
**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd**

**Využití rekombinantních alergenů k diagnostice
alergických onemocnění**

(bakalářská práce)

Praha, 2012

Nela Karásková

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal/a, řádně cituji. Prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat paní primářce MUDr. Stanislavě Honzové, Mgr. Martině Fialové a panu PharmDr. Petru Jílkovi za připomínky k této práci.

Nemalý dík patří také týmu laboratoře sérologie a infekční imunologie společnosti sylab czech s.r.o. za jejich podporu a shovívavost.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat týmu purifikace 1 společnosti Baxter Bio Science za neutichající podporu ve studiu.

Obsah

Seznam zkratk.....	4
Souhrn, Abstract, Zadání -cíl práce.....	5
1. Úvod.....	6
2. Problematika alergií.....	7
3. Alergická reakce I. Typu a protilátky IgE.....	8
3.1. Protilátky IgE	8
3.2. Alergický zánět	9
4. Alergická onemocnění.....	9
4.1. Alergická reakce dýchacích cest na inhalační alergeny	9
4.1.1. Alergická rýma a další příznaky.....	9
4.1.2. Astma bronchiale.....	10
4.2. Alergické reakce spojené s kožními projevy	11
4.2.1. Kopřivka (urtikarie), otok kůže podkoží případně sliznic (angioedém).....	11
4.2.2. Atopický ekzém, dermatitida.....	11
4.2.3. Kontaktní dermatitida.....	12
4.3. Anafylaktická reakce	12
4.4. Alergická reakce na potraviny	13
4.4.1. Příznaky potravinové alergie.....	13
4.4.2. Fenomén zkřížené alergie.....	14
5. Alergeny.....	15
5.1. Názvosloví alergenů	15
5.2. Rekombinantní alergeny	16
5.2.1 Příprava rekombinantních alergenů.....	17
5.2.2. Využití rekombinantních alergenů v diagnostice.....	17
5.3. Jednotlivé skupiny alergenů	18
5.3.1 Alergeny interiérů, bytového a domovního prostředí.....	18
5.3.2 Alergeny rostlinného původu (pyly, potraviny).....	19
5.3.3 Alergeny živočišného původu.....	23
5.3.4 Alergeny blanokřídlého hmyzu.....	25
6. Diagnostika alergií.....	27
6.1. Alergologické kožní testy	27
6.1.1 Druhy kožních testů.....	27
6.1.2 Hodnocení kožních testů.....	28
6.2 Laboratorní diagnostika	28
6.2.1 Hladina celkových protilátek IgE.....	29
6.2.2 Hladiny alergen specifických IgE.....	29
6.2.3 Funkční buněčné testy.....	40
6.2.4. Microarray.....	41
7. Konkrétní příklad využití rekombinantních alergenů.....	42
7.1. Kazuistiky	42
7.2. Výsledky laboratorního vyšetření	47
8. Shrnutí a závěr.....	49
9. Seznam použité literatury.....	50

Seznam zkratek

- BAT – test aktivace bazofilů
- CD – jednotné značení antigenů na povrchu buněk
- CRD – component - resolved in vitro diagnosis, diagnostika využívající rekombinantní alergeny
- ECP - eozinofilní kationický protein
- ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, imunochemická metoda stanovení peptidových nebo proteinových látek
- FcεR – receptor pro Fc fragment protilátek
- Ig G – imunoglobulin G (protilátka třídy G)
- IgE- imunoglobulin E (protilátka třídy E)
- IL – interleukin
- NK buňky – natural killer buňky
- PRP - pathogenesis- related proteins, ochranné a obranné bílkoviny rostlin
- RAST - radio- alergologický sorbent test
- Th2- T lymfocyty podtřídy 2
- WHO/IUIS - World Health Organization/ International Union of Immunological Societies, světová zdravotnická organizace / mezinárodní unie imunologických společností

Souhrn

Laboratorní diagnostika alergických onemocnění je v dnešní době zaměřena na průkazy specifického IgE. K rozpoznání senzibilizace jsou využívány směsné alergeny často z přírodních zdrojů s nedostatečně definovaným složením. K přesné specifikaci alergenů jsou určeny testy využívající rekombinantní alergeny. Rekombinantní alergeny se využívají nejen ke stanovení specifických protilátek IgE, ale také k testu aktivace bazofilů. Nejmodernějším testem je microarray metoda využívající rekombinantní alergeny.

V závěru práce jsou uvedeny kazuistiky a výsledky laboratorních testů, které ukazují praktické využití rekombinantních alergenů.

Abstract

Laboratory diagnosis of allergic diseases is nowadays focused on the identity of specific IgE. The detection of sensitization are often used mixed allergens from natural sources with poorly defined composition. The exact specification of the allergens are tests using recombinant allergens. Recombinant allergens are not only used for the determination of specific IgE antibodies, but also to test basophiles activation. Latest test is a microarray using recombinant allergens method.

In conclusion of this work are presented case reports and the results of laboratory tests that demonstrate the practical use of recombinant allergens.

Zadání práce - Cíl

V novém zaměstnání jsem byla přiřazena k analyzátorům UniCAP™ a Immulite® 2000 diagnostikujícím alergeny. Zařazení k těmto analyzátorům mě zaujalo a přivedlo mě k tomuto tématu. Cílem mé bakalářské práce je vypracování uceleného přehledu týkajícího se diagnostiky alergií. Dále pak objasnění využití rekombinantních alergenů v diagnostice zkřížených alergií.

1. Úvod

Diagnostika alergií je velice diskutované téma. Časté jsou i polemiky o využití rekombinantních alergenů k jejich diagnostice.

Laboratorní vyšetření patří mezi pomocné vyšetřovací metody. Anamnéza a její pečlivý rozbor jsou nezbytné k výběru vhodných laboratorních testů. Laboratorní testy jsou obvykle lépe snášeny, bývají jednou ze základních informací pro stanovení diagnózy a volbu terapie. Diagnostika je zaměřena především na stanovení hladin protilátek specifického IgE, stále častěji jsou využívány nové metody jako je BAT. Metoda microarray je zatím pro svou finanční náročnost pro rutinní využití nedostupná.

Velmi problematickou skupinou alergických reakcí je potravinová alergie, kterou trpí ve vyspělých zemích okolo 6-8% dětí a 2-4% dospělých. Principy potravinové alergie nejsou spolehlivě odhaleny. Ukázalo se, že nejvíce senzibilizující jsou v potravinách jen krátké sekvence aminokyselin označované jako epitopy. Epitopy mohou být společné i pro druhově rozdílné bílkoviny, a proto jsou zodpovědné za fenomén zkřížené alergie. (Petrů a kol., 2012)

Testy specifického IgE jsou pro diagnostiku potravinové alergie nedostatečným vodítkem, časté jsou nálezy senzibilizace na danou potravinu bez klinických příznaků nebo naopak negativní výsledky i při zjevných klinických projevech. Důvodem tohoto rozporu mohou být pro test použité nestabilní alergeny z přírodních zdrojů. Částečně tento problém napomohly vyřešit rekombinantní alergeny.

2. Problematika alergií

Alergie je nepřiměřená reakce imunitního systému organismu na látky, se kterými se běžně setkává v prostředí. Expozice alergenům navozuje ve tkáních a orgánech zánětlivé změny, které mohou vést ke změnám jejich struktury a funkce. Alergie může být lokální nebo systémová. Spektrum projevů alergických reakcí je velmi široké, od rýmy až po anafylaktický šok, jenž může končit i smrtí.

Atopie je dědičný sklon k alergii, jehož typickými projevy jsou atopický ekzém (atopická dermatitida), alergická rýma a alergický zánět spojivek a alergické astma.

Alergie je jedno z velmi častých onemocnění vyskytujících se zejména v rozvinutých zemích. Incidence tohoto onemocnění se prudce zvyšuje.

3. Alergická reakce I. Typu a protilátky IgE

Alergie je druhem přecitlivělosti organismu na alergeny projevující se produkcí IgE. Po prvním setkání s antigenem dochází k senzibilizaci pacienta. Senzibilizace vzniká mechanismy, kterými by imunitní systém za fyziologických podmínek odpovídal na mnohobuněčné parazity. Jde tedy o stimulaci diferenciací panenských T lymfocytů do podtřídy TH2 a následně stimulaci B lymfocytů. B lymfocyty jsou stimulovány k tvorbě protilátek třídy IgE. Ke stimulaci slouží interleukiny (IL), především IL-4, IL-5 produkované TH 2 lymfocyty. Protilátky třídy IgE se váží na receptory žírných buněk a bazofilů. Opakovaným kontaktem s alergenem může dojít k přemostění molekul IgE navázaných na receptorech. Přemostění způsobí agregaci receptorů těchto buněk a vyvolá uvolnění mediátorů hlavně histaminu a heparinu. V další fázi dochází k sekreci a tvorbě metabolitů kyseliny arachidonové tj. prostaglandinů, leukotrienů, tromboxanů. (Krejsek, Kopecký, 2004)

3.1. Protilátky IgE

Protilátky IgE jsou imunoglobuliny produkované B lymfocyty (plazmatickými buňkami) a jsou specifické pro jednotlivé alergeny. Molekula imunoglobulinů se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců. Těžké řetězce molekul jsou glykosylovány a váží se na specifické receptory pro Fc fragment, které se vyskytují především na buňkách imunitního systému, ale také na buňkách epitelových. Jsou tři receptory pro Fc fragment protilátek. Jedná se o vysokoafinní receptor FcεRI, nízkoafinní receptor FcεRII a membránová molekula galektin-3. Receptor FcεRI je ve vysoké hustotě zastoupen na mastocytech, bazofilech, Langerhansových buňkách kůže a folikulárních dendritických buňkách. Nízkoafinní receptor FcεRII pro Fc fragment IgE se vyskytuje zejména na B lymfocytech, NK buňkách, makrofázích, dendritických buňkách, eozinofilech, trombocytech a aktivovaných epitelových buňkách. Galektin - 3 patří do skupiny lektinů a s IgE reaguje prostřednictvím vazby cukerného zbytku obsahujícího galaktózu. Je zastoupen na mastocytech, makrofázích, neutrofilech, eozinofilech a na epitelových buňkách. (Krejsek, Kopecký, 2004)

3.2. Alergický zánět

Alergický zánět postihuje cílové orgány, především sliznice dýchacího a trávicího traktu, kůže nebo plíce. Makrofágy, eozinofilní granulocyty, mastocyty a TH2 lymfocyty se kumulují v postižené tkáni, kde spolu s epitelovými buňkami, fibroblasty a buňkami hladkého svalstva vytváří zánět. Dochází k degranulaci mastocytů, následné bronchokonstrikci, vasodilataci a edému. S odstupem hodin až desítek hodin nastupuje tzv. pozdní fáze alergického zánětu. Pozdní fáze je zprostředkovaná buněčnými složkami, dochází k ireverzibilním změnám tkáně, k její remodelaci a ztrátě funkce. (Krejsek, Kopecký, 2004)

4. Alergická onemocnění

Nejčastěji jsou alergickými projevy postiženy sliznice a kůže. Do kožních projevů patří atopický ekzém, kontaktní dermatitida, kopřivka. Slizniční projevy zahrnují postižení horních a dolních cest dýchacích jako jsou alergická rýma, astma bronchiale, postižení oční spojivky alergickou konjunktivitidou. Mezi systémové projevy patří alergie na potraviny, léky nebo reakce na hmyzí bodnutí. Při systémové reakci je postiženo více orgánových systémů současně dochází k vasodilataci s poklesem krevního tlaku a zrychlení tepu, bronchospasmem, kožními a gastrointestinálními projevy. (Hořejší, Bartůňková, 2009)

4.1. Alergická reakce dýchacích cest na inhalační alergen

Mezi inhalační alergen lze zařadit hlavně pyly, prachové alergen (plísně a roztoči) a alergen zvířecí. Nejčastější reakcí na tyto alergen je alergická rýma a astma bronchiale.

4.1.1. Alergická rýma a další příznaky

Alergická rýma se může vyskytovat jako sezónní onemocnění nebo celoroční rýma. Alergická rýma zhoršuje kvalitu života nemocných a může se z ní vyvinout astma. K příznakům patří kýchání, svědění nosu, pocit „ucpaného nosu“ a

hypersekrece vodnatého hlenu. Často dochází i k zánětům spojivek, bolestem hlavy a ke krvácení z nosu.

