



# Alergologické vyšetření

---

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

ÚKIA - FNUSA

Obor: Bioanalytik, jaro 2021

# Alergie

---

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

Tyto antigeny se nazývají alergeny.



# 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

# 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

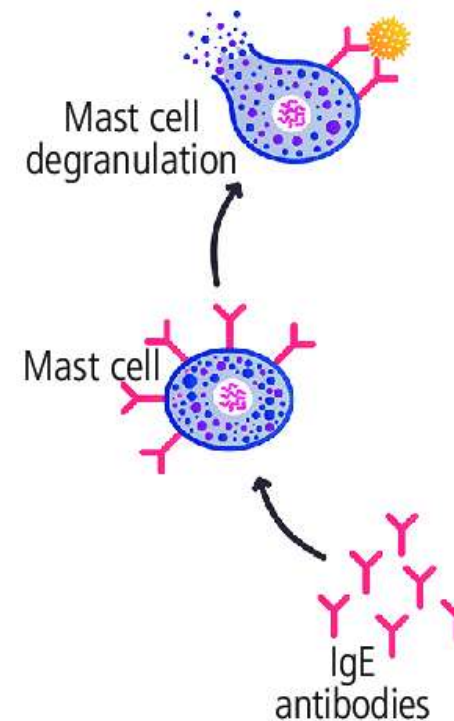
## 2. Časná fáze alergické reakce (minuty po styku)

- Aktivace žírných buněk alergenem → degranulace

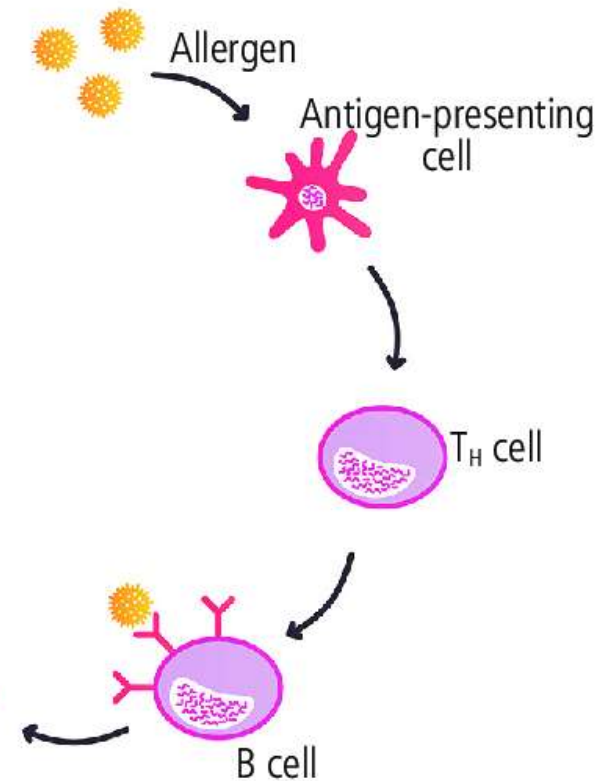
## 3. Pozdní fáze alergické reakce (hodiny po styku)

- Syntéza metabolitů kyseliny arachidonové – leukotrieny, tromboxany, prostaglandiny

