Alergologické vyšetření část I.

Mgr. Julie Štíchová
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)

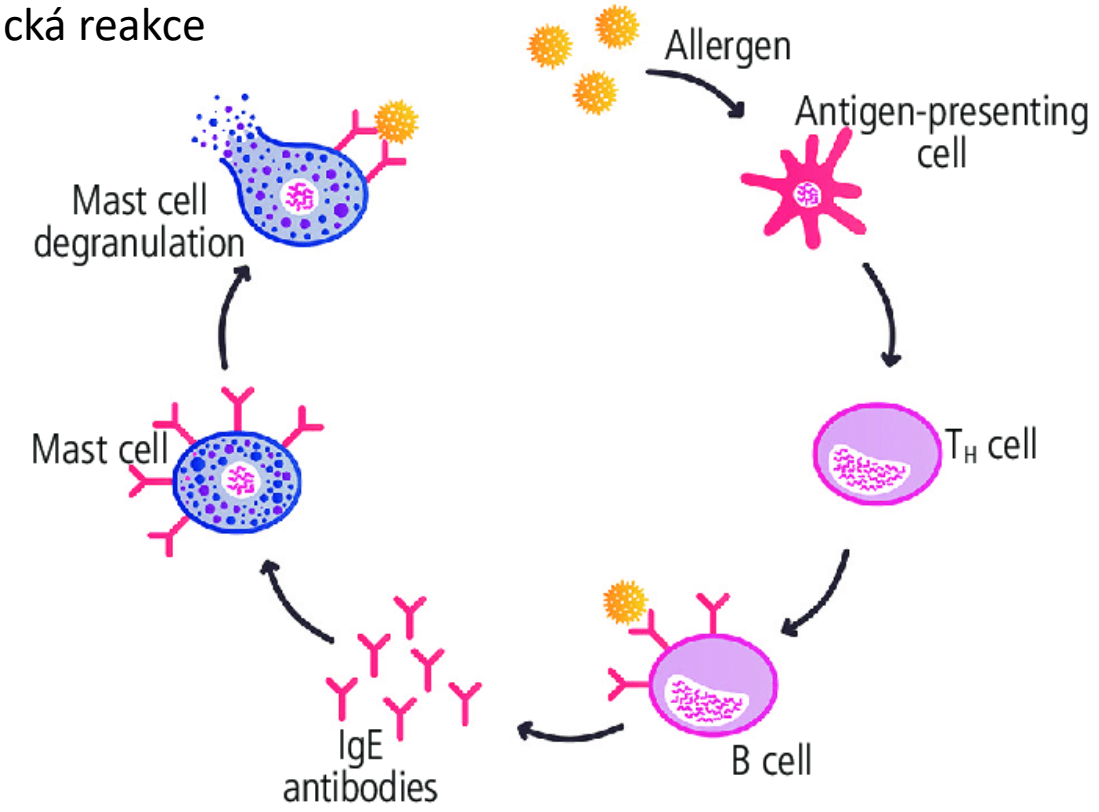
- Aktivace žírných buněk alergenem → degranulace