Sezonní alergická rýma je vyvolána inhalací pylových zrn. Typický je pro ni sezonní výskyt s příznaky po celé vegetační období dané rostliny nebo jen jeho část. V našich podmínkách jsou nejdůležitější pylové alergeny jarních stromů a keřů, později travin a plevelových rostlin. Sezonní potíže vyvolávají i spóry venkovních plísní. Jejich počet vrcholí v letních a podzimních měsících. Pacienti jsou mimo vegetační období bez příznaků, pokud u nich nedojde k rozšíření alergie na jiné než pylové alergeny. Průběh alergické rýmy závisí na množství pylových zrn v ovzduší a na intenzitě senzibilizace. K vyvolání obtíží stačí 5-50 pylových zrn v 1m³ vzduchu. Sezonní alergická rýma se až v 40% komplikuje ojedinělými nebo déletrvajícím astmatickými projevy. Pro onemocnění vzniklé pylovou přecitlivělostí je správné používat termín polinóza, rýma je jen součástí celkového onemocnění. (Špičák, Panzner, 2004)

Celoroční alergická rýma tzv. perenniální, vzniká přecitlivělostí na celoročně se vyskytující alergeny. Nejčastěji na alergeny vnitřního prostředí jako jsou roztoči, zvířecí alergeny, spory domovních plísní a některé profesní alergeny. U celoroční rýmy působí alergen dlouhodobě v malých dávkách a vyvolává výraznější a trvalejší zánětlivé změny na nosní sliznici. (Špičák, Panzner, 2004)

V důsledku zkřížené reaktivity mezi některými inhalačními a potravinovými alergeny může docházet k pálení sliznice dutiny ústní. (Krejsek, Kopecký, 2004)

4.1.2. Astma bronchiale

Průduškové astma je nejzávažnější komplikací chronické rýmy, 80-90% astmatiků trpí chronickou rýmou a téměř polovina pacientů s chronickou rýmou má i astma nebo známky bronchiální hyperreaktivity. Ve většině případů rýma astmatu předchází.

Astma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest. Hlavní podíl na tomto zánětu mají lymfocyty Th2, žírné buňky a eozinofilní granulocyty. Méně neutrofilní a bazofilní granulocyty, destičky, makrofágy, fibroblasty a epitelie dýchacích cest a buňky hladkého svalu. (Špičák, Panzner, 2004)

Klinicky se astma projevuje klidovou nebo námahovou dušností, pískoty a kašlem v návaznosti na expozici alergenu nebo při infekci respiračních cest.

Záchvaty dušnosti jsou typické hlavně časně ráno nebo v noci, bývají také vyvolány fyzickou námahou nebo silnými emocemi. (Teřl, Rybníček, 2008)

K příznakům astmatu dochází především po degranulaci mastocytů vlivem prozánětlivých mediátorů. S odstupem 3-8 hodin dosahuje vrcholu syntéza leukotrienů a prostaglandinů. Ty jsou zodpovědné za bronchokonstrikci, otok sliznice a zvýšenou produkci hlenu. Během astmatického záchvatu dochází i k infiltraci submukózy plic eozinofily a aktivovanými T lymfocyty. (Krejsek, Kopecký, 2004)

4.2. Alergické reakce spojené s kožními projevy

Do kožních projevů alergie patří atopický ekzém, kontaktní dermatitida, kopřivka. K nejčastějším alergenům vedoucím ke vzniku kožních projevů patří potraviny jako ovoce, ryby, mléko, mouka, arašídy, sója nebo vejce. Kožní reakce se objevují i po podání léků (např. penicilinů nebo sulfonamidů). Pokožku také iritují hmyzí jedy především vosy a včely.

4.2.1. Kopřivka (urtikarie), otok kůže podkoží případně sliznic (angioedém)

Kopřivka a angioedém jsou kožní onemocnění vyskytující se v kterémkoliv věku. Jsou charakterizovány vasodilatací a zvýšenou permeabilitou cév v kůži u kopřivky a podkoží u angioedému. Vyskytují se typické kopřivkové pupeny (pomfy), které jsou proměnlivé a intenzivně svědí. (Špičák, Panzner, 2004)

4.2.2. Atopický ekzém, dermatitida

Atopický ekzém je silně svědivé, chronické zánětlivé kožní onemocnění. Postihuje alergiky většinou v raném věku, proto je také nazýván dětským ekzémem. Charakteristický vývoj klinického obrazu dává atopickému ekzému rysy systémového onemocnění. Většinou vzniká v souvislosti s dědičnou predispozicí. Pokožka pacientů bývá nadměrně přesušená s defektní mechanickou bariérou pokožky. (Špičák, Panzner, 2004)

V počáteční fázi dochází k rozvoji edému v mezibuněčných prostorech. Postupně se rozvíjí svědivý ekzém jako reakce na degranulaci eozinofilů a mastocytů. Atopický ekzém se vyskytuje na predilekčních místech, jako jsou jamky pod kolena a lokty, na obličeji, krku, u kojenců se ekzém objevuje i v místech

zapářky. Postižená místa velmi svědí. Pokožka se stává drsnější. (Kopecký, Krejsek, 2004)

4.2.3. Kontaktní dermatitida

Jedná se o zánětlivé onemocnění kůže, která se objevuje po přímém kontaktu s iritující látkou. Kožní změny připomínají atopický ekzém. Reakce často vzniká na kovy, na chemikálie, na kosmetiku, na mýdlo, šampón nebo na prací prostředky. Je důležité pátrat po iritující látce a tu odstranit z kontaktu. (Kopecký, Krejsek, 2004)

4.3. Anafylaktická reakce

Anafylaktická reakce je extrémní, život ohrožující forma alergické reakce, okamžitá odpověď jedince na podání alergenu, nejpozději do 30 minut. Anafylaktická reakce se může vyvinout až v anafylaktický šok. Nejčastěji k projevům reakce dochází po injekci léku nebo po bodnutí hmyzem.

Po vazbě alergenů na imunoglobuliny třídy IgE navázané na receptory mastocytů dojde k jejich degranulaci. Z granul se uvolní adenosin, který zesiluje další degranulaci mastocytů a má bronchokonstriční účinek. Uvolní se také histamin, heparin a tryptázy. Degranulace vede k tvorbě lipidových mediátorů vznikajících z kyseliny arachidonové například k syntéze prostaglandinu D₂, sulfidopeptidových leukotrienů. (Kopecký, Krejsek, 2004)

Vyplavení aktivních mediátorů způsobí roztažení cév celého těla. Postupně začne klesat krevní tlak a jako důsledek poklesu tlaku se může zvyšovat tep, může dojít k otokům dýchacích cest. U postiženého se může dostavit astmatický záchvat, který vede k zužování průdušek. Tuto situaci lze považovat za obranou reakci, kdy se tělo snaží zabránit vdechování nebezpečné látky.

Anafylaktická reakce je kritickou klinickou situací, která vyžaduje zajištění funkcí především dýchacího a kardiovaskulárního systému. (Špičák, Panzner, 2004)

4.4. Alergická reakce na potraviny

Potravinovou alergií se rozumí nežádoucí reakce na přijatou potravu. Lze ji rozdělit na bezprostřední a opožděnou. Reakce mohou vést ke vzniku kopřivky, angioedému, alergického ekzému, astmatu, gastrointestinální reakci nebo k rozvoji anafylaktického šoku. (Kopecký, Krejsek, 2004)

4.4.1. Příznaky potravinové alergie

Potravinové alergie se projevují gastrointestinálně, například nechutenstvím, nevolností, zvracením, akutními a chronickými průjmy, břišními kolikami, pocity plnosti, pálením žáhy a orálním alergickým syndromem.

Orální alergický syndrom nacházíme nejčastěji u pacientů s přecitlivělostí na pylové alergeny (břízu, olši, lísku, trávy, obilí, pelyněk, ambrozii, ale i latex resp. *Hevea brasiliensis*). Pacient bezprostředně po požití potravin rostlinného původu (především čerstvého ovoce, zeleniny, ořechů, luštěnin, koření nebo obilovin), pociťuje pálení a svědění jazyka, patra, rtů, poruchy polykání, ale i kýčání a obstrukci nosu nebo otoky v obličeji. Požitá potravina bývá produktem rostlin, které jsou nějakým způsobem botanicky spřízněny s rostlinou, na kterou je pacient inhalačně alergický. Není podstatné, zda konzumovaná potravina je kořen, list, plod či dokonce květ (pozor na čaje, med, vermuty, koření). Případem totožnosti je líska a lískový ořech, lípa a lipový květ nebo olivovník s olivou nebo olivovým olejem.

Tímto syndromem trpí kolem 50% pylových alergiků s přecitlivělostí na časné jarní alergeny (pyly stromů) a okolo 25% pylových alergiků s převahou alergie na pyly trav a obilí.

Shoda bílkovin může být jen v několika málo aminokyselinách (epitop). Malá shoda může zapříčinit diagnostický omyl. Při vyšetření specifického IgE vyjde vyšetřovaná potravina falešně negativní, přestože klinické příznaky jsou zcela přesvědčivé a pacient je alergický na pyly. Vysvětlením této situace může být zkřížená reakce proteinu potravin v kontaktu se sliznicí dutiny ústní se specifickou protilátkou IgE namířenou původně jen proti příbuznému pylovému alergenu.

U orálního alergického syndromu je tedy rozhodující anamnéza s klinickým obrazem a zjištění zkřížené potravinové a pylové přecitlivělosti. (Špičák, Panzner, 2004)

4.4.2. Fenomén zkřížené alergie

V souvislosti s potravinovou alergií se velmi často setkáváme s fenoménem zkřížené alergie. Zkřížená alergie vzniká na základě podobnosti chemické struktury jednotlivých alergenů. Některé alergeny mají podobné úseky aminokyseliny. Pacient alergický na jeden typ alergenu může alergicky reagovat na jiný alergen. (Fuchs, 2003)

Odhaduje se, že shoda aminokyselinových sekvencí přes 50% je dostačující pro existenci zkřížené alergie. Pokud je podobnost více jak 80% hovoří se již o panalergenech. Mezi panalergeny patří profiliny, tropomyoziny, lipid transfer protein, parvalbumin, prolamin, patatin, chitináza a další. (Špičák, Panzner, 2004)

Klinicky významná je zkřížená reaktivita mezi rostlinnými alergeny různého původu. Velká část pylových alergiků je senzibilizována rostlinnými glykoproteiny. Cukerné determinanty hrají hlavní alergenní roli. Tyto alergizující glykoproteiny byly popsány u hrušky, mrkve, celeru, rajského jablka ale i u měkkýšů jako jsou plži, mlži, hlavonožci, u korýšů a hmyzu jako jsou komáři, muchničky, vosy, včely, mravenci. Částečně se tento mechanismus předpokládá i u vicilinu obsaženém v arašídě a u vicilin-like alergenu z lískového ořechu, u fosfolipázy A2 z včelího jedu. (Krejsek, Kopecký, 2004)

Některé případy homologie jsou tak rozšířené, že si vysloužili svá označení např. syndrom bříza-ovoce-zelenina-ořechy, syndrom celer-mrkev-pelyněk-bříza-koření, latex-fruit syndrom (alergenně, etiologicky nesourodý syndrom), syndrom vejce-pták aj. Podobnost je zodpovědná za zkříženou alergii na různé druhy živočišného mléka, mezi luštěninami, stromovými ořechy, mořskými a sladkovodními živočichy a podobně.

Syndrom bříza-ovoce-zelenina-ořechy

Do této skupiny patří tyto hlavní alergeny: bříza Bet v 1, jablko Mal d 1, broskev Pru p 1, hruška Pyr c 1, třešeň Pru av 1, meruňka Pru ar 1, celer Api g 1, mrkev Dau c 1, petržel Pcp r 1, lískový ořech Cor a 1, sója Gly m 4, brambor Pst H 2. (Špičák, Panzner, 2004)

Latex-fruit syndrom (kaučukovník brazilský, *Hevea brasiliensis*)

Latex obsahuje více než 30 alergenů, hlavně Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8 (profilin), Hev b 9, Hev b 11 (chitinázy

třídy I.), Hev b 12 (LTP). Nejznámějším příkladem zkřížené reaktivity je Hev b 7 s avokádem, banánem, bramborem (Sol t 1) a kiwi. (Špičák, Panzner, 2004)

5. Alergeny

Alergen je definován jako antigen navozující přecitlivělost zprostředkovanou protilátkami v třídě IgE u osob s abnormální imunitní reaktivitou. Expozice zdravých osob alergenu vede k fyziologické imunitní odpovědi projevující se například tvorbou specifických protilátek v třídě IgG. (Kopecký, Krejsek, 2004)

Kompletní alergeny spouštějí tvorbu specifických IgE protilátek a současně jsou biologicky účinné. Nekompletní alergeny jsou pozitivní v kožním testu, ale negativní v odpovědi specifických IgE protilátek. Nerelevantní alergeny spouštějí specifické IgE, ale mají negativní kožní testy. (Špičák, Panzner, 2004)

Mezi alergeny patří látky původu živočišného, rostlinného, fungiálního i bakteriálního. Alergeny se člení na hlavní a vedlejší. Jako hlavní alergeny jsou označovány alergeny, vůči kterým jsou u více než poloviny nemocných nalézány specifické protilátky IgE. Hlavní alergeny vyvolávají u těchto osob pozitivní reakci při kožních testech. Jako vedlejší jsou označovány alergeny, na které reaguje menší část alergiků. Vedlejší alergeny zapříčiňují většinou jiné příznaky než alergeny hlavní. Jsou často odpovědné za fenomén zkřížené reaktivity. (Teřl, Rybníček, 2008)

5.1. Názvosloví alergenů

Názvosloví alergenů bylo vypracováno organizací WHO/IUIS (World Health Organization/ International Union of Immunological Societies, světová zdravotnická organizace / mezinárodní unie imunologických společností), bylo publikováno v bulletinu z roku 1986 a revidováno v roce 1994. Alergeny jsou značeny prvními třemi písmeny rodového jména zdroje alergenu a prvním písmenem z druhového jména. Název alergenu začíná velkým písmenem, písmeno z druhového jména je malé. Mezi zkratkou rodového a druhového jména je mezeře. Vzhledem k tomu, že z většiny biologických druhů pochází více alergenů, následuje po mezeře za zkratkou druhového jména ještě arabská číslice. Čísli-

ce udává chronologické pořadí čištění alergenů. Pro označení rekombinantně připravených alergenů se před zkratku přidává malé písmeno r.

