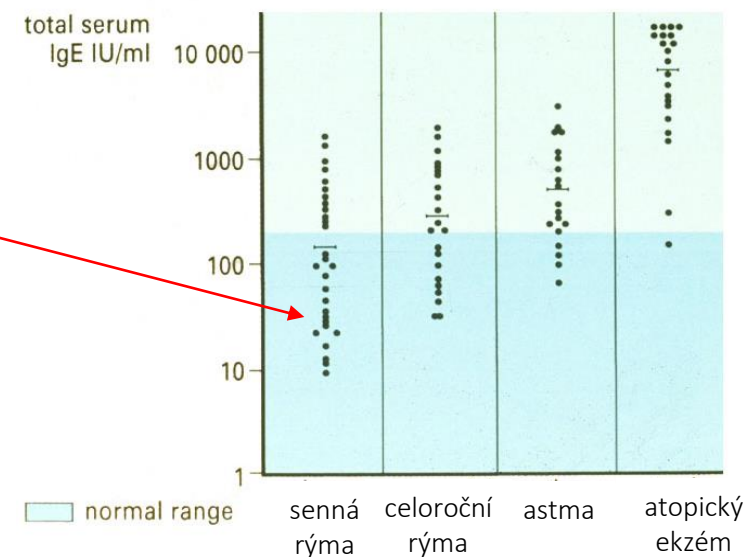
# Stanovení specifického IgE a alergenová imunoterapie

- Alergenová imunoterapie → cílem navodit u pacienta tvorbu alergen specifického IgG<sub>4</sub>
- IgG<sub>4</sub> nemá schopnost vázat se na vysokoafinitní Fc-ε receptory bazofilů → nedochází k rozvoji alergické reakce
- Alergen specifické IgG<sub>4</sub> ale může v testu obsadit alergen a zabránit tak vazbě IgE → detekujeme falešně nízké hladiny IgE
- Řešení – reverzní uspořádání detekčního systému



# Celkové a specifické IgE

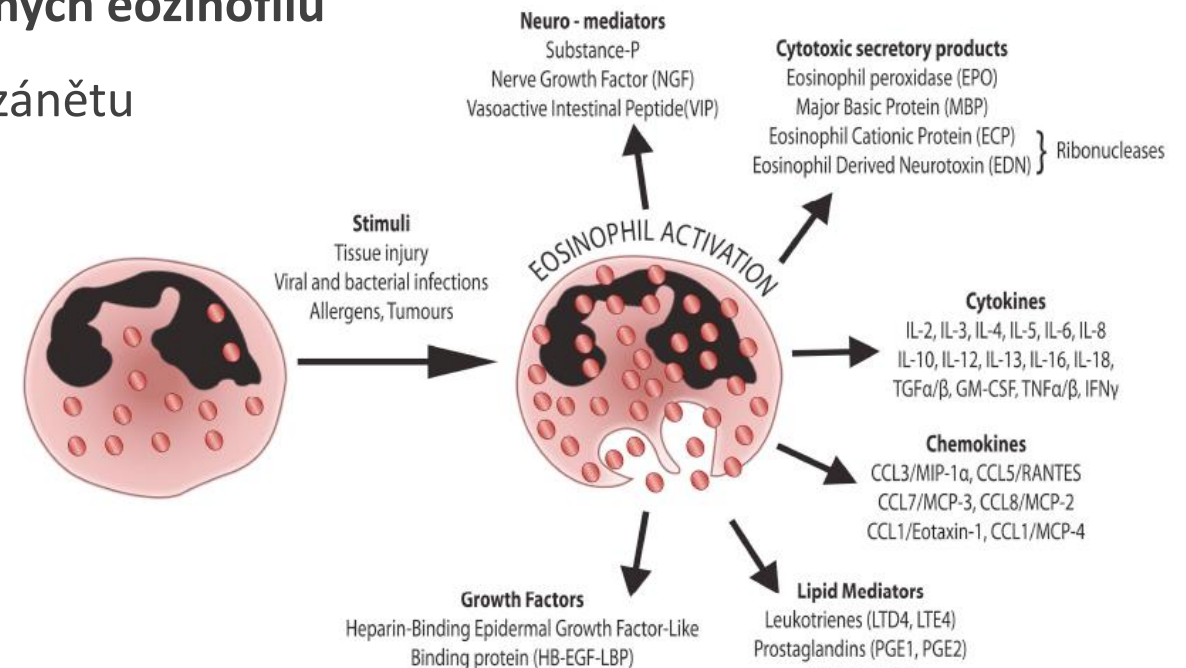
- Celkové IgE - norma **0-100 IU/ml**
- Celková koncentrace IgE koreluje s přítomností alergického onemocnění (většinou)
  - Specifita 90 %, ale senzitivita jen 30-40 %
- Pouhé stanovení celkového IgE k určení přítomnosti alergie nestačí, protože:
  - **Vysoké IgE** také u jiných diagnóz, např. nosní polypóza, Wiskot-Aldrich syndrom, hyper IgE syndrom, AIDS, parazitární onemocnění
  - **Nízké IgE** - 60 -70 % alergiků nemusí mít celkové IgE zvýšeno nad 100 UI/ml
- Specifické IgE
  - Interpretace výsledků někdy nemusí být jednoznačná (zkřížená reaktivita)
  - Specifita 95 %, senzitivita 75-85 %
  - Pozn. Specifické IgE lze také stanovit metodikami ELISA a RAST, viz skripta pro Mgr. Studenty:



<https://portal.med.muni.cz/clanek-695-vysetrovaci-metody-v-imunologicke-a-alergologicke-laboratori.html>