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

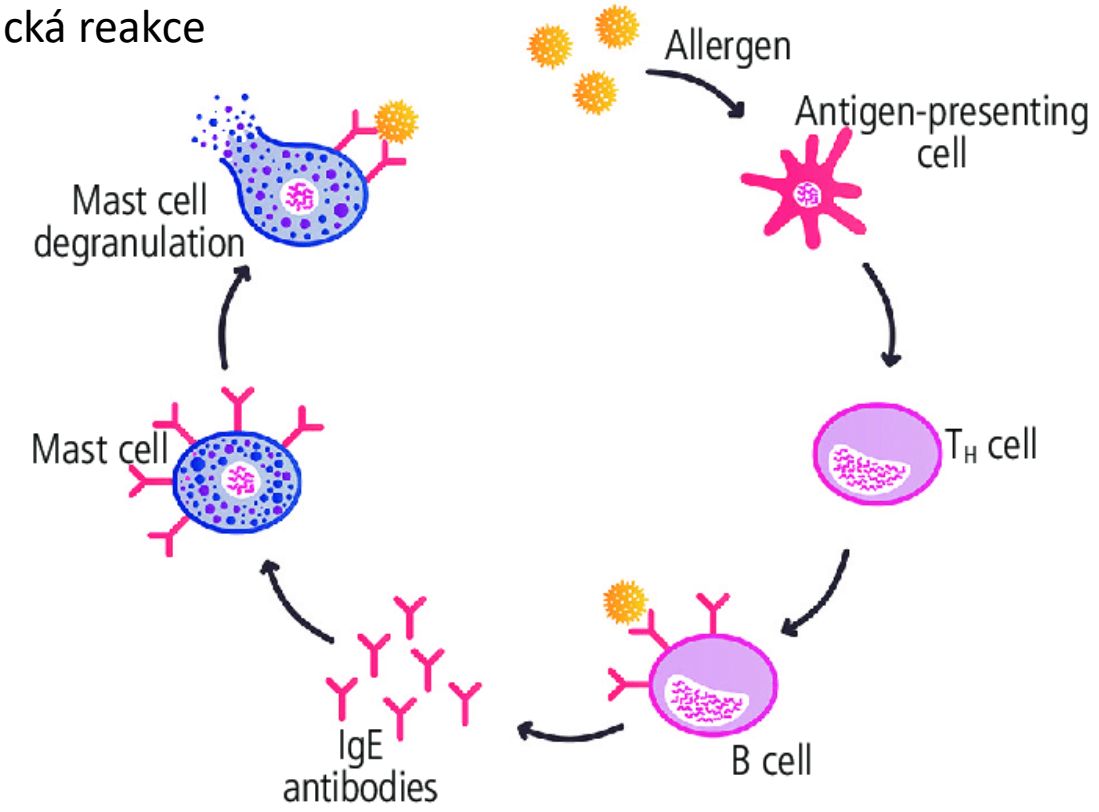


Přecitlivělost I. Typu

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

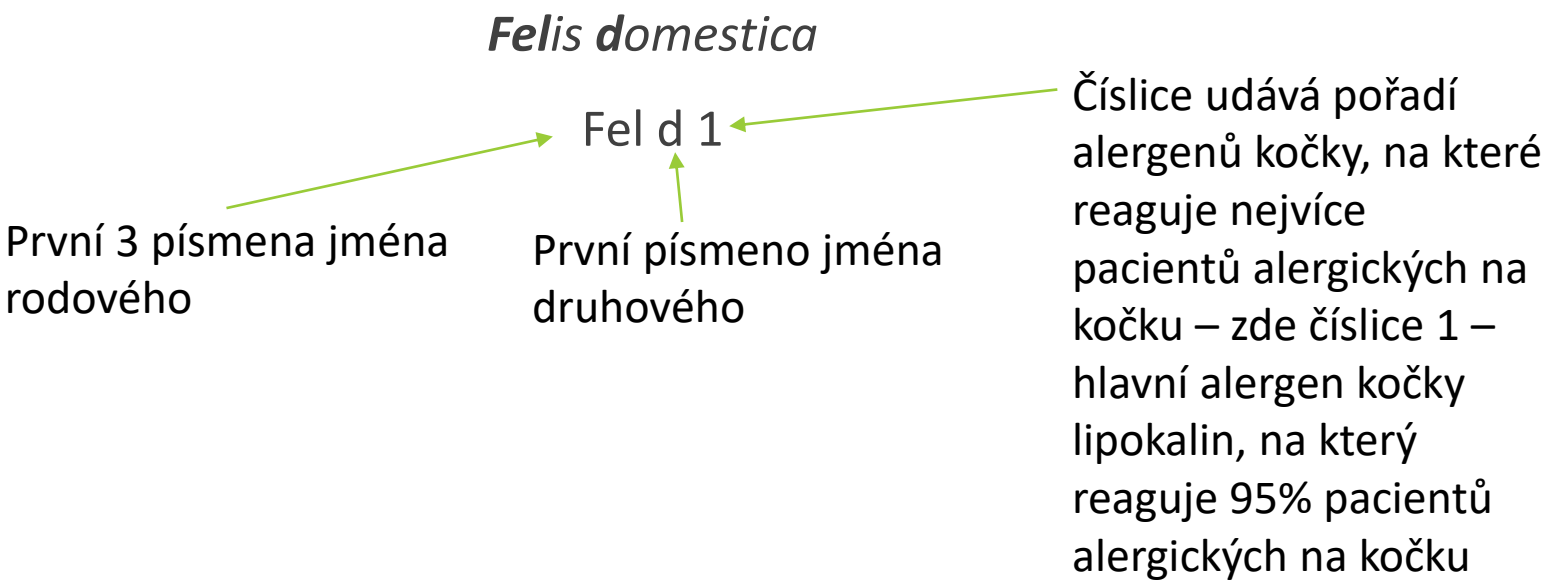
2. Časná a pozdní fáze alergická reakce

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

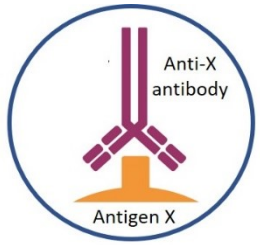
- Spouští se do pár minut od konzumace potraviny
- Klinické příznaky variabilní – od svědění dutiny ústní, rtů (orální alergický syndrom, OAS) až po život ohrožující anafylaxi

