



Alergologické vyšetření

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

ÚKIA - FNUSA

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

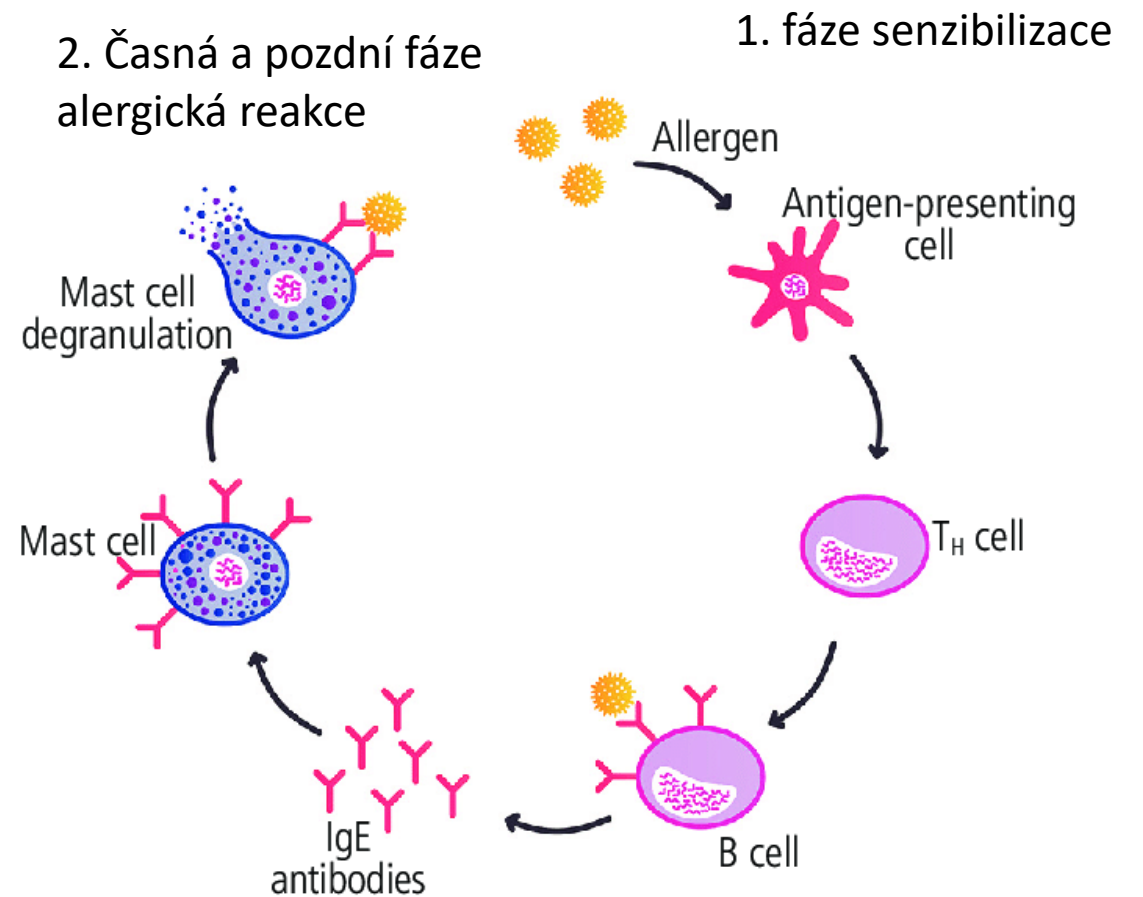
„Alergická onemocnění jsou způsobena nepřiměřenou reakcí imunitního systému na běžné neškodné antigeny pocházející z vnějšího prostředí.“

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

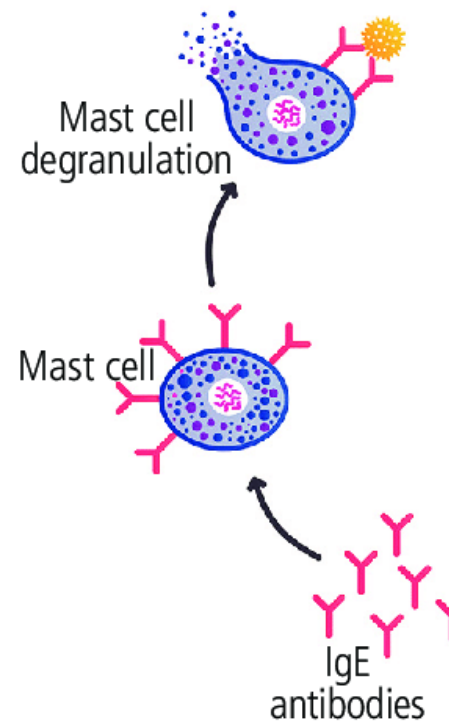
2. Časná fáze alergické reakce (minuty po styku)

- Aktivace žírných buněk alergenem → degranulace

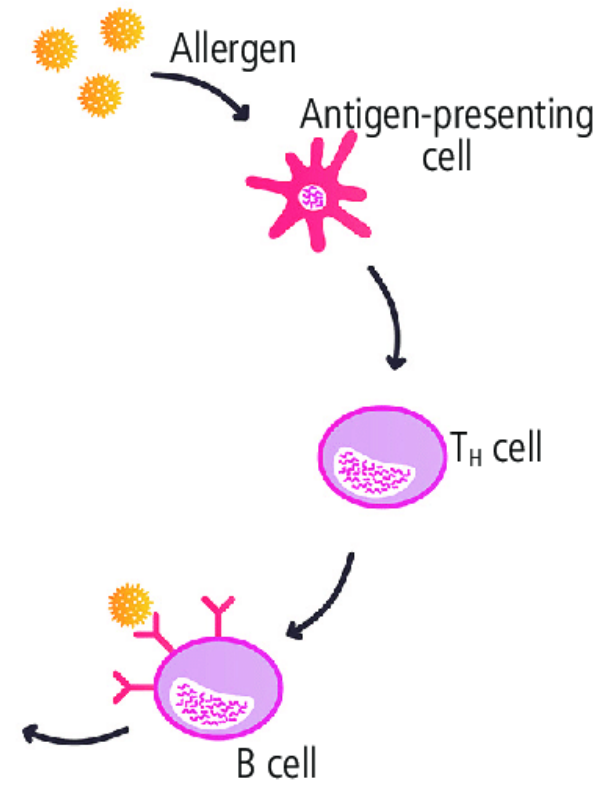
3. Pozdní fáze alergické reakce (hodiny po styku)