# Immulite 2000 – stanovení ECP

- Princip stanovení stejný jako stanovení specifického IgE
- Normální hladina v séru < **13,5 ng/ml**
- Eozinofilní kationický protein je produkt **aktivovaných eozinofilů**
- Jeho hladina koreluje se závažností eozinofilního zánětu
- Používá se k monitorování průběhu a léčby **eozinofilního alergického astmatu**



# ImmunoCap – fluorimetrie

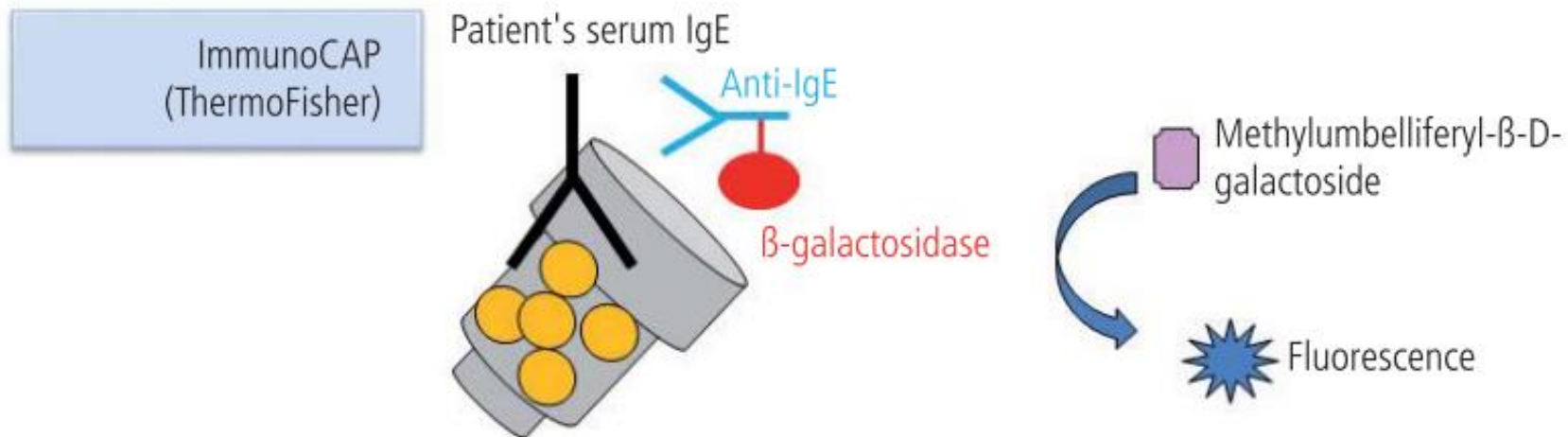


Pevná fáze – keříky, které obsahují aktivovanou celulózu – velká plocha

Na celulózu navázán alergen → na něj vazba pacientova IgE

V dalším kroku přidavek anti-IgE protilátky značené  $\beta$ -D-galaktosidázou

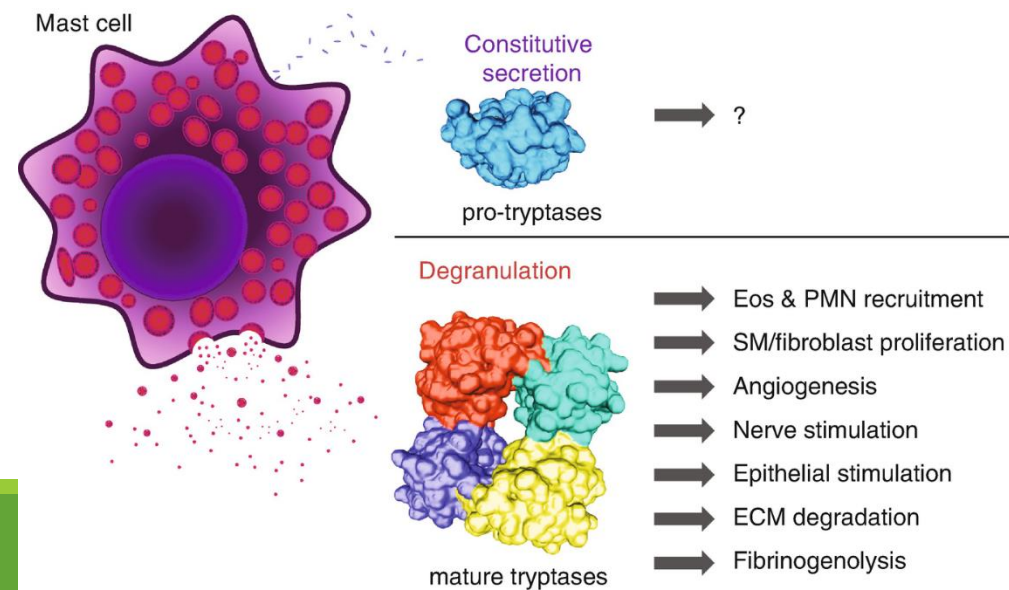
Přídavek substrátu → Methylumbelliferyl-  $\beta$ -D-galaktosid → enzym odštěpí  $\beta$ -D-galaktosid a vznikne **methylumberiferon** → **excitace světlem** → **emise fluorescenčního záření** (na rozdíl od Immulitu zde potřebujeme žárovku (Hg-Výbojka) k excitaci methylumbeliferonu!)