## 2. Časná a pozdní fáze alergická reakce



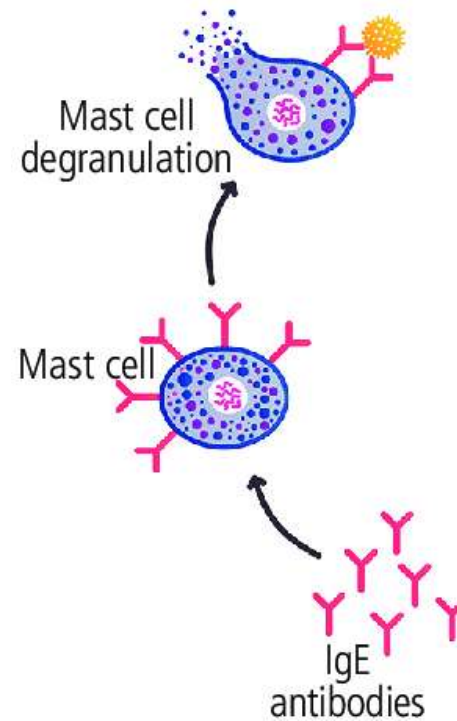
## 1. fáze senzibilizace



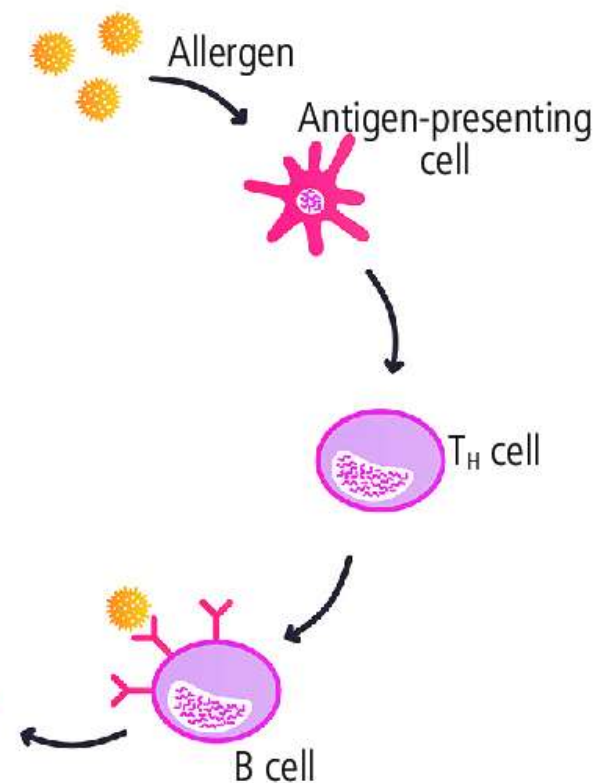
# Přecitlivělost I. Typu

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

2. Časná a pozdní fáze  
alergická reakce



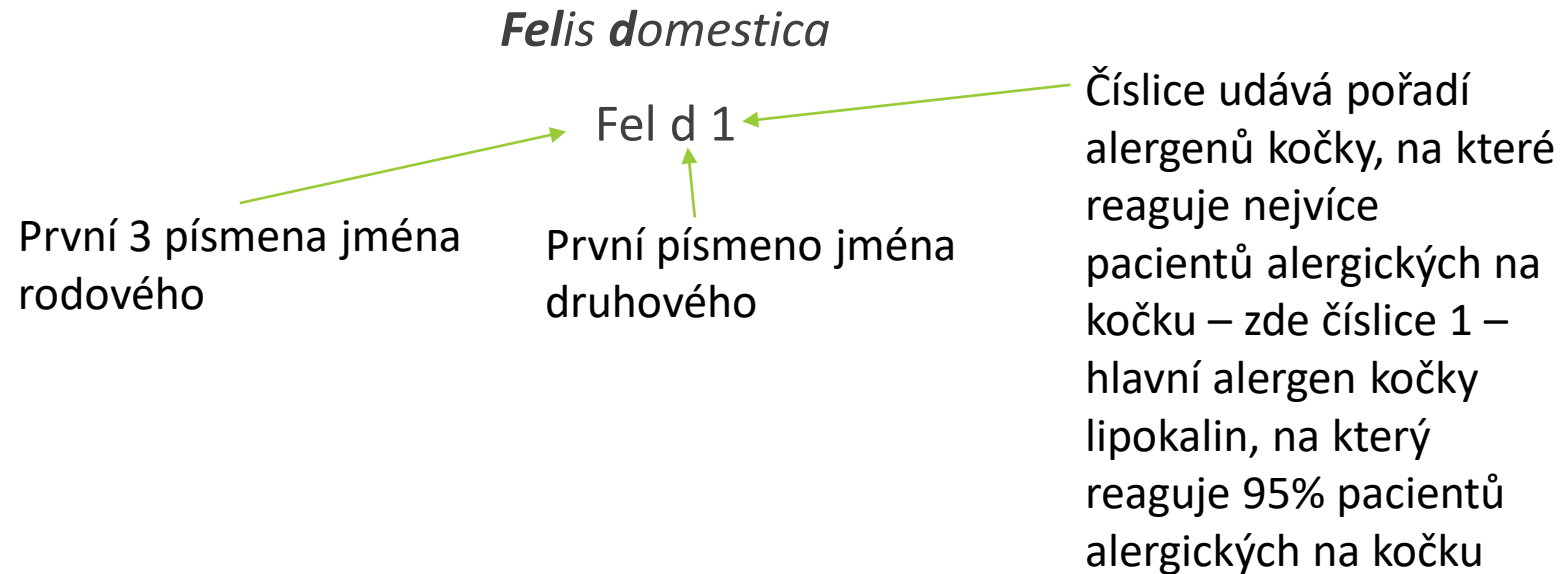
1. fáze senzibilizace



# 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 – alergeny potravinové, senzibilizace orální cestou**

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

## **Alergeny II. Třídy – alergeny inhalační**

- 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 patogenezí (obrana rostliny – hevaminy – funkce podobná lysozemu)





# 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

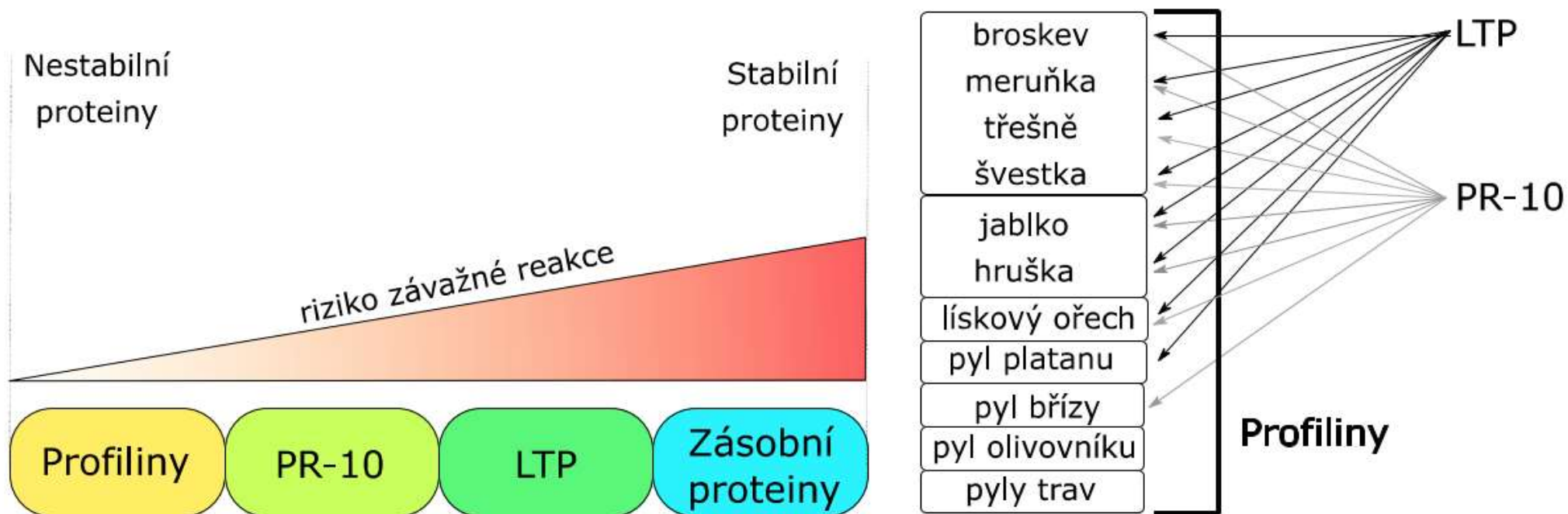
Shared epitopes

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

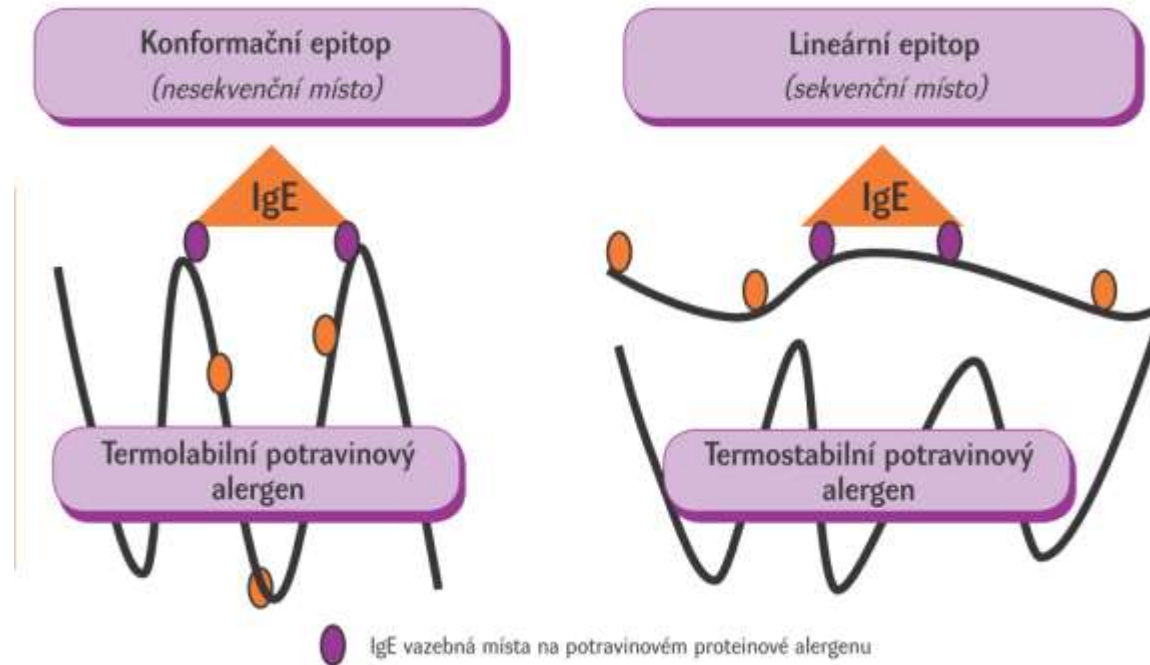


Obrázek č. 65: Základní skupiny panalergenů

# Panalergeny - stabilita

## Termolabilní alergeny:

- **Profilyny a PR-10 proteiny**
- V nativním stavu – alergenní potenciál, Povařením/kyselým pH 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 ani pH → molekuly povařením neztrácí alergenicitu
- Může hrozit závažná alergická reakce!