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 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

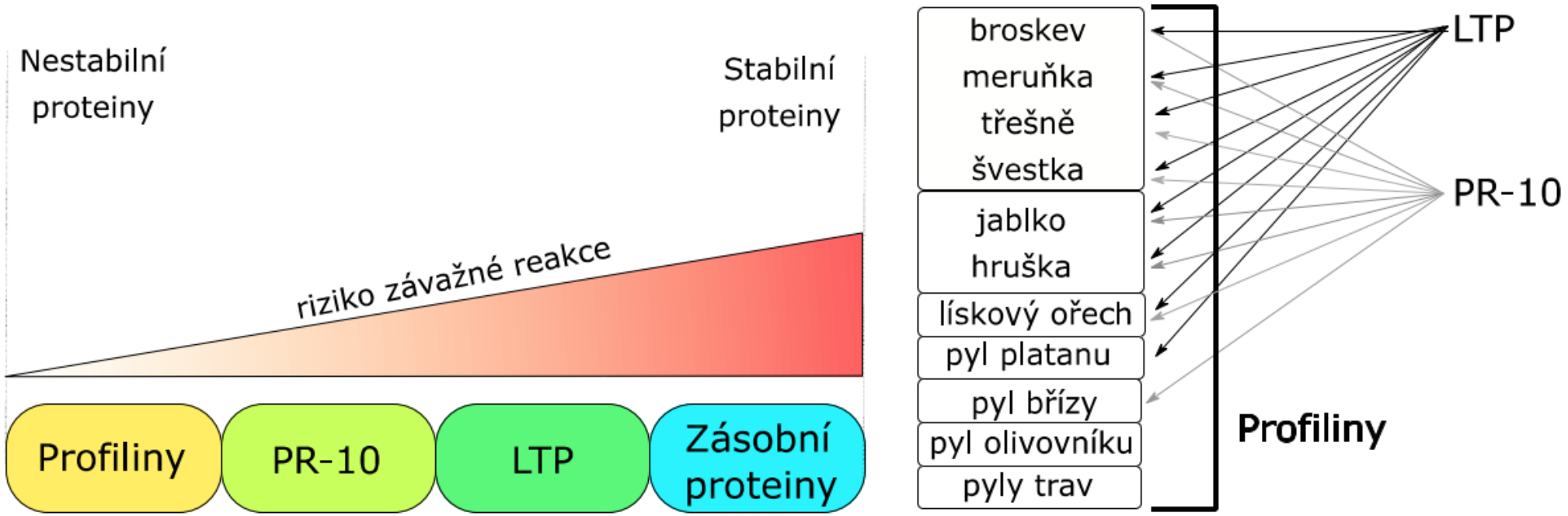
Shared epitopes

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*	Beef (hamburger)	10%
Cow's milk*	Goat's milk (goat)	92%
Cow's milk*	Mare's milk (horse)	4%
Pollen (birch, ragweed)	Fruits/vegetables (apple, peach, honeydew)	55%
Peach*	Other Rosaceae (plum, pear, apple, cherry)	55%
Melon* (cantaloupe)	Other fruits (avocado, watermelon, banana)	92%
Latex* (latex glove)	Fruits (avocado, kiwi, banana)	35%
Fruits (banana, kiwi, avocado)	Latex (latex glove)	11%