- **Stanovení tryptázy**
- **Stanovení rekombinantních alergenů**

# ImmunoCap - Tryptáza

- Uvolňuje se po aktivaci žírných buněk alergenem → **marker anafylaktické reakce**
  - Diferenciální diagnostika anafylaktických reakcí polékových, po bodnutí hmyzem
  - Také stanovení post mortem – určení anafylaktické reakce jako příčiny úmrtí
- Tryptázu tvoří také mastocyty → výrazné zvýšení u **systemových mastocytóz**
- Výhoda tryptázy (např. v porovnání s histaminem):
  - Není na rozdíl od histaminu uvolňována bazofily v krvi – vyloučena falešná pozitivita *in vitro*
  - Je v krvi stabilní kolem 48 h → možno stanovit post mortem
  - Při uchování vzorku při chladničkové teplotě – stabilní až týden
- Norma – do **13,5 ug/l**



# ImmunoCap - rekombinantní alergenů (RAL)

- Vybrané rekombinantní alergenů:

- Břıza – Bet v 1, Bet v 2
- Bojínek – Phi p 1, Phi p 5b
- Vosík – Pol d 5
- Vosa – Ves v 5
- Včela

- Koncentrace specifického IgE vůči komponentám členěna do **6 tříd**: 0-6

- Nultá třída – koncentrace **<0,35 IU/ml = negativní**
- Čím vyšší třída, tím má pacient více specifického IgE vůči dané komponentě
- S rostoucí třídou roste pravděpodobnost klinických příznaků onemocnění a jejich závažnost

sIgE		
A. mellifera	4.30 kU/l	(class III)
V. spp.	15.20 kU/l	(class III)
P. spp.	5.34 kU/l	(class III)
V. crabro	15.10 kU/l	(class III)

# ALEX (allergy explorer)

- Čipová technologie – multiplex metoda
- Stanovení až 280 alergenů v jediném kroku (čip obsahuje jak alergenové extrakty, tak vybrané rekombinantní alergeny)
- Klinik v ordinaci indikuje pacienty pro vyšetření ALEX pouze na základě klinických projevů – pacienti, kteří udávají mnohočetné alergie (inhalační, potravinové)
- Hodí se pro pacienty kde je podezření na **zkřížené alergie**
- Hladina celkového IgE nehraje při indikaci roli
- Hodnocení výsledků probíhá pomocí počítače – speciální čtečka čipů, software
- Výsledky – kUA/l, 4 semikvantitativní třídy
- Video – pracovní postup:  
[https://www.youtube.com/watch?v=k1ET1jLVmp4&ab\\_channel=DasitGroupS.p.A.](https://www.youtube.com/watch?v=k1ET1jLVmp4&ab_channel=DasitGroupS.p.A.)



# ALEX (allergy explorer)



ALEX – čipy obsahují až 280 alergenů, v průběhu inkubace pacientova séra se přidává také speciální diluent, který obsahuje **blokátor, který eliminuje vazbu anti-CCD IgE**