K odlišení izoalergenů (polymorfni formy alergenů) a alergenových variant se za pořadové číslo píše tečka a za ní dvojčíselný kód. Izoalergen je alergen pocházející z jediného druhu s podobnou molekulou, identickými biologickými funkcemi a více než 67% identitou aminokyselinových sekvencí. Podobnost je základním poznatkem o zkřížené reaktivitě.

Příklad názvosloví: alergen kočky domácí, kočka domácí latinsky *Felis domesticus*, Fel d 1, Fel d 2, další příklad alergen břízy bradavičnaté *Betula verrucosa* Bet v 1 atd.

WHO/IUIS spravuje internetovou databázi (www.allergen.org) ve které jsou všechny alergy přehledně zpracovány. U každého alergenu je uveden přírodní zdroj, rodokmen, zařazení do biochemické skupiny, molekulová hmotnost a schopnost senzibilizace.(Chapman, 2007)

5.2. Rekombinantní alergy

Pro diagnostiku, výzkum i terapii alergických onemocnění byly donedávna používány alergy získávané z přírodních zdrojů. Jednalo se o směsi látek, které neměly jednoznačné složení. Problematická byla přesná diagnostika alergie i reprodukovatelnost testů. S rozvojem molekulárně biologických a biochemických postupů, které umožnily velmi podrobnou charakterizaci molekuly alergenů, došlo k výraznému rozvoji alergologie. Díky využití molekulárně biologických poznatků se setkáváme s pojmem rekombinantní alergy. (Rybníček, Seberová, 2009)

Jedná se o alergy připravené molekulárně biologickými technikami. K prvním identifikacím DNA sekvence alergenů došlo na přelomu 80. a 90. let 20. století. Začátkem 90. let byly rekombinantní alergy zkoumány hlavně z pohledu zachování vlastností odpovídajících přirozeným alergenům a z pohledu jejich možného využití v diagnostice a terapii. Studie ukázaly, že rekombinantní alergy mohou přirozené alergy nahradit a dokonce upřesnit diagnostiku a volbu terapie.

V letech 1994-1995 byly rekombinantní alergeny poprvé úspěšně použity v kožních testech. Pokusy potvrdily, že rekombinantní alergeny vykazují specifickou reaktivitu srovnatelnou s přirozenými alergeny. (Ambusová, 2011)

5.2.1 Příprava rekombinantních alergenů

Základem rekombinantních technologií je využití molekulární biologie. Klíčovým momentem je vytvoření komplementární DNA (cDNA). (Ambusová, 2011)

Molekula mRNA izolovaná z alergenového zdroje je pomocí enzymu reverzní transkriptázy přepsána do cDNA. Molekula cDNA je zanesena do fágové DNA, bakteriofág slouží jako vektor. Vektorem je následně infikována bakterie E. Coli, která bude molekulu alergenu produkovat. Produkce alergenu je indukována přidáním isopropyl- β -galaktosidem, který je napuštěný v membráně. Membránou jsou přikryty plaky infikovaných bakterií E. Coli. Vyprodukované rekombinantní alergeny jsou purifikovány. Je kontrolována jejich biologická aktivita, vazebná kapacita na molekuly IgE, schopnost stimulovat specifické T lymfocyty a zprostředkovávat degranulaci bazofilů. (Ambusová, 2011)

5.2.2. Využití rekombinantních alergenů v diagnostice

Rekombinantní alergeny jsou využívány k diagnostice hlavně pro svou specifitu. Díky přesně známé chemické struktuře je možné odlišit jednotlivé alergeny a využít těchto znalostí ke stanovení diagnózy, k odhalení možné zkřížené alergie nebo k vyvarování se kontaktu s alergenem. Odlišení jednotlivých alergenů má velký význam i pro imunoterapii, kdy je pacient vystavován jen tomu alergenu, na který tvoří protilátky třídy IgE a není tedy zbytečně senzibilizován jinými látkami. Díky rekombinantním technologiím bylo možné najít souvislosti zkřížené reaktivity na zdánlivě nesouvisející zdroje. Pomocí těchto alergenů je možné stanovit přesné hladiny protilátek na danou chemickou strukturu. Dovolují monitoring měnících se hladin specifických protilátek v souvislosti s vystavením přirozeným alergenům nebo sledování hladin specifických protilátek během terapie. (Valenta, 1999)

5.3. Jednotlivé skupiny alergenů

5.3.1 Alergeny interiérů, bytového a domovního prostředí

Alergeny nacházející se v lidských příbytcích patří mezi nejčastější. Především jde o alergeny roztočů a plísní. Jsou to alergeny, se kterými se člověk setkává již prenatálně. Lidský plod se může senzibilizovat již od 22. týdne těhotenství. V pupečnickové krvi novorozence byly prokázány specifické IgE protilátky. (Petrů a kol., 2012)

5.3.1.1 Roztoči

Roztoči se živí odpady lidského těla a to především kůží. Dominantní postavení v našich zeměpisných polohách má druh *Dermatophagoides pteronyssinus*. Největším zdrojem tohoto roztoče jsou ptáčí hnízda, roztoči se na větší vzdálenosti dostávají do obydlí vzdušnými proudy. (Špičák, Panzner, 2004)

Alergeny roztočů se dělí podle biochemické charakteristiky, aminokyselinných sekvencí a molekulové hmotnosti do 13 skupin. Například do skupiny 1 patří glykoproteiny s výraznou aktivitou cysteinových proteáz. Jsou vytvářeny v zažívacím ústrojí roztočů. Patří sem Der f 1, Der p 1, Eur m 1, Der m 1. Do skupiny 2 patří Der f 2, Der p 2, Eur m 2, Tyr p 2. (Teřl, Rybníček, 2008)

5.3.1.2 Plísně

V domovním prostředí se plísně objevují na vlhkých místech, s dostatečnou teplotou, jako jsou zdi koupelen a kuchyní, ve schránkách na chléb, v květinách, odpadkových koších a v nesprávně udržovaných klimatizacích. Ve venkovním prostředí rostou plísně především na listech, v hlíně, vlhké tlející hmotě a substrátech.

K nejvýznamnějším patří rody *Aspergillus* Asp f 1, *Alternaria* Alt a 1 a *Cladosporium* Cla h 1.

U alergenů plísní byly dosud izolovány jen hlavní alergeny rodu *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* a *cladosporium herbarum*, jsou strukturně nepříbuzné. Alergeny z *Aspergillus oryzae*, *Saccaromyces cerevisce* a *candida albicans* jsou enzymy. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.2 Alergeny rostlinného původu (pyly, potraviny)

Významnou skupinou alergenů jsou alergeny rostlinného původu. Mohou se rozdělit do dvou velkých skupin. Alergeny odvozené od zásobních bílkovin semen rostlin a alergeny odvozené od bílkovin uplatňujících se v obraně proti patogenům především patogenům plísní a bakterií (ochranné a obranné bílkoviny). S alergeny rostlinného původu se člověk setkává v potravě nebo ve formě pylových zrn.

Zásobní bílkoviny jsou nejvýznamnějšími alergeny ořechů a obilovin. Ochranné a obranné bílkoviny jsou významnými alergeny ovoce a zeleniny.

Pylové zrno se po zachycení na vlhké sliznici horních cest dýchacích chová jako by dopadlo na květní bliznu. Při tomto ději se uvolní ze zrna enzymy, které rozrušují povrch sliznice, alergen tak prostupuje hlouběji. Pylové zrno má membránu z několika vrstev a plazmatický obal, obsahuje průměrně 20% proteinů, 37% sacharidů 4 % lipidů a 3% minerálních látek. Alergenní vlastnosti pylu jsou podmíněny obsahem antigenní skupiny schopné spustit u vnímavého jedince specifickou alergickou reakci. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.2.1 Zásobní bílkoviny

Mezi zásobní bílkoviny vyvolávající alergickou reakci patří viciliny a leguminy, řazených do skupiny globulinů. Viciliny jsou často glykosylované s karbohydrátovými determinanty, jsou to významné a obvykle hlavní alergeny luštěnin, včetně podzemnice olejně (tedy arašídů a sóji). Mají obvykle terciální tedy vysoce stabilní strukturu. Jsou odolné proteolýze a jsou proto proanafylaktické. Leguminy mají také terciální strukturu, ale nebývají glykosylované.

Do této skupiny zásobních bílkovin patří také albuminy. Ty jsou ve vodě rozpustné, bývají hojně zastoupeny (až 26%) nejčastěji v ořeších (hlavně v arašídech). (Fuchs, 2003)

5.3.2.2 Ochranné a obranné bílkoviny

Jsou označovány jako PRP (pathogenesis- related proteins). Jejich zastoupení v rostlinách činí až třetinu obsažených bílkovin. Bývají často spojovány s fenoménem zkřížené alergie. Jsou rozdělovány do skupin podle biochemické struktury.

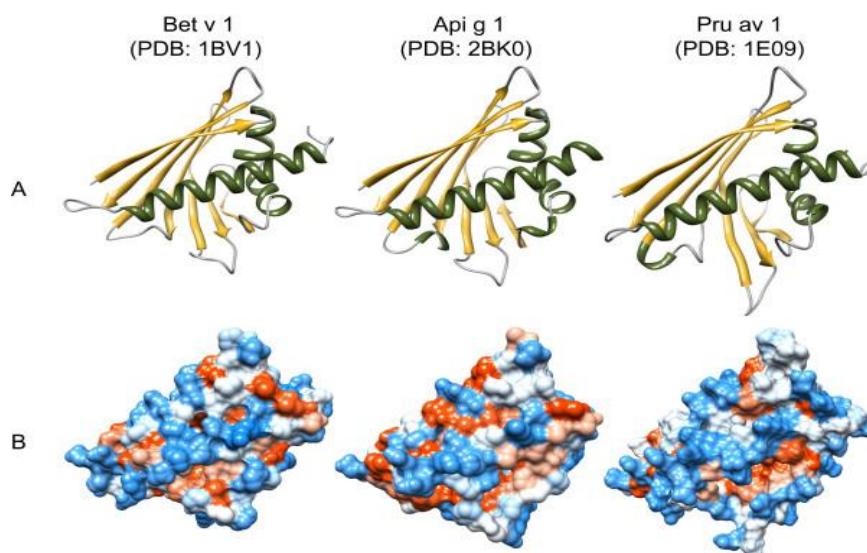
Patří sem **PRP-2 β -1,3-glukonázy**, které zajišťují ochranu především před plísněmi a jsou spojovány s „latex-fruit“ syndromem. Do této skupiny patří alergen Hev b 2 obsažený v latexu (Hevein), kiwi, avokádu, banánu, kaštanu, fíku, rajském jablku a bramborách.

PRP-3 chitinázy ničí povrchové struktury plísní a hmyzu, štěpí chitin, opět jsou spojovány s „latex-fruit“ syndromem. Jedná se o alergeny Hev b 6,02; Hev b 11 a Pers a 1, jež jsou obsaženy v latexu, avokádu, banánu, kaštanu a v lískovém ořechu.

PRP-4 tzv. chitinázám podobné, například prohevein, který je exprimován v rostlinách po chemickém napadení, je opět spojován s „latex-fruit“ syndromem. Patří sem alergen Hev b 6,01, Hev b 6,03 a Pers a 1 vyskytující se v latexu, rajském jablku, bramborách, kedlubnách, tuřínu a v černém bezu. (Fuchs, 2003)

PRP-5 traumatin homologní alergeny mají rozmanité ochranné funkce. Skupina je spojována s „latex-fruit“ syndromem. Patří sem alergen Mal d 2 obsažený v jablku, Pru av 2 z třešně, Cap a 1 z bílého pepře a zeamatín z kukuřice.

PRP-10 Bet v 1 homologní alergeny. Bet v 1 je hlavní alergen břízy bradavičnaté. Tato skupina bílkovin hraje důležitou roli v antimikrobiální obranyschopnosti rostlin. U tohoto alergenu se setkáváme se značnou podobností v sekvenci aminokyselin u nejrůznějších rostlin a potravin (viz obrázek číslo 1). Shoda v sekvenci se pohybuje mezi 37%-67%, s převahou podobnosti s ovocem. Například Bet v 1 s hlavním alergenem petržele se pohybuje okolo 36%-61% z tohoto důvodu se setkáváme i se značnou homologií a tedy i zkříženou reaktivitou u kořenové zeleniny. Značná shoda v sekvencích aminokyselin je závažným problémem pro postižené alergiky. Alergen břízy je příčinou značných zkřížených alergií, ale zároveň je i problémem diagnostickým, protože způsobuje často falešně pozitivní výsledky u testovaných pacientů, u kterých se nevyskytují klinické příznaky alergie například na kořenovou zeleninu. Homologní Bet v 1 alergeny jsou termolabilní a snadno podléhají proteolýze.