- Syntéza metabolitů kyseliny arachidonové – leukotrieny, tromboxany, prostaglandiny

2. Časná a pozdní fáze alergická reakce

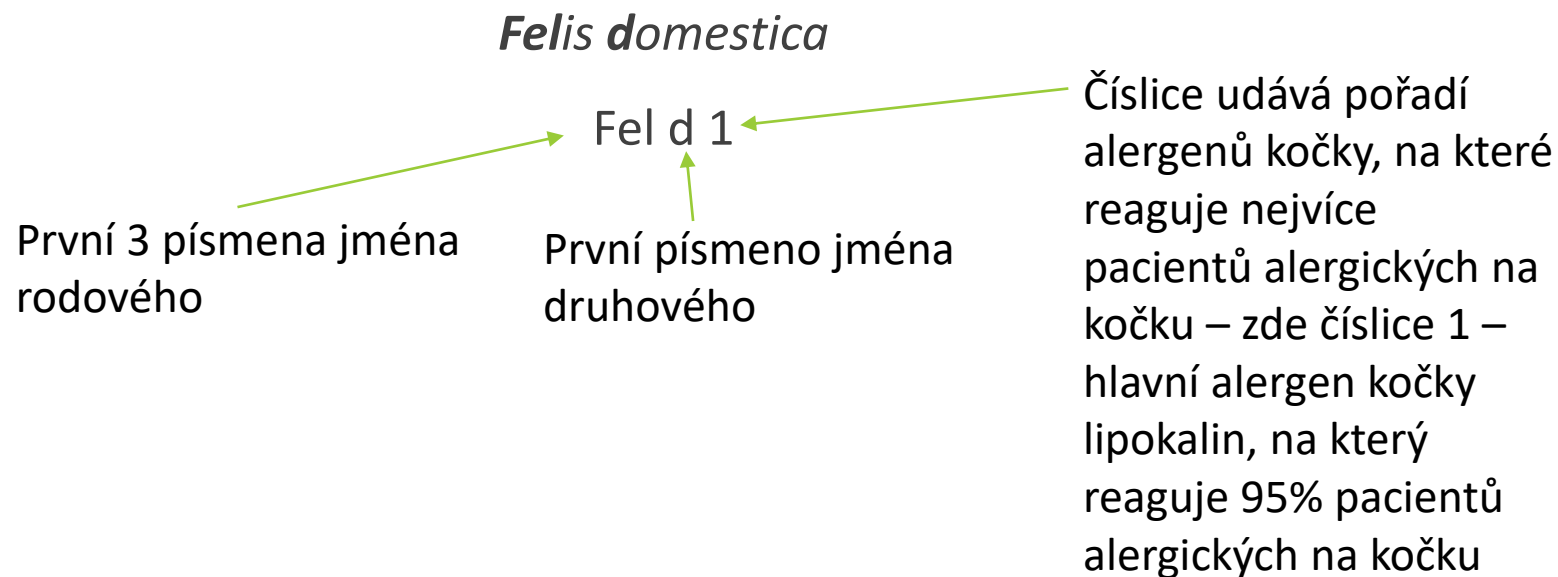


1. fáze senzibilizace



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

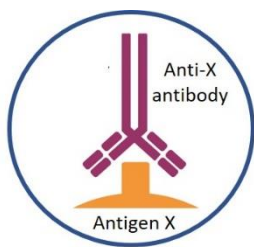
Alergeny II. Třídy – alergenové inhalace

- 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 patogenezí** (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