2. Přídavek diluentu  
a 100ul pacientova séra

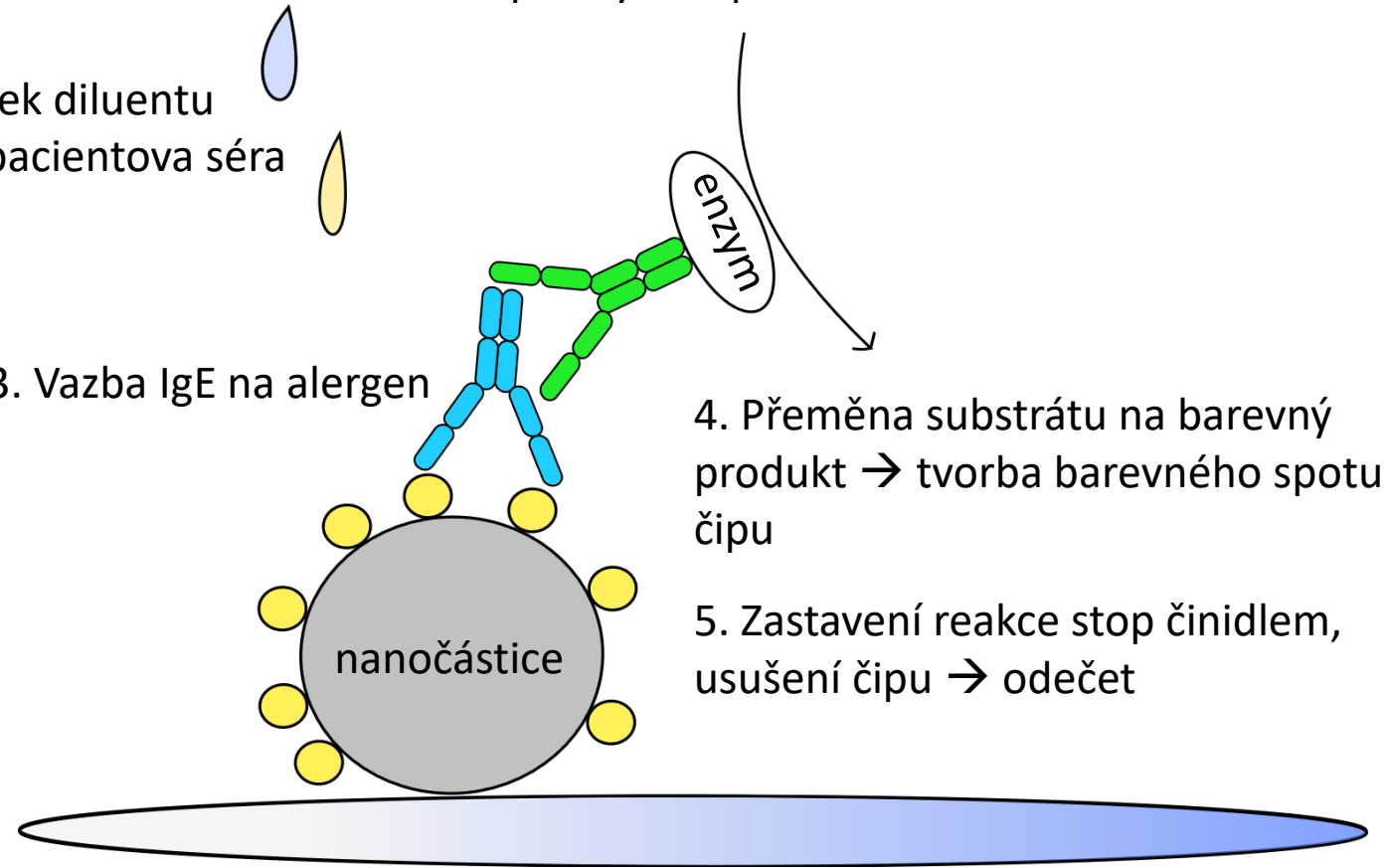
3. Vazba IgE na alergen

4. Přídavek anti-IgE značené enzymem  
→ promytí → přídavek substrátu

4. Přeměna substrátu na barevný produkt → tvorba barevného spotu na čipu

5. Zastavení reakce stop činidlem, usušení čipu → odečet

1. Na čipu jsou ve formě spotu imobilizovány nanočástice potažené alergenem - je dána přesná poloha spotu na čipu pro konkrétní alergen








# ALEX (allergy explorer)



- Využití:
  - Indikace pro specifickou imunoterapii
  - Vyhodnocení rizik pro pacienta s cílem zabránit závažným alergickým reakcím
  - Získáváme molekulární informace o zkřížené reaktivitě

Například zásobní proteiny jako jsou Ara h 1,2,3 nebo 6 mohou vyvolat alergické symptomy vedoucí až k anafylaktickému šoku. Naopak, Ara h 8, protein PR-10 obvykle nevyvolává závažnější problém, přitom ale vede k tomu, že výsledky testu extraktu jsou pozitivní, což vede k určité nejistotě na straně lékaře i pacienta. Podobné konstelace se objevují i u dalších potravinových alergenů, např. sóji, lískových ořechů či vlašských ořechů.

	CCD	PROFILIN	PR-10	LTP	STORAGE PROTEINS
 Peanut	MUXF3*	Bet v 2**	Ara h 8	Ara h 9	Ara h 1 Ara h 2 Ara h 3 Ara h 6
 Hazelnut			Cora 1	Cora 8	Cora 9 Cora 14
 Walnut				Jugr 3	Jugr 1
 Brazil Nut					Ber e 1
 Cashew					Ana o 3

# ImmunoCap ISAC

- Taktéž biočipová technologie
- Na rozdíl od ALEXe se zde používá k detekci **anti-IgE značená fluorochromem**
- Výsledkem tedy není barevná reakce, ale odečítá se fluorescence pomocí speciálního laserového snímače

	 <b>ISAC</b> (Thermofisher)	 <b>ALEX</b> Allergy Explorer (MADx)
Složení	112 komponent 51 alergenových zdrojů	125 komponent + 157 extraktů 160 alergenových zdrojů
Biologický materiál množství	plasma, sérum 30 µl	plasma, sérum 100 µl
Doba trvání testu	cca 4 hodiny	cca 4 hodiny
Doba odezvy	delší doba odezvy 3-4 pacienti/test	krátká doba odezvy 1 pacient/test
		stanovení celkového IgE <b>Inhibice CCD</b>

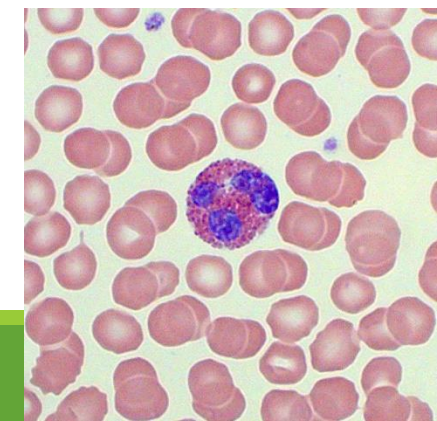
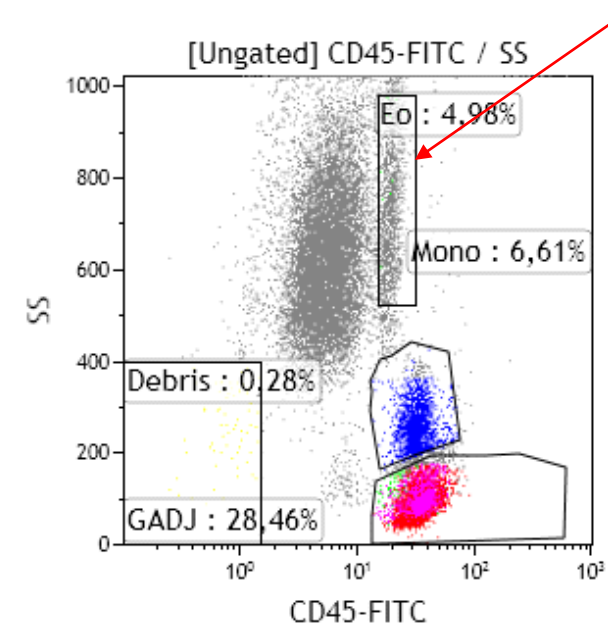
# Buněčné testy v alergologii

---

1. Stanovení počtu eozinofilů (I.typ přecitlivělosti)
2. Test aktivace bazofilů (BAT) (I.typ přecitlivělosti)
3. Test proliferace lymfocytů na pozdní alergickou reakci (IV. typ přecitlivělosti)