Obrázek číslo 1 ukazuje shodu ve struktuře alergenů skupiny Bet v 1 (bříza, celer, třešně). Převzato z www.pdb.org

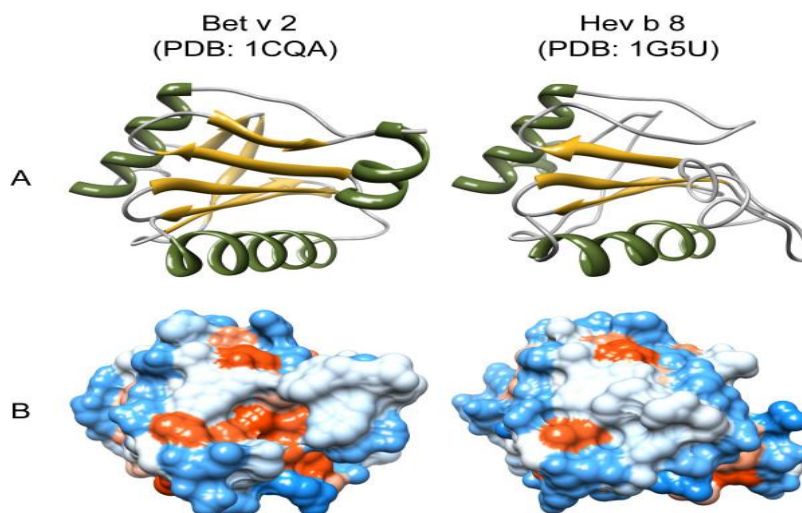
PRP-14 LTP- lipid transfer protein. LTP jsou termostabilní bílkoviny rezistentní k proteolýze, proto jsou tráveny mnohem déle a mohou častěji vyvolat systémové příznaky. V rostlinách se účastní stability povrchových membrán formou transportu fosfolipidů. Pomáhají v transportu lipidů mezi lipozomy a mitochondriemi, mají antibakteriální účinky. Patří sem alergen broskve Pru p 3, třešně Pru av 3, meruňky Pru ar 3, švestky Pru d 3, jablka Mal d 3 a rostlin jako jsou kukuřice, lískový ořech, vlašský ořech, arašíd, hroznové víno a další. (Fuchs, 2003)

LTP je zařazen mezi panalergeny a je významně spojován se zkříženou reaktivitou mezi ovocem, zeleninou a stromovými ořechy. LPT je velice stabilní, v důsledku jeho stability jsou popisovány těžké celkové reakce. Byl nalezen dokonce i v pivu. (Špičák, Panzner, 2004)

Profiliny jsou ubikviterní alergeny, řazené mezi panalergeny. Jde o skupinu proteinů vázajících kyselinu. Tyto proteiny jsou odpovědné za organizaci aktinových vláken v buněčném skeletu. (Špičák, Panzner, 2004)

Profiliny jsou někdy označovány jako Bet v 2 family, alergen Bet v 2 je považován za druhý nejdůležitější alergen břízy (viz obrázek číslo 2). Rostlinné profiliny váží aktin a jsou nezbytné pro povrchovou integritu buněk. V rostlinách zaujmají až 17% všech bílkovin. Citlivost na břízový profilin se nachází přibližně u každého pátého břízového alergika. Profiliny některého ovoce splňují hranici

více než 80% senzibilizovaných pacientů, a proto jsou profily ovoce často hlavními alergeny. Například alergie na ananas, u které se setkáváme se skoro 100% reaktivitou na Ana c 1. Do skupiny profilinů patří také alergeny celeru Api g 4, jablka Mal d 4, broskve Pru p 4, hrušky Pyr c 4, sóji Gly m 3, arašídů Ara h 5 a bojínku Phl p 7. Homologie rostlinných profilinů je vysoká, často až 80%. Z tohoto důvodu se často setkáváme se zkříženou alergií a především se syndromem bříza-pelyněk-celer nebo syndromem trávy-jablko-broskev. (Fuchs, 2003)



Obrázek číslo 2 ukazuje shodu ve struktuře alergenů skupiny Bet v 1 (břízy a latexu). Převzato z www.pdb.org

Bet v 6 homologní alergeny, izoflavon-reduktázy.

U této skupiny alergenů se setkáváme se zkříženou alergií na jablka, hrušky, pomeranče, banánu, manga, liči, jahody, cukety a mrkvi. (Fuchs, 2003)

Inhibitory α - amyláz a proteáz

Inhibují trypsin, jsou účinné proti α - amylázám a serinovým proteázám hmyzu a proti plísním. (Špičák, Panzner, 2004)

α -amylázy a proteázy jsou alergeny obilovin jako je pšenice, ječmen, žito, rýže a kukuřice. (Fuchs, 2003)

Papain like proteinázy, thiol-proteázy

Papain je alergen papáji. Glicinin Gly m 1 je hlavní alergen sóji a patří také do skupiny thiol-proteáz. Podobný alergen je obsažen i ve fíku, ananasu a kiwi. (Fuchs, 2003)

Vzhledem k rozšíření těchto látek je pravděpodobnost zkřížené reaktivity tohoto ovoce. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.3 Alergeny živočišného původu

Zvířata jsou součástí našeho života. Ve 40% českých domácností jsou chována zvířata a dokonce ve třetině rodin s alergickým dítětem nebo dospělým. Alergeny zvířat mají velkou schopnost udržovat se na povrchu předmětů interiéru, na šatech a všech předmětech, které s nimi byly v kontaktu. Jsou to tedy lepidivé látky, které mají schopnost kontaminovat i nejmenší prachové částice aerosolu. Tímto faktem překračují rámec vysloveně kontaktních alergenů. Většina těchto alergenů je vylučována slinami, mazovými žlázami nebo močí. Srst a chlupy hrají menší roli.

Podle vstupu alergenu do organismu dochází k projevům kožním, očním nebo po vdechnutí k alergické rýmě až k astmatu.

Mnohé potraviny živočišného původu mají alergenní potenciál a mohou vyvolat systémovou reakci. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.3.1 Kočka domácí (*Felis domesticus*).

Kočíčí alergeny patří k nejagresivnějším a nejdéle přetrvávajícím v prostředí. Hlavní alergen Fel d 1 je obsažen především ve slinách a kožních šupinách. Jedna kočka vyprodukuje denně 3-7 mikrogramů tohoto alergenu, samci tvoří alergenu více. Kočíčí alergeny přetrvávají v prostředí ještě dlouhé měsíce, tento alergen lze prokázat i v dopravních prostředcích, školách a ve veřejných prostorách. Nejúčinnějším způsobem jak alergii předejít je úplně odstranit jakýkoliv kontakt s kočkou. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.3.2 Pes domácí (*Canis familiaris*).

Zdrojem alergenu je kožní odpad a sliny, menší množství alergenu je v srsti a v moči. Mezi jedinci téhož druhu i mezi druhy existuje značná různorodost antigenní skladby alergenu, takže není znám žádný specifický alergen. Přesto je za hlavní alergen považován Can f 1. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.3.3 Hlodavci (*Rodentia*)

Myši, krysy, morčata, křečci a králíci vylučují alergeny močí. Po zaschnutí moče jsou alergeny zaneseny do ovzduší, kde kontaminují prachové částice. Myš domácí (*Mus musculus*) vylučuje alergen Mus m 1, který patří mezi prealbuminy. Potkan (*Rattus norvegicus*) má dvě hlavní alergizující látky a to α_2 -mikroglobulin Rat n 1B a prealbumin Rat n 1A. Morče domácí (*Cavia porcellus*) je nosičem hlavního alergenu Cav p 1 obsaženého hlavně v moči. Králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*) vylučuje alergeny glykoproteinové povahy AgR1 označovaný Ory c 1. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.3.4 Ptáci

Ptáci jsou zdrojem alergenů obsažených v peří a to hlavně staršího peří, které je znečištěno roztoči. Ptačí vejce obsahují alergeny ovomukoid Gal d 1, ovalbumin Gal d 2, konalbumin Gal d 3 a lysozym Gal d 4. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.3.5 Ryby (mořské, sladkovodní), korýši a měkkýši

V mořských měkkýších a korýších se nachází tropomyosin, který má alergenní potenciál. Tropomyosin hraje roli v kontrakci svalových mikrofilament s aktinem a myosinem a rozhoduje o morfologii buněk, které nepatří do svalové tkáně.

Hlavním alergenem v rybích tkáních je parvalbumin, jenž je obsažen jak v mořských, tak i ve sladkovodních rybách. Tato bílkovina váže vápník, je velmi stabilní a odolává tepelnému zpracování i trávicím enzymům. Díky své stabilitě může vyvolat celkové alergické příznaky včetně rozvoje anafylaktického šoku. Důležitá je i skutečnost, že parvalbumin je obsažen i ve sladkovodních rybách. Při alergii na rybí svalovinu je doporučena úplná eliminace ryb z jídelníčku.

Některé reakce po požití ryb nejsou způsobeny alergií na parvalbumin, ale alergií na rybího parazita *Anasakis simplex*, kterým je napadeno velké procento ryb žijících v hejnech, jako jsou tresky, makrely, sledi. Jedná se o alergii na bílkovinu, která je homologní s tropomyosinem. (Fuchs, 2003)

5.3.3.6 Kravské mléko

Častá je i alergie na kravské mléko, které obsahuje několik alergizujících bílkovin, především bílkoviny syrovátky β -laktoglobulin (Bos d 5), α -laktoglobulin

(Bos d 4), hovězí sérový albumin, kasein (Bos d 8) a další. Tyto bílkoviny jsou termostabilní. Ke spuštění alergické reakce obvykle stačí 10-100mg. Rozhodující je také primární, sekundární a terciární struktura. Lineární struktura má schopnost alergizovat doživotně.

Alergie na bílkoviny syrovátky u malých dětí mívá tendenci vyhasínat, naopak alergie na kasein bývají celoživotní. (Špičák, Panzner, 2004)

5.3.3.7 Vaječné bílkoviny

Objevuje se i alergie na vaječný žloutek a bílek. Vejce obsahuje asi 23 glykoproteinů s alergizujícím potenciálem. Mezi hlavní alergeny bílku patří ovomukoid (Gal d 1) a ovalbumin (Gal d 2), ovotransferin (Gal d 3) a lysozym (Gal d 4). K bílkovinám žloutku patří ubikviterní bílkovina označovaná jako kuřecí sérový albumin. Tato bílkovina je odpovědná za respirační příznaky při inhalaci prachu ptačího peří, stejně jako za příznaky po požití drůbežního masa. Je termolabilní, proto konzumace kuřecího masa vyvolává reakci jen zřídka. (Špičák, Panzner, 2004)

Hlavní alergeny bílku mohou vyvolat zkříženou alergii mezi jednotlivými drůbežními vejci. Hlavní alergen žloutku může vyvolat syndrom „pták-vejce“. Je to poměrně vzácná situace. Alergik původně alergický na vaječný žloutek se stane citlivým na alergeny drůbežního masa nebo se vyvine inhalační alergie na „sérový albumin“obsažený v peří drůbeže. (Fuchs, 2003)

5.3.4 Alergeny blanokřídlého hmyzu

Klinicky závažnou skupinou alergenů je skupina alergenů blanokřídlého hmyzu. Včelí a vosí jed obsahuje množství prozánětlivých látek zahrnujících histamin nebo serotonin. Hlavními složkami jedu jsou fosfolipáza A2, hyaluronidáza, kyselá fosfatáza, melitin a další. Alergické účinky blanokřídlého hmyzu jsou mimořádně závažné, protože včelí a vosí bodnutí může vyvolat anafylaktický šok. (Fuchs, 2003)

Fosfolipáza A 2 (viz obrázek číslo 3) je epitop fosfolipázy lymfocytů B, která stimuluje tvorbu IgE protilátek u člověka. Fosfolipáza včelího jedu způsobuje zkříženou reaktivitu s nepříbuznými alergeny potravin jako je pohanka, rajské jablko, špenát nebo med. Pravděpodobně jde o vazbu IgE protilátek proti těmto

potravinám s epitopy postraních cukerných řetězců glykoproteinů hmyzu. (Špičák, Panzner, 2004)



Obrázek číslo 3 fosfolipáza A2 (převzato z www.pdb.org)

Melittin je malá molekula náchylná tvořit polymery proti kterým vzniká alergická reakce. (Špičák, Panzner, 2004)

Vysvětlení tak rychlé reakce na malé množství těchto alergenů je zřejmě právě ve zkřížené reaktivitě. Vnímavý jedinec je senzibilizován některou potravinou a při dalším kontaktu s alergenem dochází velmi snadno k rozvoji alergie. Zkřížená reaktivita také vysvětluje alergickou reakci po prokazatelně prvním kontaktu s alergenem hmyzího jedu. (Špičák, Panzner, 2004)

6. Diagnostika alergií

Vlastní alergologické vyšetření se skládá z anamnézy, fyzikálního klinického vyšetření, kožních testů, laboratorních testů a podle potřeby testů provokačních, expozičních nebo epikutánních.