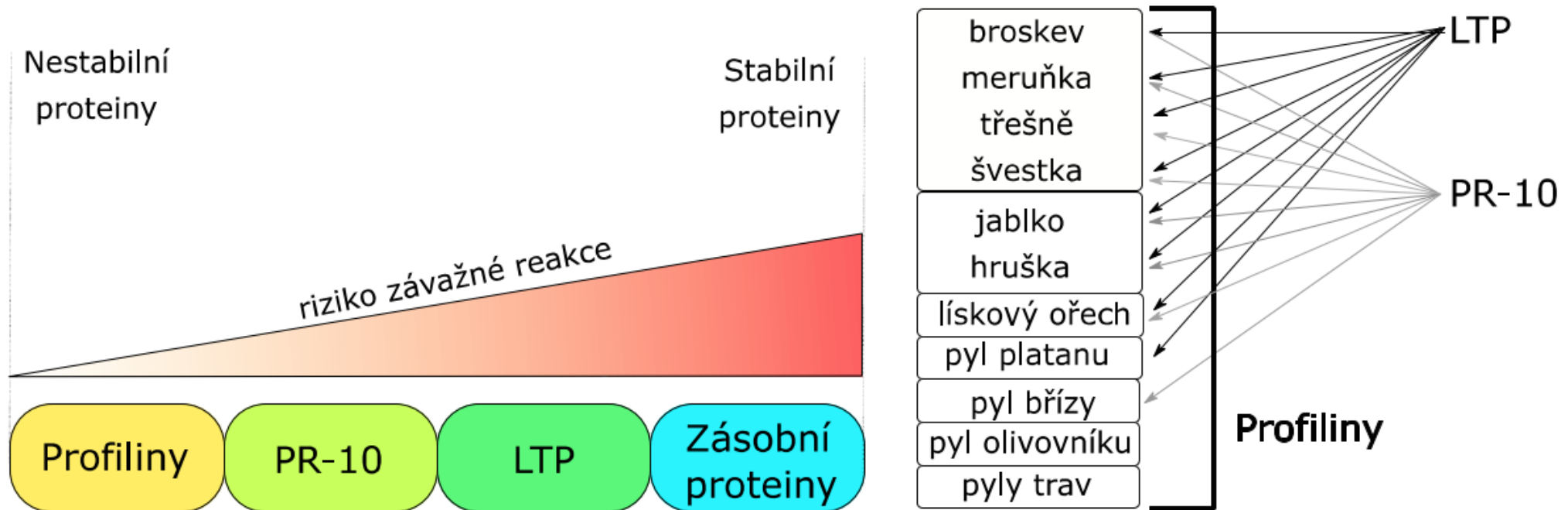
Shared epitopes

Similar epitopes

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

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

Panalergeny

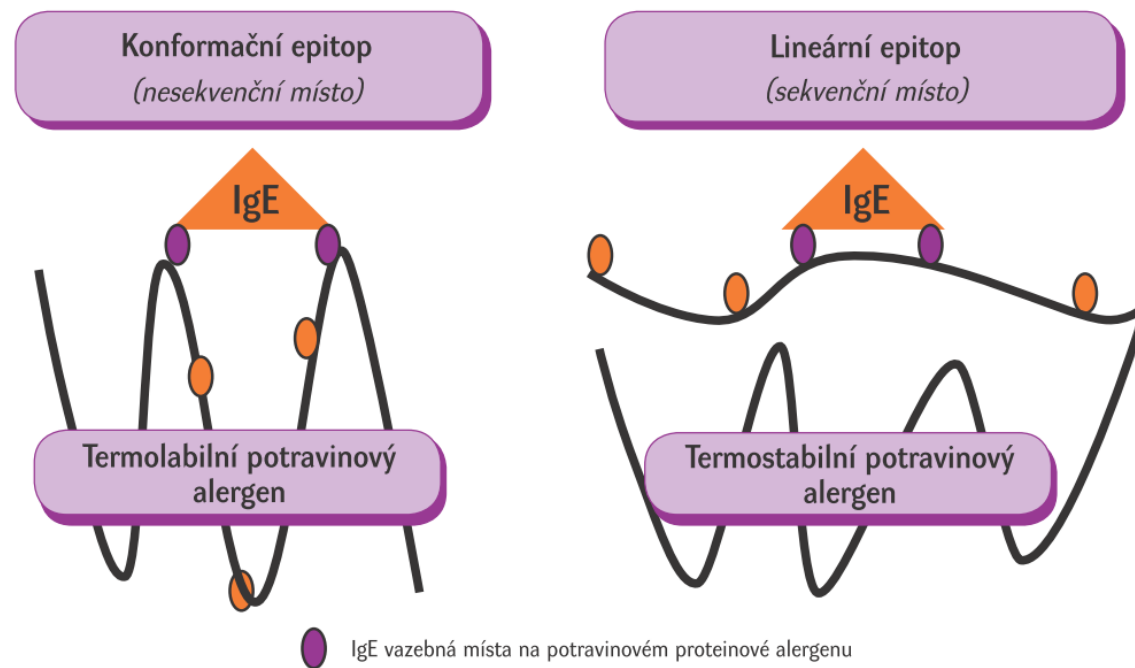


Obrázek č. 65: Základní skupiny panalergenů

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!

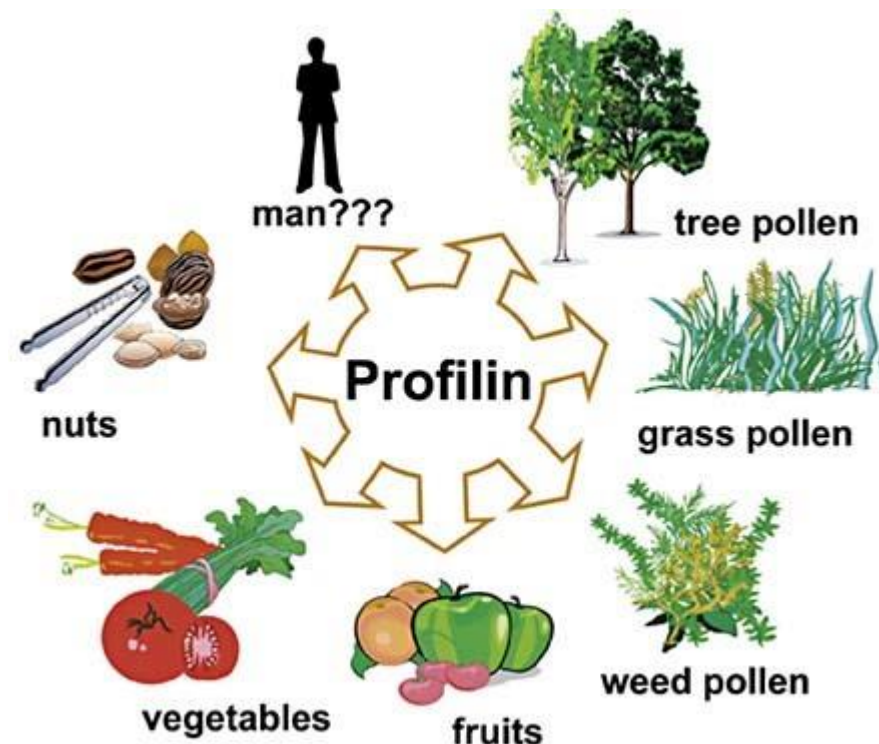
Pozn. Vzácně se vyšší teplotou může alergenicita potravin zvýšit → burské oříšky → pražení → změna konformace molekuly → vytvoření alergenního epitopu