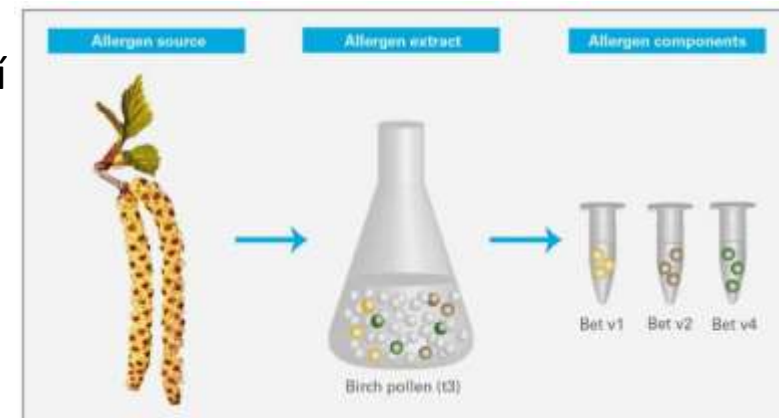
# Alergeny pro laboratorní diagnostiku

## Standardizované alergenové extrakty

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

## Rekombinantní alergeny

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



# Komponentová diagnostika – stanovení rekombinantních alergenů (RAL)

---

- Určí u pacienta konkrétní antigenní determinantu, na kterou se IgE váže
- Dokážeme rozlišit, zda u pacienta po podání alergenu hrozí **závažná reakce (anafylaxe)**
- Dále např. reakce na včelu a vosu
  - U stanovení specifického IgE na včelu a vosu pomocí alergenových extraktů bývá často přítomna zkřížená reaktivita (existuje určitá homologie ve struktuře obou jedů) – pacient falešně pozitivní na obojí
  - Komponentová diagnostika dokáže odlišit, zda je pacient opravdu alergický na včelu nebo vosu (není zde nespecifita způsobená zkříženou reaktivitou)
- → význam pro **alergenovou imunoterapii** (složení alergenů, zda má význam je pacientovi podávat)



# 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, tryacylglyceroly, 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 alergen
2. Intradermální testy – blanokřídlý hmyz, léky
3. Epikutánní testy – kontaktní alergie (IV. Typ)





## 2. Narušení kůže plastovým kopíčkem

## 1. Aplikace kapky alergenu



## 3. Inkubace cca 20 min



## 4. Odečet velikost pupene

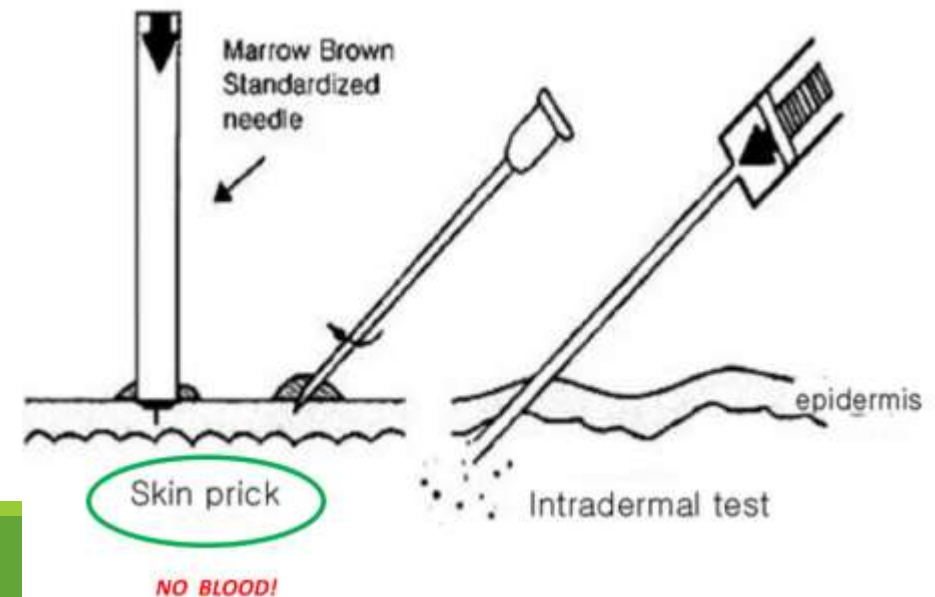


## 1. Prick testy

- 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 s kožním onemocněním 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
- 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/imunostimulační terapie
- Nelze testovat látky toxické a s extrémními hodnotami pH



## 4. Vyšetření dýchacích cest – diagnostika astmatu

---

- **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 (počet molekul NO na  $10^{*9}$  molekul vzduchu)
- **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)  
**Pozn. dříve se ke stanovení specifického IgE používala i ELISA - dnes už ne!! – nahrazení přístrojovými metodami**
3. ImmunoCap Phadia – stanovení tryptázy a vybraných rekombinantních alergenů
4. MADx Allergy Explorer multiplex metoda - stanovení až 280 alergenů

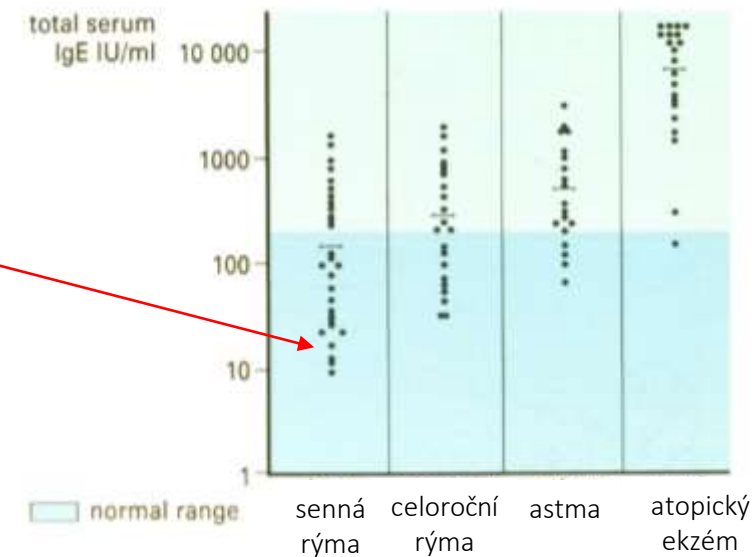
### Buněčné testy

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

# Celkové IgE

- Celkové IgE - norma **0-100 IU/ml** – stanovení **nefelometricky**
- Celková koncentrace IgE koreluje s přítomností alergického onemocnění
- 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

