

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2016

Michaela Bocskorová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Michaela Bocskorová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**STANOVENÍ SPECIFICKÝCH IgE NA PEVNÉ FÁZI,
VÝZNAM ZKŘÍŽENĚ REAGUJÍCÍCH ALERGENŮ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Jitka Ochotná

PLZEŇ 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 3 2016

.....

vlastnoruční podpis

Děkuji Mgr. Jitce Ochotné za odborné vedení práce, za poskytování cenných rad, informací a materiálních podkladů k této bakalářské práci. Dále děkuji za vstřícnost a čas, který mi věnovala.

Anotace

Příjmení a jméno: Bocskorová Michaela

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Stanovení specifických IgE na pevné fázi, význam zkříženě reagujících alergenů

Vedoucí práce: Mgr. Jitka Ochotná

Počet stran: 64 (číslovaných 40, nečíslovaných 24)

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 24

Klíčová slova: alergie, zkřížená alergie, ImmunoCAP ISAC, pylový alergen, specifické IgE, panalergen, rekombinanty

Souhrn:

Bakalářská práce je zaměřena na problematiku zkřížených alergií a diagnostiku alergií pomocí metody ImmunoCAP ISAC.

Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části je popsána alergie, její klinické projevy, diagnostika a léčba alergických onemocnění. Dále je zde kapitola věnovaná zkříženým alergiím a pseudoalergiím.

Praktická část práce je zaměřena na retrospektivní analýzu dat získaných vyšetřením pacientů FN Plzeň metodou ImmunoCAP ISAC. U pacientů byl vytvořen senzibilizační profil a bylo u nich stanoveno, zda se u nich objevuje zkřížená alergie na některý ze sedmi vybraných pylových alergenů.

Annotation

Surname and name: Bocskorová Michaela

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: Detection specific IgE on the solid phase, the importance of cross-reactive allergens

Consultant: Mgr. Jitka Ochočná

Number of pages: 64 (numbered 40, not numbered 24)

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 24

Key words: allergy, cross-allergy, ImmunoCAP ISAC, pollen allergen, specific IgE, panallergen, recombinants

Summary:

This bachelor thesis is focused on cross-allergy and allergy diagnostic methods using ImmunoCAP ISAC.

This thesis is divided into theoretical and practical part. The theoretical part describes allergy, its clinical manifestations, diagnosis and treatment of allergic diseases. There is also a chapter devoted to the cross-allergy and pseudoallergy.

The practical part is focused on a retrospective analysis of data obtained by examinations of patients in Faculty Hospital in Pilsen using ImmunoCAP ISAC. Patients sensitization profile has been created, and they were determined whether they appear cross allergy to any of the seven selected pollen allergens.

Obsah

Úvod	13
1 Alergie	15
1.1 Alergeny.....	15
1.1.1 Názvosloví alergenů	16
1.2 Druhy alergenů	17
1.2.1 Zvířecí alergeny.....	17
1.2.2 Pyly.....	17
1.2.3 Plísně	17
1.2.4 Alergie na hmyz.....	18
1.2.5 Potravinové alergeny	18
1.2.6 Alergeny bytového a domovního prostředí	19
1.3 Panalergeny- profilin, polkalcin a lipid transfer protein.....	19
1.3.1 Profilin.....	19
1.3.2 Polkalciny	20
1.3.3 Lipid transfer proteiny (LTP)	20
1.4 Rekombinantní alergeny	20
1.4.1 Příprava rekombinantních alergenů.....	21
2 Fáze alergické reakce.....	21
2.1 Fáze senzibilizace	22
2.2 Časná a pozdní fáze alergické reakce	22
3 Specifické IgE.....	23
4 Diagnostika alergických onemocnění.....	24
4.1 Alergologické kožní testy	24
4.2 Laboratorní vyšetření.....	24
4.3 Provokační testy.....	25
5 Klinické projevy alergie	26

5.1	Asthma bronchiale	26
5.2	Atopická dermatitida (ekzém)	26
5.3	Kopřivka (urtikárie)	27
5.4	Orální alergický syndrom (OAS).....	27
5.5	Anafylaktický šok	28
6	Zkřížené alergie (zkřížená reaktivita).....	29
7	Pseudoalergie (falešné alergie).....	32
8	Léčba alergických onemocnění	32
8.1	Eliminace alergenu	32
8.2	Farmakoterapie	33
8.3	Alergenová imunoterapie.....	33
8.4	Pomocná léčba	33
9	Cíl práce.....	35
10	Metodika práce	35
11	Výzkumné otázky	36
12	Stanovení specifických IgE na pevné fázi.....	37
12.1	ImmunoCAP ISAC® (Immuno Solid-phase Allergen Chip).....	37
12.1.1	Reagencie.....	37
12.1.2	Postup	38
12.2	Vlastní stanovení	41
12.2.1	Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Art v 3.....	42
12.2.2	Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Bet v 2.....	43
12.2.3	Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Bet v 4.....	44
12.2.4	Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Mer a 1	45
12.2.5	Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Ole e 7.....	46
12.2.6	Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Phl p 7	47
12.2.7	Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Phl p 12.....	48

13	Diskuze	49
	Závěr	52
	Použitá literatura	53
	Seznam zkratk	55
	Seznam tabulek	56
	Seznam grafů	57
	Seznam obrázků	58
	Seznam příloh	59
	Přílohy	60

Úvod

Alergie je označována za nemoc století. Zejména v posledních desetiletích výrazně stoupá počet osob, které trpí alergickým onemocněním. V průběhu života se vlivem okolního prostředí neustále imunizujeme vůči různým podnětům, ať se jedná o plísně, houby, různé chemické toxiny nebo například potraviny. Imunitní systém zdravého jedince si i při opakovaném setkání s alergenem sám poradí, ovšem v případě nemocného jedince imunitní systém funguje jinak. Po kontaktu s alergenem si vytvoří protilátky, které při dalším setkání vyvolají alergickou reakci. Alergie nepatří mezi život ohrožující onemocnění, přesto pacienty nepříznivě ovlivňuje po celý jejich život. Jedná se tedy nejen o zdravotní, ale i ekonomický a společenský problém, který se snaží vyřešit řada odborných společností. Zvyšující se rozvoj alergií je přisuzován ekonomické a hygienické úrovni společnosti. Jako paradox se proto může zdát, že čím vyspělejší civilizace, tím vyšší počet alergiků. Mezi další důvody vzniku alergie patří znečištěné ovzduší, špatná životospráva, nedostatek pohybu, stres nebo nadbytečné užívání léků.

Fenoménem současnosti jsou zkřížené alergie. Jedná se o stav, kdy protilátky proti imunoglobulinu E vytvořené v organismu jedince reagují na strukturně velmi podobné aminokyseliny obsažené v jiných alergenech. Tyto zkřížené reaktivity mohou způsobit, že pacient alergický na pyl břízy bude reagovat například i na pyly trav. Dalším typickým příkladem je alergie současně na pyl a potravinu, kdy člověku může vadit nejenom pyl pelyňku, ale také celer, mrkev nebo petržel. Klinicky se zkřížená alergie projevuje spíše mírně (například orálně alergickým syndromem), ale může dojít až k anafylaktickému šoku. K určení diagnózy zkřížené alergie se využívají testy založené na stanovení specifických imunoglobulinů E, nejčastěji se jedná o metodu ELISA.

V teoretické části bakalářské práce bylo cílem popsat problematiku alergií, její klinické projevy, diagnostiku a léčbu. Následující část práce je zaměřena především na oblast zkřížených alergií.

Praktická část je zaměřena na stanovení specifických IgE na pevné fázi pomocí metody ImmunoCAP ISAC. Předem byl vybrán soubor sedmi pylových alergenů a retrospektivní analýzou byly vypracovány senzibilizační profily pacientů FN Plzeň. U pacientů se následně stanovilo, zda se u nich jedná o zkříženou alergii mezi jednotlivými pylovými alergeny, či nikoliv.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Alergie

Termín alergie označuje nepřiměřenou a přehnanou reakci imunitního systému jedince na látky, se kterými se doposud setkával v běžném prostředí. Nejčastěji se jedná o látky zevního (exogenního) původu (Litzman, a další, 2001).

Alergii popsal již v 5. století před naším letopočtem Hippokrates, který diagnostikoval astma a rovněž objevil existenci potravinových alergií. Zjistil totiž, že sýr je pro mnohé pochoutkou, avšak u některých osob jeho pozření vyvolá těžkou alergickou reakci. V roce 1905 definoval vídeňský pediatr Baron Clemens von Pirquet termín alergie (z řeckého *allos – ergon* = reaguje jinak) jako abnormální reakci některých jedinců na běžné látky. (Orlová, 2002; Litzman, a další, 2001).

Po první světové válce provedli dva němečtí vědci Prausnitz a Kustner experiment, kterým dokázali, že alergii způsobují látky obsažené v krevním séru. V roce 1967 manželé Ishizakovi z Japonska objevili a popsali imunoglobulin E (Orlová, 2002).

1.1 Alergeny

Pojem alergen označuje antigen vyvolávající alergickou reakci spojenou s tvorbou specifických protilátek třídy IgE. Při opakovaném setkání s alergenem se u citlivého člověka spustí kaskáda buněčných pochodů, které se navenek projeví jako klinické příznaky alergie. Ke spuštění této kaskády, a tudíž i k alergické reakci, dojde pouze u osob s abnormální imunitní reaktivitou. Expozice u normálních osob vede k fyziologické imunitní odpovědi projevující se zvýšenou produkcí protilátek třídy IgG (Krejsek, a další, 2004; Litzman, a další, 2001).

V současné době rozlišujeme tři typy alergenů- kompletní, nekompletní a nerelevantní. Alergeny kompletní spouštějí tvorbu specifických IgE protilátek a současně jsou biologicky aktivní. Alergeny nekompletní jsou negativní v odpovědi specifických IgE protilátek, ale jsou pozitivní v kožním testu. Nerelevantní alergeny sice spouštějí tvorbu specifických IgE protilátek, ale mají kožní testy negativní (Špičák, a další, 2004).

Alergeny se dále rozlišují na hlavní a vedlejší. Hlavní alergeny vyvolají tvorbu specifické IgE protilátky (a tím způsobí pozitivitu v kožním testu) u více než 50% jedinců, kteří jsou na daný alergen přecitlivělí. Tyto alergeny jsou obsaženy v léčebných preparátech pro

alergenovou imunoterapii a v komerčně dodávaných testovacích soupravách pro in vitro a in vivo testování. Na alergeny vedlejší reaguje jen malé množství alergiků a jsou často zodpovědné za zkřížené reaktivity (Krejsek, a další, 2004; Špičák, a další, 2004).

Alergenem se může stát jakákoliv látka způsobující alergickou reakci. Nejčastějšími alergeny jsou pyly, plísně a potraviny. S některými alergeny se jedinec setkává zcela ojediněle, účinkům jiných je vystaven sezónně (například působení pylů a jejich vliv na spuštění alergické rýmy) (Orlová, 2002).

1.1.1 Názvosloví alergenů

Nomenklatura alergenů byla vytvořena organizací WHO/IUIS, která v roce 1986 vydala seznam 26 přesně popsáných alergenů trav, bylin, časných stromů a roztočových alergenů. Později byly stanoveny podmínky pro možnost zařazování alergenů do nomenklatury na základě strukturální molekulové vlastnosti alergenu a průkazu IgE zprostředkované reakce. Značení alergenů vychází z rodového a druhového jména. Označení alergenu se skládá z prvních tří písmen rodového jména, za mezerou následuje první písmeno druhového jména a číslo, které vyjadřuje pořadí, kdy bylo dosaženo purifikace. V rámci nomenklatury jsou popsány izoalergeny (alergeny různé molekulární formy pocházející z jednoho druhu), dále izoformy, alergenové geny, rekombinantní alergeny (značené písmenem „r“) a syntetické peptidy (Krejsek, a další, 2004; Špičák, a další, 2004).

Příklad názvosloví: alergen roztoče *Dermatophagoides pteronyssinus* je označován Der p 1. Vzhledem k tomu, že bylo plně popsáno několik alergenů tohoto roztoče, označují se pak následující alergeny jako Der p 2, Der p 3 atd. Alergen břízy bradavičnaté *Betula verrucosa* je v nomenklatuře označován jako Bet v 1, alergen kočky domácí *Felis domesticus* je Fel d 1 (Krejsek, a další, 2004).

WHO spravuje internetovou databázi (www.allergen.org), ve které se dají vyhledat všechny alergeny. Je zde uveden jejich přírodní zdroj, zastaralý název, biochemické zařazení a schopnost senzibilizace.

1.2 Druhy alergenů

1.2.1 Zvířecí alergeny

Zvířecí alergeny se vylučují především slinami, močí a mazovými žlázami, méně významná je srst a chlupy. Alergeny zvířat kontaminují i nejmenší částice prachu. Jsou lepivé a mají proto velkou schopnost udržovat se na šatech, nábytku a stěnách. V domácnostech se vyskytují až několik měsíců po odstranění zvířete. Po kontaktu s alergenem dochází u citlivého jedince ke kožním nebo očním projevům, po vdechnutí k alergické rýmě či astmatu. Nejagresivnějším alergenem je Fel d 1, alergen kočky domácí. Méně významným je Can f 1, alergen psa domácího, a alergeny hlodavců (Petrů, 2012; Špičák, a další, 2004).

1.2.2 Pyly

Největší skupinou alergenů venkovního prostředí jsou pyly se sezónním výskytem. Pylová sezóna začíná na jaře, kdy se vyskytují především pyly stromů (břízy, lísky a olše), v létě jsou dominantní pyly trav a na podzim kvetou různé plevely a byliny (pelyněk, lebeda). Pylové zrnko je produktem samčího orgánu květu, vzniká v tyčinkách semenných rostlin. Přenáší se hmyzem a větrem. Pacient může být alergický pouze na jeden pyl určité rostliny, nebo může zkříženě reagovat na skupinu příbuzných rostlinných druhů. Pyly se rozdělují do 6 základních skupin, které zahrnují nejvýznamnější alergeny. Patří sem:

- Bříza + příbuzné druhy (líska, olše)
- trávy + obiloviny
- olivovník + jasan
- pelyněk + ambrozie
- drnavec + kopřiva
- cypřišovitě (Špičák, a další, 2004).

1.2.3 Plísně

Plísně se vyskytují v teplém prostředí s vysokou vlhkostí, ať už se jedná o venkovní nebo domácí prostředí. Ve venkovním prostředí jsou především v hlíně a na listech, vrchol jejich výskytu je během pylové sezóny. V domácnostech se plísně vyskytují celoročně a jsou především v koupelnách, kuchyních, květináčích a na dalších teplých a vlhkých místech.