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

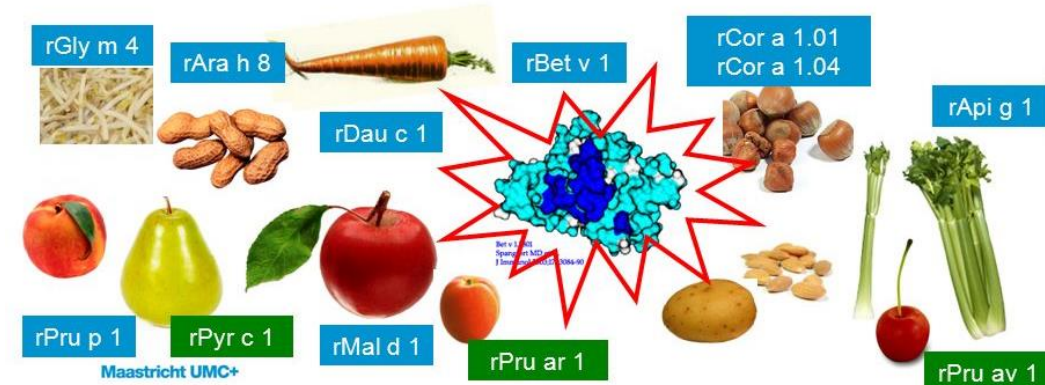


Panalergeny

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:

Pyly 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), arašídech (Ara h 9)
- Termostabilní
- Zde není asociace s alergií na pyl

Panalergeny



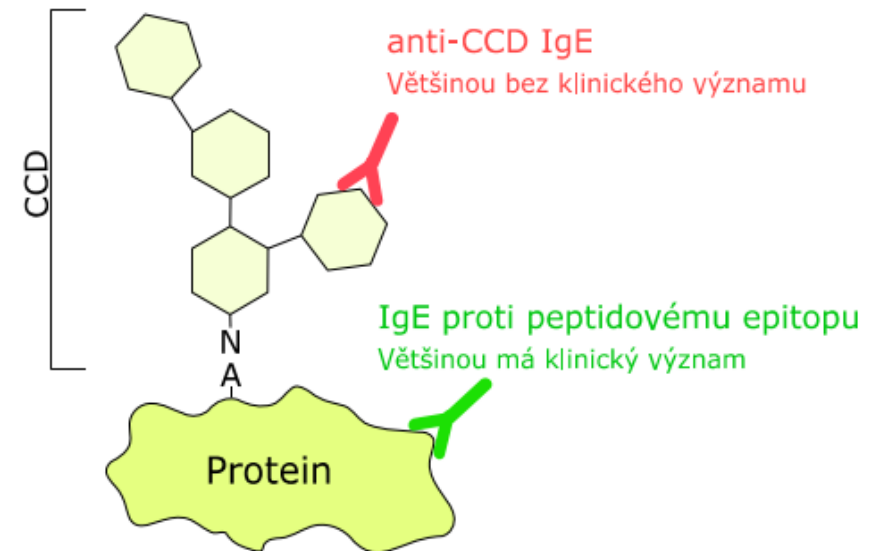
4. Zásobní proteiny

- Termostabilní
- Viciliny, leguminy, 2S albumin
- Vyskytují se hlavně v ořeších, semenech, peckách, **arašídech (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

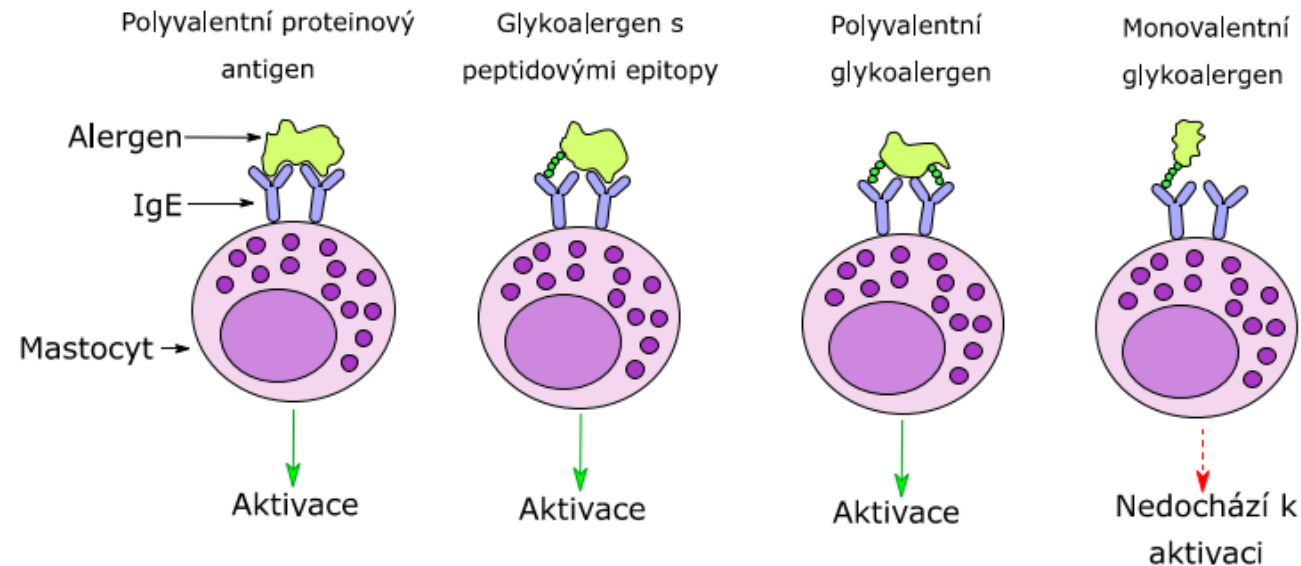
CCD determinanty

- Většina alergenů jsou glykoproteiny – obsahují také sacharidové struktury
- Zkříženě reagující IgE protilátky se mohou tvořit i proti těmto sacharidovým strukturám (**C**ross-reactive **C**arbohydrate **D**eterminants)
- 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.