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

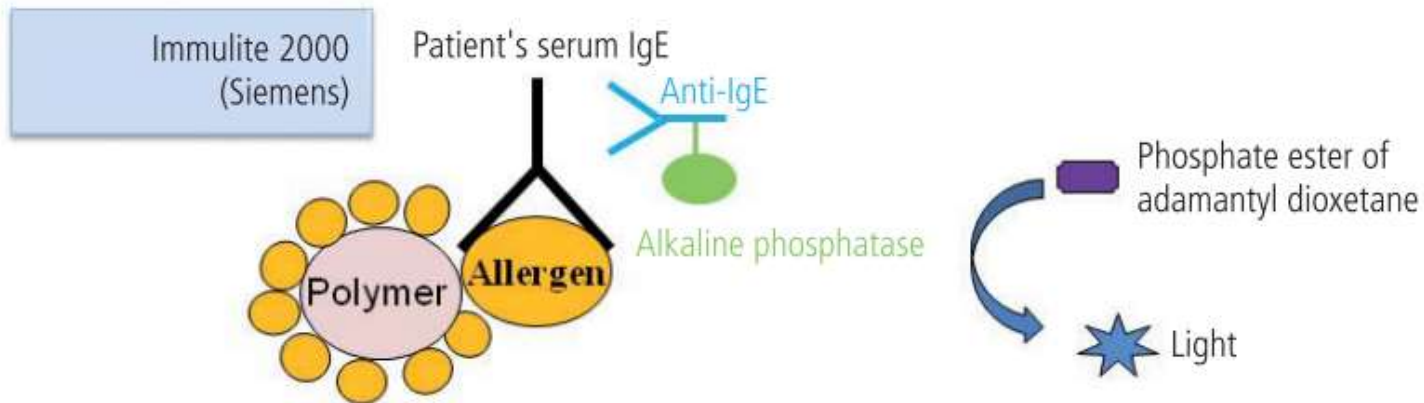


- <https://portal.med.muni.cz/clanek-695-vysetrovaci-metody-v-imunologicke-a-alergologicke-laboratori.html>

# Immulate 2000 – specifické IgE

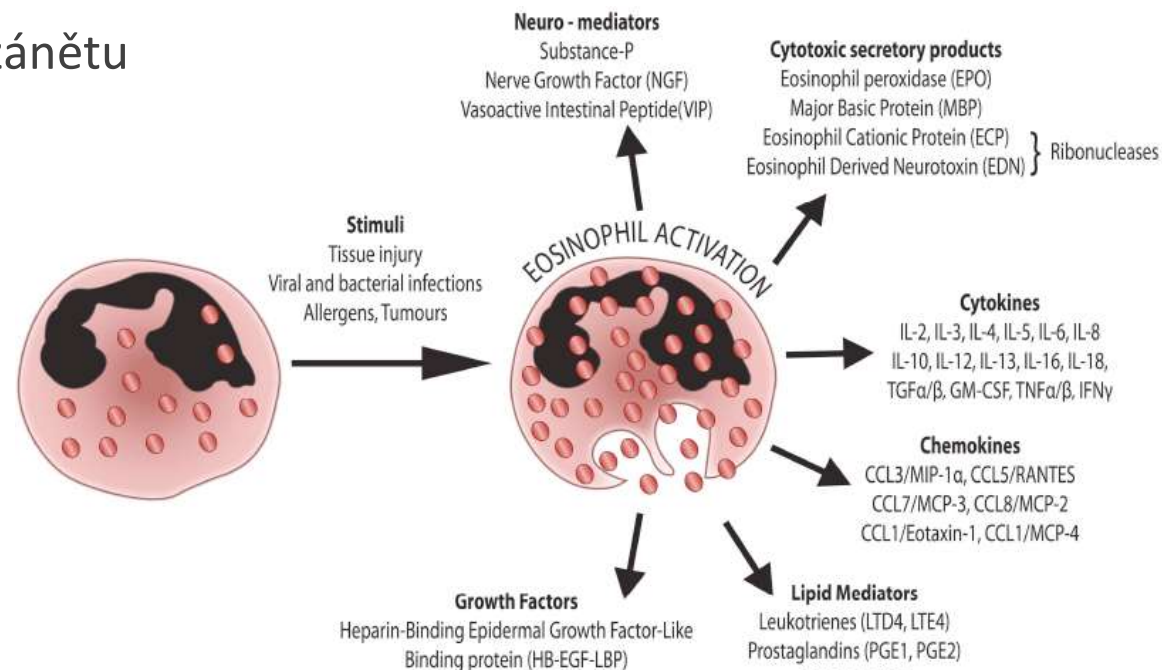
(používá alergenové extrakty)

- Enzymově zesílená chemiluminiscence
- Pevná fáze – 1 velká plastová kulička potažená biotinem
- Přidáme alergen 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 - **adamantyl-dioxetan-fosfátu** odštěpí enzym fosfát → vzniká nestabilní aniont, který při rozkladu uvolní emisi fotonů – zaznamená se počet záblesků



# Immulite 2000 – stanovení ECP

- Princip stanovení – chemiluminiscence - podobně jako stanovení specifického IgE (rozdíl - na plastové kuličce je navázána záchytná protilátka anti-ECP, zbytek principu je identický)
- Eozinofilní kationický protein je produkt **aktivovaných eozinofilů**
- Jeho hladina koreluje se závažností eozinofilního zánětu (toxicita – poškození epitelu dýchacích cest)
- Používá se k monitorování průběhu a léčby **eozinofilního alergického astmatu** (pokles ECP → úspěšná léčba)
- Normální hladina v séru < **24 ng/ml**





# Phadia ThermoFisher – fluorimetrie

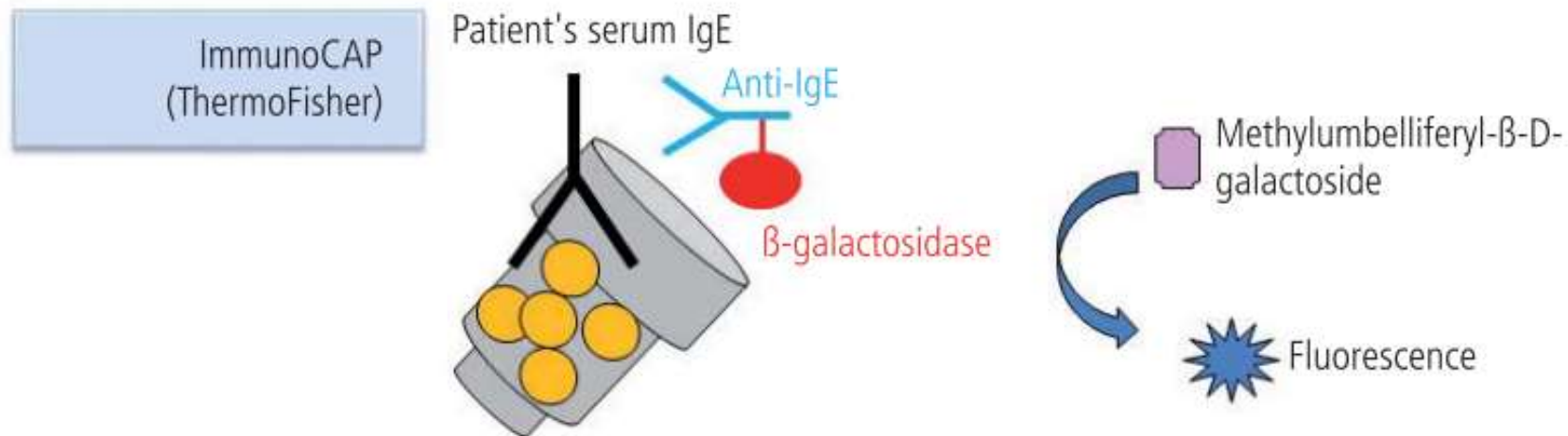


Pevná fáze – plastové kepičky, které obsahují aktivovanou celulózu – velká plocha