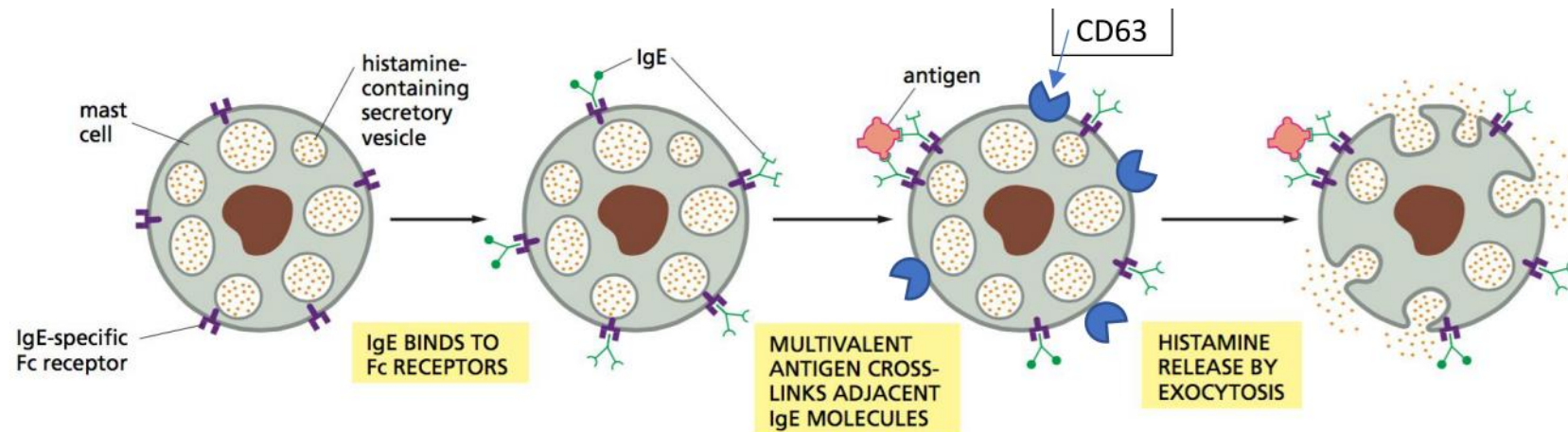
# Stanovení počtu eozinofilů

- Princip – hematologický analyzátor
    - Hydrodynamická fokusace vzorku
    - Impedanční vlastnosti buněk - počet
    - Průchod světelným paprskem – vlastnosti o velikosti a granularitě
  - Krevní diferenciál dospělého člověka:
    - Lymfocyty: 20-45 %
    - Monocyty 2-12 %
    - Neutrofily 50-70 %
    - **Eosinofily 1-3 %**
    - Bazofily < 1 %
- Jak se liší zastoupení lymfocytů u dětí?
- Zvýšení eozinofilů – alergická, parazitární onemocnění...
  - Použití – monitoring eozinofilního astmatu
  - Při znalosti absolutního počtu leukocytů lze absolutní počty buněk dopočítat
    - Leukocyty  $4-10 \cdot 10^9/l$




# Test aktivace bazofilů (BAT)

- Bazofily v neaktivovaném stavu exprimují v nízké míře znak CD203c, jsou CD63 negativní
- Při aktivaci a degranulaci se zvyšují znaky **CD63** a CD203c → měření pomocí průtokové cytometrie
- Provedení testu – prestimulace plné krve s IL-3 → následuje přidavek alergenu → inkubace → promytí → značení protilátkami (anti-CD63, anti-CD203c, anti-IgE) → promytí → lýza erytrocytů



# BAT – alergený

---

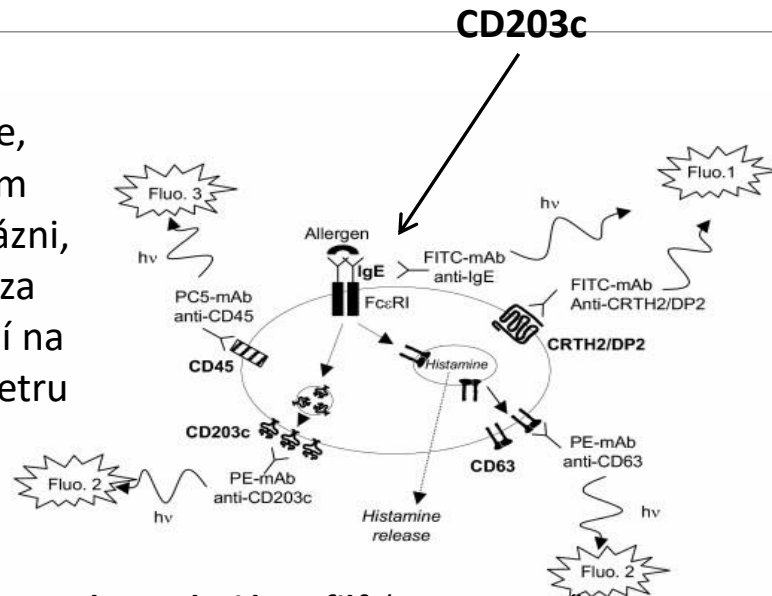
- Většinou se na BAT používají alergený z prick testů
- U podezření na lékové alergie doktor spolu s krví zasílá do laboratoře podezřelý lék → v laboratoři rozdrčen, přefiltrován a naředěn
  - Pozn. v minulosti se používaly k provedení BAT i potraviny, protože neexistovaly standardizované alergenové extrakty → v laboratoři se potravina rozdrtila, naředila a výsledný roztok se přefiltroval
- U každého BAT testu se používá ředění alergenu v pořadí 10krát, 100krát a 1000krát → proč?  

- Někdy může být koncentrace alergenu natolik velká, že bazofily se výrazně naaktivují a během inkubace podlehnou nekróze → výsledkem měření je falešná negativita
- Proto se může stát, že např. při ředění 10krát je reakce negativní, ale pozitivní v ředění 100krát!