6.1. Alergologické kožní testy

Kožní test je určený k detekci přítomnosti protilátek IgE specifických pro daný alergen. Výhodou je možnost testování více alergenů současně. Kožní testy jsou relativně bezpečné a standardizované. Základním principem je zavedení malého množství alergenu do epidermis. V přítomnosti specifických protilátek IgE dojde s alergenem k přemostění protilátek na povrchu žírných buněk. Přemostění přes Fc receptory vede k degranulaci, do okolí buněk se uvolní histamin a jiné látky, začne syntéza leukotrienů a dalších mediátorů. Mediátory způsobí vasodilataci, zvýší permeabilitu cév. Následně dojde k tkáňovému otoku, tvorbě pupenu a okolnímu zarudnutí. (Špičák, Panzner, 2004)

Kožní test je prováděn při podezření na přítomnost alergického onemocnění. Zpravidla je prováděna sada testů, které zahrnují soubor nejběžnějších inhalačních alergenů. Jsou to jednotlivé alergeny nebo směsi příbuzných a zkříženě reagujících látek. Většinou jsou to alergeny pylu jarních časných břízovitých stromů, pylu trav, pylu podzimní (hlavně pelyněk), ambrozie, alergeny nejčastějších roztočů a plísní, alergeny zvířecí (zejména kočky a psa). Alergenové extrakty použité k testu jsou komerčně dodávané roztoky, pokud možno standardizované. Jakékoliv spektrum alergenů musí obsahovat také negativní a pozitivní kontrolu (histamin, kodein), která stimuluje sekreci žírných buněk. (Špičák, Panzner, 2004)

Léky mohou ovlivnit výsledky testů, často je nutné vysadit například antihistaminika, p. o. kortikoidy, psychofarmaka a další léky před kožním testováním. (Petrů a kol., 2012)

6.1.1 Druhy kožních testů

Prick test

Na očištěnou a odmaštěnou pokožku se nanáší kapky alergenového extraktu ve vzdálenosti 3cm od sebe. Musí být dodržena i minimální vzdálenost od

lokte 3cm a zápěstí 5cm. Po nanesení kapek se pokožka naruší lancetou, zbytek roztoku se odsaje tampónem, test se odečítá přibližně za 15minut. (Špičák, Panzner, 2004)

Intradermální test

Pokožka je očištěna a desinfikována. Intradermálně je inzulinovou stříkačkou aplikováno 0,02-0,05ml alergenu tak aby vznikl pupen o průměru přibližně 3mm. Mezi jednotlivými testy se dodržuje 5cm vzdálenost. Vzdálenost od lokte a zápěstí je stejná jako u prick testu, tedy 3cm a 5cm. (Špičák, Panzner, 2004)

6.1.2 Hodnocení kožních testů

Hodnocení je prováděno lékařem po 15 minutách. Hodnotí se průměr pupenů a erytému. Za jednoznačně pozitivní výsledek prick testu se považuje vznik intradermálního edému o průměru 3mm a více. U intradermálních testů je jednoznačně pozitivní výsledek edém o průměru 5mm a větší.

Kožní test je většinou testem první volby. Je to rychlá a poměrně spolehlivá metoda pro inhalační alergeny. Senzitivita i specificita je udávána okolo 85%. (Špičák, Panzner, 2004)

6.2 Laboratorní diagnostika

Laboratorní vyšetření (vyšetření *in vitro*) patří mezi pomocné vyšetřovací metody v diagnostice alergií. Jejich výhodou je jejich bezpečnost a lepší snášenlivost. Jsou široce využívány často také v případech, kdy není možné provést klinické testy. K takovým situacím dochází především, když nelze vysadit léčbu nebo nelze pacienta testovat *in vivo* vzhledem k jeho zdravotnímu stavu.

Část laboratorních metod je závislá na okamžité analýze vzorku. Jedná se především o funkční buněčné testy, vyšetření hladiny ECP (eozinofilní kationický protein) a tryptázy.

Laboratorní diagnostika alergií je zaměřena na reakce zprostředkované protilátkami IgE. Eozinofilie a zvýšená hladina celkových protilátek IgE jsou obvykle první informace pro lékaře a potvrzují, že se jedná o možnou přítomnost atopie.

Specificita testů je definována negativním výsledkem u osob bez problémů, eliminuje falešně pozitivní nálezy. Senzitivita je naopak dána pozitivním výsledkem u osob zjevně trpících daným onemocněním. Eliminuje falešně negativní

nálezy. Zásadní význam mají hodnoty cut-off. Jde o hraniční hodnotu, od které bude brán výsledek jako pozitivní.

Diagnostice předchází preanalytická fáze, která zahrnuje přípravu pacienta na odběr. Platí obecné zásady. Vyvarovat se od večera před odběrem fyzické námaze, lačnit 10-12 hodin před odběrem, ráno se napít vody (200-300 ml). Odběr by měl být proveden v ranních nebo dopoledních hodinách. (Petrů a kol., 2012)

6.2.1 Hladina celkových protilátek IgE

K základním vyšetřením patří celkové IgE, není ale spolehlivým vodítkem a to především u závažných alergických onemocnění. Hladina protilátek se v tomto případě může pohybovat v normálních hodnotách. Vždy je nutné brát v potaz různé věkové kategorie. Celková hladina protilátek IgE je udávána v jednotkách IU/ml, někdy jako ng/ml přičemž 1IU/ml odpovídá 2,4 ng/ml.

Při nálezů zvýšených hodnot celkových IgE protilátek je také nutné vyloučit jiné onemocnění například helmintózy, virové infekce, systémová autoimunitní onemocnění, imunodeficience a vaskulitidy. (Petrů a kol., 2012)

6.2.2 Hladiny alergen specifických IgE

V současné době patří vyšetření alergen specifických protilátek IgE k nejrozšířenějším rutinním testům. Výběr jednotlivých alergenů je volen na základě předcházející anamnézy případně na základě výsledků kožních testů.

Vyšetření je indikováno v případech, kdy jsou kožní testy málo jednoznačné, příliš riskantní nebo není možné je provést vůbec. Problematické provedení kožních testů bývá u dětí s různými kožními chorobami, při obavách z rozvoje anafylaktického šoku, u pacientů, kteří nespolupracují nebo u malých dětí, a v případech, kdy není možné vysadit léky interferující s výsledky testů *in vivo*. Dalším problémem provedení kožních testů je nedostupnost kvalitních alergenových extraktů se spolehlivým výsledkem. Toto vyšetření je vhodné i při diskrepanci mezi anamnézou a výsledkem testu *in vivo*. Jsou také využívány k posouzení účinnosti imunoterapie.

Hlavním problémem diagnostiky specifických IgE protilátek je obtížná standardizace jednotlivých komerčně dodávaných laboratorních souprav, které se liší druhem, množstvím i vazbou alergenu, použitými substráty a enzymy. Dů-

sledkem těchto odchylek je obtížné porovnání výsledků jednotlivých testů. Při podezření na chybnost výsledku je třeba test zopakovat jinou metodou. Kvalitnější výsledky jsou dosaženy použitím technik s vysokou vazebnou kapacitou nosiče alergenu nebo v kapalném prostředí. Tyto techniky využívají analyzátoři Uni Cap, Immulite 2000 a další. Výsledky těchto metod se odvíjí od konkrétního vyšetřovaného alergenu. Přítomnost specifických IgE protilátek prokazuje senzibilizaci pacienta. Alergen nemusí vyvolávat klinické příznaky. (Petrů a kol., 2012).

Hodnota specifických IgE protilátek je udávána buď semikvantitativně v tzv. RAST třídách, nebo kvantitativně v IU/ml.

Tabulka číslo 1 ukazuje vztah hodnoty specifického IgE v kU/l a RAST třídy (RAST= radio- alergologický sorbent test)

Specifické IgE v kU/l	Třída pozitivity	Hodnota s IgE
< 0,35 IU/ml	RAST třída 0	Negativní
0,35–0,70 IU/ml	RAST třída 1	Nízká
0,70–3,50 IU/ml	RAST třída 2	Středně pozitivní
3,50–17,5 IU/ml	RAST třída 3	Vysoká
17,5–50,0 IU/ml	RAST třída 4	Velmi vysoká
50,0–100 IU/ml;	RAST třída 5	Velmi vysoká
> 100 IU/ml	RAST třída 6	Velmi vysoká

Tabulka číslo 1. Rast třídy a specifické IgE

Při určování specifických IgE se využívají i screeningové skupinové testy, které detekují přítomnost senzibilizace na několik alergenů v jednom kroku. Jsou to například různé druhy potravin nebo inhalační alergeny. Teprve pak následuje roztestování jednotlivých alergen- specifických IgE protilátek na konkrétní alergeny. U léků, latexu, ovoce a zeleniny je známá nízká senzitivita těchto alergen- specifických protilátek.

V diagnostice specifických protilátek IgE klasickými metodami je využíváno alergenových extraktů. Alergenové extrakty jsou získané z různých zdrojů, jako jsou pylová zrna, hmyzí jedy nebo potraviny. Problematická je jejich standardizace vzhledem k nesourodému výskytu alergenů v těchto zdrojích. Molekulárně čisté alergeny lze získat pomocí rekombinantních metod nebo jako purifikované

alergeny z přírodních zdrojů. Takto získané alergeny jsou přesně definované a jsou vhodné pro standardizaci.

Techniky využívající takto cíleně připravené alergeny jsou označovány jako CRD (component- resolved in vitro diagnosis). Pomocí CRD je možné získat poznatky o možné zkřížené přecitlivělosti i na další alergenové zdroje. Například u pacienta přecitlivělého na alergen Bet v 2, tedy na profilin pylu břízy, je předpoklad přecitlivělosti i na profilin z jiných zdrojů jako jsou jablka, broskve a oříšky. (Ballmer-Weber B. K. et al., 2005)

Interpretace výsledků alergen specifických IgE není vždy snadná. Problematiké je detekování specifických IgE protilátek u pacientů s extrémně vysokými hladinami celkového IgE. V těchto případech dochází často k falešné pozitivitě výsledků. Naopak falešně negativní výsledky mohou být detekovány při odběru provedeného příliš brzy po prodělané těžké alergické reakci, kdy jsou alergen-specifické protilátky ze séra vyčerpány. Doba, za kterou dojde k obnovení protilátek, není zcela jasně určena. Studie udávají rozmezí 2-6 týdnů. (Petrů a kol., 2012)

V současné době jsou používány různé principy testů pro stanovení specifických IgE, které jsou modifikací první diagnostické metody z radio-alergosorbent testu. (Bartůňková, Paulik a kol., 2005)

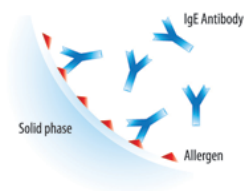
RAST(radio-alergosorbent test)

Princip stanovení specifických IgE je založen na kovalentní vazbě alergenu na nitrocelulózuovou pevnou fází, kterou bývá papírový disk. Disk je inkubován s vyšetřovaným sérem. Během inkubace dochází k navázání specifických IgE na disk. Po inkubaci je disk promyt a inkubován s protilátkou proti IgE která je označena izotopem jodu I¹²⁵. Intenzita radioaktivity je přímo úměrná množství specifických IgE. (Humplová, 2005)

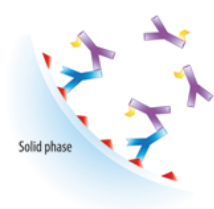
ELISA

Většina v současnosti využívaných testů je založena hlavně na principu ELISA (Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay). Metody je možné rozdělit například podle způsobu vazby alergenu na pevnou nebo kapalnou fází. (Bartůňková, Paulik a kol., 2005)

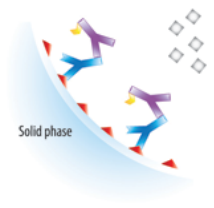
UniCAP®Pharmacia – vazba alergenu na pevnou fázi (obrázek číslo 4)



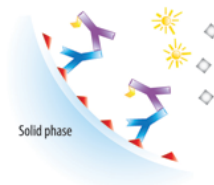
Alergen je kovalentně vázaný na pevné fázi, reaguje se specifickými IgE protilátkami ve vzorku pacienta.



Nespecifické IgE protilátky se vymyjí. Přidané protilátky proti IgE, značené enzymem vytvoří komplex.



Po inkubaci jsou nenavázané enzymem značené protilátky proti IgE vymyty a navázaný komplex je inkubován s fluorescenčním substrátem.



Po zastavení reakce je měřena fluorescence v eluátu. Čím vyšší fluorescence, tím více je specifické IgE protilátky přítomno ve vzorku pacienta.