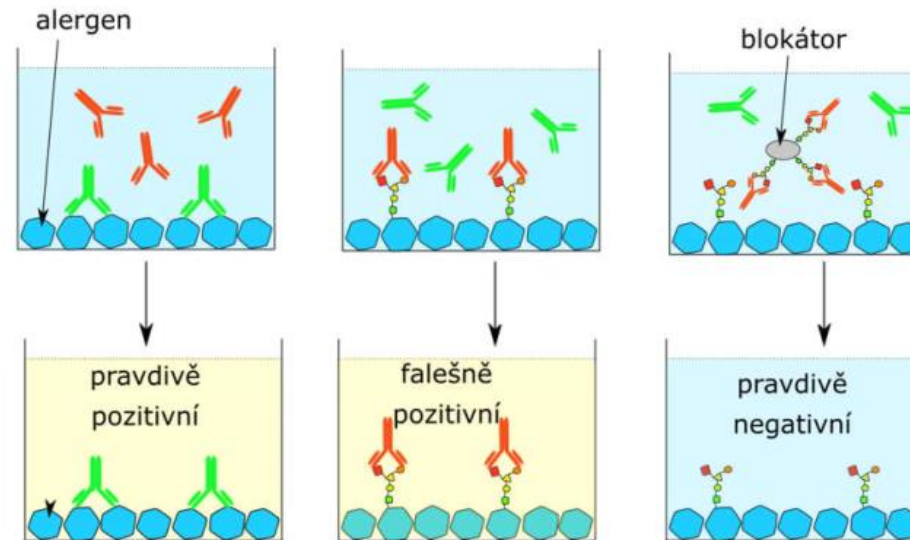
CCD determinanty

- 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

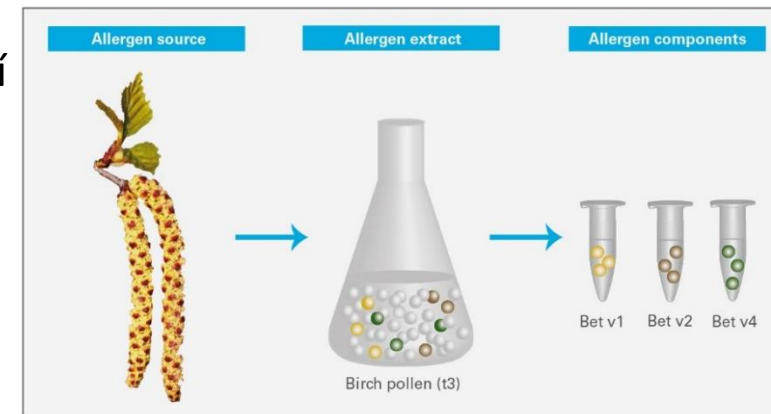
Alergeny pro laboratorní diagnostiku

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)

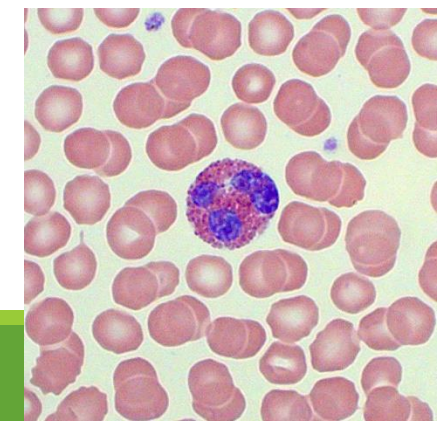
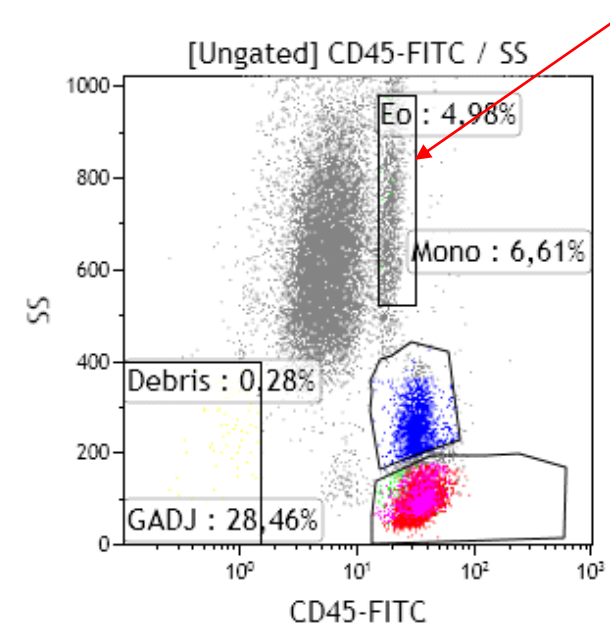
Laboratorní diagnostika zahrnující kombinaci vyšetření specifických IgE protilátek proti alergickým extraktům a rekombinantním alergickým pomohla postavit správně diagnózu u naší pacientky. Pacientka potom podstoupila alergickou imunoterapii proti vose. Vyšetřování koncentrace specifických IgE protilátek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

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)