# BAT

funkční test umožňující vyšetření aktivace bazofilů po setkání se s určitým alergenem *in vitro*

Na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)

Vyšetření periferní heparinované krve, stimulace alergenem při 37 °C ve vodní lázni, zastavení reakce, lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru

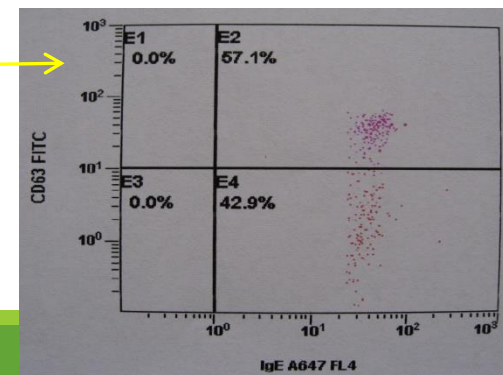
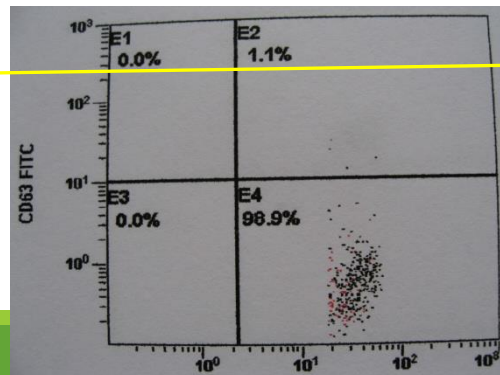
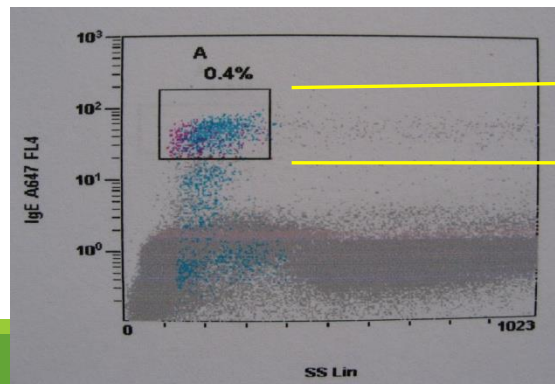


Založen na expresi aktivačního znaku (**CD63**) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem *in vitro*

Reakce přecitlivělosti jsou podstatou alergických onemocnění. Reakce přecitlivělosti I. typu neboli **IgE** **mediovaná alergie** - je zprostředkována protilátkami IgE. IgE se naváže na bazofily ve fázi senzibilizace. Při dalším setkání s alergenem – alergen přemostí IgE, to vede k aktivaci bazofilů - masivnímu uvolnění produktů degranulace bazofilů a mastocytů → **zvýšená exprese CD63 a CD203c** na aktivovaných bazofilech.

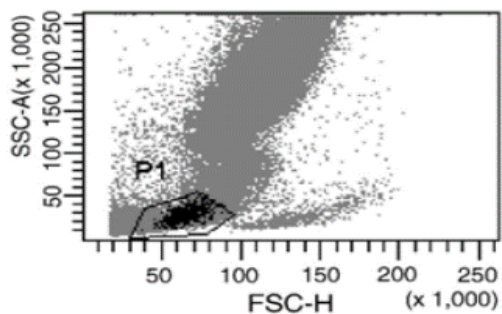
ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)  
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)

Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů

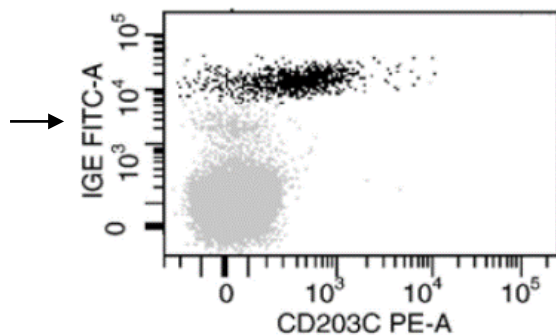


# BAT – gatovací strategie

(Pacient alergický na kočku – alergen *Fel d*)



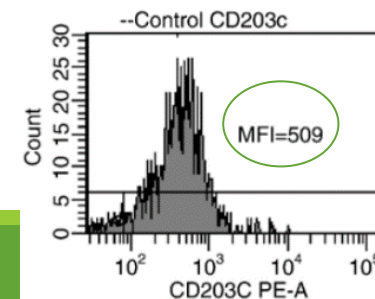
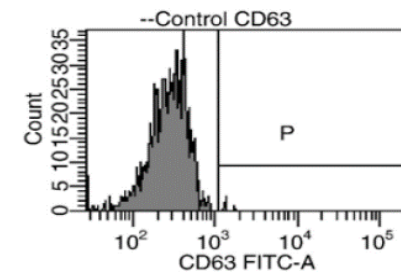
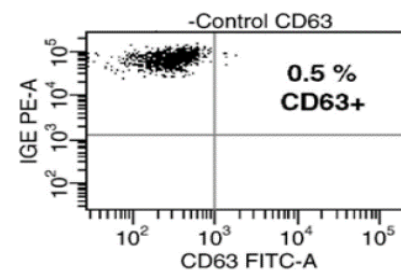
1. Na Forward scatteru a Side scatteru gatovány lymfocyty



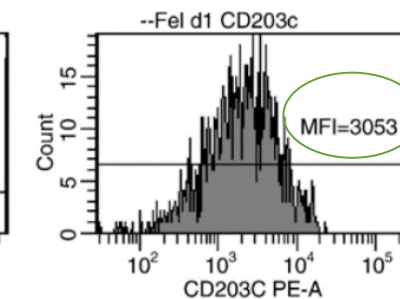
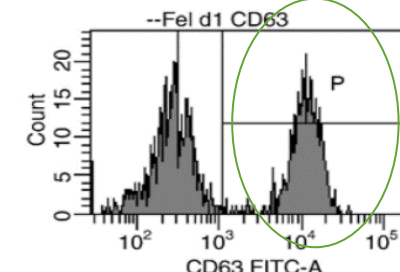
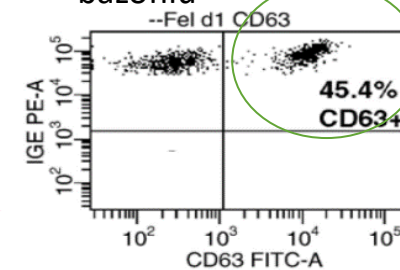
2. Z lymfocytů gatovány pouze IgE pozitivní buňky - bazofily

3. Bazofily – sledujeme CD63 a CD203c

Negativní kontrola  
Bazofily jsou CD63 neg.