Na celulózu navázán alergen → na něj vazba pacientova IgE

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

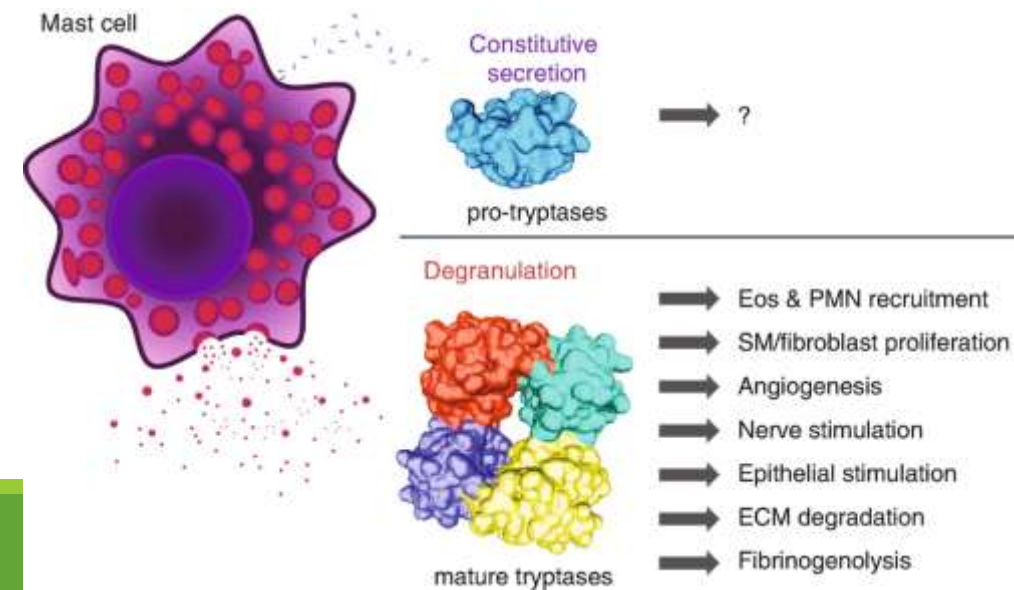
Přídavek substrátu → Methylumbelliferyl-  $\beta$ -D-galaktosid → enzym odštěpí  $\beta$ -D-galaktosid a vznikne **methylumberiferon** → **excitace světlem** → **emise fluorescenčního záření** (na rozdíl od Immulitu zde potřebujeme žárovku (Hg-Výbojka) k excitaci methylumbeliferonu!)



- Stanovení tryptázy
- Stanovení specifického IgE proti rekombinantním alergenům

# 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 **0-13,5 ug/l**



# 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

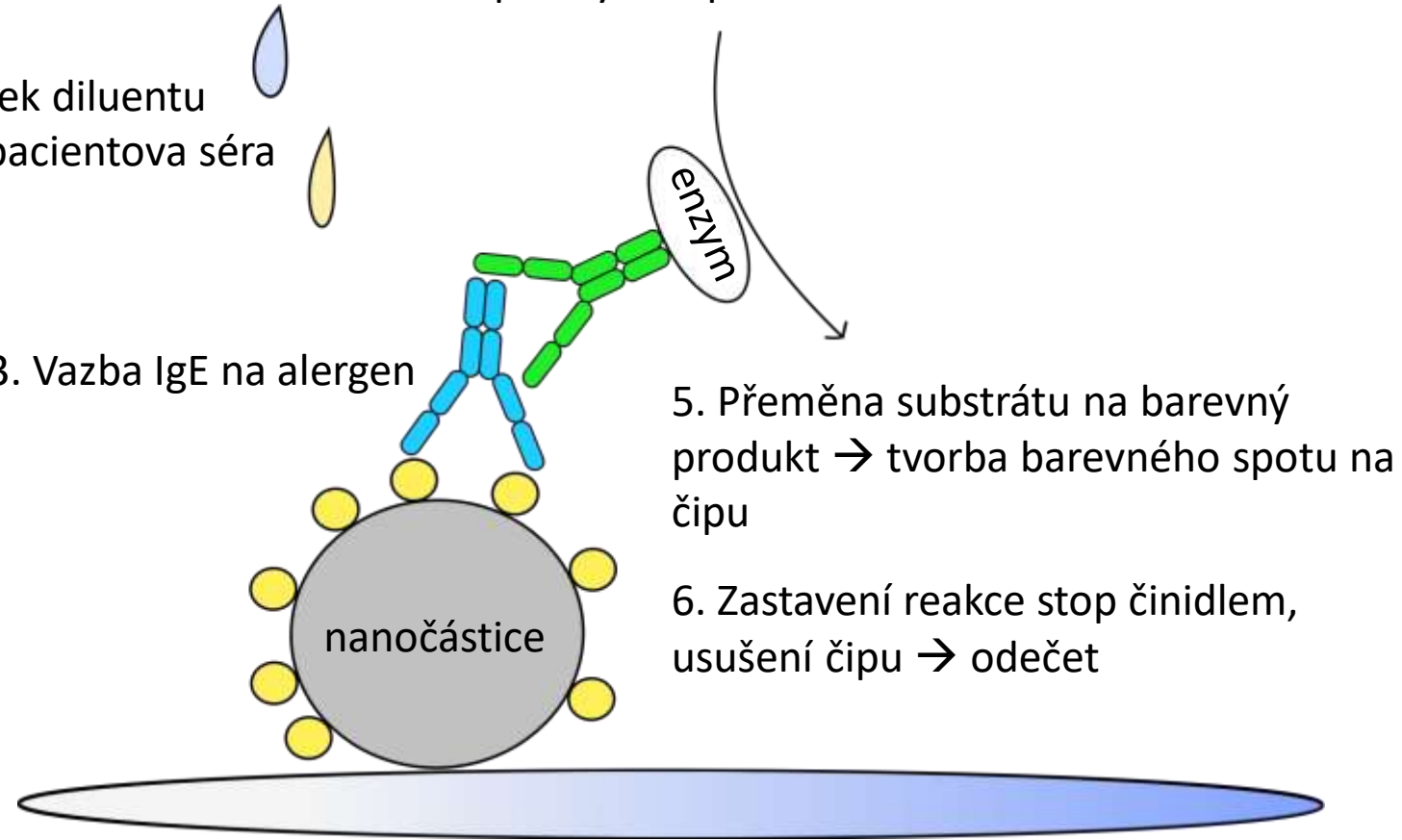
3. Vazba IgE na alergen

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

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

6. 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)

- 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=klET1jLVmp4&ab\\_channel=DasitGroupS.p.A.](https://www.youtube.com/watch?v=klET1jLVmp4&ab_channel=DasitGroupS.p.A.)