Panalergeny

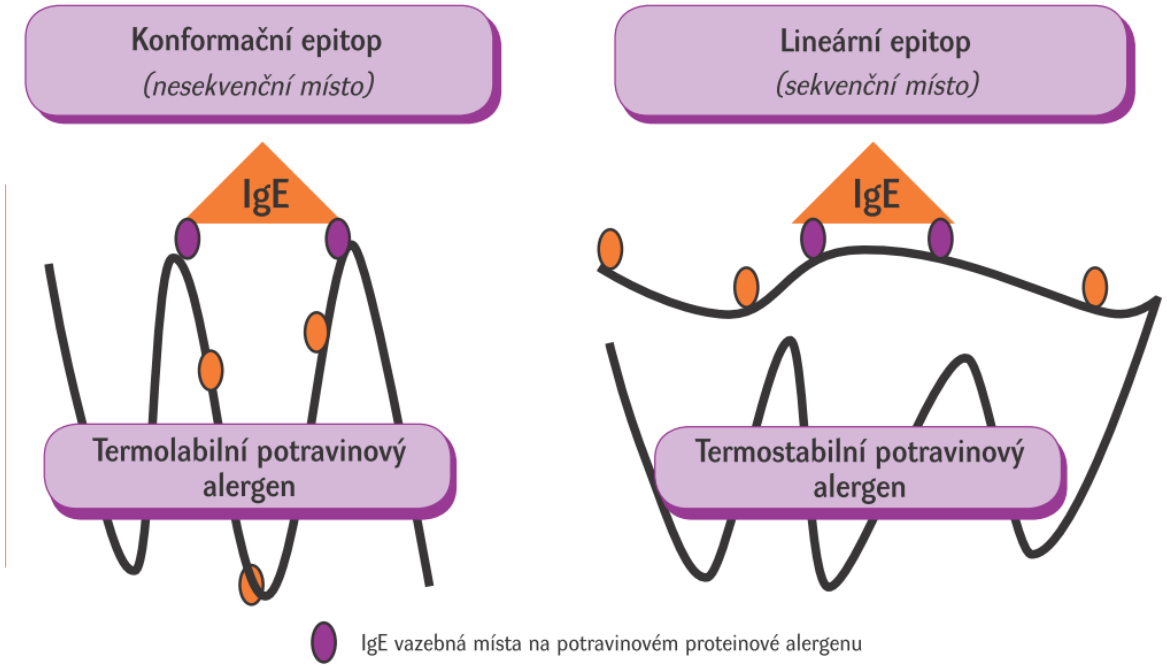


Obrázek č. 65: Základní skupiny panalergenů

Panalergeny - stabilita

Termolabilní alergeny:

- **Profiliny 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:

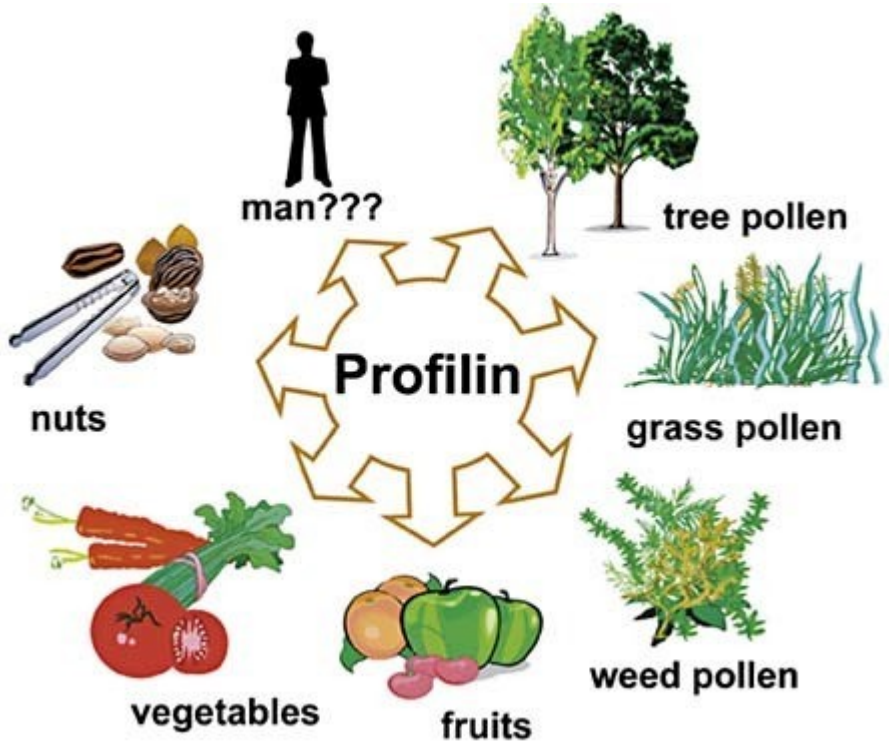
- **LTP a zásobní proteiny**
- Alergenní epitop tvořen blízkými aminokyselinami ve struktuře molekuly
- Není ovlivněn varem → molekuly povařením neztrácí alergenicitu
- Může hrozit závažná alergická reakce!