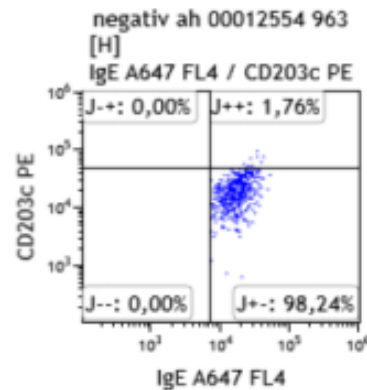
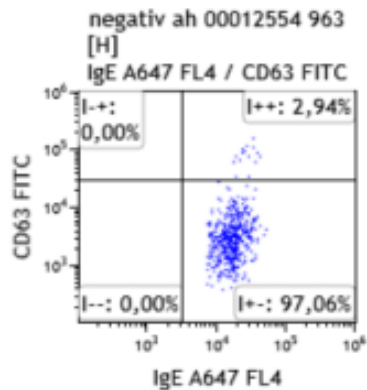
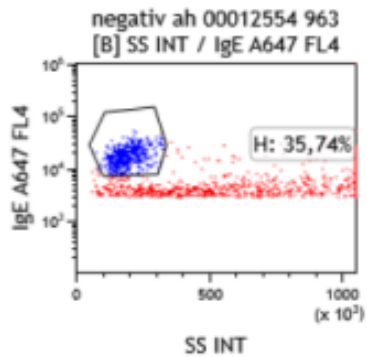


Pozitivní pacient – vidíme populaci CD63 pozitivních bazofilů

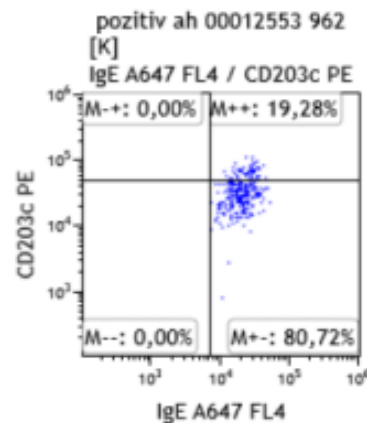
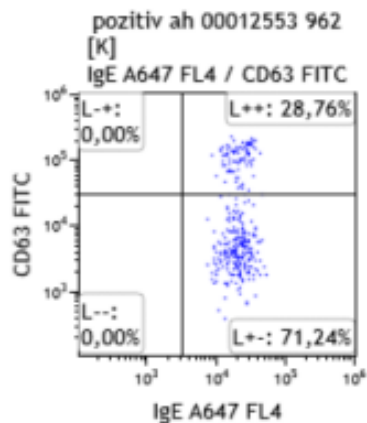
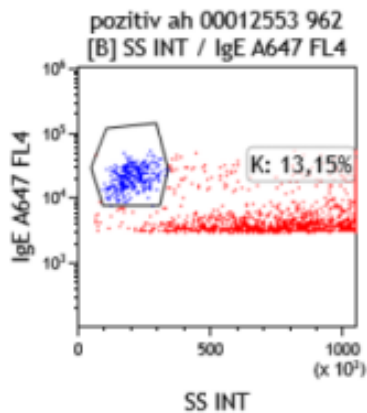




## Negativní kontrola



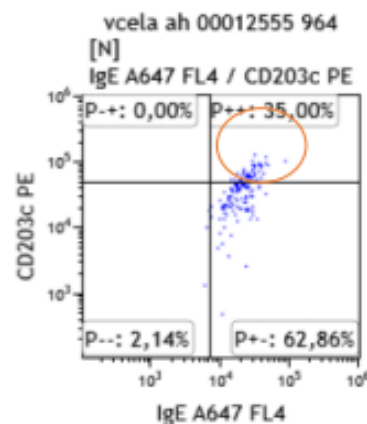
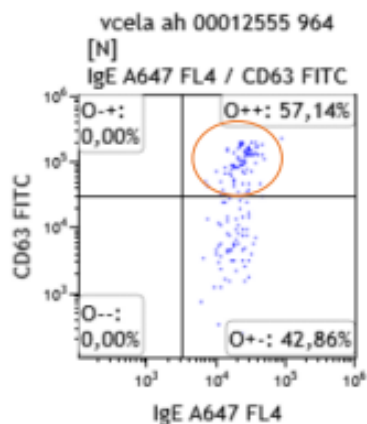
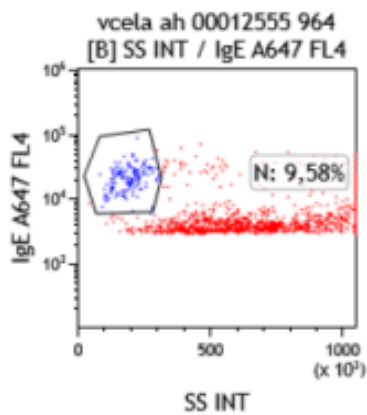
## Pozitivní kontrola