Obrázek číslo 4: UniCAP®Pharmacia – princip testu (zdroj www.phadia.com)

V roce 1992 byla uvedena na trh technologie ImmunoCAP firmy Pharmacia a později UniCAP™, která je dodnes považována za „zlatý standard“ mezi technikami stanovujícími specifické IgE (viz obrázek číslo 5). Její výhodou je vysoce kapacitní vazebný sorbent ve speciálním kalíšku (viz obrázek číslo 6). Sorbent je trojrozměrný polymer s velkým vnitřním povrchem. Sorbent umožňu-

je navázat na svůj povrch minimálně třikrát více alergenu než aktivované papírové disky nebo až padesátkrát více než běžné plasty používané jinými výrobci. Extrémně vysoká vazebná kapacita zajišťuje navázání všech protilátek nezávisle na jejich afinitě a zároveň eliminuje nespecifické vazby. U této metody je zajištěna dostatečná citlivost pro stanovení i velmi nízké koncentrace IgE protilátek. Detekce je zprostředkována pomocí anti- IgE protilátek značených enzymem β -galaktosidázou. Do směsi je přidáván fluorescenční substrát, který je enzymaticky přeměněn galaktosidázou a fluorescenční produkt, který je detekován. Rozsah měření je od 0,35 IU/ml – 100 IU/ml. (Humplová, 2005)

Pro tuto metodu jsou již dostupné testy využívající rekombinantních alergenů (viz. Seznam). Převzato z (www.thermoscientific.com/phadia).

Travní pyly

nCyn d 1 Bermuda grass *Cynodon dactylon* g216
rPhl p 1 Timothy *Phleum pratense* g205
rPhl p 2 Timothy *Phleum pratense* g206
nPhl p 4 Timothy *Phleum pratense* g208
rPhl p 6 Timothy *Phleum pratense* g209
rPhl p 7 Timothy *Phleum pratense* g210
rPhl p 11 Timothy *Phleum pratense* g211
rPhl p 12 Profilin, Timothy *Phleum pratense* g212
rPhl p 1, rPhl p 5b Timothy *Phleum pratense* g213
rPhl p 7, rPhl p 12 Timothy *Phleum pratense* g214
rPhl p 5b Timothy *Phleum pratense* g215

Pyly plevelů

nAmb a 1 Ragweed *Ambrosia elatior* w230
nArt v 1 Mugwort *Artemisia vulgaris* w231
nArt v 3 LTP, Mugwort *Artemisia vulgaris* w233
rPar j 2 LPT, Wall pellitory *Parietaria judaica* w211
nSal k 1 Saltwort *Salsola kali* w232

Stromové pyly

rBet v 1 PR-10, Birch *Betula verrucosa* t215
rBet v 2 Profilin, Birch *Betula verrucosa* t216

rBet v 4 Birch *Betula verrucosa* t220

rBet v 6 Birch *Betula verrucosa* t225

rBet v 2, rBet v 4 Birch *Betula verrucosa* t221

nCup a 1 Cypress *Cupressus arizonica* t226

rOle e 1 Olive *Olea europaea* t224

Mikroorganismy

rAlt a 1 *Alternaria alternata* m229

rAsp f 1 *Aspergillus fumigatus* m218

rAsp f 2 *Aspergillus fumigatus* m219

rAsp f 3 *Aspergillus fumigatus* m220

rAsp f 4 *Aspergillus fumigatus* m221

rAsp f 6 *Aspergillus fumigatus* m222

Zvířecí, kožní proteiny

nBos d 6 BSA, Cow *Bos spp.* e204

rCan f 1 Dog *Canis familiaris* e101

rCan f 2 Dog *Canis familiaris* e102

nCan f 3 Dog serum albumin *Canis familiaris* e221

rCan f 5 Dog *Canis familiaris* e226

rFel d 1 Cat *Felis domesticus* e94

rFel d 4 Cat *Felis domesticus* e228

rEqu c 1 Horse *Equus caballus* e227

nFel d 2 Cat serum albumin *Felis domesticus* e220

nSus s Pig serum albumin, Swine *Sus scrofa* e222

Hmyz

nDer p 1 House dust mite *Dermatophagoides Pteronyssinus* d202

rDer p 2 House dust mite *Dermatophagoides Pteronyssinus* d203

rDer p 10 Tropomyosin, House dust mite *Dermatophagoides Pteronyssinus*
d205

Jedy

rApi m 1 Phospholipase A2, Honey bee *Apis mellifera* i208

rVes v 1 Phospholipase A1, Common wasp *Vespula vulgaris* i211

rVes v 5 Common wasp *Vespula vulgaris* i209

rPol d 5 Paper wasp *Polistes dominulus* i210

Profesní alergený

rHev b 1 Latex *Hevea brasiliensis* k215
rHev b 3 Latex *Hevea brasiliensis* k217
rHev b 5 Latex *Hevea brasiliensis* k218
rHev b 6.01 Latex *Hevea brasiliensis* k219
rHev b 6.02 Latex *Hevea brasiliensis* k220
rHev b 8 Profilin, Latex *Hevea brasiliensis* k221
rHev b 9 Latex *Hevea brasiliensis* k222
rHev b 11 Latex *Hevea brasiliensis* k224

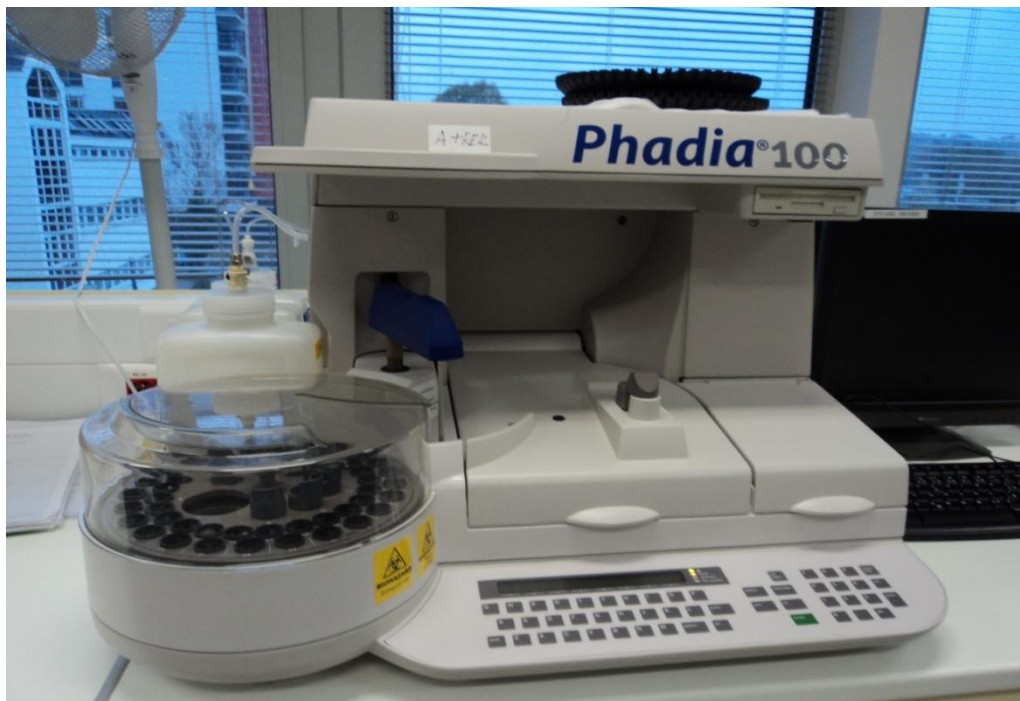
Profesní alergeny / enzymy

Alkalase *Bacillus spp.* k205
nAna c 2 Bromelain, Pineapple *Ananas comosus* k202
nAsp o 21 alpha-amylase *Aspergillus oryzae* k87
nCar p 1 Papain, Papaya *Carica papaya* k201
nGal d 4 Lysozyme, Egg *Gallus spp.* k208
Maxatase *Bacillus licheniformis* k204
Savinase *Bacillus spp.* k206
nSus s Pepsin, Swine *Sus scrofa* k213

Potraviný

rAct d 8 PR-10, Kiwi *Actinidia deliciosa* f430
rApi g 1.01 PR-10, Celery *Apium graveolens* f417
rAra h 1 Peanut *Arachis hypogaea* f422
rAra h 2 Peanut *Arachis hypogaea* f423
rAra h 3 Peanut *Arachis hypogaea* f424
rAra h 8 PR-10, Peanut *Arachis hypogaea* f352
rAra h 9 LTP, Peanut *Arachis hypogaea* f427
rBer e 1 Brazil nut *Bertholletia excelsa* f354
nBos d 4 alpha-lactalbumin, Milk *Bos spp.* f76
nBos d 5 beta-lactoglobulin, Milk *Bos spp.* f77
nBos d 8 Casein, Milk *Bos spp.* f78
nBos d Lactoferrin, Milk *Bos spp.* f334
rCor a 1 PR-10, Hazel nut *Corylus avellana* f428
rCor a 8 LTP, Hazel nut *Corylus avellana* f425
rCyp c 1 Carp *Cyprinus carpio* f355
rGad c 1 Cod *Gadus morhua* f426

nGal d 1 Ovomuroid, Egg *Gallus spp.* f233
nGal d 2 Ovalbumin, Egg *Gallus spp.* f232
nGal d 3 Conalbumin, Egg *Gallus spp.* f323
rGly m 4 PR-10, Soy *Glycine max* f353
nGly m 5 beta-conglycinin, Soy *Glycine max* f431
nGly m 6 Glycinin *Glycine max* f432
rPen a 1 Tropomyosin, Shrimp *Penaeus aztecus* f351
rPru p 1 PR-10, Peach *Prunus persica* f419
rPru p 3 LTP, Peach *Prunus persica* f420
rPru p 4 Profilin, Peach *Prunus persica* f421
rTri a 19 Omega-5 Gliadin, Wheat *Triticum spp.* f416
Ostatní
MUXF3 CCD, Bromelain o214



Obrázek číslo 5. Analyzátor UniCAP™.



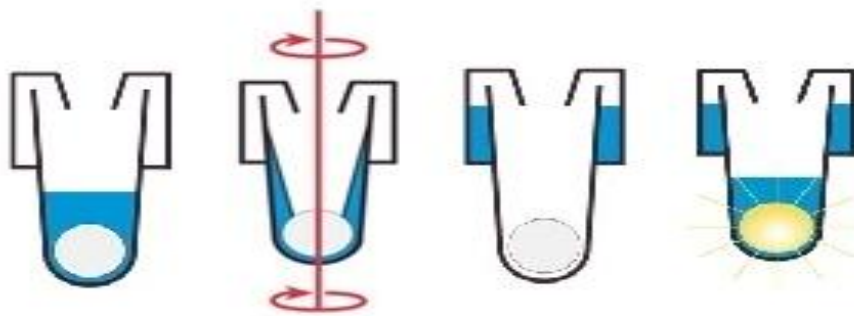
Obrázek číslo 6. Reakční kalíšek analyzátoru UniCAP™.

Immulite® 2000 – vazba alergenu v kapalně fázi (obrázek číslo 7)

Jedná se o stolní analyzátor. Reakce probíhá ve speciální reakční kyvetě, v níž je kulička potažená biotinem. Kyveta slouží jako reakční nádobka po celou dobu testu od první inkubace až po měření signálu. K vazbě alergenu a specifického IgE dochází v roztoku a výsledný imunokomplex je vázán avidinem na biotin kuličky. K detekci reakce se přidává anti-IgE protilátka značená alkalickou fosfatázou. Dalším krokem je hydrolýza dioxetanového substrátu alkalickou fosfatázou za vzniku chemiluminiscence (viz obrázek číslo 7). Výsledky jsou udávány v kU/l. (Humplová, 2005)

Analyzátor Immulite® 2000 zatím nevyužívá k analýze rekombinantní alergenů.

Na obrázku číslo 8 je tento analyzátor vyfocen. Obrázek číslo 9 ukazuje antiséra, alergeny a zásobníky kuliček analyzátoru Immulite.



Vzorky a re-
gencie jsou automa-
ticky pipetovány do
testovací kyvety a
inkubovány při 37°C

Po inkubaci je
kyveta roztočena
podél své verti-
kální osy při vy-
soké rychlosti.

Reakční tekutina
je vytlačena zcela
zachycena do
postranních ko-
mor kyvety.

Promytí
kompletně
odstraní nena-
vázaný materi-
ál z kuličky a
okolí.

Po přidání
chemilumis-
cenčního sub-
strátu je vyzá-
řené světlo
měřeno vyso-
ce citlivým
fotonásobi-
čem.