Pozn. Vzácně se vyšší teplotou může alergenicita potraviny 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:

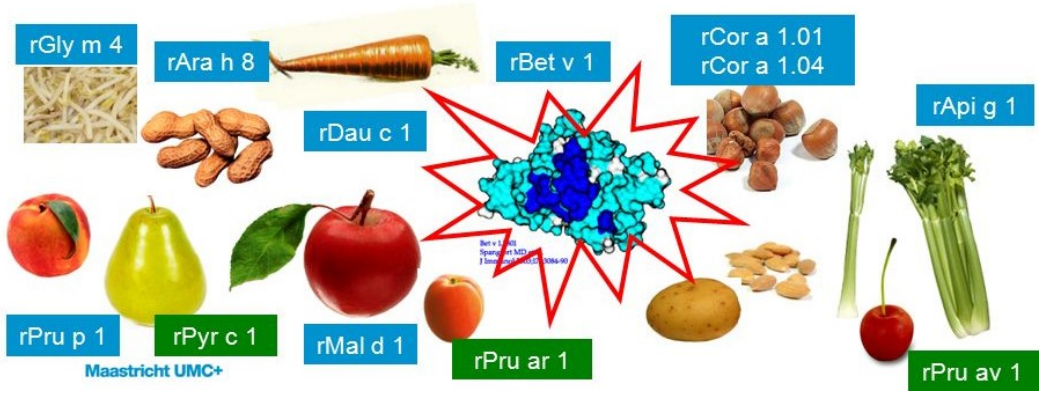
Pyl → Ovoce (hruška, banán, pomeranč) → Zelenina (mrkev, paprika, rajče) → Ořechy



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:



Pyl břízy → ovoce (jabko, 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 pyly

Panalergeny

4. Zásobní proteiny

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

	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

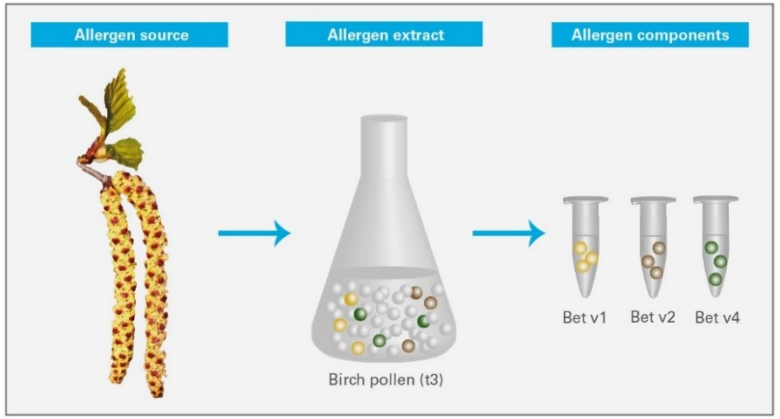
Alergeny pro laboratorní diagnostiku

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 alergeny

- Ze zdroje alergenu 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 molekulu, která vyvolává senzibilizaci
- Dokážeme rozlišit, zda u pacienta po podání určité potraviny hrozí **závažná reakce**
- 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
  - → 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

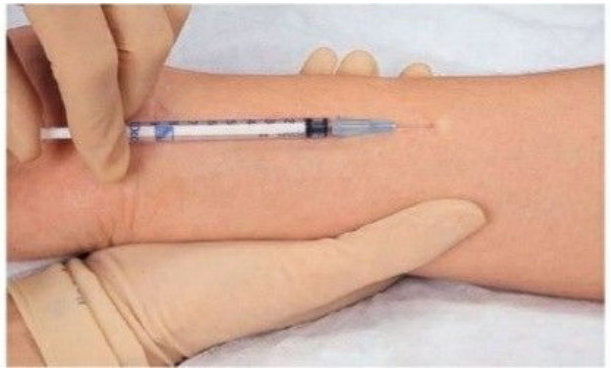
- Pro zhodnocení celkového zdravotního stavu pacienta se odebírá krev kromě alergologických parametrů také na:
  - Biochemie – základní biochemické parametry (glukóza, tryacylglyceroly, cholesterol, hormony štítné žlázy…)
  - Hematologie – krevní obraz
  - Imunologie – základní screening autoprotilátek (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 alergeny
2. Intradermální testy – blanokřídlý hmyz, léky
3. Epikutánní testy – kontaktní alergie (IV. Typ)