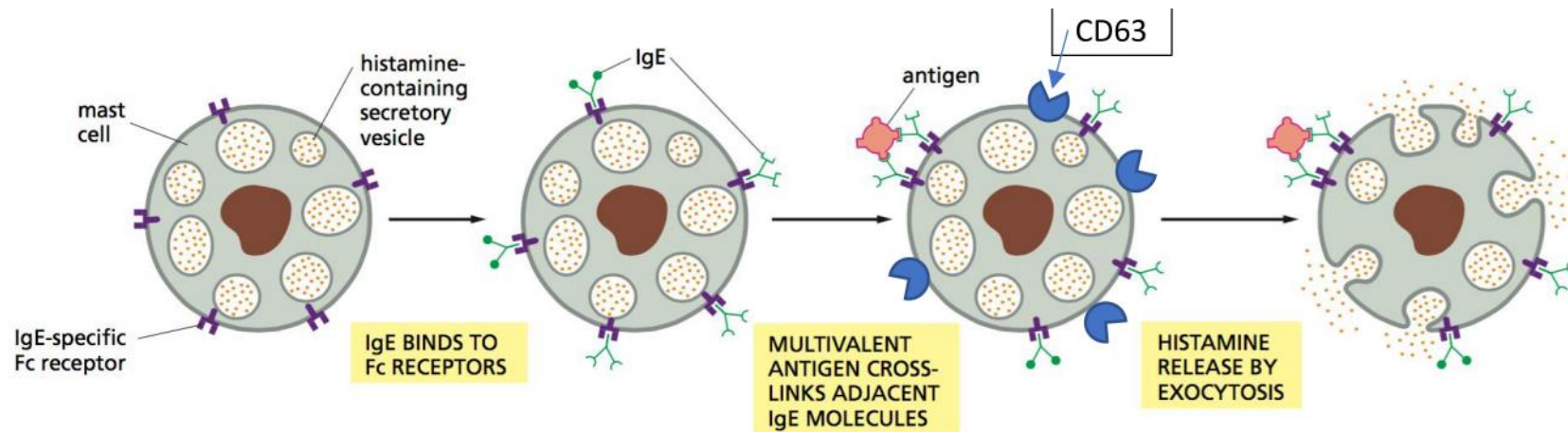
Stanovení počtu eozinofilů

- 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 %
 - **Eozinofily 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



Zdroj: <https://raphaels7.wordpress.com/2015/08/21/basophil-activation-test/>

BAT – alergený

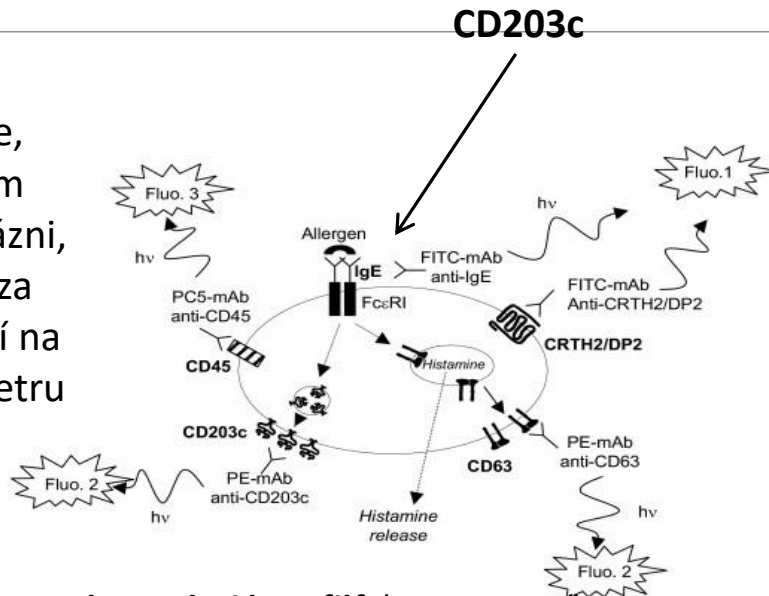
- Většinou se na BAT používají alergený z prick testů
- U podezření na lékové alergie doktor spolu s krví zasílá do laboratoře podezřelý lék → v laboratoři rozdrcen, přefiltrován a naředěn
 - Pozn. v minulosti se používaly k provedení BAT i potraviny, protože neexistovaly standardizované alergenové extrakty → 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 heparinizované krve, stimulace alergenem při 37 °C ve vodní lázni, zastavení reakce, lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru

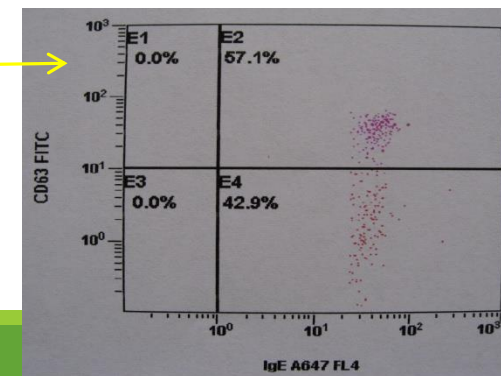
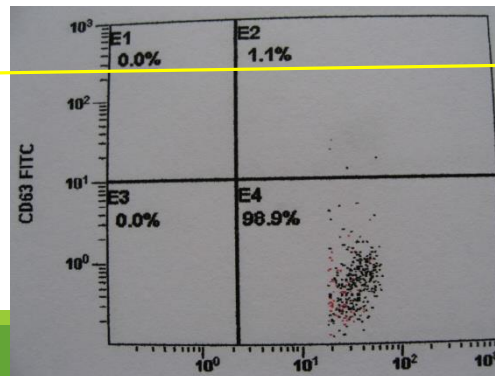
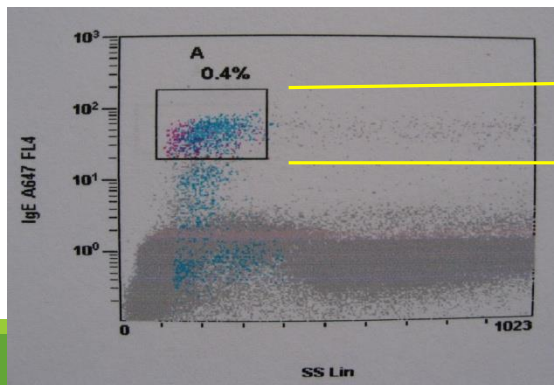