# ALEX (allergy explorer)

- Využití:

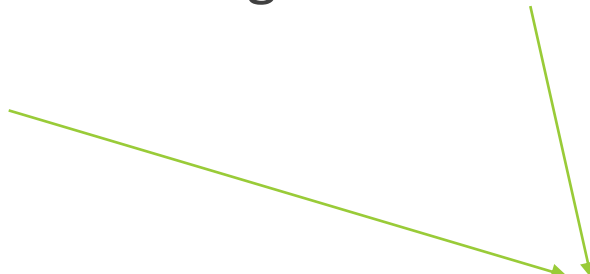
- Indikace pro specifickou imunoterapii
- Vyhodnocení rizik pro pacienta s cílem zabránit závažným alergickým reakcím
- Získáváme molekulární informace o zkřížené reaktivitě

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

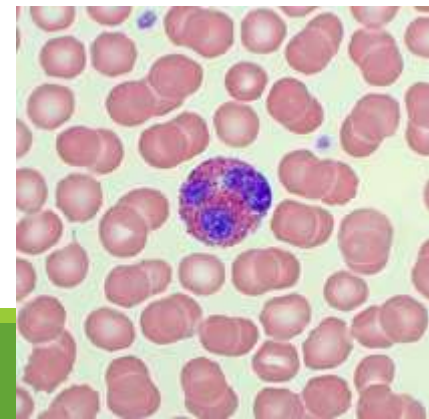
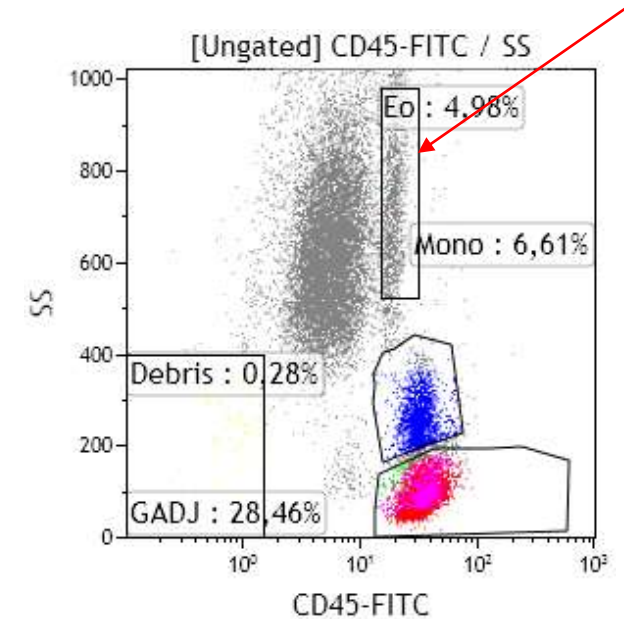
# Buněčné testy v alergologii

---

1. Stanovení počtu eozinofilů (I.typ přecitlivělosti) - rutinně
  2. Test aktivace bazofilů (BAT) (I.typ přecitlivělosti) - rutinně
- 
1. Test proliferace lymfocytů na pozdní alergickou reakci (IV. typ přecitlivělosti)
  2. ELISPOT (IV. typ přecitlivělosti)
- Detekce pozdních reakcí na léčiva  
(pouze specializovaná pracoviště, výzkumné testy)
- 

# 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 %
- Zvýšení eozinofilů – alergická, parazitární onemocnění...
- Použití – monitoring eozinofilního astmatu
- Při znalosti absolutního počtu leukocytů lze absolutní počty buněk dopočítat
  - **Leukocyty  $4-10 \cdot 10^9/l$**

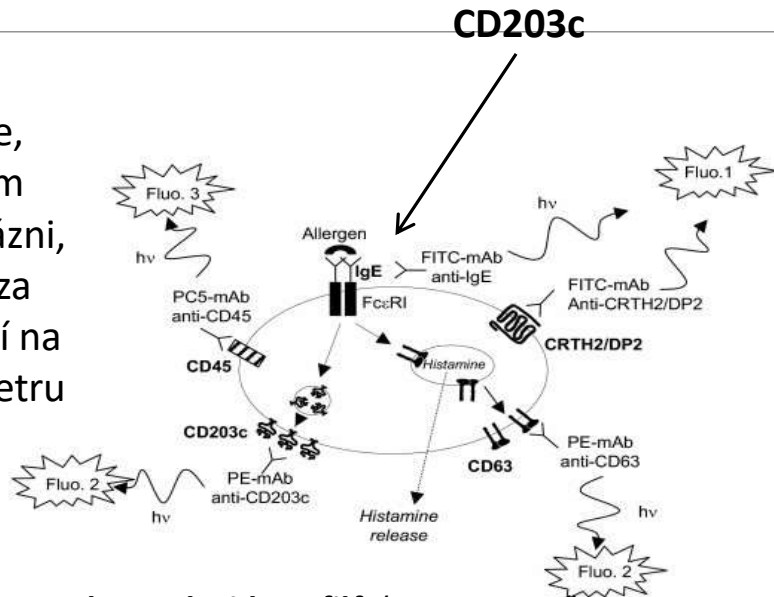


# Test aktivace bazofilů (BAT)

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

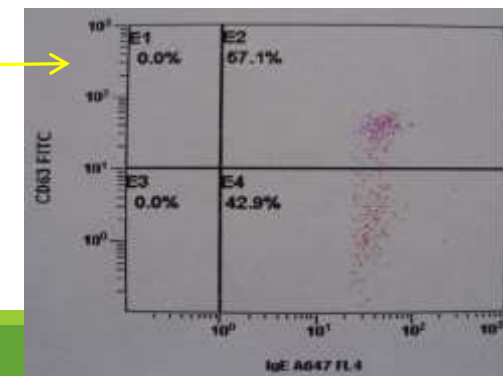
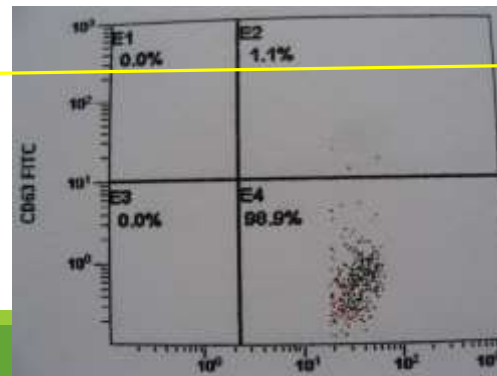
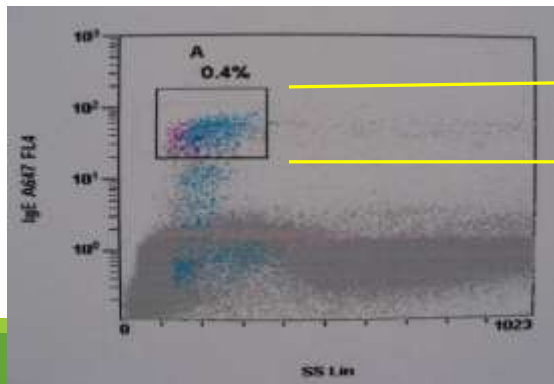


Založen na expresi aktivačního znaku (**CD63**) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem *in vitro*

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)