1. Aplikace kapky alergenu

2. Narušení kůže plastovým kopíčkem

3. Inkubace cca 20 min

4. Odečet velikost pupene

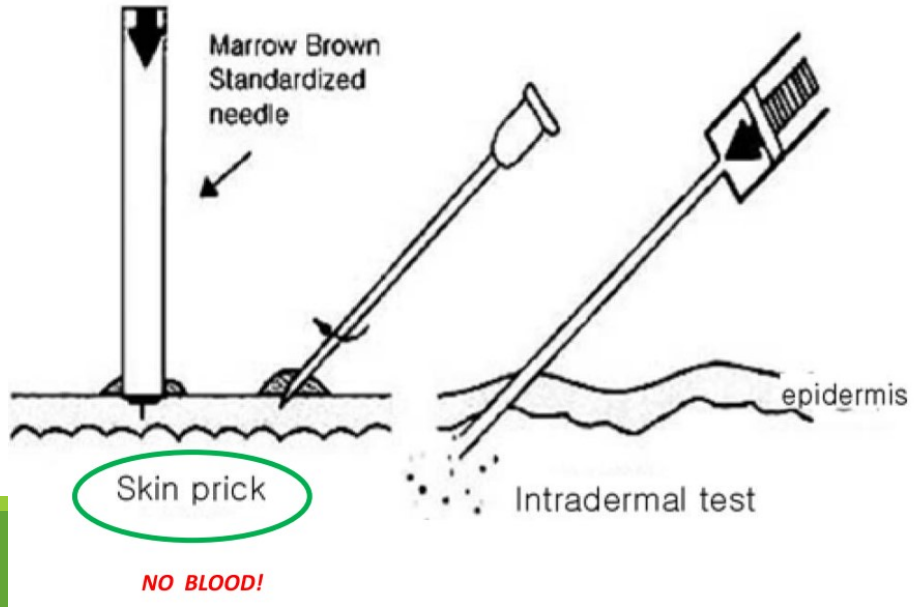
1. Prick testy

- 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 s kožním onemocněním v místě provedení testu a lidé, kterým není možné vysadit léčbu

Intradermální test

Aplikace alergenu do podkoží injekčně

- 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

https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2011/03/14.pdf

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 (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

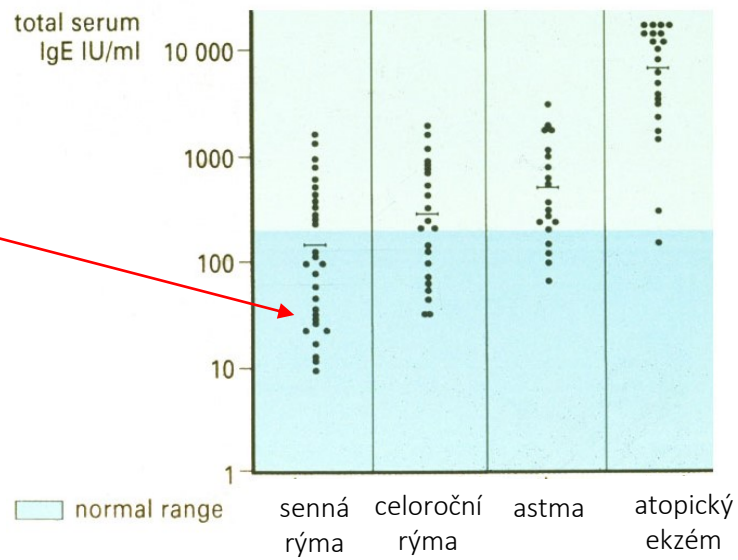
1. Nefelometrie – stanovení celkového IgE
2. Immulite 2000 – stanovení specifického IgE, eozinofilní kationický protein (ECP)
   Pozn. dříve se ke stanovení specifického IgE používala i ELISA **dnes už ne!!** – nahrazení přístrojovými metodami
3. AlaSTAT – stanovení specifického IgE
4. ImmunoCap Phadia – stanovení tryptázy a vybraných rekombinantních alergenů
5. MADx Allergy Explorer, Immunocap ISAC – multiplex metody - stanovení až 280 alergenů