Obrázek číslo 7: Immulite®2000 – princip testu (zdroj www.medical.siemens.com)



Obrázek číslo 8. Analyzátor Immulite® 2000



Obrázek číslo 9: Immulite®2000 – zásobníky antisér, alergenů a reakčních kuliček

6.2.3 Funkční buněčné testy

Alergeny vyvolávají aktivaci bazofilů především prostřednictvím přemostění specifických IgE navázaných na jejich povrchu. V průběhu aktivace dochází k expresi, tedy vyjádření znaku CD63 na povrchu buněčné membrány bazofilů. Tento znak CD63 lze značit monoklonální protilátkou a detekovat průtokovým cytometrem. (Honzová, 2004)

Principem těchto laboratorních testů je stimulace krevních bazofilů alergenem. Aktivaci bazofilů je možné hodnotit analýzou mediátorů uvolňovaných do okolí bazofilů. Jedná se o histamin nebo sulfidoleukotrieny. Nevýhodou testů měřících uvolnění mediátorů je nutnost izolace buněk na hustotním gradientu, při které hrozí nespecifická stimulace bazofilů. V plné krvi jsou měřeny i mediátory z jiných buněk (monocytů, eozinofilů). Druhým způsobem testování je sledování membránových znaků charakteristických pro aktivované bazofily. Test je označován jako BAT tedy test aktivace bazofilů. (Al De Weck, 2008)

BAT

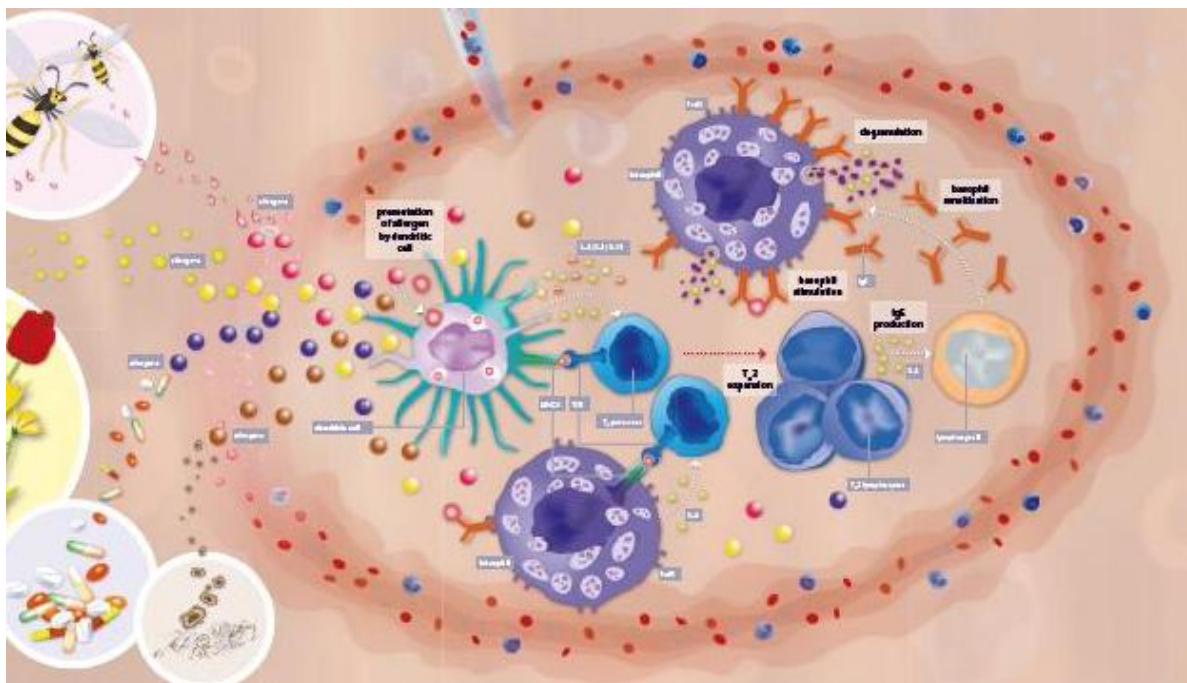
Principem testu je sledování exprese znaku CD63 na bazofilech po inkubaci s alergenem (viz obrázek číslo 10). CD63 je protein cytoplazmatických granulí klidových buněk. Po inkubaci bazofilů s alergenem dochází k jejich aktivaci prostřednictvím jejich vysokoafinního receptoru. Aktivace je provázena expresí CD63 na buněčné membráně. Exprese CD63 na povrchu bazofilů velmi dobře koreluje s jejich degranulací. Po inkubaci vzorku s alergenem je přidána protilátka označující bazofily (anti-IgE, anti-CD203). Před měřením je provedena lýza erytrocytů. Měření je prováděno v průtokovém cytometru. Výsledkem je procento aktivovaných bazofilů z celkového počtu přítomných bazofilů. Stimulace bazofilů je prováděna vodnými roztoky alergenů, s výhodou lze využít roztoky rekombinantních alergenů, které jsou přesně molekulově definovány.

Při stanovení alergie na inhalační alergeny pomocí BAT je udávána senzitivita 91% až 93% a specifita 98% až 100%.

Test BAT pro potravinové alergeny je výrazně senzitivnější i specifitější než test specifických IgE. Oba parametry jsou udávány mezi 80% až 90%.

U vyšetření alergie na latex je BAT považován za vysoce spolehlivý, reprodukovatelný, s uspokojivou senzitivitou (80-90%) a s vysokou specifitou až 100%. Stejně úspěšné je i vyšetření alergie na hmyzí jedy.

BAT se zdá být vhodnou metodou pro diagnostiku alergií. Ukazuje se, že BAT má dokonce vyšší senzitivitu než široce užívané vyšetření alergen specifických IgE. (Honzová, 2004)

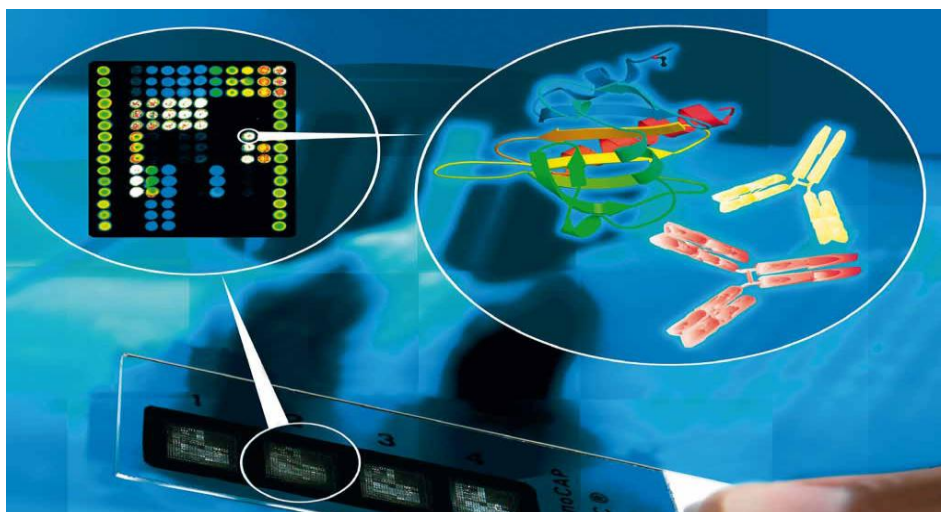


Obrázek číslo 10: Aktivace bazofilů (zdroj: www.exbio.com)

6.2.4. Microarray

Metoda microarray prováděná na skleněné nebo silikonové destičce, na níž je v malém bodě navázáno spousty bílkovinných molekul, tzv. čip. V případě vyšetření alergie jsou na destičku navázány rekombinantní alergeny. K označení navázaných protilátek se používá většinou fluorescenční barvivo. Fluorescence je detekována. (Harwanegg, 2003) Schématicky je tato metoda zobrazena na obrázku číslo 11.

Microarray systémy mohou zachytit z jedné kapky materiálu (např. séra) specifické IgE protilátky proti desítkám až stovkám alergenů. Jejich nevýhodou je zatím vysoká cena vyšetření. Dosud nevyřešeným problémem je odlišení klinicky významné protilátky od klinicky nevýznamných, které jsou pouze známkou senzibilizace, či jsou detekovány laboratorním vyšetřením jako důsledek zkřížené reakce na příbuzné alergeny. (Honzová, 2009)



Obrázek číslo 11. Schéma technologie microarray
(www.thermoscientific.com/phadia)

V současné době jsou komerčně dostupné technologie umožňující stanovit specifické IgE proti 103 alergenním molekulám. Výsledky testování těchto metod byly slibné. Testy vykazovaly vysokou specifitu a senzitivitu a dobře korelovaly s již existujícími konvenčními testy. (Sanz, 2011)

Diagnostika je prováděna pomocí alergenních složek (component - resolved diagnosis, CRD). U některých alergenů může být senzitivita metodiky microarray nižší v důsledku nedostatečné glykosylace proteinů v bakteriálních systémech používaných k jejich produkci. Nedostatečná glykosylace může mít význam při vazbě na IgE. (Sanz, 2011)

7. Konkrétní příklad využití rekombinantních alergenů

7.1. Kazuistiky

Kasuistika č. 1 – Pacientka 21 let

Atopický ekzém se projevil od osmého měsíce věku, zhoršoval se v souvislosti se zařazením kravského mléka, vejce a celeru do stravy. Od 5 let měla pacientka příznaky polinosy (alergická rýma, konjunktivitida) v jarních až letních měsících. Od 6 let se přidaly projevy astma bronchiale. V posledních asi 2 letech u pacientky došlo ke zhoršení atopického ekzému zejména v obličeji

s projevy dermatitidy periorálně. Pociťuje pálení a svědění v dutině ústní po některých potravinách, z těchto příznaků podezřívá kiwi, syrová jablka. Dietu dodržuje jen částečně. Výrazné zhoršení ekzému v obličeji pozorovala ve vánočním období.

Vyšetření:

V kožních prick testech s inhalačními alergeny pacientka výrazně pozitivně reagovala na pyly břízovité, trávy a obilí.

Kožní prick testy se zásobními alergeny (Alyostal) diagnostikovaly pouze hraničně celer, testy se syrovými potravinami poukázaly výrazně pozitivní reakci na mrkev, celer, petržel, slabě pozitivní reakci na jablko a rajče. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce číslo 2.

Celkové IgE bylo výrazně zvýšeno (1 155 IU/ml).

Byly nalezeny i vysoké hodnoty specif. IgE na pyly (bříza >100, bojíněk >100, jílek >100, srha >100, žito >100, pelyněk 1.4, Derm. pter 0.1, Derm. fari-nae 0.22 U/ml). Specifické IgE potraviny jablko 3.96, celer 4,66, mrkev 4,22 U/ml.

Vyšetření rekombinantních alergenů prokázalo vysoce pozitivní reakci na Bet v 1, negativní reakci na profiliny (Bet v 2, Phl p 12), vysoce pozitivní reakci na Dau c 1 pozitivita na Api g 1. Hodnoty ukazuje tabulka číslo 3.

	Alyostal	syrová potravina
Pozitivní kontrola	10 / 25	8 / 20
Negativní kontrola	0	0
Mrkev	0	10 / 25
Celer	3 / 5	5 / 15
Petržel	Test není k dispozici	10 / 20
Jablko	0	3 / 5
Rajské jablko	0	3 / 5

Tabulka číslo 2. Výsledky kožních testů, pupen / zarudnutí. (cm)

Alergen (rekombinantní)	specif. IgE (U/ml)	BAT (%)	Komentář
Bet v 1	100	90	výrazně pozitivní
Bet v 2	0,49	1.4	negativní
Phl p 1	100	-----	výrazně pozitivní
Phl p 12	0,48	-----	negativní
Mal d 1	-----	4	negativní
Api g 1	19,6	-----	pozitivní
Dau c 1	-----	86	výrazně pozitivní

Tabulka číslo 3. Výsledky rekombinantních alergenů specifických IgE a výsledky testu BAT.

Závěr:

Jedná se o pacientku s pylovou alergií, přecitlivělost na potraviny je dána zkříženou reakcí mezi alergeny v rámci rodiny Bet v 1.

Pacientce byla doporučena dietní opatření s úplnou eliminací syrové zeleniny zejména mrkve, omezení jablka, oříšků. Pacientka byla upozorněna na možné riziko rozšíření reakce na další potraviny se zkříženou reakcí s hlavním alergenem břízy (Bet v 1) – stromové ořechy, syrové brambory, hruška, třešně, meruňka, broskev.

Kasuistika č. 2 – pacientka 45 let

Pacientka je léčena řadu let pro polinózu s klinickými projevy alergické rýmy a alergické konjunktivitidy s potížemi v období duben až červen. Trpí opakujícími se záněty horních cest dýchacích, pro časté angíny jí byly chirurgicky odstraněny mandle. Řadu let má projevy potravinové alergie s obrazem alergického orálního syndromu. Udává potíže po požití syrového jablka, mrkve a lískových oříšků. Ke zhoršení potravinové alergie dochází v průběhu posledních dvou let, reakce se rozšířila na další ovoce (meruňky, třešně, syrovou zeleninu). Po požití syrové mrkve se objevila i kožní reakce. Potíže začal pacientce vyvo-

lávat i celer a to jak syrový, tak vařený. Po jeho konzumaci dává bolesti břicha, průjmy.

Vyšetření:

Kožní prick testy výrazně pozitivní bříza, líska, olše, habr, směs trav a žito. Výrazně pozitivní pelyněk (pupen 8 mm, erytém 10 mm). Kožní prick testy s potravinami (Alyostal) pozitivita na mrkev (5/6), celer (3/4), meruňky, jablko negativní.

Výsledek laboratorního vyšetření celkového IgE byl 128 IU/ml.

Specifické IgE prokázaly významné zvýšení protilátek na pyl břízy, bojínku, žita i pelyňku. Specifické IgE na vybrané potraviny ukázaly mírně zvýšenou hodnotu s lískovým oříškem (1,5 U/ml), mrkev (1,22 U/ml), hraniční hodnoty pro celer (0,42 U/ml). Negativní výsledek byl pro petržel (0,1 U/ml), jablko (0,25 U/ml), arašídý (0,15 U/ml). Viz tabulka číslo 4.