Existuje velké množství plísní, ale jen minimum z nich je klinicky významných.

Mezi nejčastější venkovní plísně patří rod *Altenaria* a *Cladosporium*, nejvýznamnějšími domovními plísněmi jsou rody *Aspergillus* a *Penicillium* (Špičák, a další, 2004).

1.2.4 Alergie na hmyz

Nejčastější příčinou alergie je včelí a vosí jed. Vyskytují se také alergie na bodnutí čmelákem, mravencem, blechou, vší, komárem a štěnicí. Jed obsažený v žihadle působí toxicky i na zdravého jedince, ale u alergika dochází k prudké reakci, kopřivce a otokům, které mohou být na jazyku a hrtanu kritické a vést až k udušení (Zavázal, 2000).

Diagnóza alergie na hmyzí bodnutí je založena na anamnéze, kožních testech za použití jedu podezřelého hmyzu a na vyšetření specifických IgE protilátek. První pomocí při bodnutí hmyzem je okamžité odstranění žihadla, pokud zůstalo v ráně, přiložení studeného obkladu a podání antihistaminik. Jestliže u pacienta dojde k rozvoji anafylaktické reakce, je vysoká pravděpodobnost, že při dalším bodnutí bude mít příznaky mnohem horší. Proto se u těchto pacientů přistupuje k léčbě hyposenzibilizací, kdy je pacientovi v pravidelném intervalu podáván extrakt z hmyzího jedu. Koncentrace extraktu se postupně zvyšují a po dosažení silných dávek se přechází k udržovací léčbě.

Hmyz může také způsobit inhalační alergie, kdy senzibilizovaný jedinec vdechne částičky těl hmyzu a reaguje na ně spuštěním alergické rýmy nebo astmatem (Špičák, a další, 2004; Orlová, 2002).

1.2.5 Potravinové alergeny

Potravinové alergeny jsou proteiny nebo glykoproteiny s přirozenou antigenní povahou. Potravinově senzibilizovat dokáže celkem 41 z dosud známých 9318 bílkovinných rodin.

Je nutné rozlišovat potravinovou alergii od potravinové intolerance, která je způsobena toxickým nebo metabolickým působením potravy na člověka a imunitní mechanismy zde nehrají žádnou roli.

Mezi nejčastěji se vyskytující potravinové alergeny patří kasein obsažený v kravském mléku, β -laktoglobulin (Bos d 5) v syrovátce, parvalbumin v rybích tkáních a 23 bílkovin obsažených ve vejci, například alergen žloutku Gal d 5. Jedinou možností léčby potravinové alergie je eliminace potravin obsahujících daný alergen, což ale může vést k problémům se správným sestavením nutričně vyváženého jídelníčku (Fuchs, 2008; Krejssek, a další, 2004).

1.2.6 Alergeny bytového a domovního prostředí

Jedná se o alergeny, se kterými je člověk v neustálém kontaktu a setkává se s nimi již prenatálně. Lidský plod je schopen senzibilizace od 22. týdne těhotenství a v pupečnickové krvi novorozence byly prokázány protilátky IgE.

Významným zdrojem alergenů interiérů je domácí prach. Jedná se o různorodou směs obsahující výměšky roztočů, chlupy domácích zvířat, vlasy, zbytky těl roztočů a hmyzu, lidské a zvířecí epitelie, textilní vlákna, pyly či plísňe, které se neustále víří ve vzduchu, pronikají do dýchacích cest a citlivého jedince mohou senzibilizovat a vyvolat u něj alergickou reakci. V minulosti byly ze sesbíraného prachu vyráběny extrakty, které se používaly při kožním testování a imunoterapii. Alergologicky nejvýznamnější složkou domácího prachu jsou roztoči druhu *Dermatophagoides pteronyssinus* a *Dermatophagoides farinae* (Špičák, a další, 2004; Bystroň, 1997).

1.3 Panalergeny- profilin, polkalcin a lipid transfer protein

Jako panalergeny označujeme alergeny, u kterých podobnost mezi bílkovinami obsaženými v epitopech přesáhne 80%. Panalergenů existuje velké množství a jsou zodpovědné za vznik zkřížených alergií. Níže jsou popsány tři vybrané druhy – profiliny, polkalciny a lipid transfer proteiny.

1.3.1 Profilin

Profiliny jsou termolabilní panalergeny o molekulové hmotnosti 12-15kDa. Vzhledem ke své teplotní nestálosti nejčastěji vyvolávají orálně alergický syndrom po požití syrových potravin. Aminokyselinová sekvence se pohybuje v rozmezí 124-153 aminokyselin. Profiliny jsou aktin vázající proteiny, které regulují mikrovláknovou dynamiku a tvoří pevný cytoskelet rostlinných buněk.

Profiliny se nacházejí jako hlavní alergeny v pylu břízy Bet v 2, bažanky Mer a 1 a bojínku Phl p 12 (Fuchs, 2003).

U některých druhů ovoce se vyskytuje pouze alergie na profilin. Typickým příkladem je ananas (Ana c 1) a banán (Mux xp 1). Profiliny se nacházejí také v živočišných buňkách, ale zatím není popsána žádná zkřížená reakce mezi rostlinnými a živočišnými profiliny. Důvodem je nízká homologie a také to, že živočišné produkty se před konzumací zpravidla tepelně upraví (Fuchs, 2004).

1.3.2 Polkalciny

Polkalciny jsou malé Ca^{2+} vázající proteiny produkované prašníky a pyly kvetoucích rostlin. Tyto panalergeny patří do rodiny EF-hand proteinů, obsahují 77-84 aminokyselin a jejich molekulová hmotnost je 10kDa. Polkalciny jsou zapojeny do signalizačních procesů a do procesů, které probíhají v průběhu klíčení pylových zrn (Henzl, a další, 2011).

1.3.3 Lipid transfer proteiny (LTP)

Jedná se o termostabilní polypeptidy, které jsou velmi odolné vůči tepelnému zpracování a působení chemických a fyzikálních vlivů¹. LTP jsou velmi odolné proti působení trávicích enzymů (především pepsinu), a mohou proto vyvolat systémové příznaky s poruchou krevního oběhu, dýchání až anafylaxe. Již z názvu je patrné, že se jedná o bílkoviny přenášející tuky uvnitř buněk. LTP obsahují 91-93 aminokyselin a molekulová hmotnost je zhruba 9kDa.

Díky své termostabilitě se lipid transfer proteiny dříve využívaly ke genetické modifikaci potravin.

Nejčastěji se vyskytují jako panalergeny ovoce (broskev, třešeň, jablko), ale jsou obsaženy také v lískovém ořechu (Cor a 8), kukuřici (Zea m 14), olivovníku (Ole e 7) a pelyňku (Art v 3).

Chemická podobnost LTP v odlišných nepříbuzných rostlinách může být nižší než 50% a přesto i takto nízká shoda vyvolá zkříženou reakci (Fuchs, 2005; Fuchs, 2003).

1.4 Rekombinantní alergeny

Alergeny využívané pro rutinní diagnostiku a terapeutické účely se získávají izolací z přírodního zdroje určitého alergenu. Vzhledem k tomu, že v současnosti je popsána aminokyselinová struktura většiny alergenů, lze vyrobit vysoce specifické čisté alergenové preparáty, které se označují jako rekombinantní alergeny a využívají se k určení profilu senzibilizace pacienta. Studie potvrdily, že rekombinantní alergeny mohou nahradit alergeny přirozené a přispět tak ke zlepšení diagnostiky a následné terapie. Rekombinantní alergeny

¹ Byla popsána alergie na pivo (respektive lipid transfer protein ječmene), který přečkal celý proces výroby piva od sušení, pražení, vaření a karamelizaci pivovarnického ječmene. Tento lipid transfer protein má velký podíl na existenci pивní pěny.

vykazují srovnatelnou specifickou reaktivitu s přirozenými alergeny, a tudíž je lze použít pro kožní testování.

Alergenové extrakty se využívají k diagnostice specifických IgE protilátek. Ukazují ale pouze, proti jakému alergenu je pacient senzibilizován, proto se ke stanovení profilu senzibilizace daného pacienta využívá CRD (component-resolved diagnosis) (Ambrusová, 2011). „CRD využívá definované alergeny ke stanovení individuálního profilu IgE reaktivity s cílem identifikovat molekuly, které jsou v příčinné souvislosti s alergickým onemocněním“ (Ambrusová, 2011 str. 51). Díky CRD lze stanovit hladinu specifických protilátek, odlišit sdruženou a zkříženou senzibilizaci a určit, s jakou frekvencí jsou alergeny rozpoznávány molekulami IgE. Pomocí metody microarray, při které je panel nejběžnějších rekombinantních alergenů nanesen na čipu, lze jen z minimálního množství krevního séra stanovit profil senzibilizace pacienta (Ambrusová, 2011).

1.4.1 Příprava rekombinantních alergenů

Základním cílem při přípravě rekombinantních alergenů je získání molekul cDNA (komplementární deoxyribonukleové kyseliny), které kódují alergeny. Nejvhodnější metodou pro jejich získání je IgE imunoscreeing. Používá se také metoda PCR, avšak dochází při ní k izolaci molekul cDNA se sníženou biologickou aktivitou.

Molekula mRNA (mesengerové RNA) je reverzní transkriptázou přepsána do cDNA, ta je začleněna do fágové DNA. Jako vektor slouží bakteriofág, který později infikuje *Escherichia coli*, aby mohla být vnesená cDNA exprimována. Plaky infikované *E. coli* se překryjí membránou, která je napuštěna isopropyl- β -galaktosidem, a tím dojde k produkci alergenu. Vyprodukované rekombinantní alergeny se purifikují a kontroluje se u nich biologická aktivita, schopnost vázat se na molekulu IgE a schopnost stimulovat T lymfocyty a degranulovat bazofily (Ambrusová, 2011).

2 Fáze alergické reakce

Alergická reakce je imunitní odpověď organismu na antigeny (alergeny). Jedná se o hypersenzitivní a přecitlivělou reakci, ke které u zdravých jedinců nedochází.

2.1 Fáze senzibilizace

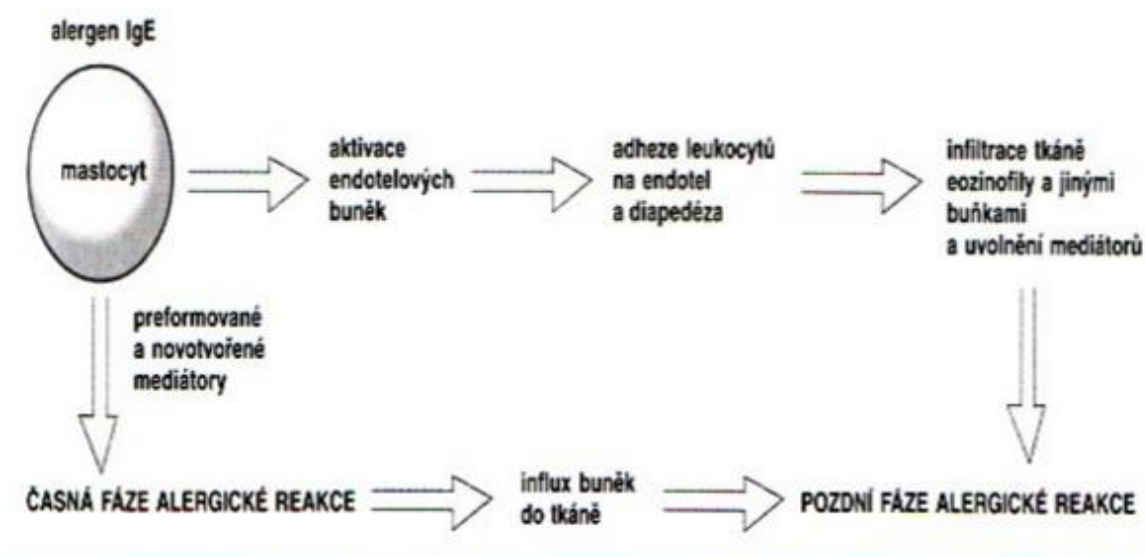
Ve fázi senzibilizace dochází k rozpoznání alergenu buňkami prezentujícími antigen. Během této prezentace se T lymfocyty (Th0 buňky) diferencují na Th2 buňky, které produkují celou řadu cytokinů (např. IL-3, IL-4 nebo IL-5). Následně se buňky Th2 nahromadí v postižené tkáni a indukují tvorbu IgE protilátek. Protilátky se dostávají do krevního oběhu, kde se váží na Fc receptor žírných buněk a bazofilů. K rozvoji alergické reakce dojde až při opakovaném setkání s alergenem (Hořejší, a další, 2013; Špičák, a další, 2004).

2.2 Časná a pozdní fáze alergické reakce

K rozvoji časné fáze dochází okamžitě po opakovaném styku s alergenem. Je zprostředkována uvolněním mediátorů (histaminu a heparinu) alergické reakce ze žírných buněk, ale i tvorbou primárních mediátorů de novo.

Následuje pozdní fáze alergické reakce, která se projeví až v několikahodinovém intervalu. Tvoří se při ní sekundární mediátory, především metabolity kyseliny arachidonové, které mají cytotoxický a chemotaktický účinek. Za dočasné a trvalé změny postižených tkání jsou zodpovědné zejména eozinofilní mediátory (Hořejší, a další, 2013; Špičák, a další, 2004).