Buněčné testy

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

Celkové a specifické IgE

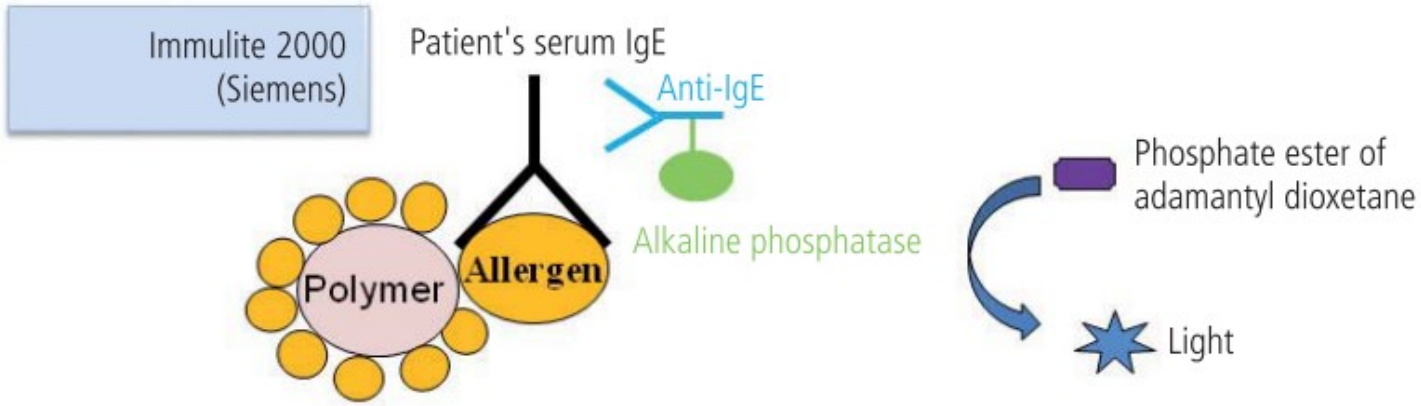
- Celkové IgE - norma **0-100 IU/ml** – stanovení **nefelometricky**
- Celková koncentrace IgE koreluje s přítomností alergického onemocnění (většinou)
  - Specifita 90 %, ale senzitivita jen 30-40 %
- Pouhé stanovení celkového IgE k určení přítomnosti alergie nestačí, protože:
  - **Vysoké IgE** také 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 %
  - https://portal.med.muni.cz/clanek-695-vysetrovaci-metody-v-imunologicke-a-alergologicke-laboratori.html

Immulite 2000 – specifické IgE

- 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 přídavku **dioxetan-adamantyl-fosfátu** odštěpí enzym fosfát → vzniká nestabilní aniont, který při rozkladu uvolní emisi fotonů – zaznamená se počet záblesků

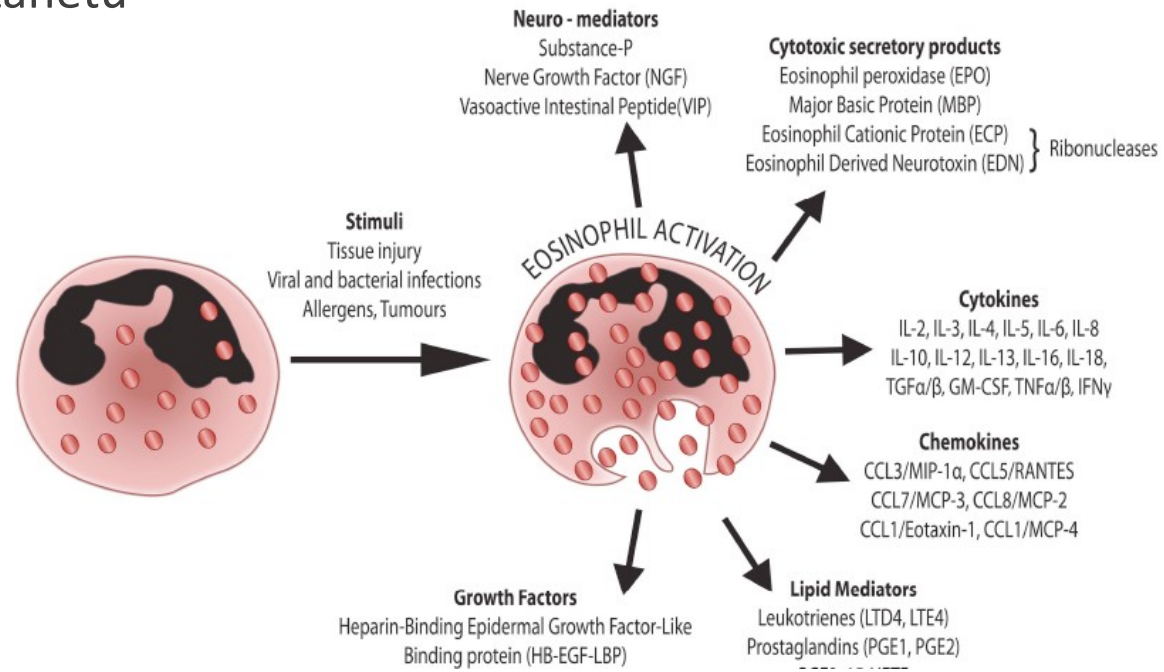


Celkové IgE hranice pozitivity:

100 IU/ml

Immulite 2000 – stanovení ECP

- Princip stanovení – chemiluminiscence - podobně jako stanovení specifického IgE
- 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 **< 13,5 ng/ml**



