



# Alergologické vyšetření II

---

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

## 5. Alergologické testy *in vitro* - přehled

---

### In vivo testy:

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

### Buněčné testy

1. Stanovení počtu eozinofilů
2. Test aktivity bazofilů (BAT)

### 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, Immucap ISAC – multiplex metody - stanovení až 280 alergenů

# 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

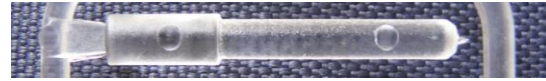
---

Lze je provést přímo v ordinaci alergologa

1. Prick testy – inhalační, potravní a zvířecí alergenů
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

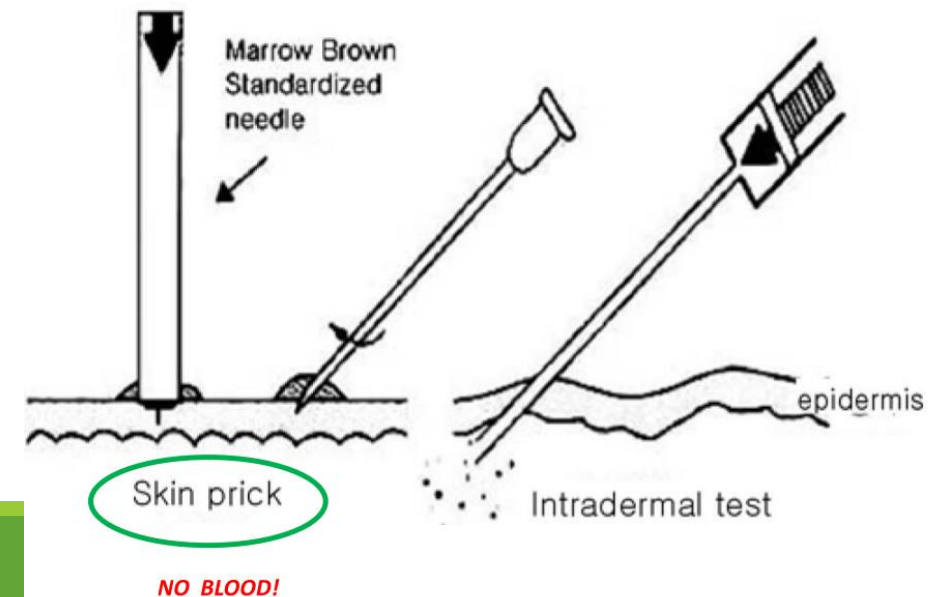


## 1. Prick testy

- Preanalytická 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



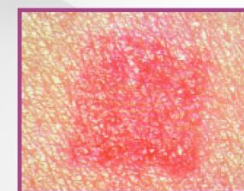