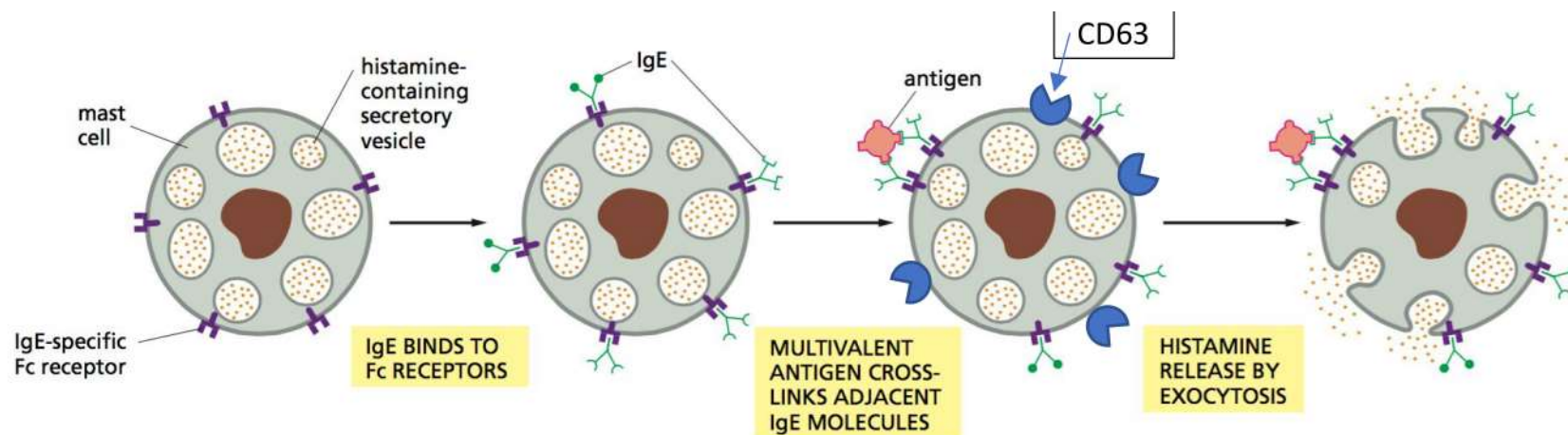
Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů






# 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



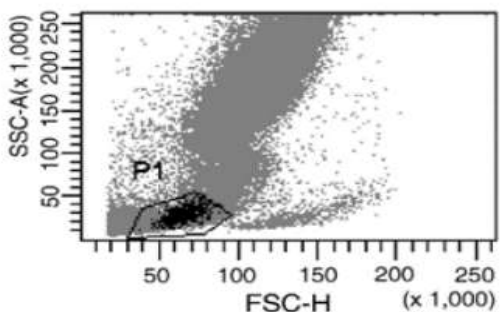
# BAT – alergen

---

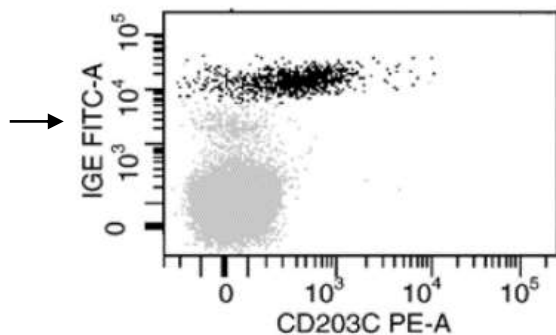
- Většinou se používají alergen z prick testů
- U podezření na lékové alergie doktor spolu s krví zasílá do laboratoře podezřelý lék → v laboratoři rozdrcen, přefiltrován a naředěn
- U každého BAT testu se používá ředění alergenu v pořadí 10krát, 100krát a 1000krát → proč?  

- 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 – gatovací strategie

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



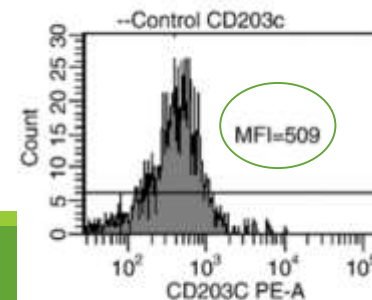
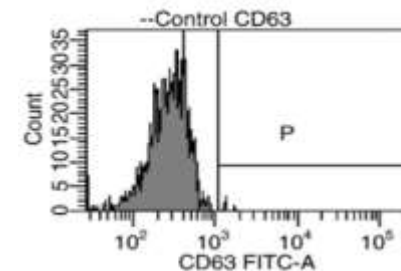
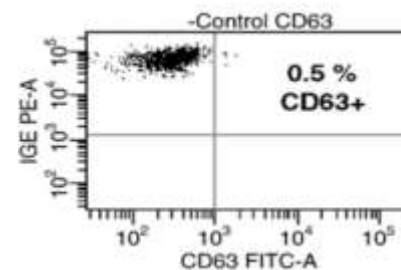
1. Na Forward scatteru a Side scatteru gatovány lymfocyty



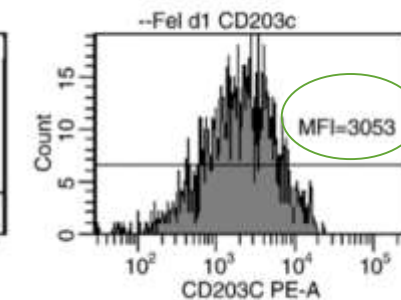
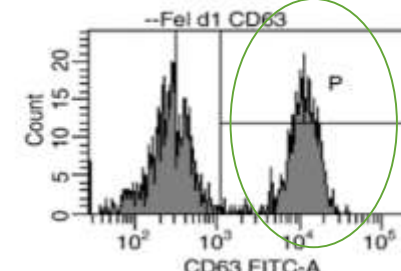
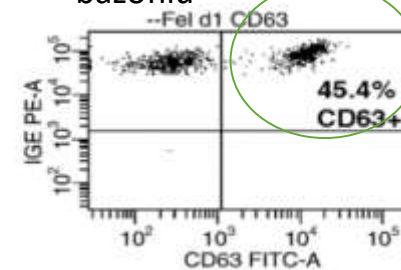
2. Z lymfocytů gatovány pouze IgE pozitivní buňky - bazofily

3. Bazofily – sledujeme CD63 a CD203c

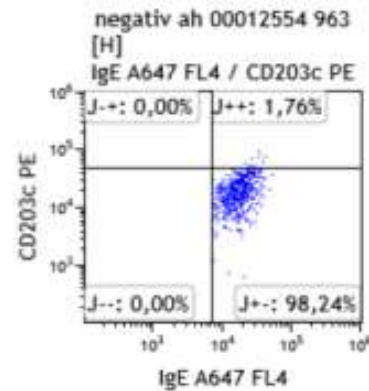
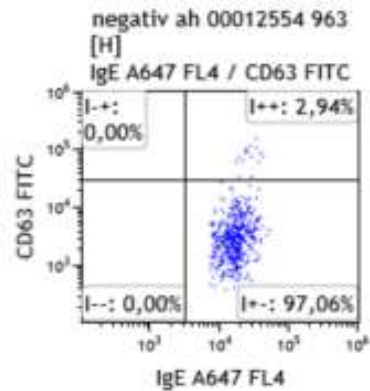
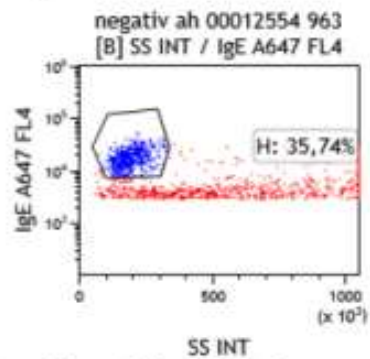
Negativní kontrola  
Bazofily jsou CD63 neg.