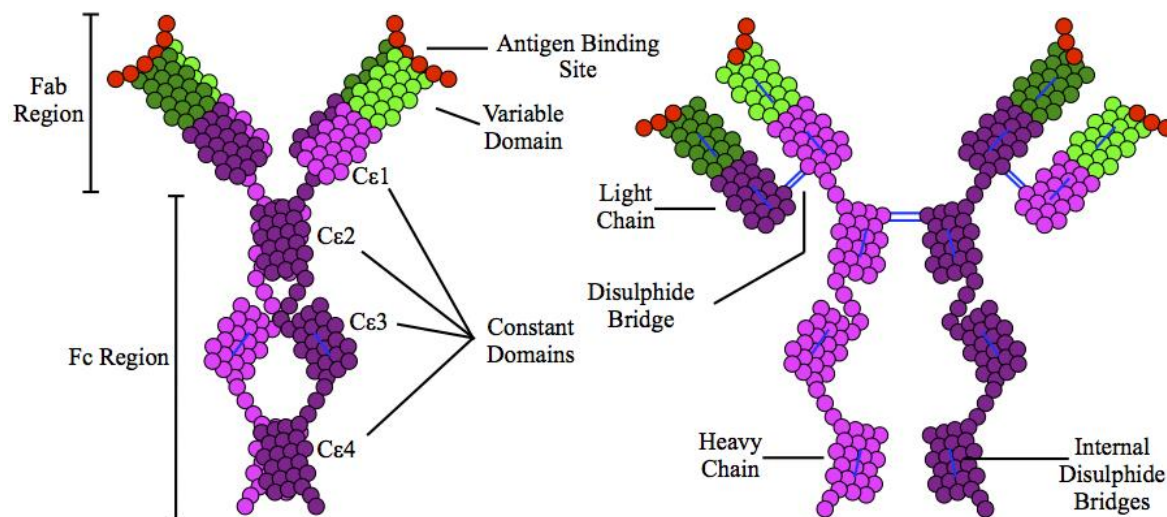
Obrázek 1: Časná a pozdní fáze alergické reakce



Zdroj: (Špičák, a další, 2004)

3 Specifické IgE

Obrázek 2: *Struktura IgE*



Zdroj: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9d/IgE.jpg>

Imunoglobulin E obsahuje dva těžké (ϵ) a dva lehké řetězce (κ nebo λ). Vysokoafinní receptory $Fc\epsilon RI$ se nacházejí na povrchu žírných buněk a bazofilů. Nízkoafinní receptory pro IgE protilátky se nacházejí na povrchu mnoha buněk- například T a B lymfocytů, makrofágů, eozinofilů nebo trombocytů (Hořejší, a další, 2013; Špičák, a další, 2004).

Ke stanovení diagnózy přecitlivělosti zprostředkované IgE protilátkami se využívá celá řada klinických a laboratorních postupů. Základní klinické vyšetření zahrnuje především velmi podrobnou anamnézu. Rychlou metodou ke stanovení IgE protilátek jsou kožní prick testy. Občas ale nelze tyto testy provést, proto přichází na řadu další vyšetřovací metody. Z testů *in vitro* je nejčastěji využíváno stanovení hladin specifických IgE v krevním séru.

Diagnostické sety pro stanovení specifických IgE jsou většinou založeny na principu metody ELISA, ve které jsou alergeny navázány na pevné fázi a v případě pozitivní reakce dochází ke vzniku komplexu alergen - sIgE. Přítomnost alergen specifických IgE protilátek znamená přecitlivělost vůči danému alergenu (Lochman, a další, 2003).

Ke stanovení specifických IgE protilátek se velmi často využívá ImmunoCAP ISAC.

4 Diagnostika alergických onemocnění

Přesné určení diagnózy je u alergií velmi důležité, protože může přispět ke zlepšení zdravotního stavu a dokonce může dojít i k vyléčení pacienta. Nejprve je provedeno základní vyšetření u praktického lékaře, kdy dojde k ujasnění povahy onemocnění a vyloučí se choroby nealergického původu. Následuje alergologické vyšetření, které se skládá z anamnézy, fyzikálního klinického vyšetření, kožních testů a laboratorního vyšetření. Podle potřeby je doplněno o testy provokační, expoziční a epikutánní (Špičák, a další, 2004).

4.1 Alergologické kožní testy

Kožní test je prováděn pro zjištění přítomnosti specifických IgE protilátek vůči určitému alergenu. Při výběru alergenů se vychází z anamnézy a klinických údajů pacienta. Nejpoužívanějším kožním testem je prick test. Roztoky alergenů se aplikují na volární stranu předloktí a následně se provede vpich lancetou. Výsledky testu se odečítají po 20 minutách, hodnotí se zarudnutí a tkáňový otok. Vždy je nutné aplikovat negativní kontrolu (fyziologický roztok) a pozitivní kontrolu (histamin nebo kodein fosfát), pokud by v místě vpichu histaminu nedošlo k žádné reakci, nelze výsledky testů interpretovat a vyšetření se musí zopakovat. Obvykle je prováděna základní sada testů obsahující soubor nejběžnějších inhalačních alergenů, popřípadě je doplněna o další alergeny v závislosti na anamnéze pacienta (Krejsek, a další, 2004; Špičák, a další, 2004).

Základní testovací řadu tvoří pyly, roztoči domácího prachu, epitelie kočky a psa a vzdušné plísně. V diagnostice potravinové alergie lze použít metodu prick to prick, kdy se lanceta zapíchně do alergenu (například ovoce) a následně se s ní provede vpich do kůže (Petrů, 2012).

4.2 Laboratorní vyšetření

Standardním laboratorním vyšetřením při podezření na alergické onemocnění je stanovení hladiny celkových a specifických IgE protilátek v krevním séru nebo plazmě. Stanovení celkové hladiny IgE se používá jako screeningové vyšetření pro průkaz alergické senzibilizace, ale má malou výpovědní hodnotu. Alergický pacient může mít normální

hodnoty, naopak zdravý jedinec bez alergie může mít celkovou hladinu IgE zvýšenou z důvodu parazitární infekce, revmatoidní artritidy nebo kvůli nádorovému onemocnění.

Stanovení specifických IgE protilátek má vysokou využitelnost a provádí se u pacientů, u nichž kožní test alergii jednoznačně nepotvrdil nebo nemohl být z nějakého důvodu vůbec proveden. K testování se využívají komerčně dostupné sady obsahující stovky různých alergenů. U jednoho pacienta nelze vyšetřit celou paletu alergenů. Z tohoto důvodu se nejprve testuje pomocí sady, která obsahuje směs určité skupiny alergenů a při pozitivní reakci následuje roztestování s jednotlivými alergeny ze směsi. Specifické IgE protilátky se nejčastěji vyšetřují metodou ELISA a CAP-FEIA (Fluorescent Enzyme ImmunoAssay). Koncentrace hladiny IgE protilátek se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách IU/ml.

Při laboratorním vyšetření se také může provést test aktivace bazofilů po expozici alergenem, test uvolnění histaminu a tzv. CAST test (Cellular Allergen Stimulation Test). Tyto metody se v současné době z důvodu vysoké ceny a nároků na vybavení laboratoře využívají především pro výzkumné účely (Krejsek, a další, 2004; Špičák, a další, 2004).

4.3 Provokační testy

„Provokační testy jsou uměle simulovanou situací, v níž pacienta vystavíme podezřelému spouštěcímu podnětu, ať už specifickému, nebo nespecifickému, a jeho reakci odečítáme podle zvolené metody“ (Špičák, a další, 2004 str. 119). Provokačními testy lze vyšetřovat sliznice nosní, bronchiální, oční a gastrointestinální. Nejjednodušší metodou využívanou u profesionálních alergií je vyřazení nemocného z prostředí, které vyvolává příznaky nemoci, a sledování změny jeho klinického stavu při vyřazení a po následném návratu do původního prostředí. Od provokačních testů se v současné době ustupuje, jelikož při nich dochází k přímé expozici alergenu, pro pacienta představují větší riziko a jsou časově náročné, jelikož se vyšetřuje jen jeden alergen (Petrů, 2012; Špičák, a další, 2004).

5 Klinické projevy alergie

5.1 Asthma bronchiale

Prevalence astmatu stoupá, za posledních deset let se počet astmatiků zdvojnásobil.

Asthma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, na němž se podílí mnoho buněk, především lymfocyty Th2, žírné buňky a eozinofilní granulocyty. Astma zvyšuje reaktivitu dýchacích cest vůči různým podnětům, způsobuje reverzibilní bronchiální obstrukce, a pokud není léčeno, dojde k remodelaci stěny bronchů (Špičák, a další, 2004).

Průduškové astma se nejčastěji projevuje dušností, obtížným dýcháním, tlakem na hrudi, pískoty a kašlem. Typická je dušnost v noci a po tělesné námaze. Vliv na rozvoj astmatu má především časný a opakovaný kontakt novorozence s alergenem, mezi další faktory patří znečištěné životní prostředí, kouření matky v těhotenství a respirační virové infekce (Teřl, a další, 2008; Špičák, a další, 2004).

Pro potvrzení diagnózy astmatu je nutné provést alergologické testy, vyšetření funkce plic, rentgen hrudníku, popřípadě se odebere bronchoalveolární laváž a provede se biopsie bronchiální sliznice (Špičák, a další, 2004).

Správně indikovaná a včasná léčba vede u většiny pacientů ke stabilizování stavu a ke zlepšení prognózy astmatu. Při léčbě se klade důraz na spolupráci s pacientem, který si sám sleduje a vyhodnocuje symptomy a s ohledem na svůj aktuální stav si upravuje léčbu (Špičák, a další, 2004).

5.2 Atopická dermatitida (ekzém)

Atopický ekzém je velmi rozšířené kožní onemocnění projevující se již v prvních měsících života. Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění kůže. Typickým příznakem je zarudlá kůže, silné svědění a velmi suchá pokožka s tvorbou šupinek. Pacienti mají většinou velmi zvýšenou hladinu IgE protilátek jako reakci na patologické imunitní odpovědi při kontaktu s alergenem. Kůže nepřiměřeně reaguje na dráždivé podněty, kterými může být teplo, tření, sůl obsažená v potu nebo chemické látky.

Prevalence atopického ekzému v posledních letech roste. Důvodem může být zvýšená zátěž organismu znečištěným životním prostředím a domácími alergeny (především roztoči).

Onemocnění se vyskytuje rovnoměrně nezávisle na pohlaví. Předpokládá se polygenní dědičnost s autosomálně dominantní expresí nosného genu. Genetický podklad je neznámý (Špičák, a další, 2004; Bystroň, 1997). „*Prevalence onemocnění u dětí se zvyšuje na 81% v případě, že oba rodiče mají atopický ekzém. Pokud má jeden z rodičů atopický ekzém a druhý astma nebo sennou rýmu, má 59% dětí rovněž atopický ekzém. Pokud jen jeden z rodičů má atopický ekzém a druhý je bez respirační alergie, má 56% dětí atopický ekzém*“ (Špičák, a další, 2004 str. 240). Podle věkových období se ekzém dělí do tří fází, které se liší kožními projevy. Jedná se o kojeneckou (od 2 měsíců do 2 let věku), dětskou (2-12 let) a dospělou formu. Za hlavní příčinu atopického ekzému se považuje alergie na určité potraviny, v dětském věku převážně na kravské mléko.

Smyslem léčby atopické dermatitidy je úleva a snaha udržet onemocnění pod kontrolou, protože neexistuje žádný lék, který by ji vyléčil. Pokud je známa příčina obtíží, je nejsnazším způsobem omezit nebo úplně vyloučit kontakt pacienta s alergenem. Při nastoupení obtíží se musí pokožka neustále hydratovat, pro těžší případy lékaři předepisují kortikosteroidní preparáty a svědění lze snížit chladem nebo antihistaminiky se sedativním účinkem (Špičák, a další, 2004; Bystroň, 1997).

5.3 Kopřivka (urtikárie)

Kopřivka je kožní onemocnění, které se vyskytuje v jakémkoliv věku a projevuje se výsevem kopřivkových pupenů (pomfů) na kůži a intenzivním svěděním. Kopřivka je charakterizována vazodilatací a zvýšenou permeabilitou cév v kůži. Akutní urtikárie propukne náhle po setkání se spouštěcím alergenem a během několika hodin odezní. U chronické kopřivky trvají výsevy pupenů déle než 4 týdny.

Kopřivka může být alergického původu, ale i nealergické povahy. Mezi příčiny akutní kopřivky patří alergie na léky, bodnutí či kousnutí hmyzem, přecitlivělost na pyly, rostliny, roztoče domácího prachu nebo některé potraviny. (Špičák, a další, 2004; Orlová, 2002).

5.4 Orální alergický syndrom (OAS)

O orálním alergickým syndromem se hovoří v souvislosti s potravinovou alergií. Přítomnost tohoto syndromu nalezneme převážně u pacientů s přecitlivělostí na pylové alergeny, jedná

se totiž o alergii pylově asociovanou. Pokud pacient s orálním alergickým syndromem pozře potravinu rostlinného původu (nejčastěji ovoce, ořechy nebo luštěniny), dojde u něj k pálení a svědění dutiny ústní a jazyka, k otoku rtů a k poruše polykání. Vzácně může dojít k angioedému a anafylaktickému šoku. Patofyziologicky se jedná o zkříženou alergii, která je dána existencí podobných nebo stejných bílkovin (alergenů) obsažených zároveň v potravě i v pylovém zrně. Pacientem pozřená potravina musí být tedy botanicky spřízněná s rostlinou, na jejíž pyl je pacient alergický (Špičák, a další, 2004; Bystroň, 1997).

5.5 Anafylaktický šok

Anafylaktická reakce je z více než 50% způsobena protilátkami třídy IgE. Jedná se o náhlou, život ohrožující reakci. Nejtěžší formou anafylaxe je anafylaktický šok. Zhruba u 30% osob s anafylaktickým šokem se jedná o idiopatickou anafylaxi, kdy není známa příčina. Alergeny různého původu se naváží na Fc fragment na povrchu mastocyty, dojde k degranulaci mastocyty a začne se uvolňovat histamin, tryptáza a heparin. Anafylaxe vyvolaná imunitními komplexy způsobí deregulovanou aktivaci komplementového systému. K tomu nejčastěji dochází při intravenózní aplikaci imunologických preparátů nebo radiokontrastních látek. Degranulaci mastocytů mohou způsobit také některé léky, například antibiotika. Spouštěčů anafylaxe je velké množství, nejčastějšími zástupci jsou antibiotika, inzulin, parathormon, sérum proti hadímu jedu nebo tetanu, alergenové extrakty, potraviny, jedy, latex a mnoho dalších.

Anafylaxe se projevuje zvracením, průjmem, kašlem, srdeční arytmií, smrštěním hladkého svalstva a bronchokonstrikcí. Pokud dojde k anafylaktické reakci, je nutné u pacienta zajistit funkce kardiovaskulárního a dýchacího systému. Parenterálně je pacientovi podán adrenalin (Krejsek, a další, 2004)

Po stabilizaci stavu je pacient převezen do nemocnice na pozorování nebo k intenzivní péči na JIP. Anafylaxe má relativně dobrou prognózu, která je závislá na rychlosti a kvalitě první pomoci. (Petrů, 2006).

6 Zkřížené alergie (zkřížená reaktivita)

V souvislosti s alergií na potraviny se stále častěji hovoří o zkřížené reaktivitě.

Klíčovou roli při senzibilizaci hrají jen sekvence několika málo aminokyselin, které jsou označovány jako epitopy, a je proti nim namířena variabilní část IgE. Epitopy jsou zodpovědné za zkřížené alergie, protože mohou být společné pro druhově odlišné bílkoviny a označují se jako sdílené epitopy (Fuchs, 2008).