# Epikutánní test

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



## ALLERGY PATCH TEST Positive Reactions



Weak Positive



Strong Positive



Extreme Positive



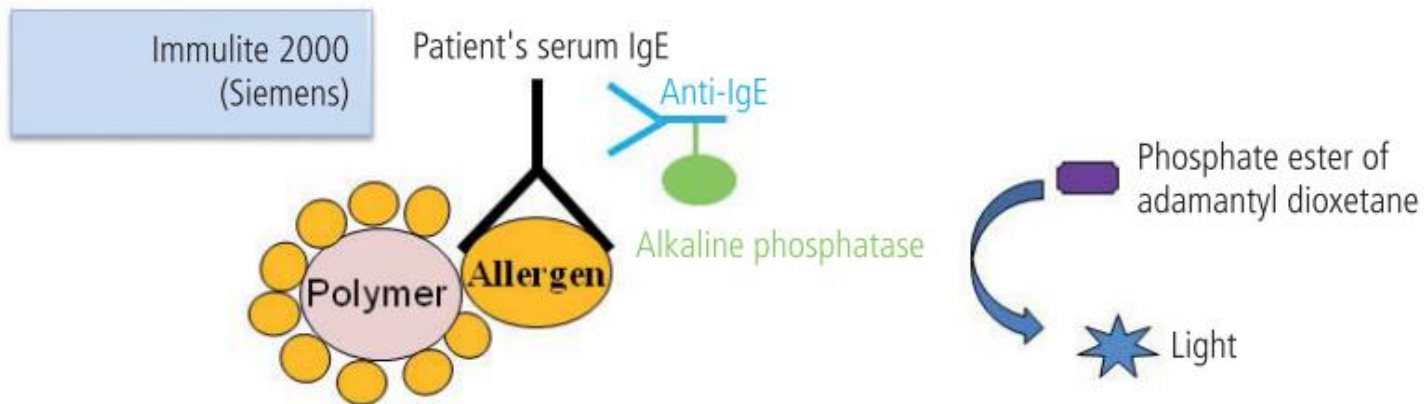
## 4. Vyšetření dýchacích cest

---

- **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)

# 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

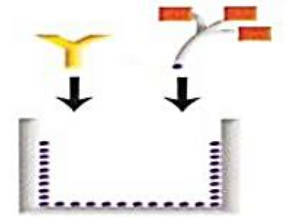


Celkové IgE hranice positivity:  
**100 IU/ml**

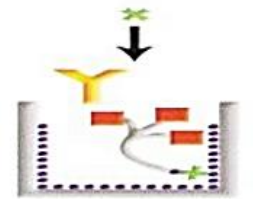
# AlaSTAT

- 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**

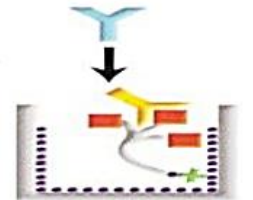
## AlaSTAT



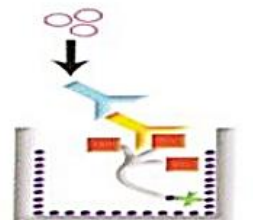
Serum and allergens incubate in liquid phase.



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



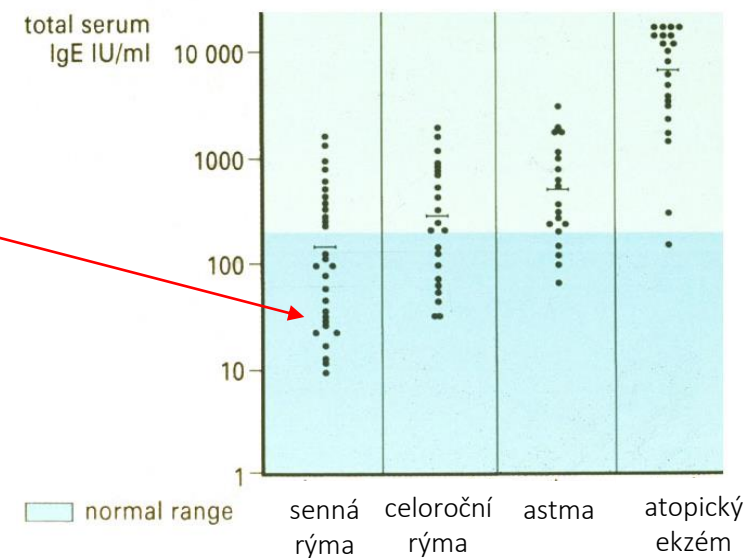
Antibody conjugate binds to serum IgE.



Substrate initiates colorimetric reaction.