Založen na expresi aktivačního znaku (**CD63**) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem *in vitro*

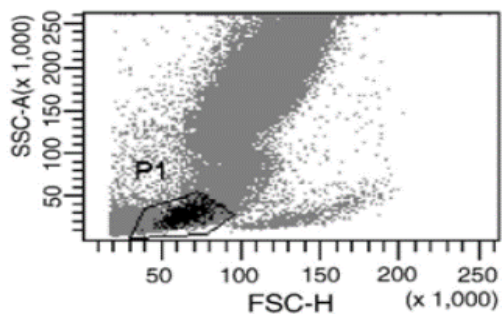
Reakce přecitlivělosti jsou podstatou alergických onemocnění. Reakce přecitlivělosti I. typu neboli **IgE** **mediovaná alergie** - je zprostředkována protilátkami IgE. IgE se naváže na bazofily ve fázi senzibilizace. Při dalším setkání s alergenem – alergen přemostí IgE, to vede k aktivaci bazofilů - 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)

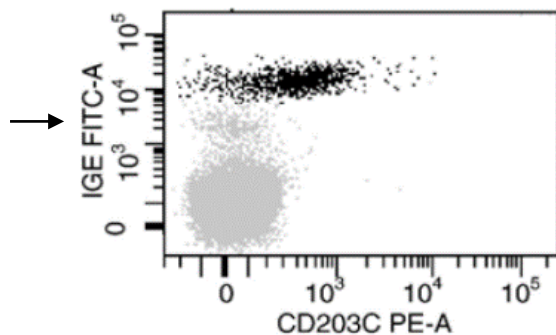
Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů



BAT – gatovací strategie (Pacient alergický na kočku – alergen *Fel d*)



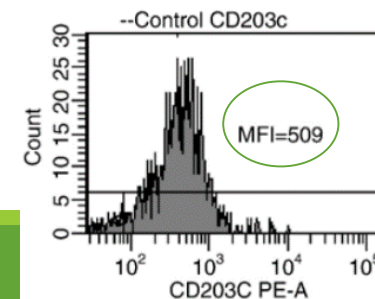
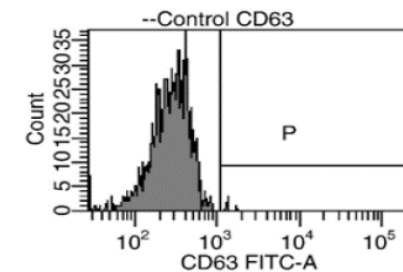
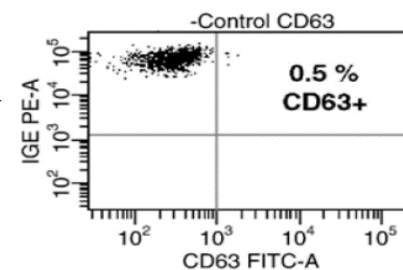
1. Na Forward scatteru a Side scatteru gatovány lymfocyty



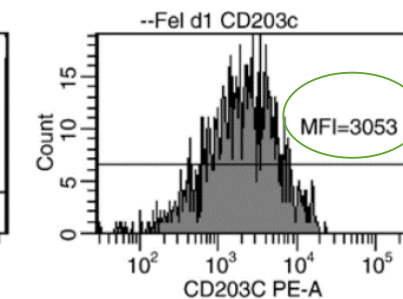
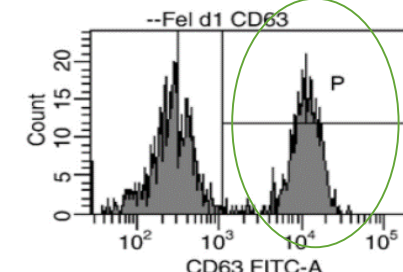
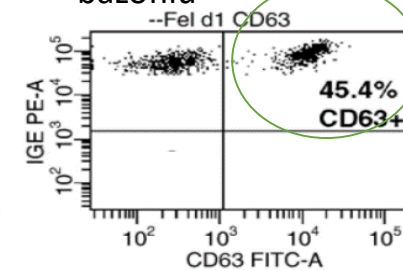
2. Z lymfocytů gatovány pouze IgE pozitivní buňky - bazofily

3. Bazofily – sledujeme CD63 a CD203c

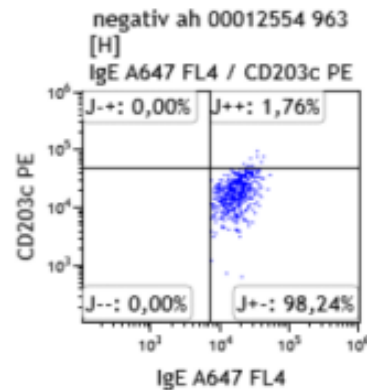
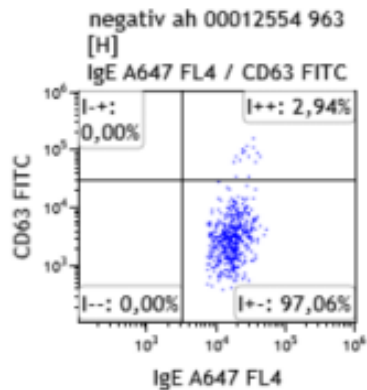
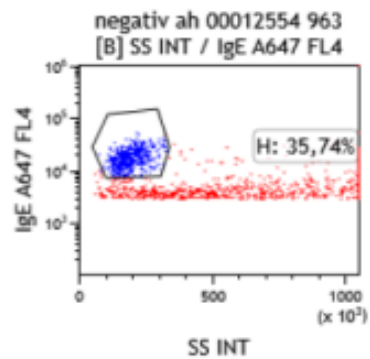
Negativní kontrola
Bazofily jsou CD63 neg.