Pokud podobnost bílkovin ve složení epitopů přesáhne 50%, dojde ke zkřížené reaktivitě. Při homologii nad 80%, se hovoří o tzv. panalergenech, mezi které patří profiliny, polkalciny, lepek obilovin, lipid transfer proteiny ovoce a zeleniny, kasein nebo ořechové viciliny. Profiliny se nacházejí v rostlinách, příkladem může být alergen břízy Bet v 1 nebo profilin u slunečnice, hrušky, jablka, mrkve, arašídů a dalších. Profiliny jsou velmi citlivé na tepelnou denaturaci a na trávení v gastrointestinálním traktu, tudíž u pacientů senzibilizovaných na profiliny dojde k reakci obvykle pouze v dutině ústní. Velmi významná je zkřížená reaktivita mezi alergeny různého rostlinného původu. Například alergen jablka Mal d 1 je z 63% homologní s alergenem břízy Bet v 1, což znamená, že je zde vysoká pravděpodobnost zkřížené reakce (Hauser, a další, 2010; Fuchs, 2008; Krejsek, a další, 2004; Špičák, a další, 2004).

„Zkřížená alergie je tedy stav, kdy se specifická IgE protilátka svými vazebnými místy naváže na bílkovinu, která původně nevyvolala její produkci“ (Petrů, 2012 str. 416).

Z biologického pohledu jsou velmi významné molekuly rostlinných buněk. Velké množství pylových alergiků je senzibilizováno rostlinnými glykoproteiny, které byly popsány u hrušky, mrkve a celeru, ale také u měkkýšů, korýšů a hmyzu (Fuchs, 2003).

V našich zeměpisných podmínkách se nejčastěji jedná o zkříženou reaktivitu mezi ovocem či zeleninou a pylem stromu. Z důvodu velké rozšířenosti některých skupin alergenů si dané homologie zasloužily vlastní označení. Příkladem je syndrom bříza-ovoce-zelenina-ořechy, latex-fruit syndrom nebo homologie s LTP (Špičák, a další, 2004).

Více než polovina alergických osob na pyly břízy je také alergická na ovoce a zeleninu (jablko, hruška, broskev, švestka, třešeň, meruňka) a na oříšky, mandle, kokosový ořech a ořechy. Člověk, alergický na pelyněk, má v 50% i alergii na celer. Po dlouhodobém kontaktu s ptáky může vzniknout alergie na vejce. Dále je popsána zkřížená alergie na latex

vyskytující se u osob ve zdravotnictví. Latex nejčastěji zkříženě reaguje s avokádem a kiwi (Bidat, a další, 2005).

Pro diagnostické účely je nezbytná podrobná znalost struktury alergenů. Problémem může být určení alergenů v geneticky modifikovaných rostlinách. Příkladem může být rajče, ve kterém byl po genetické modifikaci nalezen alergen z arašídů Ara h. Pozření takto modifikovaného rajčete osobou přecitlivělou na Ara h by tedy mohlo mít až fatální následky. Je tedy nutné přesné označování genů vnesených do potravin při jejich modifikaci (Krejsek, a další, 2004).

Tabulka 1: Nejčastější příklady zkrřížené alergie

Tab. 2: Nejčastější příklady zkrřížené alergie	
Pyly	Potraviny
břiza	jablko, hruška, třešeň, broskev, nektarinka, meruňka, švestka a kiwi lískový ořech (ale i ostatní stromové ořechy i mandle) a maliny celer, mrkev , petržel, koření (nejčastěji směs - např. curry), rajské j. brambory (syrové), sója, ale i jedlé kaštany, med – pylová kontaminace vzácně banán, mango, pomeranč a arašíd
trávy	rajské jablíčko , brambory, lilek a paprika (resp. vše z čeledi lilkovité) pšenice i jiné cereálie , rýže, hrášek a sója pažitka, cibule, arašíd, meloun, pomeranč, kiwi, vzácně i jiné ovoce, vermuty
pelyněk	celer, mrkev, petržel , pastinák, koření (především čeleď mířkovité : fenykl, kmín, kopr, anýz, libeček, kerblík, bedrník, koriandr, andělka, ale může jít i o jiné čeledi - estragon, bazalka, majoránka, dobromysl - oregáno, paprika a pochopitelně směsná koření - např. až 35 druhů v curry) slunečnice – semínka i olej, heřmánek – odvar k p.o. užití, ale pozor i na obklady kiwi, mango, hrášek, rajské jablíčko, stromové ořechy i arašíd méně ovoce (peckovice i malvice), vermuty, med – pylová kontaminace
ambrosia	meloun, vodní meloun, banán , okurka, cuketa, jablko, hruška, celer a latex
platan	lískový ořech, broskev, jablko, kiwi, meloun, lískový ořech, kukuřice, hlávkový salát, některé luštěniny (zelené fazole a hrášek) – nejspíše přes LTP tento typ zkrřížené alergie je typický pro jižní státy Evropy
oliva	oliva a olivovníkovité (jasan, ptačí zob a šeřík) broskev, hruška, kiwi, meloun, stromové ořechy (Španělsko, Itálie, Řecko)
latex (kaučukovník)	banán, kiwi, avokádo, fíky, mango, meloun , jedlé kaštany, méně brambory, rajské j., hrozinky, stromové ořechy, pohanka, ale i meruňky a broskve
sója (luštěniny)	arašíd čočka , hrách, fazole, boby, lupina, cizrna, ricina aj. potravinářská aditiva luštěninového původu: - karubin (nosná látka u „AR-antirefluxních“ mléčných dietetik): E 410 - guar, traganť a arabi gummy: E 412, E 413, E 414
další zkrřížené alergie - bez pylové asociace	
roztoci (a šváby)	korýši (krab, humr, langusta, kreveta, rak mořský i říční), měkkýši (chobotnice, sépie, škeble, mušle včetně ústřic) a suchozemští hlemýžďi, pozn: jde o panalergen tropomyozin
ryby	veškeré ryby sladkovodní i mořské, jde o panalergen parvalbumin
kočkovité šelmy (kočka)	vepřové maso
kravské mléko	mléka kozí, ovčí , buvolí, bizoní a kobyli (nejméně velbloudí) pozor na hovězí a telecí maso (zkrřížená alergie v 5-10%)
vajíčko	v 5-10% zkrřížená alergie s drůbežím masem (přes alfa-livetin)

Zdroj: (Fuchs, 2008 str. 32)

7 Pseudoalergie (falešné alergie)

Jako pseudoalergie se označuje časná reakce organismu, která klinicky napodobuje alergickou reakci, ale není zprostředkována IgE protilátkami (Špičák, a další, 2004).

Falešnou alergii vyvolávají potraviny obsahující velké množství histaminu nebo tyraminu, který se během trávení uvolňuje a vyvolává stejné příznaky jako alergie.

Je nutné odlišit pseudoalergii od potravinové alergie pomocí alergologických testů. Mezi jídla bohatá na histamin patří vejce, uzeniny, rajčata, ryby, jahody nebo čokoláda a požití velkého množství může vyvolat kopřivku. Pokud je projevem ekzém, je nutné si po dobu jednoho týdne vést tzv. „potravinový vyšetřovací protokol“, podle kterého alergolog určí alergen vyvolávající obtíže. U pseudoalergie stačí omezit potraviny bohaté na histamin, v případě potravinové alergie je nutné dietní opatření (Bidat, a další, 2005).

8 Léčba alergických onemocnění

Léčba alergického onemocnění by měla být komplexní a měla by zahrnovat eliminaci alergenu, léčbu alergického zánětu, imunoterapii a pomocnou léčbu.

8.1 Eliminace alergenu

Pokud je znám alergen vyvolávající obtíže, je nejsnazším léčebným i preventivním opatřením jeho vyloučení z pacientova okolí. Snadná je eliminace potravinových alergenů a léků, problém nastává u eliminace vzdušných alergenů (pylů, plísňí, roztočů) a při alergii na bodnutí hmyzu. Zde je nutné alespoň co nejvíce omezit styk pacienta s alergenem, například pylový alergik se nebude na jaře procházet po rozkvetlé louce a podobně. Pokud není odhalen alergen způsobující obtíže, je vhodné provést obecné úpravy v bytě nemocného. Jedná se především o odstranění kvetoucích rostlin, koberců, ve kterých se udržuje prach, snížení vlhkosti v bytě a také se doporučuje nechovat domácí zvířata.

Pokud se podaří úplná eliminace alergenu, pacient nepotřebuje žádnou další léčbu (Špičák, a další, 2004; Orlová, 2002).

8.2 Farmakoterapie

Léčba alergického zánětu probíhá farmakoterapií. Základními skupinami léků jsou antihistaminika, anticholinergika, antileukotrieny, kortikosteroidy, kromony, metylxantiny a sympatomimetika.

Antihistaminika 1. generace mají sedativní účinek, antihistaminika 2. a 3. generace mají sedativní účinek nižší. Antihistaminika blokují receptory pro histamin, kortikosteroidy působí protizánětlivě, kromony stabilizují membrány žírných buněk. Těžké projevy alergií se léčí imunosupresivními a protizánětlivými látkami (Špičák, a další, 2004).

8.3 Alergenová imunoterapie

Alergenová imunoterapie spočívá v podávání postupně se zvyšujících dávek alergenu až k dávce udržovací. Ta se poté aplikuje opakovaně v určitém časovém rozmezí a zajišťuje, že při opakované expozici alergenem se u pacienta zmírní nebo dokonce zmizí obtíže. Cílem alergenové imunoterapie je snížit závažnost onemocnění, zlepšit kvalitu života pacienta a omezit podávání léků (Špičák, a další, 2004).

8.4 Pomocná léčba

Do podpůrné léčby patří léky, které se u alergií používají ke zmírnění příznaků. Patří sem masti a pudry při kožních projevech, léky usnadňující odkašlávání nebo tlumící dráždivý kašel a nosní nebo oční kapky. Pomocná léčba zahrnuje také úpravu životního stylu, změnu jídelníčku a pobyt v lázních (Bystroň, 1997).

PRAKTICKÁ ČÁST

9 Cíl práce

V praktické části bakalářské práce byl popsán imunoglobulin E a princip stanovení specifických IgE na pevné fázi.

Cílem praktické části bylo potvrzení, nebo vyvrácení předem stanovených výzkumných otázek a vytvoření senzibilizačního profilu u vybraného souboru pacientů FN Plzeň. U těchto osob bylo vyšetřeno 112 alergenových komponentů metodou ImmunoCAP ISAC od firmy Phadia.

Získané výsledky byly dále zpracovány a vyfiltrovali se z nich takoví pacienti, kteří jsou primárně senzibilizováni na následující alergeny:

- Bříza Bet v 4, Bet v 2
- Pelyněk Art v 3
- Bažanka Mer a 1
- Olivovník Ole e 7
- Bojínek Phl p 7, Phl p 12

Následně se u každého z pacientů stanovil druhý nejčastěji se vyskytující alergen, který může způsobovat zkříženou reaktivitu s alergenem hlavním. Vše se přehledně zpracovalo do grafů podle senzibilizačního profilu pacientů s přecitlivělostí na zvolené alergeny.

10 Metodika práce

Soubor pro praktickou část bakalářské práce tvořili pacienti vyšetření v průběhu čtyř let na alergologické ambulanci FN Plzeň. Metodou ImmunoCAP ISAC bylo vyšetřeno celkem 1856 pacientů. U každého z nich se stanovilo specifické IgE současně proti 112 alergenovým komponentům. Vyšetření se prováděla z krevního séra, které bylo po odběru ihned zamrazeno na teplotu -20°C a v den vyšetření znovu rozmrazeno.

Naměřené výsledky byly zpracovány pomocí softwaru Phadia MIA, převedeny na ISAC standardizované jednotky (ISU) a porovnány s referenčními hodnotami. Za zvýšenou hodnotu bylo považováno specifické IgE vyšší než 0,3 ISU.

Praktická část práce je zaměřena na senzibilizaci pacientů k sedmi konkrétním alergenům, které jsou uvedeny v tabulce níže. V tabulce jsou uvedeny vybrané alergeny, jejich latinský

název, rostlina, jejíž pyl daný alergen obsahuje, a druh panalergenu, který způsobuje zkříženou reaktivitu.

Tabulka 2: Sledované alergeny

Alergen	Latinský název alergenu	Pyl	Panalergen
Art v 3	Artemisia vulgaris	Pelyněk	Lipid transfer protein
Bet v 2	Betula verrucosa	Bříza	Profilin
Bet v 4	Betula verrucosa	Bříza	Polkalcin
Mer a 1	Mercurialis annua	Bažanka	Profilin
Ole e 7	Olea europaea	Olivovník	Lipid transfer protein
Phl p 7	Phleum pratense	Bojínek	Polkalcin
Phl p 12	Phleum pratense	Bojínek	Profilin

Zdroj: vlastní výzkum

11 Výzkumné otázky

- 1) Zda u profilinu Phl p 12 pochází senzibilizace od:
 - a. pylů trav (specifické složky Phl p 1 / Phl p 5)
 - b. pylu břízy (specifická složky Bet v 1).
- 2) Zda u profilinu Bet v 2 pochází senzibilizace od:
 - a. pylů trav (specifické složky Phl p 1 / Phl p 5)
 - b. pylu břízy (specifická složky Bet v 1).
- 3) Zda u polkalcinu Phl p 7 pochází senzibilizace od:
 - a. pylů trav (specifické složky Phl p 1 / Phl p 5)
 - b. pylu břízy (specifická složky Bet v 1, Bet v 2).
- 4) Zda u polkalcinu Bet v 4 pochází senzibilizace od:
 - a. pylů trav (specifické složky Phl p 1 / Phl p 5)
 - b. pylu břízy (specifická složky Bet v 1, Bet v 2).
- 5) Zda u lipid transfer proteinu Art v 3 pochází senzibilizace od:
 - a. pylů trav (specifické složky Phl p 1 / Phl p 5)
 - b. pylu břízy (specifická složky Bet v 1, Bet v 2)
 - c. od panalergenů potravin.
- 6) Zda u lipid transfer proteinu Ole e 7 pochází senzibilizace od:

- a. pylů trav (specifické složky Phl p 1 / Phl p 5)
 - b. pylu břízy (specifická složky Bet v 1, Bet v 2).
- 7) Zda u profiline Mer a 1 pochází senzibilizace od:
- a. pylů trav (specifické složky Phl p 1 / Phl p 5)
 - b. pylu břízy (specifická složky Bet v 1, Bet v 2).

12 Stanovení specifických IgE na pevné fázi

Jednou z metod používaných pro stanovení specifických IgE protilátek a zkříženě reagujících alergenů v Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň je metoda ImmunoCAP ISAC. Tato metoda se využívá k sestavení senzibilizačního profilu pacienta.