ImunoCap – fluorimetrie

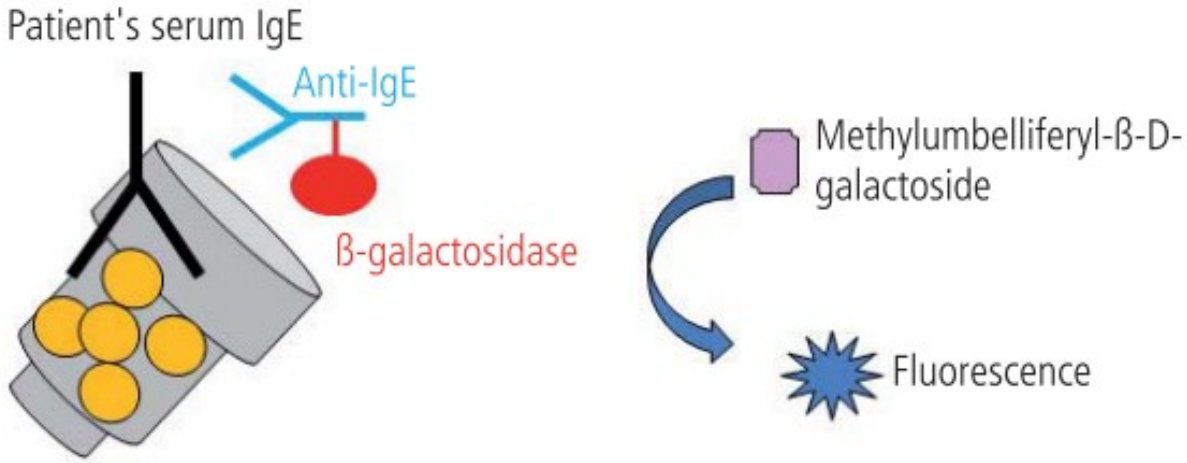
Pevná fáze – kepíky, které obsahují aktivovanou celulózu – velká plocha

Na celulózu navázán alergen → na něj vazba pacientova IgE

V dalším kroku přídavek anti-IgE protilátky značené β-D-galaktosidázou

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

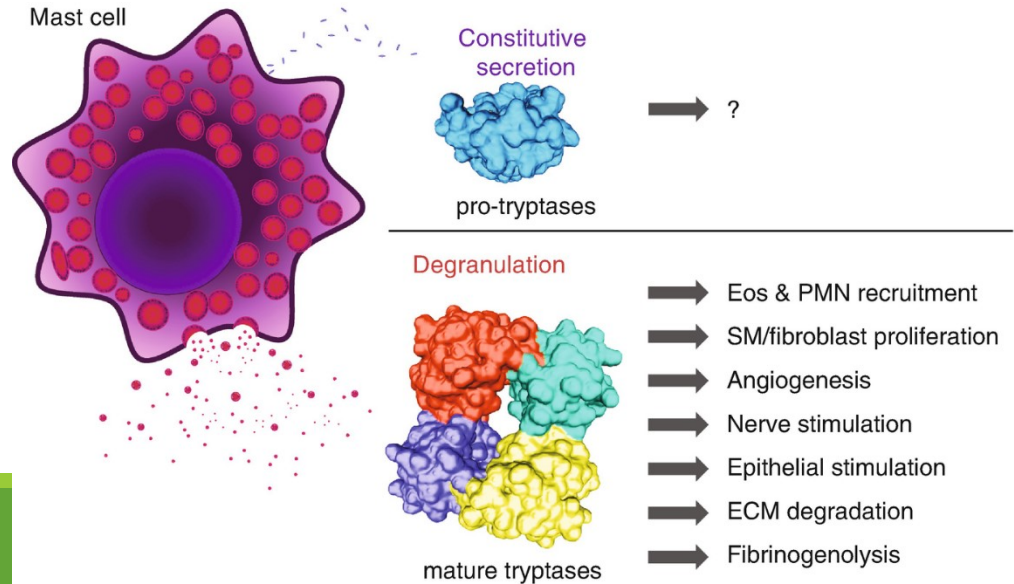
ImmunoCAP (ThermoFisher)



- **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 **systémových 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 – RAL
rekombinantní alergeny

	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)

- 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 (koncentrací) roste pravděpodobnost klinických příznaků onemocnění
  - Výsledek stanovení – vytipovat pacienty vhodné pro alergenovou imunoterapii (např. silně alergické na včelu nebo vosu kde hrozí anafylaktická reakce)
  - Pacienti – vakcinace alergeny včely/vosy
  - Cíl – snaha navodit toleranci tak, aby se místo IgE tvořilo alergen specifické IgG_4
  - IgG_4 nemá schopnost se vázat na receptory bazofilů a žírných buněk !! → nedochází k degranulaci po styku s alergenem → redukce reakce na včelu nebo vosu