Pozitivní pacient – vidíme populaci CD63 pozitivních bazofilů



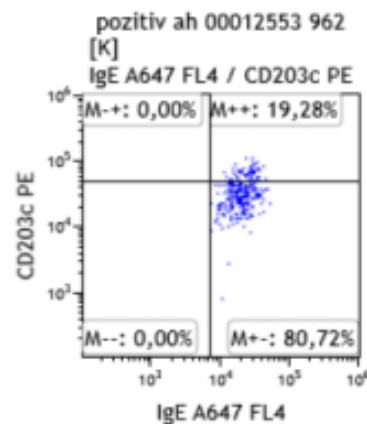
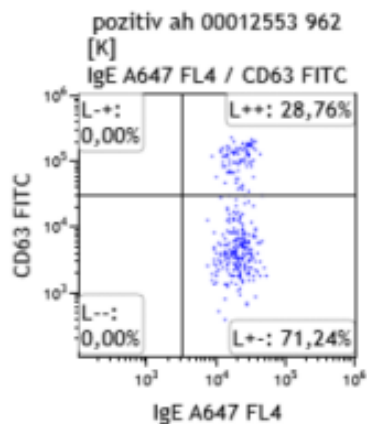
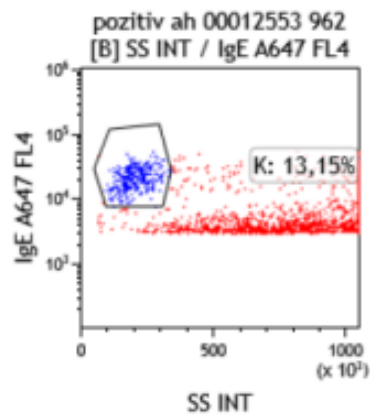
Negativní kontrola



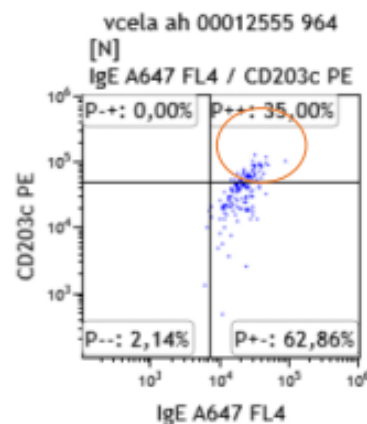
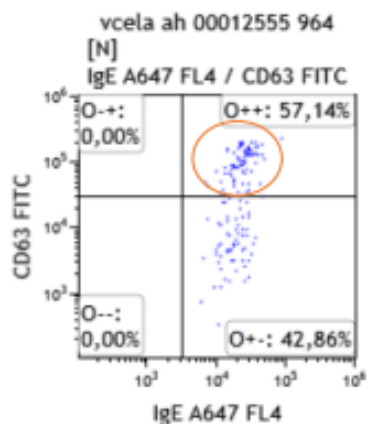
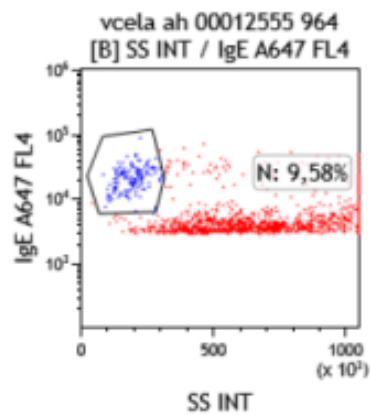
- Při vyšetření BAT u pacienta je součástí testu vždy:

- Pozitivní kontrola (stimulace fMLP)
- Negativní kontrola (PBS)
- U BAT totiž neexistují konkrétní referenční meze

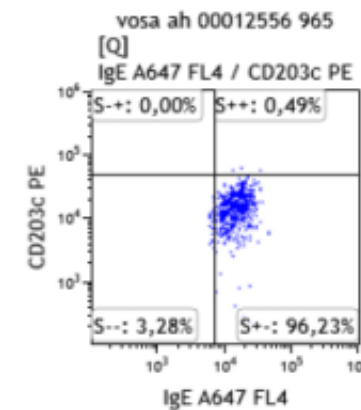
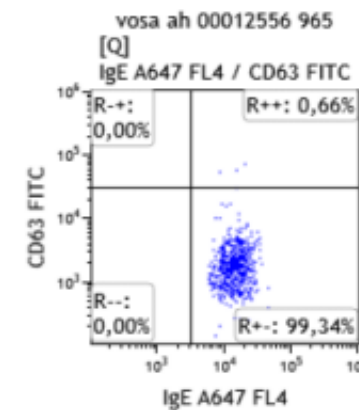
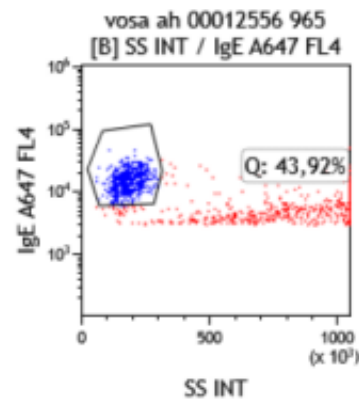
Pozitivní kontrola



Včela



Vosa



Rychlé vyhledávání

Edukační weby

Digitální video

Materiály k přednáškám

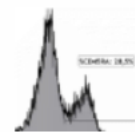
Obrazové kasuistiky

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
Vyšetřovací metody v imunologické a alergologické laboratoři	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
informace
 Ohodnoťte
(každý měsíc testy článků)

✘ Nemáte požadované oprávnění:
uživatel vzdělávací sítě MEFANET
[[více informací o autentizačním rámci sítě MEFANET](#)]



M U N I

[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](#)