12.1 ImmunoCAP ISAC® (Immuno Solid-phase Allergen Chip)

ImmunoCAP ISAC je semikvantitativní in vitro diagnostika pro měření alergen specifických IgE protilátek v lidském séru nebo plazmě. Alergeny jsou navázány na pevné části microarray destičky, po přidání vzorku pacienta dojde k reakci a vytvoření komplexu alergen-protilátka. Každý čip obsahuje čtyři reagenční pole pro stanovení čtyř různých pacientů a v každém reagenčním poli je navázáno 112 alergenů. Reakce se zvýrazňuje fluorescencí, která se následně měří na speciálním MIA analyzátoru za vlnové délky 532nm (Phadia, 2015).

12.1.1 Reagencie

Všechny potřebné reagencie pro metodu ImmunoCAP ISAC se dodávají v setu firmou Phadia. Obsah tohoto setu vystačí na 20 vyšetření.

Set obsahuje:

- 5 čipů, na každém z nich se nachází 4 reakční pole
- Anti-IgE protilátku značenou fluorescenčně
- Specifickou IgE kontrolu

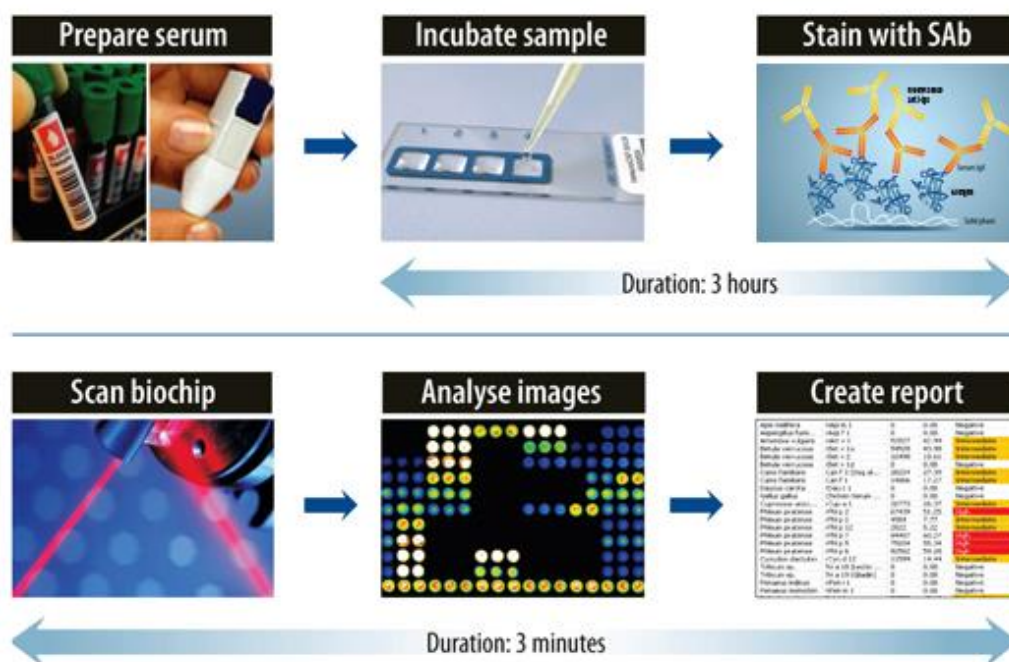
Všechny reagencie jsou připraveny k přímému použití. Musí se skladovat v lednici a před měřením je nutné nechat je vytemperovat na pokojovou teplotu. Set obsahuje reagencie vyrobené z lidských krevních derivátů. Tyto deriváty byly testovány na nepřítomnost

protilátky proti HIV1, HIV2 a lidské žloutence typu B a C, ale je důležité s nimi stále zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem.

Pro vyhodnocení testu ImmunoCAP ISAC musí být laboratoř vybavena laserovým scannerem a ke stanovení se využívá software Phadia Microarray Image Analysis (MIA) (Phadia, 2015).

12.1.2 Postup

Obrázek 3: Postup ImmunoCAP ISAC



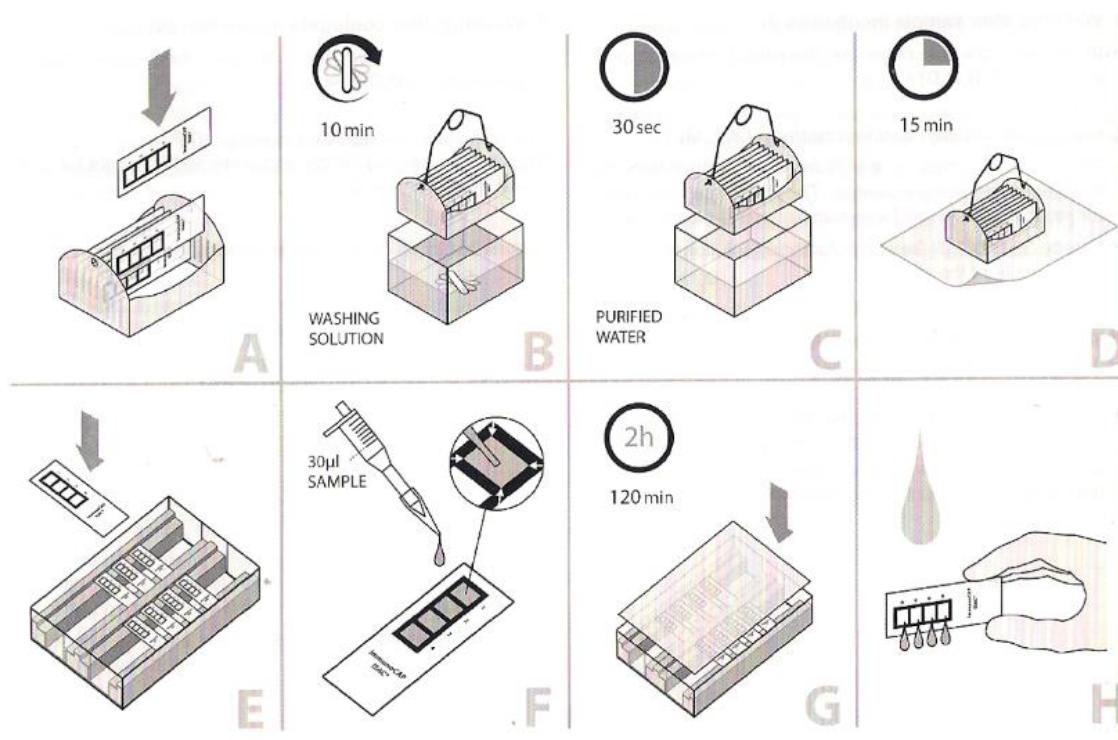
Zdroj:

http://www.phadia.com/Global/A%20Shared%20files%20and%20images/Test%20principles/Test%20Principle%20ISAC/TestPrinciple_IC_ISAC_2.png

K vyšetření pomocí ImmunoCAP ISAC se používají vzorky venózní (popřípadě kapilární) krve nabrané do zkumavky s antikoagulačním činidlem heparinem. K vyšetření se používá sérum nebo plazma. Vzorky krve mohou být uchovány v lednici při 2-8°C po dobu jednoho týdne. Při delším skladování je výrobcem doporučeno vzorky zmrazit na teplotu -20°C a před měřením je rozmrazit a nechat vytemperovat na pokojovou teplotu. Celé vyšetření senzibilizace pacienta pomocí ImmunoCAP ISAC trvá necelé 4 hodiny.

Specifická IgE kontrola obsažená v setu se měří jako klasický patientský vzorek a je nutné ji stanovit buď při použití nové šarže setu, nebo jednou měsíčně (Phadia, 2015).

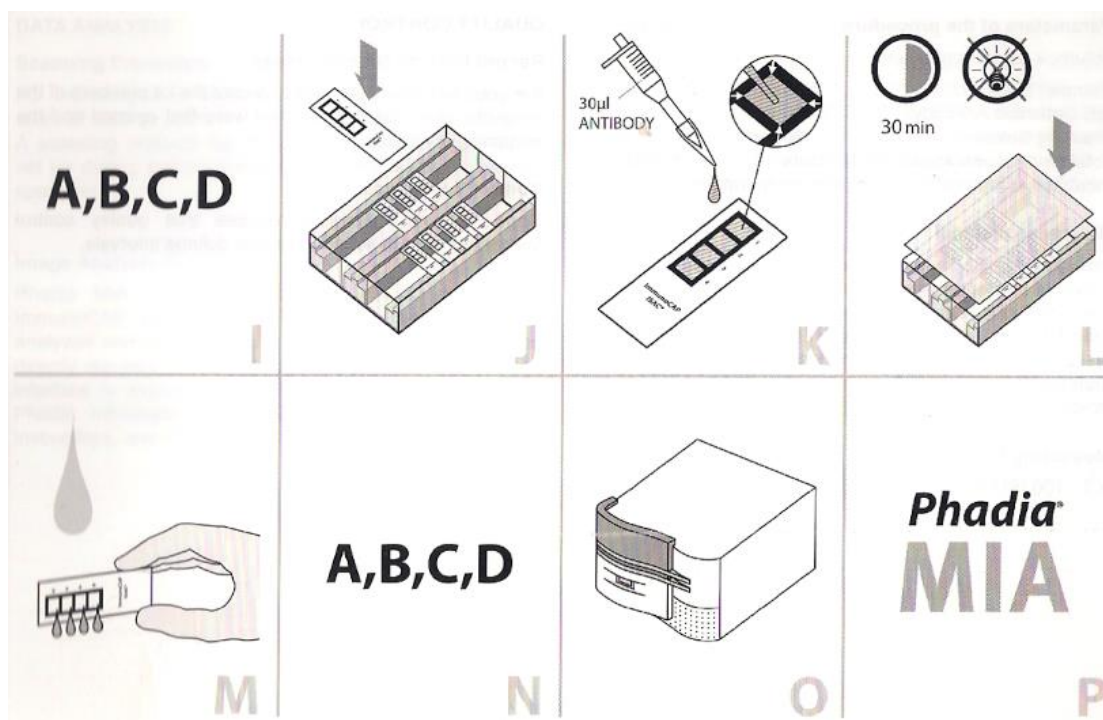
Obrázek 4: ImmunoCAP ISAC postup-1. část



Zdroj: (Phadia, 2015)

- 1) Pacientské vzorky si očísľujeme a danými čísly si označíme jednotlivá reagenční pole na čípech. Čipy poté umístíme do stojánku (racku) na sklíčka a vložíme je do nádoby naplněné promývacím roztokem (washing solution) na 10 minut. (A, B)
- 2) Rack vyjmeme a vložíme na 30 sekund do nádoby s destilovanou vodou. Poté necháme sklíčka zhruba 15 minut schnout. Je nutné počkat, až budou čipy úplně suché. V laboratoři ÚIA FN Plzeň se k urychlení procesu sušení používá speciální centrifuga Cytospin 4. (C, D)
- 3) Čipy umístíme do vlhké komůrky reakčními místy nahoru. Do každého reakčního pole nakapeme 30µl pacientského vzorku. Špičkou z pipety vzorek lehce rozetřeme tak, aby bylo celé reakční pole rovnoměrně pokryté vrstvou vzorku. (E, F)
- 4) Vlhkou komůrku zavřeme a čipy inkubujeme 120 minut při pokojové teplotě. (G)
- 5) Opatrně vyjmeme čipy z vlhké komůrky tak, aby nedošlo ke smíchání vzorků. Uchopíme je za dlouhou boční stranu a necháme je promývat pod proudem destilované vody 5-10 sekund. (H)

Obrázek 5: ImmunoCAP ISAC postup 2. část



Zdroj: (Phadia, 2015)

- 6) Zopakujeme kroky A, B, C, D.
- 7) Po promytí a usušení umístíme čipy znovu do vlhké komůrky. Do každého reakčního pole napipetujeme 30 µl fluoresceinem značené protilátky proti lidskému IgE dodávané výrobcem. Vlhkou komůrku zavěsíme, zakryjeme hliníkovou folií, abychom zabránili přístupu světla, a inkubujeme 30 minut. (J, K, L)
- 8) Po uplynutí stanovené inkubační doby čipy vyjmeme a promyjeme pod tekoucí destilovanou vodou. Dbáme neustále na to, aby nedošlo ke smíchání vzorků. (M)
- 9) Znovu zopakujeme kroky A, B, C, D.
- 10) Nyní je možné jednotlivé čipy prohlížet pomocí speciálního laserového scanneru.
- 11) Scanner vyhodnotí fluorescence na všech 112 bodech, které tvoří alergeny zanesené v reakčním poli čipu. Výstupem je laboratorní protokol.
- 12) Výsledky jsou vydávány ve standardizovaných jednotkách ISU (ISAC standardized units) a jsou rozděleny do čtyř skupin (Phadia, 2015).

Tabulka 3: Hodnocení výsledků ImmunoCAP ISAC sIgE 112

Rozsah ImmunoCAP ISAC sIgE 112 (hladina protilátek IgE)	Odpovídající hodnota ISU-E
0 (nedetekovatelné nebo velmi nízké)	$< 0,3$
1 (nízké)	$\geq 0,3 < 1$
2 (mírně zvýšené)	$\geq 1 < 15$
3 (velmi zvýšené)	≥ 15

Zdroj: (Phadia, 2015)

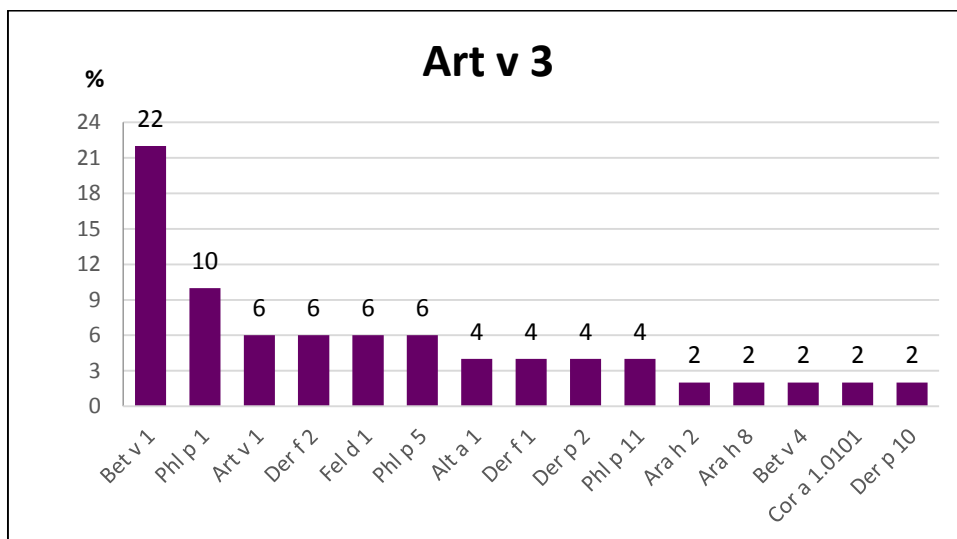
12.2 Vlastní stanovení

Naměřené hodnoty všech 1856 pacientů byly převedeny do tabulky, ze které byli vyfiltrováni pacienti s primární senzibilizací ke sledovaným alergenům Art v 3, Bet v 2 a Bet v 4, Mer a 1, Ole e 7, Phl p 7 a Phl p 12. Podle těchto alergenů byla data rozdělena do sedmi souborů a v každém z nich byl stanoven druhý nejhojnější alergen, který zkříženě reaguje s hlavním alergenem. Výsledky byly zpracovány do následujících grafů podle jednotlivých senzibilizačních profilů u pacientů s pozitivitou ke sledovanému alergenů.