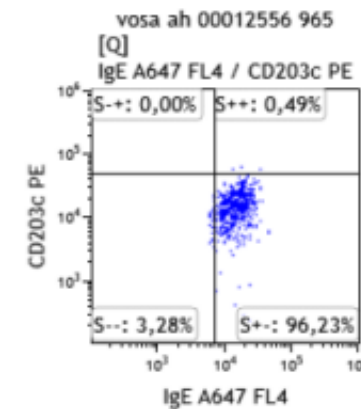
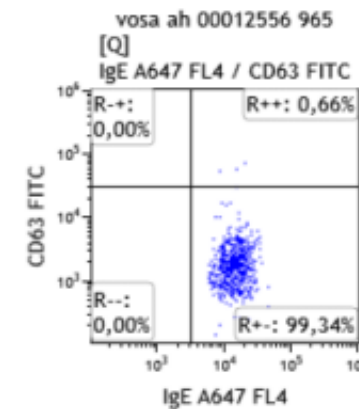
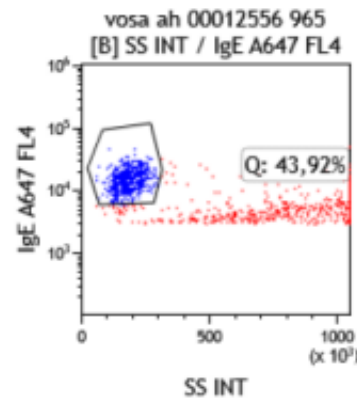
- Při vyšetření BAT u pacienta je součástí testu vždy:

- Pozitivní kontrola (stimulace fMLP)
- Negativní kontrola (PBS)
- **Zdravá kontrolní osoba!!** (ověření funkčnosti celého testu a aby bylo pacienta s čím srovnat)
- U BAT totiž neexistují konkrétní referenční meze

## Včela

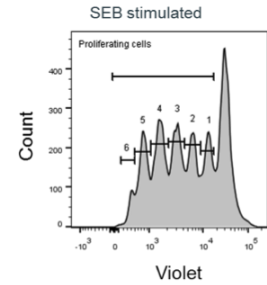
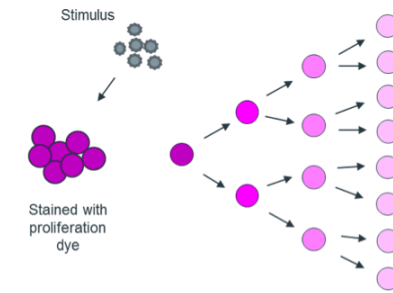


## Vosa



# Proliferace lymfocytů

PBMCs



- Pacienti se závažnými reakcemi na léky
- Princip: inkubace lymfocytů pacienta s podezřelým lékem 7 dní v médiu → poté měření proliferace
  - Součástí testu též negativní kontrola (PBS), pozitivní kontrola (PHA, ConA) a zdravá kontrolní osoba!
- Pokud lymfocyty proliferují, je daný lék považován za spouštěč pozdní alergické reakce (IV. Typ přecitlivělosti dle Coombse a Gella)
- Úskalí:
  - Testován je přímo lék, ale ne jeho metabolity (některé léky se biotransformují na metabolity, které mají daný účinek)
  - Některé léky přímo působí jako inhibitory proliferace (např. prostaglandin E2 → útlum produkce IL-2)
  - Možnost falešné positivity bez klinických příznaků pacienta → nutno vždy hodnotit výsledky spolu s klinickými daty

Rychlé vyhledávání

Edukační weby

Digitální video

Materiály k přednáškám

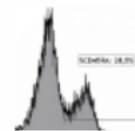
Obrazové kasuistiky

## Vyšetřovací metody v imunologické a alergologické laboratoři




Autor: [Marcela Vlková](#), Roman Hakl, Zita Chovancová, Julie Štíchová

Publikováno: 5.12.2019, poslední úpravy: 23.3.2020












Obor: [Imunologie](#), [alergologie](#), [Laboratorní diagnostika](#) | Pracoviště: [Ústav klinické imunologie a alergologie](#)



Skripta jsou určena zejména pro studenty předmětu Klinická imunologie magisterského oboru Bioanalytik a doplňují skripta Základy vyšetření v klinické imunologii. Skripta mají za úkol seznámit studenty se základy moderních testů v imunologické buněčné laboratoři, významná část je věnována i novým metodám v alergologické diagnostice. Skripta jsou doplněna i o kapitulu o klinickém využití monoklonálních protilátek; jedná se o velmi moderní směr klinické medicíny, se kterým musí být seznámeni i studenti nelékařských medicínských oborů.

Příloha	Datum	Velikost	Přístupnost [?]	Klinicky citlivé [?]	Licence
 <a href="#">Vyšetřovací metody v imunologické a alergologické laboratoři</a>	 5.12.2019	1.4 MB	uživatel vzdělávací sítě MEFANET	–	

### 4-D hodnocení:

 Skripta a návody	 Edukační weby a atlasy	 Digitální video	 Prezentace a animace	 Obrazový materiál – kasuistiky	 E-learningové kurzy (LMS)	 Recenzováno <b>informace</b> Ohodnoťte (text truncated)
						

✘ Nemáte požadované oprávnění:

**uživatel vzdělávací sítě MEFANET**

[ [více informací o autentizačním rámci sítě MEFANET](#) ]



[Přihlášení uživatelů sítě MEFANET a české akademické federace identit eduID.cz bez nutnosti registrace \[?\]](#)

### Pro registrované uživatele **mimo sít' MEFANET**

Uživatelské jméno (e-mail):

Heslo:

Odeslat

**Nejste zaregistrováni?** Prosím [prostudujte si registrační pokyny a vyplňte registrační formulář](#).

**Zapomněli jste heslo?** [Vyžádejte zde](#)