Vyšetření pomocí testu aktivace bazofilů se zásobními alergeny (Alyostal) a vyšetření s rekombinantními alergeny prokázalo silně pozitivní reakci na Bet v 1 i na Bet v 2, pozitivní reakci na celer, silně pozitivní reakci na Api g 1, silně pozitivní reakci na mrkev, mírně pozitivní reakci na Dau c 1. Viz tabulka číslo 5.

Tabulka číslo 4. Výsledky specifických IgE. (IU/ml)

Bříza	> 100
Líska	2.3
Bojínek	12
Žito	18
Pelyněk	17
lísk.oříšky	1.5
Mrkev	1.22
Celer	0.42
Petržel	0.1
Jablko	0.25
Arašídý	0.15

Alergen	Test aktivace basofilů	Komentář
Bříza	81 %	pozitivní
Bet v 1	95 %	silně pozitivní
Bet v 2	94 %	silně pozitivní
Trávy směs	90 %	pozitivní
Pelyněk	87 %	pozitivní
Mrkev	74 %	pozitivní
Dau c 1	38 %	mírně pozitivní
Celer	88 %	pozitivní
Api g 1	95 %	silně pozitivní

Tabulka číslo 5. Výsledky testů aktivace bazofilů.

Souhrn:

Pacientka trpí pylovou alergií s klinickými projevy potravinové alergie. Byla prokázána přecitlivělost na pyly stromů (břízovité) trav i pelyňku. Pomocí vyšetření s rekombinantními alergeny byla zjištěna reakce jak na hlavní alergen břízy (Bet v 1), tak na vedlejší alergen břízy (profilin Bet v 2). Potravinová alergie je způsobena zkříženou reakcí mezi alergeny jak skupiny hlavního alergenu břízy (Api g 1, Dau c 1), tak ve skupině profilinů (lze předpokládat reakci u celeru na Api g 4, u mrkve Dau c 4, buráků Ara h 5 i dalších).

Pacientka byla poučena o nutnosti dietních opatření a informována o riziku spojeném s alergií na profiliny, které mohou být částečně termostabilní a částečně odolné vůči trávicím enzymům. Pacientka byla poučena o možném riziku i závažnější alergické reakce na potraviny a mimo dietní opatření byla vybavena pohotovostními léky.

7.2. Výsledky laboratorního vyšetření

Pacient číslo 1 – 31let, muž.

ALERGENY - Bazotest							
BAT negativní kontrola	[-*]	4,3	%	0.0 - 10.0	Heparin	91439	
BAT pozitivní kontrola	[-*]	97,1	%	15.0 - 100	Heparin	91439	
BAT bílek vaječný	[-*]	6,4	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
BAT mléko kravské	[-*]	4,5	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
BAT mouka pšeničná	[--]!	81,8	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
BAT mouka žitná	[--]!	54,6	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
BAT treska	[-*]	11,2	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
BAT sója	[--]!	34,2	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
BAT Phl p1 (rek.alergen)	[--]!	90,9	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
BAT Bet v1 (rek.alergen)	[-*]	4,9	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
BAT Bet v2 (rek.alergen)	[-*]	5,5	%	0.0 - 15.0	Heparin	91439	
ALERGENY - specifické IgE, IgG							
# slgE bílek vaječný	[-*]	0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE mléko kravské	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE mouka pšeničná	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE mouka žitná	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE ořechy burské	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE ořechy lískové	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE ořechy vlašské	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE mák	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE treska	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE sója	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
slgE rPru p3 LTP (rek.alergen)	[-*]	< 0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE med	[-*]	0,16	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	

Specifické IgE testy nevykazovaly výrazně zvýšené hodnoty, až test BAT poukázal na senzibilizaci na Phl p 1, což je hlavní alergen z bojínku.

Pacient číslo 2 – 7 let, muž

ALERGENY - specifické IgE, IgG							
# slgE bílek vaječný	[--]*	0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE žloutek vaječný	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE mléko kravské	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE ořechy burské	[--]!	> 100,00	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
slgE rAra h1 (rek.alergen)	[--]!	> 100,00	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
slgE rAra h9 (rek.alergen)	[-*]	< 0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE srňa	[--]!	3,88	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE bojínek	[--]!	2,79	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE bříza	[-*]	0,11	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE ambrosie pelyňkolistá	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	
# slgE pelyněk černobýl	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235	

Po analýze specifického IgE, bylo požadováno testování rekombinantními alergeny, které poukázaly na zvýšenou citlivost na rAra h 1, což je zásobní bílkovina arašídů, podobná proteinům v sóje, vlašských ořechích, čočce a v sezamovém oříšku. Tato bílkovina patří do skupiny vicilinů a je velmi odolná proteolýze (dáno terciální strukturou).

Pacient číslo 3 – 24 let, žena

ALERGENY - specifické IgE, IgG

# slgE tomka	[--]!	0,94	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE srha	[--]!	1,12	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE kostřava	[--]!	1,74	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE jilek	[--]!	1,65	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE bojínek	[--]!	1,72	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE bříza	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE pelyněk černobýl	[-*]	0,20	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE Dermatophagoides pteronyssinus	[--]!	12,30	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE nDER p1 (rek.alergen)	[--]!	3,00	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE nDER p2 (rek.alergen)	[--]!	22,80	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rDER p10 (rek.alergen)	[-*]	< 0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE Dermatophagoides farinae	[--]!	18,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE epitel kočka	[--]!	1,02	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE Cladosporium herbarum	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE Alternaria tenuis	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235

Testy s rekombinantními alergeny ukázaly, že pacientka je senzibilizována alergeny roztoče Der p 2.

Pacient číslo 4 – 8 let, muž

ALERGENY - specifické IgE, IgG

# slgE směs-Inhalační panel 6	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91237
<i>Složení směsi: cladosporium herbarum, bojínek luční, alternaria tenuis, bříza bradavičnatá, pelyněk černobýl</i>						
# slgE Dermatophagoides pteronyssinus	[--]!	22,20	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE nDER p1 (rek.alergen)	[--]!	21,30	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE nDER p2 (rek.alergen)	[--]!	56,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rDER p10 (rek.alergen)	[-*]	< 0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE kys. acetylsalicylová	[-*]	< 0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91219

Testy s rekombinantními alergeny ukázaly na senzibilizaci na hlavní alergeny roztoče Der p 1 a Der p 2.

Pacient číslo 5 – 54 let, muž

ALERGENY - specifické IgE, IgG

# slgE ořechy lískové	[--]!	1,92	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE jablko	[-*]	0,13	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE bojínek	[-*]	< 0,10	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rPhi p1 (rek.alergen)	[-*]	< 0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rPhi p12 (rek.alergen)	[-*]	< 0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE bříza	[--]!	18,00	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rBet v1 (rek.alergen)	[--]!	5,39	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rBet v2 (rek.alergen)	[-*]	< 0,35	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE pelyněk černobýl	[-*]	0,11	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235

Rekombinantní alergeny odhalily senzibilizaci pacienta na hlavní alergen břízy, Bet v 1, s tímto nálezem souvisí také senzibilizace na lískové ořechy.

Pacient číslo 6 – 19 let, žena

ALERGENY - specifické IgE, IgG

# slgE bojínek	[---]!	> 100,00	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rPhl p1 (rek.alergen)	[---]!	62,50	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rPhl p12 (rek.alergen)	[---]!	1,57	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE bříza	[---]!	25,00	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rBet v1 (rek.alergen)	[---]!	9,32	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
slgE rBet v2 (rek.alergen)	[---]!	2,11	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235
# slgE pelyněk černobýl	[---]!	22,70	U/ml	0.00 - 0.35	Sérum	91235

Rekombinantní alergeny prokázaly senzibilizaci na hlavní alergen břízy (Bet v 1) a bojínku (Phl p 1), ale i na profilyny (Bet v 2, Phl p 12).

8. Shrnutí a závěr

Užití vhodného panelu rekombinantních alergenů umožnilo zlepšit tradiční diagnostické techniky stanovení specifických IgE. Zvýšila se senzitivita a reprodukovatelnost testu a také stabilita alergenů. (Sanz, 2011)

Novou slibnou možností diagnostiky je využití rekombinantních alergenů s expozicí efektorových krevních buněk nesoucích na svém povrchu navázané protilátky IgE. (Honzová, 2009)

Díky rekombinantním alergenům a vývoji nových velkokapacitních matic s pevnou fází (microarray), bude možné zlepšit diagnostiku alergií a to zejména alergií na potravinové alergeny. (Sanz, 2011)

Diagnostika zkřížené alergie je možná právě díky objevu rekombinantních alergenů.

Rekombinantní alergeny mohou charakterizovat alergii včetně možných rizik, upozornit na možná rizika závažné alergické reakce, vysvětlit pacientovi důvod jeho potíží, doporučit vhodná režimová a dietní opatření, indikovat co nejpřesněji alergenovou imunoterapii.

9. Seznam použité literatury

1. Ambrusová Z., Rekombinantní alergeny, *Alergie*, ročník 13/2011, str. 50-53, ISSN1212-3536
2. Al De Weck et al., Diagnostic Test Based on Human Basophils: More Potentials and Perspectives Than Pitfalls, II. Technical Issues, *Journal of investigational alergology and clinical imunology*, 2008, Vol. 18(3), Esmon Publicidad, str. 143-155, ISSN: 1018-9068 – D
3. Ballmer-Weber B.K. et al., "Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: Does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure?", *Clinical and experimental allergy*, vol.35/2005, str. 970-978, ISSN1365-2222
4. Bartůňková J., Paulík M. a kolektiv, *Vyšetřovací metody v imunologii*, 2005, Grada, ISBN 80-247-0691-1
5. Fuchs M, *Potravinové alergeny-zkřížená alergie*, *Alergie*, ročník 5/2003, str. 121-127, ISSN1212-3536
6. Harwanegg C.et al., "Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy", *Clinical and experimental allergy*, Vol.33/2003, str.7-13, ISSN1365-2222
7. Honzová S., *Možnosti laboratorní diagnostiky alergie*, WWW. internimediceina.cz, *Interní medicína pro praxi*, 2009,11(4) str. 168-170, ISSN - 1803-5256
8. Honzová S., *Aktivace bazofilních granulocytů v průkazu atopie*, Referátový výběr z dermatovenerologie, ročník 46, č. Spc.1/2004, str 31-36, ISSN1213-9106
9. Hořejší V., Bartůňková J., *Základy imunologie*, 4. Vydání, 2009, Triton, ISBN 978-80-7387-280-9
10. Humplova Z., *Laboratorní diagnostika v alergologii*, Výběr atestačních prací z alergologie a klinické imunologie, 2005, ročník IX(2), Tigris, str.17-45, ISSN 1214-5971

11. Chapman M. D. and col., Nomenclature and structural biology of allergens, *Journal of allergy and clinical immunology*, vol.119/nr.2/2007, str. 414-420, ISSN0091-6749
12. Krejsek J., Kopecký O., *Klinická imunologie, Nukleus*, 2004, ISBN 80-86225-50-X
13. Lochman I., Lochmanová A., *Laboratorní diagnostika alergie, Alergie*, ročník 13/2011, str. 73-77, ISSN1212-3536
14. Pauli G, Malling HJ. The current state of recombinant allergens for immunotherapy. *Current Opinion Allergy Clin Immunol* 2010(Dec);10(6), str. 575-581. ISSN 1528-4050
15. Petrů V. a kolektiv, *Dětská alergologie, Mladá fronta*, 2012, ISBN 978-80-204-2584-3.
16. Rybníček O., Seberová E. a kolektiv, *Průvodce specifickou alergenovou terapií*, 2009, Tigis, ISBN 978-80-903750-7-9
17. Sanz M. L., Blázquez A. B., García B. E., Microarray of allergenic component-based diagnosis in food allergy, *Curr Opin Allergy and Clinical immunology* 2011/8(apr), vol 12, str. 204-209, ISSN 1528-4050
18. Sicherer S. H., "Clinical implications of cross-reactive food allergens", *Journal of allergy and clinical immunology*, vol.108/nr.6/2001, str. 881-890, ISSN0091-6749
19. Špičák V., Panzner P., *Alergologie, Karolinum*, 2004, ISBN 80-7262-265-X
20. Špičák V., Standardizace alergenů a hlavní alergeny, *Alergie*, 2003/2, str. 145-150, ISSN 1212-3536
21. Teřl M., Rybníček O., *Asthma bronchiale v příčinách a klinických obrazech*, 2008, Geum, ISBN 978-80-86256-59-7
22. Valenta R. et al., The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy, *Clinical and experimental Allergy*, 1999/29, str. 896-904, ISSN 1365-2222
23. Vokurka M., Hugo J. a kolektiv, *Velký lékařský slovník, 7vydání, Jessenius Maxdorf*, 2003, ISBN 978-80-7345-130-1
24. www.pdb.org, An Information Portal to Biological Macromolecular Structures (informační portál struktur biologických makromolekul)
25. www.thermoscientific.com/phadia, katalog firmy Phadia. 2012.