12.2.1 Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Art v 3

Na pyl pelyňku (Art v 3) bylo z celkového počtu 1856 alergiků senzibilizováno 50 osob. Panalergenem pelyňku je lipid transfer protein.

Graf 1: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Art v 3



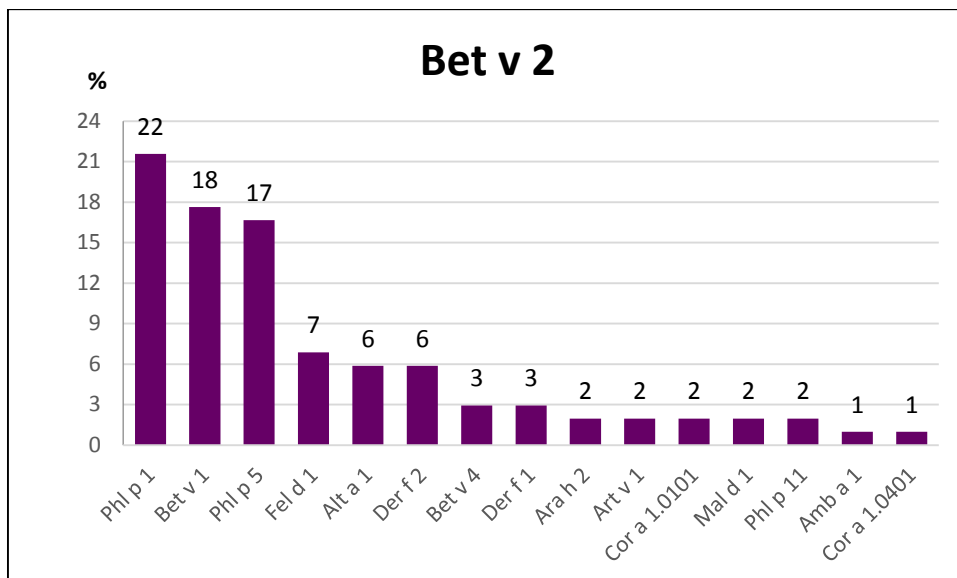
Zdroj: vlastní výzkum

Z těchto 50 senzibilizovaných jedinců bylo nejvíce senzibilizováno ještě pylem břízy (Bet v 1), druhý v pořadí je pyl bojínku Phl p 1. Dále se zde vyskytuje senzibilizace na další alergeny pelyňku. 3 pacienti (6%) vykazují pozitivní reakci s alergenem roztoče Dermatophagoides farinae Der f 2 a dalších 6% s alergenem kočky domácí Fel d 1.

12.2.2 Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Bet v 2

Bříza Bet v 2 byla pozitivní u 102 pacientů. Bet v 2 panalergen patří mezi profiliny.

Graf 2: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Bet v 2



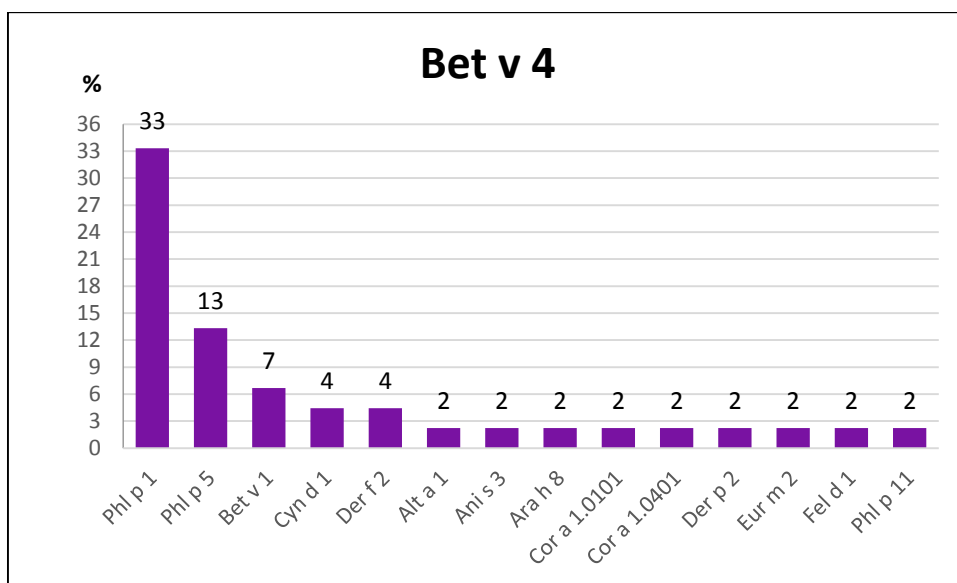
Zdroj: vlastní výzkum

Kosenzibilizaci s pylem břízy vykazuje bojínek Phl p 1 (22%), pyl břízy z další pylové skupiny Bet v 1 (18%) a další pyl bojínku Phl p 5 (17%). Dalších 7% pacientů bylo senzibilizovaných alergenem kočky domácí Fel d 1 a 6% prokazovalo reaktivitu s alergenem vřeckovýtusné houby *Alternaria alternata* (Alt a 1) nebo s roztočem Der f 2.

12.2.3 Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Bet v 4

Bet v 4 je dalším panalergenem břízy a patří mezi polkalciny. Senzibilizační profil s pozitivitou Bet v 4 tvoří 45 pacientů.

Graf 3: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Bet v 4



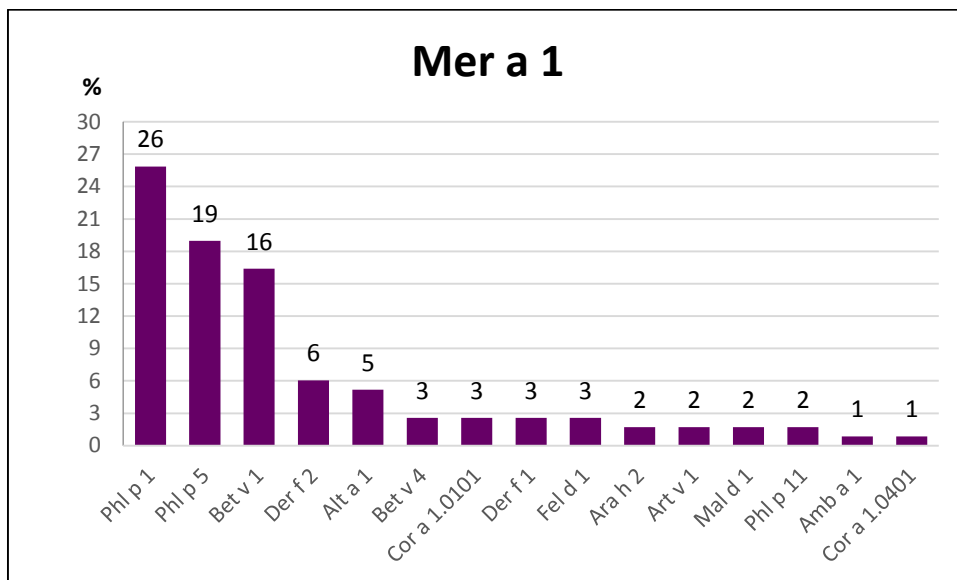
Zdroj: vlastní výzkum

Nejhojněji se zde vyskytuje senzibilizace na pyl bojínku Phl p 1 (33%), Phl p 5 (13%) a na pyl břízy Bet v 1 (7%). Na rod trav troskut (Cyn d 1) a na roztoče Der f 2 reaguje 6% sledovaných osob. Dále se zde vyskytuje přecitlivělost na alergen houby Alternaria (Alt a 1), na parazitického červa Anisakis simplex (Ani s 3), arašíd (Ara h 8), na pyl lísky a lískového ořechu (Cor a 1.0101, Cor a 1.0401) a další.

12.2.4 Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Mer a 1

Pylem bažanky (Mer a 1) bylo senzibilizováno 116 vyšetřovaných pacientů.

Graf 4: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Mer a 1



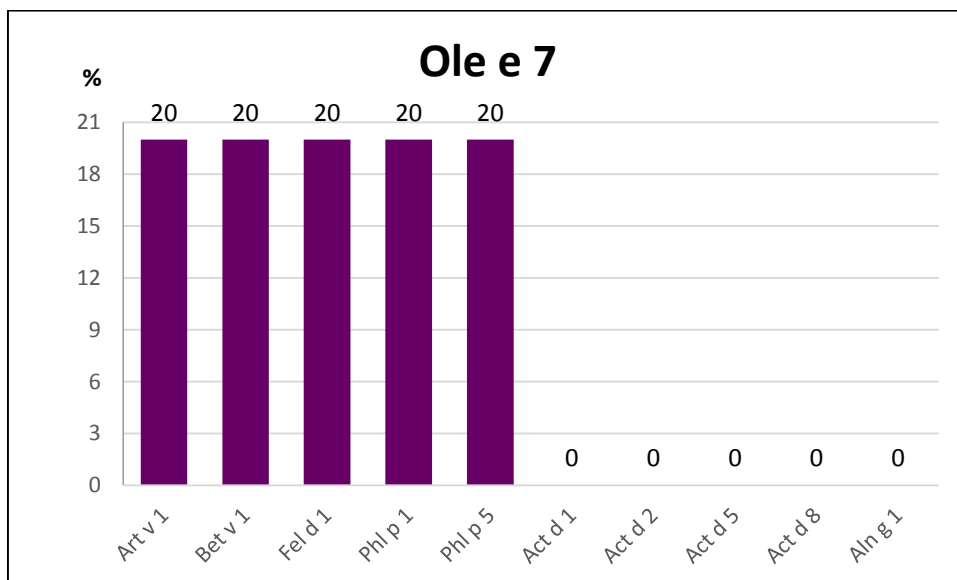
Zdroj: vlastní výzkum

Pacienti senzibilizovaní pylem bažnatky byli nejčastěji senzibilizováni ještě pylem bojínku. Na Phl p 1 reaguje 26% pacientů, na Phl p 5 reaguje 19%. Dále se zde vyskytuje reakce na alergen břízy (Bet v 1), na roztoče Der f 2, na vřeckovýtrusnou houbu Alternaria (Alt a 1), na lísku (Cor a 1.0101) nebo na kočku domácí (Fel d 1).

12.2.5 Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Ole e 7

Pacientů vykazujících senzibilizace k alergenu olivovníku bylo velmi málo, konkrétně pouze 5.

Graf 5: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Ole e 7



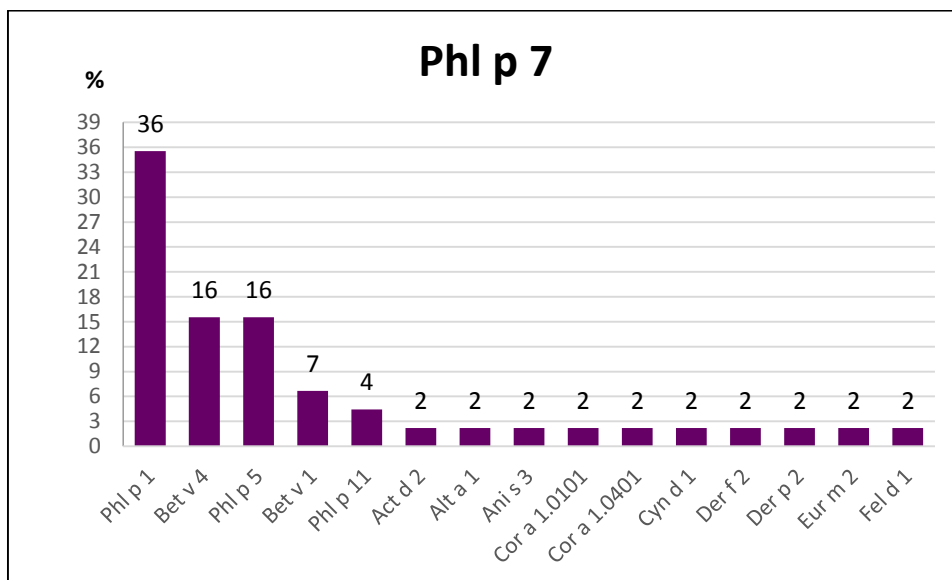
Zdroj: vlastní výzkum

Vzhledem k nízkému počtu primárních senzibilizací k Ole e 7 nemá graf kvalitní vypovídací hodnotu. Na alergen pelyňku (Art v 1), břízy (Bet v 1), kočky domácí (Fel d 1) a na bojíněk (Phl p 1 a Phl p 5) reagoval vždy pouze jeden pacient.

12.2.6 Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Phl p 7

Bojínek obsahuje panalergen polkalcin Phl p 7. Specifické IgE protilátky proti Phl p 7 jsou pozitivní u 45 pacientů.

Graf 6: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Phl p 7



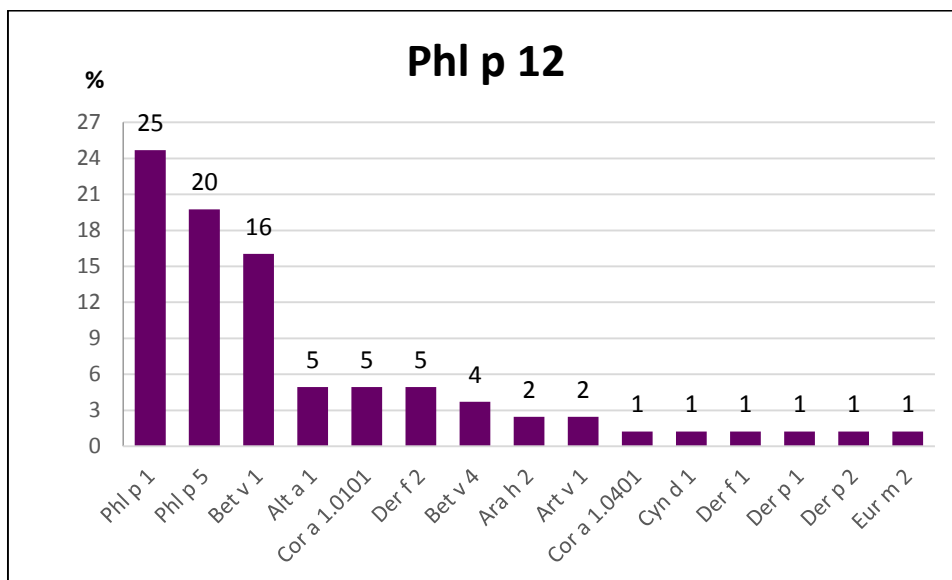
Zdroj: vlastní výzkum

Podle předpokladů byla senzibilizace na Phl p 7 nejčastěji spojena se senzibilizací na Phl p 1 (36 %) a Phl p 5 (16 %). Dalších 16% osob reagovalo na pyl břízy Bet v 1. Pacienti byli dále senzibilizováni na kiwi (Act d 2), na houbu Alternaria (Alt a 1), na parazita Anisakis simplex (Ani s 3), na lísku a lískový ořech a další alergeny.