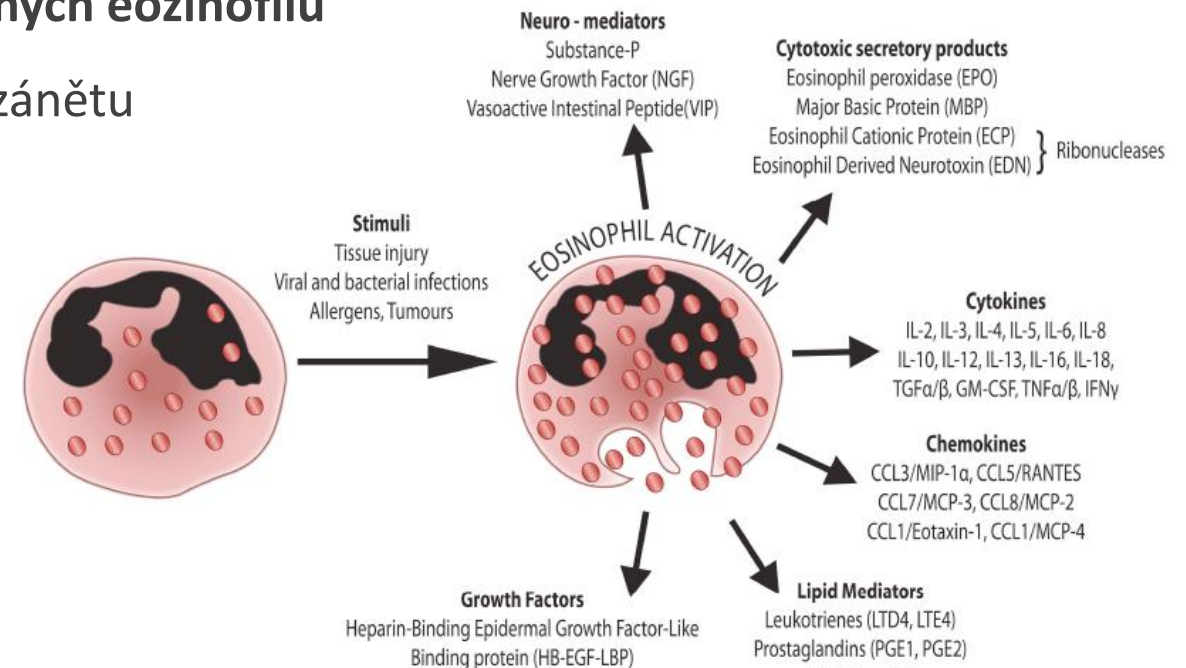
# Celkové a specifické IgE

- 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



# 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

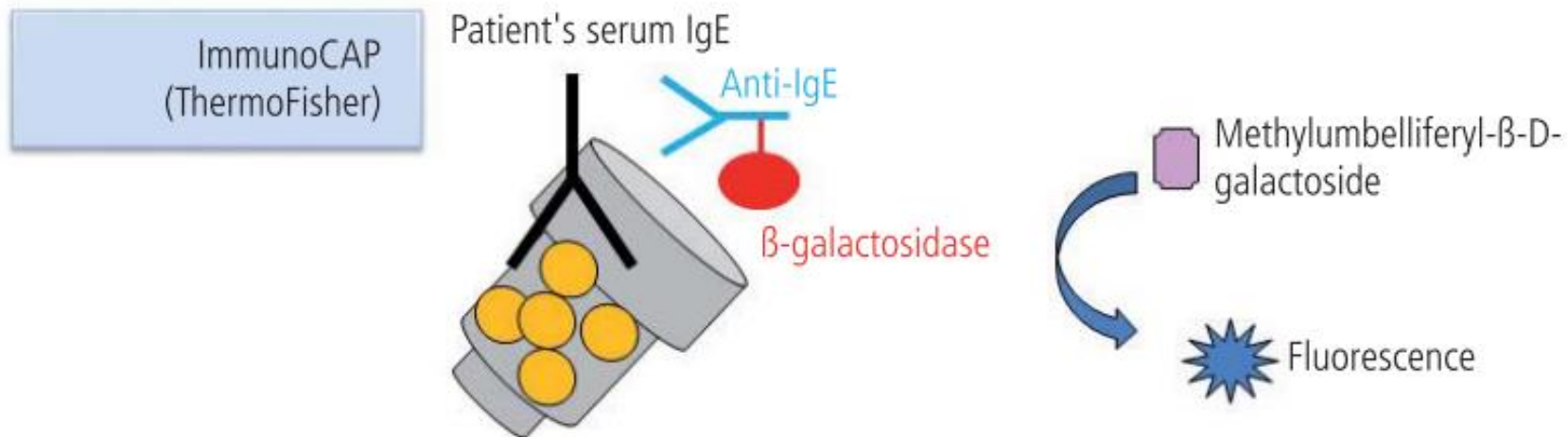


Pevná fáze – keříky, které obsahují aktivovanou celulózu – velká plocha

Na celulózu navázán alergen → na něj vazba pacientova IgE

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

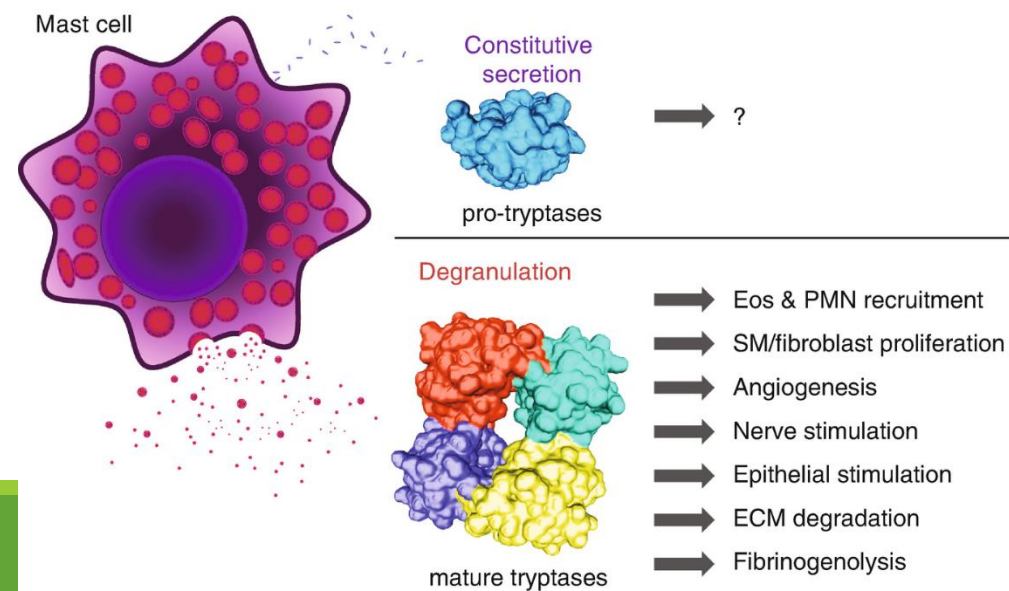
Přídavek substrátu → Methylumbelliferyl-  $\beta$ -D-galaktosid → enzym odštěpí  $\beta$ -D-galaktosid a vznikne **methylumberiferon** → **excitace světlem** → **emise fluorescenčního záření** (na rozdíl od Immulitu zde potřebujeme žárovku (Hg-Výbojka) k excitaci methylumbeliferonu!)



- **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 alergen (RAL)

- Vybrané rekombinantní alergen:

- Bříza – 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

- Účel stanovení: Detekce konkrétní komponenty, na kterou se váže specifické IgE – vyloučení zkřížené reaktivity, indikace pacientů pro alergenovou imunoterapii

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
- 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)

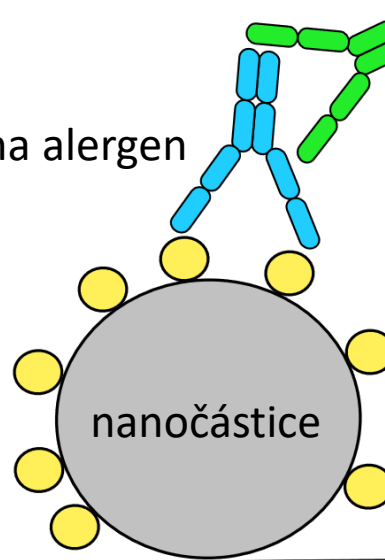


ALEX – čipy obsahují až 280 alergenů

2. Přídavek diluentu  
a 100ul pacientova séra



3. Vazba IgE na alergen



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

enzym



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

# 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>