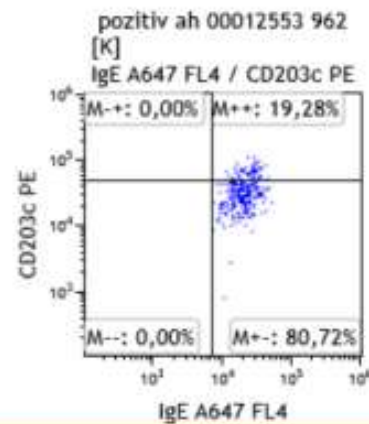
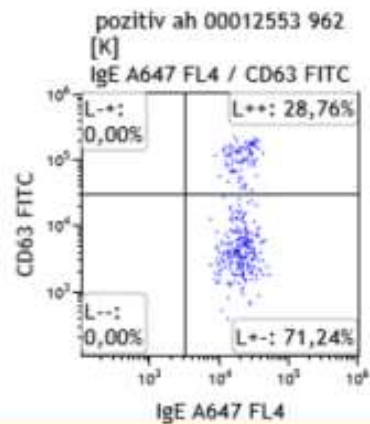
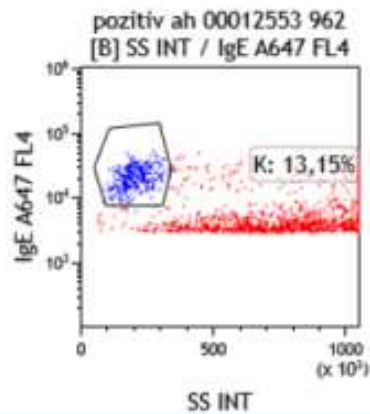
Pozitivní pacient – vidíme populaci CD63 pozitivních bazofilů



## Negativní kontrola



## Pozitivní kontrola



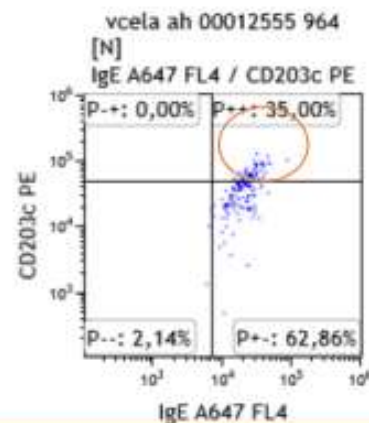
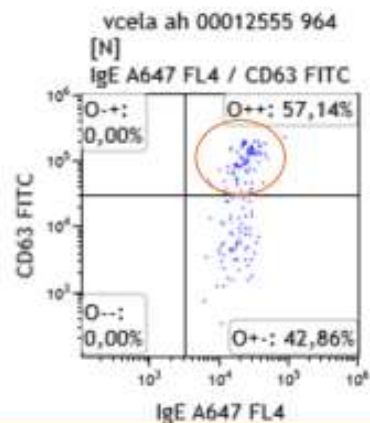
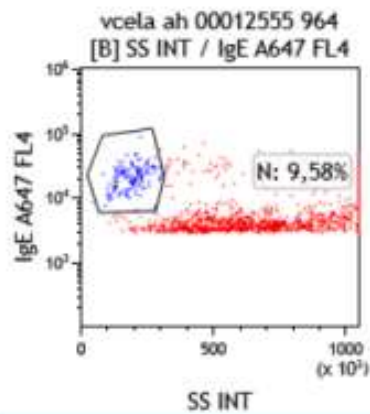
- Při vyšetření BAT u pacienta je součástí testu vždy:
  - Negativní kontrola (PBS)
  - Pozitivní kontrola (stimulace fMLP)
  - 3 ředění alergenu (10x, 100x, 1000x)

Hodnocení:

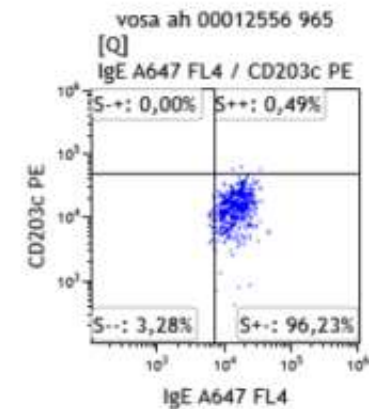
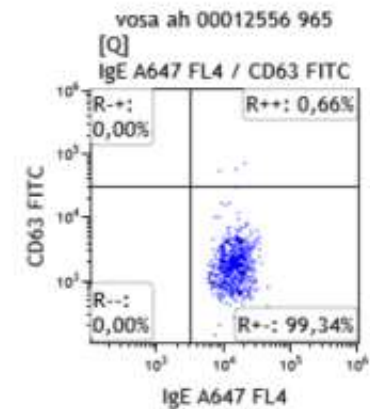
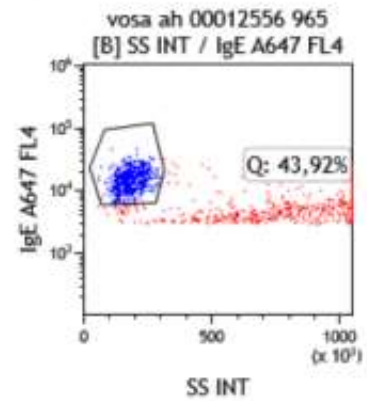
Alergenové extrakty: pozitivita  $\geq 15\%$  CD63+ bazofilů

Léčiva: pozitivita  $\geq 5\%$  CD63+ bazofilů

## Včela



## Vosa



# Proliferace lymfocytů (LTT, lymphocyte transformation test) – metoda $H_3$ thymidyn

---

- Pacienti se závažnými reakcemi na léky → IV. Typ přecitlivělosti dle Coombse a Gella
- Princip: inkubace lymfocytů pacienta s podezřelým lékem 7 dní v médiu → poté měření proliferace pomocí metody  $H_3$  thymidyn
  - 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
- 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

# ELISPOT

(pouze specializovaná pracoviště)

## ○Princip:

1. Izolace PBMC
2. Nasazení PBMC do jamek ELISPOT destičky, jejíž dno je pokryto protilátkou proti IFN- $\gamma$
3. Přídavek podezřelého léku k buňkám
4. Inkubace 24-72h (pokud se antigen specifické lymfocyty lékem aktivují, budou produkovat IFN- $\gamma$ )
5. Odmytí buněk, přídavek detekční protilátky proti IFN- $\gamma$  značené enzymem
6. Přídavek substrátu  $\rightarrow$  vývoj barevných spotů

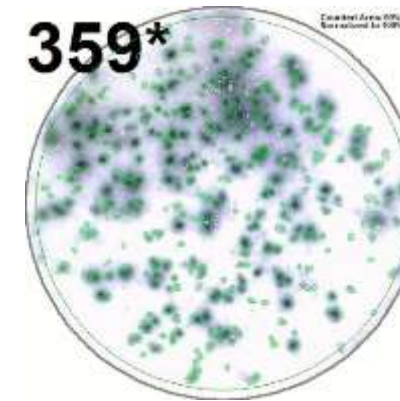
Příklad – pacient s pozdní reakcí na klindamycin – projevil se exantémem po těle  
nutná hospitalizace

Vpravo patrná silná pozitivita – lymfocyty po styku s klindamycinem tvořily IFN- $\gamma$   
(359 spotů, vs. 19 spotů u kontroly)

Vhodné pro pacienty se závažnými reakcemi, kde nelze provést kožní/expoziční testy



Kontrolní osoba



Pacient