12.2.7 Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Phl p 12

Posledním zkoumaným panalergenem pylu bojínku byl profilin Phl p 12, na který bylo senzibilizováno 81 vyšetřovaných pacientů.

Graf 7: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Phl p 12



Zdroj: vlastní výzkum

Dalo se předpokládat, že největší reaktivitu k Phl p 12 budou vykazovat další molekuly pylu bojínku. Zde se konkrétně jedná o Phl p 1, na který reaguje 25% pacientů, a Phl p 5 u 20% pacientů. Dalších 16% je senzibilizovaných pylem břízy (Bet v 1). Na plíseň *Alternaria* (Alt a 1), na lísku (Cor a 1.0101) a na roztoče (Der f 2) reagovalo vždy 5% pacientů.

13 Diskuze

Předmětem výzkumu v praktické části bylo vytvoření senzibilizačního profilu pacientů s primární senzibilizací k sedmi vybraným pylovým alergenům. Konkrétně se jednalo o profily Bet v 2, Mer a 1 a Phl p 12, polkalciny Bet v 4 a Phl p 7 a lipid transfer proteiny Art v 3 a Ole e 7.

Retrospektivně bylo analyzováno 1856 pacientů vyšetřených metodou ImmunoCAP ISAC v letech 2010 až 2014. Data byla dále zpracována a z konečných výsledků byly sestaveny grafy, díky kterým budou zodpovězeny stanovené výzkumné otázky (dále jen „VO“).

VO1: Zda u profilinu Phl p 12 pochází senzibilizace od pylů trav, nebo od pylu břízy.

K vyhodnocení první výzkumné otázky jsem použila graf číslo 7. Z tohoto grafu vyplývá, že zde nedochází ke zkřížené reaktivitě mezi profilinem Phl p 12 a pylem břízy. Nejhojněji jsou zde zastoupeny pyly bojínku druhové rodiny Phl p 1 a Phl p 5 (celkem 45%). Alergen břízy Bet v 1, který by způsoboval zkříženou reaktivitu s profilinem Phl p 12 se vyskytuje pouze u 16% pacientů.

U profilinu Phl p 12 tedy pochází senzibilizace od dalších pylů trav a nejedná se o zkříženou reaktivitu.

VO2: Zda u profilinu Bet v 2 pochází senzibilizace od pylů trav, nebo od pylu břízy.

Podle grafu číslo 2 lze usuzovat, že profilin Bet v 2 zkříženě reaguje s pyly trav. Pozitivní reakci na pyl trávy Phl p 1 mělo 22% jedinců a na Phl p 5 reagovalo 17%. Jedná se tedy o větší množství pacientů senzibilizovaných na pyly trav než na pyl břízy Bet v 1. Dochází zde také k relativně vysoké senzibilizaci s alergenem kočky domácí Fel d 1 (7%) a s vřeckovýtrusnou houbou *Alternaria alternata* Alt a 1 (6%).

Profilin Bet v 2 zkříženě reaguje s pyly trav Phl p 1 i Phl p 5.

VO3: Zda u polkalcinu Phl p 7 pochází senzibilizace od pylů trav, nebo od pylu břízy.

Z grafu číslo 6 vyplývá, že u polkalcinu Phl p 7 jednoznačně dochází k senzibilizaci dalšími pyly trav. Na alergen Phl p 1 reagovalo 36% pacientů, na Phl p 5 16%. Dalších 23% pacientů reagovalo na pyly břízy. Jen malé množství pacientů reagovalo na jiné alergeny než na bojínek a břízu.

U pylu bojínku Phl p 7 tedy pochází senzibilizace od dalších pylů trav a nejedná se o zkříženou alergii.

VO4: Zda u polkalcinu Bet v 4 pochází senzibilizace od pylů trav, nebo od pylu břízy.

Pacientů primárně senzibilizovaných na polkalcin břízy Bet v 4 bylo 45 a jejich senzibilizační profil je vyhodnocen v grafu číslo 3. Z něj jednoznačně vyplývá, že téměř polovina vyšetřovaných pacientů (46%) reagovala na pyly trav Phl p 1 a Phl p 5.

Jedná se tedy o zkříženou reaktivitu mezi polkalcinem břízy a specifickými složkami pylů trav.

VO5: Zda u lipid transfer proteinu Art v 3 pochází senzibilizace od pylů trav, od pylu břízy, nebo od panalergenů potravin.

U lipid transfer proteinu Art v 3 se předpokládalo, že primární senzibilizace nepochází od pylů trav. V úvahu přicházely spíše lipid transfer proteiny obsažené v potravinách. Tyto panalergeny se nacházejí například v broskvi Pru p 3, arašídů Ara h 9 nebo lískovém oříšku Cor a 8.

Provedený výzkum zaznamenaný v grafu č. 1 ovšem tuto domněnku vyvrátil. 22% vyšetřovaných pacientů reagovalo na alergen pylu břízy Bet v 1 a 10% na alergen trávy Phl p 1. V grafu se kromě různých druhů pylů vyskytoval pouze arašíd u 4% vyšetřovaných osob a lískový oříšek u 2% pacientů.

Lipid transfer protein pylu Art v 3 zkříženě reaguje s pyly břízy a trav.

VO6: Zda u lipid transfer proteinu Ole e 7 pochází senzibilizace od pylů trav, nebo od pylu břízy.

Ole e 7 je hlavní alergen pylu olivovníku, který způsobuje senzibilizaci v zeměpisných oblastech, kde je vysoká expozice k těmto pylům. Osoby, které se do kontaktu s pylem olivovníku si proti nim protilátky téměř netvoří. Důvodem senzibilizace na Ole e 7 by mohl být například delší nebo často opakovaný pobyt v přímořských oblastech.

Pro stanovení lipid transfer proteinu u alergenu olivovníku Ole e 7 bylo k dispozici pouze 5 patientských vzorků. Vzhledem k nízkému počtu vyšetření tedy graf nemá žádnou vypovídací hodnotu.

U olivovníku Ole e 7 se nedá určit, zda senzibilizace pochází od pylů trav, nebo od pylu břízy.

VO7: Zda u profilinu Mer a 1 pochází senzibilizace od pylů trav, nebo od pylu břízy.

Po vyhodnocení grafu číslo 4 lze potvrdit, že profilin bažanky Mer a 1 zkříženě reaguje s pyly trav Phl p 1 a Phl p 5.

Při vynechání pacientů senzibilizovaných na jakýkoliv pyl trávy nebo břízy a sestavení nového vyhodnocovacího grafu by vyšla zkřížená reaktivita na latex a na potraviny – například lísku a lískový oříšek, arašíd, jablko nebo broskev. Vzhledem k relativně nízkému počtu vyšetřovaných pacientů na pozitivitu Mer a 1 (116 osob) ale nelze jednoznačně stanovit, že za zkříženou reaktivitou by mohl stát nějaký potravinový alergen. K takovému tvrzení by bylo nutné zvětšit množství vyšetřovaných pacientů a výsledky ověřit.

V praktické části práce se podařilo ověřit původce primární senzibilizace u pacientů s pozitivní reakcí vůči pylu bojínku (Phl) a pylu břízy (Bet). Z výsledků vyplývá, že primárně senzibilizující složkou u profilinů a polkalcinů jsou právě tyto pyly. Při analýze jsme pozorovali velké množství pacientů, kteří byli senzibilizováni jak na pyl břízy, tak na pyly bojínku.

Závěr

Bakalářská práce se zaměřuje na zkřížené alergie a na stanovení specifických protilátek IgE na pevné fázi, které jsou využívány při diagnostice alergických onemocnění.

Teoretická část se zaměřuje na vysvětlení problematiky alergie, jsou zde stručně popsány druhy alergenů a fáze alergické reakce. Následující kapitola je věnována diagnostice alergických onemocnění, zmíněny jsou kožní prick testy, vyšetření krevních vzorků v laboratoři a provokační testy, při kterých je pacient vystaven působení alergenu, a sledují se obranné reakce organismu. Dále jsou zde popsány klinické projevy alergie a jsou zde nastíněny možnosti léčby alergických onemocnění.

Vzhledem k tématu práce se v teoretické části nachází kapitola věnovaná pouze zkříženým alergiím, kde je popsán mechanismus vzniku a nachází se zde také tabulka, která uvádí nejčastější příklady zkřížených alergií.

Praktická část práce byla zaměřena na vytvoření senzibilizačního profilu pacientů vyšetřovaných na alergologické ambulanci FN Plzeň. Po retrospektivním zpracování naměřených dat bylo možné odpovědět na zadané výzkumné otázky. Ve všech případech bylo potvrzeno, že původcem primární senzibilizace pacientů je pyl bojínku nebo břízy. Ve čtyřech případech ze sedmi byla potvrzena zkřížená reaktivita mezi těmito pyly. Velké množství vyšetřovaných pacientů bylo ko-senzibilizováno jak na pyl trav, tak na pyl břízy.

Stanovení specifických IgE u pacientů s podezřením na zkříženou reaktivitu se začalo používat teprve nedávno. K vyšetření byla použita jedna komerčně dostupná technologie microarray, která sice obsahuje velké množství vyšetřovaných alergenů, ale může mít různou specifitu a senzitivitu na různé molekuly.

Stanovení frekvence senzibilizací na pylové skupiny může být důležité při zvažování specifické alergenové imunoterapie a při výrobě alergenových extraktů užívaných pro léčbu pacientů.

Použitá literatura

AMBRUSOVÁ, Zuzana. *Rekombinantní alergeny.* Alergie. 2011, 1, stránky 50-53. ISSN 1212-3536.

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a PAULÍK, Milan. *Vyšetřovací metody v imunologii.* Praha : Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

BIDAT, Étienne a LOIGEROT, Christelle. *Alergie u dětí.* [překl.] Edita Paulasová. Praha : Portál, 2005. ISBN 80-7178-936-4.

BYSTRONĚ, Jaromír. *Alergie : Průvodce alergickými nemocemi pro lékaře i pacienty.* Ostrava : MIRAGO, 1997. ISBN 80-85922-46-0.

FUCHS, Martin. *Potravinová alergie.* Practicus: odborný časopis praktických lékařů. 2008, 6, stránky 30-34. ISSN 1213-8711.

FUCHS, Martin. *Panalergeny- bílkoviny přenášející tuky.* Alergie, Astma, Bronchitida. 2005, 1, stránky 24-26. ISSN 1212-3544.

FUCHS, Martin. *Panalergeny – Druhý břízový alergen (PROFILIN) a jeho homologie (podobnosti).* Alergie, Astma, Bronchitida. 2004, 4, stránky 20-23. ISSN 1212-3544.

FUCHS, Martin. *Potravinové alergeny - zkřížená alergie.* Alergie. 2003, 2. ISSN 1212-3536.

HAUSER, Michael, a další. *Panallergens and their impact on the allergic patient.* Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology. 2010, 1. DOI: 10.1186/1710-1492-6-1.

HENZL, Michael T., TAN, Anmin a REED, Mark A. *Heightened stability of polycalcin Phl p 7 is correlated with strategic placement of apolar residues.* Biophysical Chemistry. 2011, 159, stránky 110-119. ISSN 0301-4622.

HOŘEJŠÍ, Václav a BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie.* Praha : TRITON, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.

KREJSEK, Jan a KOPECKÝ, Otakar. *Klinická imunologie.* Hradec Králové : Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-x.

LITZMAN, Jiří, KUKLÍNEK, Pavel a RYBNÍČEK, Ondřej. *Alergologie a klinická imunologie*. Brno : Vydavatelství IDVPZ, 2001. ISBN 80-7013-345-7.

LOCHMAN, Ivo, KLOUDOVÁ, Alena a NOVÁK, Vítězslav. *Stanovení specifického IgE - volba metody*. *Alergie*. 2003, 1. ISSN 1212-3536.

ORLOVÁ, Kateřina, [překl.]. *Alergie : [problémy s imunitou, příznaky, léčba / z anglického originálu ... přeložila Kateřina Orlová]*. Havlíčkův Brod : Fragment, 2002. ISBN 80-7200-610-x.

PANZNER, Petr, a další. *Analýza senzibilizačních profilů pylových alergiků z oblastí západních Čech*. *Alergie*. 2014, 4, stránky 215-224. ISSN 1212-3536.

PETRŮ, Vít a KRČMOVÁ, Irena. *Anafylaktická reakce*. Farmakoterapie pro praxi. Praha : Maxdorf, 2006. ISBN 80-7345-099-2.

PETRŮ, Vít. *Dětská alergologie*. Praha : Mladá fronta, 2012. ISBN 978-80-204-2584-3.

PHADIA. *ImmunoCAP ISAC: ImmunoCAP ISAC sIgE 112*. Uppsala, Sweden : Thermo scientific, 2015.

RADAUER, C., a další. *Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis*. *Clinical and experimental allergy*. 2006, Sv. 36, 7, stránky 920-929. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2006.02521.x.

ŠPIČÁK, Václav a PANZNER, Petr. *Alergologie*. Praha : Karolinum, 2004. ISBN 80-7262-265-x.

TEŘL, Milan a RYBNÍČEK, Ondřej. *Asthma bronchiale v příčinách a klinických obrazech*. Cheb : Geum, 2008. ISBN 978-80-86256-59-7.

ÚSTAV KLINICKÉ IMUNOLOGIE A ALERGOLOGIE. *Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii*. Hradec Králové : Garamon, 2004. ISBN 80-86472-17-5.

ZAVÁZAL, Vladimír. *Abeceda pro alergiky a pro třetinu naší populace*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2000. ISBN 80-7184-724-0.

Seznam zkratek

CAP-FEIA - Fluorescent Enzyme ImmunoAssay

CAST test - Cellular Allergen Stimulation Test

cDNA - komplementární deoxyribonukleové kyseliny

CRD - component-resolved diagnosis

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ELISA - enzyme-linked immuno sorbent assay

Fc ϵ RI - receptor pro Fc fragment protilátky

IgE - imunoglobulin E

IL - interleukin

ISU - ISAC standardizované jednotky

JIP - jednotka intenzivní péče

kDa - kilodalton

LTP - lipid transfer protein

MIA - Microarray Image Analysis

mRNA - messengerová ribonukleová kyselina

PCR - Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

sIgE - specifický imunoglobulin E

Th0 - podskupina T-lymfocytů, která se dosud nesetkala s antigenem

Th2 - podskupina T-lymfocytů 2. podtřídy

VO - výzkumná otázka

WHO/IUIS - World Health Organization/International union of immunological societies,
světová zdravotnická organizace/mezinárodní unie imunologických společností

Seznam tabulek

Tabulka 1: Nejčastější příklady zkřížené alergie.....	31
Tabulka 2: Sledované alergeny	36
Tabulka 3: Hodnocení výsledků ImmunoCAP ISAC sIgE 112	41

Seznam grafů

Graf 1: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Art v 3	42
Graf 2: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Bet v 2	43
Graf 3: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Bet v 4	44
Graf 4: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Mer a 1	45
Graf 5: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Ole e 7	46
Graf 6: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Phl p 7	47
Graf 7: Senzibilizační profil u pacientů s pozitivitou Phl p 12	48

Seznam obrázků

Obrázek 1: Časná a pozdní fáze alergické reakce	22
Obrázek 2: Struktura IgE.....	23
Obrázek 3: Postup ImmunoCAP ISAC	38
Obrázek 4: ImmunoCAP ISAC postup-1. část.....	39
Obrázek 5: ImmunoCAP ISAC postup 2. část	40

Seznam příloh

Příloha 1: Seznam alergenových komponent	60
--	----

Přílohy

Příloha 1: Seznam alergenových komponent

Name	Info	Function	Isoform	Organism
Act d 1	Kiwi	Cysteine protease	Act d 1	Actinidia deliciosa
Act d 2	Kiwi	Thaumatococin-like protein	Act d 2	Actinidia deliciosa
Act d 5	Kiwi	Kiwelin	Act d 5	Actinidia deliciosa
Act d 8	Kiwi	PR-10 protein	Act d 8	Actinidia deliciosa
Aln g 1	Alder	PR-10 protein	Aln g 1.0101	Alnus glutinosa
Alt a 1	Alternaria	Acidic glycoprotein	Alt a 1.0101	Alternaria alternata
Alt a 6	Alternaria	Enolase	Alt a 6.0101	Alternaria alternata
Amb a 1	Ambrózie	Pectate lyase	Amb a 1	Ambrosia artemisiifolia
Ana c 2	Bromelain	CCD marker	Ana c 2	Ananas comosus
Ana o 2	Kešu	Storage protein, 11S globulin	Ana o 2.0101	Anacardium occidentale
Ani s 1	Anisakis	Serine protease inhibitor	Ani s 1.0101	Anisakis simplex
Ani s 3	Anisakis	Tropomyosin	Ani s 3.0101	Anisakis simplex
Api g 1	Celer	PR-10 protein	Api g 1.0101	Apium graveolens
Api m 1	Jed včely	Phospholipase A2	Api m 1	Apis mellifera
Api m 4	Jed včely	Melittin	Api m 4	Apis mellifera
Ara h 1	Arašíd	Storage protein, 7S globulin	Ara h 1	Arachis hypogaea
Ara h 2	Arašíd	Storage protein, Conglutin	Ara h 2	Arachis hypogaea
Ara h 3	Arašíd	Storage protein, 11S globulin	Ara h 3	Arachis hypogaea
Ara h 8	Arašíd	PR-10 protein	Ara h 8.0101	Arachis hypogaea
Art v 1	Pelyněk	Defensin	Art v 1	Artemisia vulgaris
Art v 3	Pelyněk	Lipid transfer protein (nsLTP)	Art v 3	Artemisia vulgaris
Asp f 1	Aspergillus	Mitogillin family	Asp f 1.0101	Aspergillus fumigatus
Asp f 2	Aspergillus	Fibrinogen Binding Protein	Asp f 2.0101	Aspergillus fumigatus
Asp f 3	Aspergillus	Peroxisomal protein	Asp f 3.0101	Aspergillus fumigatus
Asp f 4	Aspergillus	Unknown	Asp f 4.0101	Aspergillus fumigatus
Asp f 6	Aspergillus	Mn superoxide dismutase	Asp f 6.0101	Aspergillus fumigatus
Ber e 1	Para ořech	Storage protein, 2S albumin	Ber e 1.0101	Bertholletia excelsa
Bet v 1	Bříza	PR-10 protein	Bet v 1.0101	Betula verrucosa

Bet v 2	Bříza	Profilin	Bet v 2.0101	Betula verrucosa
Bet v 4	Bříza	Polcalcin	Bet v 4.0101	Betula verrucosa
Bla g 1	Rus domácí	Cockroach group 1	Bla g 1.0101	Blattella germanica
Bla g 2	Rus domácí	Aspartic protease	Bla g 2.0101	Blattella germanica
Bla g 4	Rus domácí	Calycin	Bla g 4.0101	Blattella germanica
Bla g 5	Rus domácí	Glutathione S-transferase	Bla g 5.0101	Blattella germanica
Bla g 7	Rus domácí	Tropomyosin	Bla g 7	Blattella germanica
Bos d 4	Kravské mléko	Alpha-lactalbumin	Bos d 4	Bos domesticus
Bos d 5	Kravské mléko	Beta-lactoglobulin	Bos d 5	Bos domesticus
Bos d 6	Kravské mléko/maso	Serum albumin	Bos d 6	Bos domesticus
Bos d 8	Kravské mléko	Casein	Bos d 8	Bos domesticus
Bos d lactoferrin	Kravské mléko	Transferrin	Bos d lactoferrin	Bos domesticus
Can f 1	Pes	Lipocalin	Can f 1.0101	Canis familiaris
Can f 2	Pes	Lipocalin	Can f 2.0101	Canis familiaris
Can f 3	Pes	Serum albumin	Can f 3	Canis familiaris
Cla h 8	Cladosporium	Mannitol dehydrogenase	Cla h 8.0101	Cladosporium herbarum
Cor a 1.0101	Pyl lísky	PR-10 protein	Cor a 1.0101	Corylus avellana
Cor a 1.0401	Lískový ořech	PR-10 protein	Cor a 1.0401	Corylus avellana
Cor a 8	Lískový ořech	Lipid transfer protein (nsLTP)	Cor a 8.0101	Corylus avellana
Cor a 9	Lískový ořech	Storage protein, 11S globulin	Cor a 9	Corylus avellana
Cry j 1	Kryptomerie	Pectate lyase	Cry j 1	Cryptomeria japonica
Cup a 1	Cypřiš	Pectate lyase	Cup a 1	Cupressus arizonica
Cyn d 1	Troskut	Grass group 1	Cyn d 1	Cynodon dactylon
Cyp c 1	Kapr	Parvalbumin	Cyp c 1.0101	Cyprinus carpio
Dau c 1	Mrkev	PR-10 protein	Dau c 1.0101	Daucus carota
Der f 1	D. farinae (HDM)	Cysteine protease	Der f 1	Dermatophagoides farinae
Der f 2	D. farinae (HDM)	NPC2 family	Der f 2.0101	Dermatophagoides farinae
Der p 1	D. pteronyssinus (HDM)	Cysteine protease	Der p 1	Dermatophagoides pteronyssinus
Der p 10	D. pteronyssinus (HDM)	Tropomyosin	Der p 10.0101	Dermatophagoides pteronyssinus
Der p 2	D. pteronyssinus (HDM)	NPC2 family	Der p 2	Dermatophagoides pteronyssinus
Equ c 3	Kůň	Serum albumin	Equ c 3	Equus caballus
Eur m 2	Euroglyphus maynei (HDM)	NPC2 family	Eur m 2.0101	Euroglyphus maynei

Fel d 1	Kočka	Uteroglobin	Fel d 1.0101	Felis domesticus
Fel d 2	Kočka	Serum albumin	Fel d 2	Felis domesticus
Fel d 4	Kočka	Lipocalin	Fel d 4.0101	Felis domesticus
Gad c 1	Treska	Parvalbumin	Gad c 1.0101	Gadus callarias
Gal d 1	Vaječný bílek	Ovomucoid	Gal d 1	Gallus domesticus
Gal d 2	Vaječný bílek	Ovalbumin	Gal d 2	Gallus domesticus
Gal d 3	Vaječný bílek	Conalbumin/Ovotransferrin	Gal d 3	Gallus domesticus
Gal d 5	Žloutek/kuřecí maso	Livetin/Serum albumin	Gal d 5	Gallus domesticus
Gly m 4	Sója	PR-10 protein	Gly m 4.0101	Glycine max
Gly m 5	Sója	Storage protein, Beta-conglycinin	Gly m 5	Glycine max
Gly m 6	Sója	Storage protein, Glycinin	Gly m 6	Glycine max
Hev b 1	Latex	Rubber elongation factor	Hev b 1.0101	Hevea brasiliensis
Hev b 3	Latex	Small rubber particle protein	Hev b 3.0101	Hevea brasiliensis
Hev b 5	Latex	Acidic protein	Hev b 5.0101	Hevea brasiliensis
Hev b 6	Latex	Prohevein	Hev b 6.01	Hevea brasiliensis
Hev b 8	Latex	Profilin	Hev b 8.0204	Hevea brasiliensis
Mal d 1	Jablko	PR-10 protein	Mal d 1.0108	Malus domestica
Mer a 1	Bažanka	Profilin	Mer a 1.0101	Mercurialis annua
Mus m 1	Myš	Lipocalin	Mus m 1	Mus musculus
Ole e 1	Pyl olivovníku	Common olive group 5	Ole e 1	Olea europaea
Ole e 2	Pyl olivovníku	Profilin	Ole e 2	Olea europaea
Par j 2	Drnavec	Lipid transfer protein (nsLTP)	Par j 2.0101	Parietaria judaica
Pen a 1	Kreveta	Tropomyosin	Pen a 1.0101	Penaeus aztecus
Pen i 1	Kreveta	Tropomyosin	Pen i 1	Penaeus indicus
Pen m 1	Kreveta	Tropomyosin	Pen m 1	Penaeus monodon
Phl p 1	Bojíněk	Grass group 1	Phl p 1.0101	Phleum pratense
Phl p 11	Bojíněk	Ole e 1-related protein	Phl p 11.0101	Phleum pratense
Phl p 12	Bojíněk	Profilin	Phl p 12.0101	Phleum pratense
Phl p 2	Bojíněk	Grass group 2	Phl p 2.0101	Phleum pratense
Phl p 4	Bojíněk	Berberine bridge enzyme	Phl p 4	Phleum pratense
Phl p 5	Bojíněk	Grass group 5	Phl p 5.0101	Phleum pratense
Phl p 6	Bojíněk	Grass group 6	Phl p 6.0101	Phleum pratense
Phl p 7	Bojíněk	Polcalcin	Phl p 7.0101	Phleum pratense

Pla a 1	Platan	Putative invertase inhibitor	Pla a 1.0101	Platanus acerifolia
Pla a 2	Platan	Polygalacturonase	Pla a 2	Platanus acerifolia
Pru p 1	Broskev	PR-10 protein	Pru p 1.0101	Prunus persica
Pru p 3	Broskev	Lipid transfer protein (nsLTP)	Pru p 3	Prunus persica
Sal k 1	Slanobýl	Pectin methylesterase	Sal k 1	Salsola kali
Ses i 1	Sezam	Storage protein, 2S albumin	Ses i 1	Sesamum indicum
Tri a 18	Pšenice	Agglutinin isolectin 1	Tri a 18	Triticum aestivum
Tri a Gliadin	Pšenice	Crude gliadin	Tri a Gliadin	Triticum aestivum
Tri a 19.0101	Pšenice	Omega-5 gliadin	Tri a 19.0101	Triticum aestivum
Tri a aA_TI	Pšenice	Alpha-amylase / Trypsin inhibitor	Tri a aA_TI	Triticum aestivum
Ara h 6	Arašíd	Storage protein, 2S albumin	Ara h 6	Arachis hypogaea
Ara h 9	Arašíd	Lipid transfer protein (nsLTP)	Ara h 9.0101	Arachis hypogaea
Blo t 5	B. tropicalis (HDM)	Mite group 5	Blo t 5.0101	Blomia tropicalis
Can f 5	Pes	Arginine Esterase	Can f 5.0101	Canis familiaris
Che a 1	Merlík	Ole e 1-related protein	Che a 1.0101	Chenopodium album
Equ c 1	Kůň	Lipocalin	Equ c 1.0101	Equus caballus
Fag e 2	Pohanka	Storage protein, 2S albumin	Fag e 2	Fagopyrum esculentum
Jug r 1	Vlašský ořech	Storage protein, 2S albumin	Jug r 1	Juglans regia
Jug r 2	Vlašský ořech	Storage protein, 7S globulin	Jug r 2	Juglans regia
Jug r 3	Vlašský ořech	Lipid transfer protein (nsLTP)	Jug r 3	Juglans regia
Lep d 2	L. destructor (storage mite)	NPC2 family	Lep d 2.0101	Lepidoglyphus destructor
MUXF3	CCD	CCD	N/A	N/A
Ole e 7	Pyl olivovníku	Lipid transfer protein (nsLTP)	Ole e 7	Olea europea
Ole e 9	Pyl olivovníku	Beta-1,3-glucanase	Ole e 9.0101	Olea europea
Pen m 2	Kreveta	Arginine kinase	Pen m 2	Penaeus monodon
Pen m 4	Kreveta	Sarcoplasmic calcium binding protein	Pen m 4	Penaeus monodon
Pla a 3	Platan	Lipid transfer protein (nsLTP)	Pla a 3.0101	Platanus acerifolia
Pla l 1	Jitrocel	Ole e 1-related protein	Pla l 1.0101	Plantago lanceolata
Pol d 5	Vosík	Antigen 5	Pol d 5.0101	Polistes dominulus
Tri a 14	Pšenice	Lipid transfer protein (nsLTP)	N/A	Triticum aestivum
Ves v 5	Vosa	Antigen 5	Ves v 5.0101	Vespula vulgaris

Phl p 5	Bojinek	Grass group 5	Phl p 5.0204	Phleum pratense
Hev b 6.01	Latex	Prohevein	Hev b 6.01	Hevea brasiliensis