

Možnosti laboratorní diagnostiky alergie

MUDr. Stanislava Honzová
Imunologické centrum, Imumed s.r.o., Praha

Laboratorní vyšetření, která používáme k průkazu alergie, jsou založena na stanovení specifických IgE protilátek u atopických pacientů. V průběhu posledních let byly vyvinuty nové laboratorní postupy.

Klíčová slova: diagnostika alergie, alergen specifické IgE, test aktivace bazofilů, rekombinantní alergen.

Laboratory tests in allergy diagnosis

In vitro diagnosis of type I allergy is based on the detection, and quantification of allergen-specific IgE antibodies in serum of atopic patients. New laboratory methods were introduced during past years.

Key words: allergy diagnosis, allergen specific IgE, basophil activation test, recombinant allergens.

Interní Med. 2009; 11(4): 168–170

Úvod

Laboratorní diagnostika alergie, tj. testy in vitro, je nedílnou součástí vyšetření alergického pacienta. Je potřebné si ale uvědomit, že laboratorní vyšetření nemohou nahradit vyšetření klinické. Základem vyšetření alergického pacienta zůstává podrobná anamnéza, klinické vyšetření a testy s alergeny, kožní prick testy. Laboratorní vyšetření u alergických onemocnění jsou indikována zejména u onemocnění a stavů spojených s tvorbou IgE protilátek, tj. s alergickou reakcí prvního typu. Běžně dostupné laboratorní testy nejsou schopny zachytit a prokázat alergické stavy, které jsou způsobeny jinými mechanismy (alergická reakce II., III., IV. typu dle Gella a Coombse).

Stanovení koncentrace specifických IgE protilátek

Průkaz a stanovení specifických IgE protilátek v séru patří mezi klasická alergologická laboratorní vyšetření. Hodnota specifických IgE protilátek je udávána buď semikvantitativně v tzv. RAST třídách, nebo kvantitativně v IU/ml (tabulka 1). Všechny u nás dostupné postupy vycházejí ze základního principu ELISA testu (1). Liší se možností automatizace, způsobem navázání antigenu (alergenu) či detekce. Problémem je obtížná standardizace stanovení specifických IgE protilátek. Všechny testy by měly mít CE certifikaci a všechny laboratoře vyšetřující specifické IgE by měly být kontrolovány v systémech externí kontroly kvality (EQA). Přesto jsou výsledky získané různými postupy nebo různými diagnostickými soupravami obtížně srovnatelné. Na tuto skutečnost je nutno pamatovat při hodnocení a srovnávání nálezů z různých laboratoří.

Vyšetření specifických IgE protilátek je **indikováno** zejména (2, 3):

- u pacientů, kde je kontraindikace kožních prick testů (např. vysoké riziko anafylaxe na susp. alergen)
- u pacientů, kdy nelze vysadit léky, které interferují s kožními testy (antihistaminika, kortikoidy, některá antidepresiva apod.)
- u pacientů s rozsáhlým kožním onemocněním
- u velmi malých dětí, nespolutracujících pacientů, u gravidních patientek
- při diskrepanci mezi anamnézou a výsledkem kožních prick testů
- pro potvrzení relevantního alergenu v souvislosti s alergenovou imunoterapií
- v případech, kdy neexistují vhodné alergen pro kožní prick testy.

Vyšetření specifických IgE protilátek má stále svá omezení, na které musíme myslet při **interpretaci** tohoto vyšetření (3):

- Vyšetření je přínosné pouze tam, kde lze předpokládat alergickou reakci prvního typu (tj. zprostředkovanou IgE). U pacientů s onemocněními, kde hlavní roli v patogenezi hrají jiné mechanismy než IgE (kon-

taktní ekzém, některé typy potravinové alergie), je nevhodné. U těchto pacientů je indikováno vyšetření např. pomocí kožních epikutánních (tzv. patch) testů.

- Negativní specifické IgE na určitý lék nevylučuje významnou alergickou reakci na tento lék. Velká část polékových reakcí není zprostředkována IgE, ale i v případě IgE zprostředkované lékové alergie (např. penicilin) nemusí dostupné laboratorní testy prokázat reakci na některé minoritní alergen.
- Vyšetření není schopno prokázat alergickou reakci na labilní alergen zejména potravinové (některé alergen ovoce a zeleniny). U těchto pacientů je nutno použít kožní prick testy s čerstvými potravinami.
- Až 15 % pacientů alergických na latex může mít negativní nález při vyšetření specifických IgE. U těchto pacientů je na zvážení indikace vyšetření pomocí rekombinantních alergenů a pomocí buněčných technik.
- Bezprostředně po těžké alergické, anafylaktické reakci existuje několikátýdenní období, ve kterém není možno specifické IgE protilátky v krvi prokázat. Vyšetření je vhodné o několik týdnů odložit.

Tabulka 1. Vztah hodnoty specifického IgE v kU/l a RAST třídy

Specifické IgE v kU/l	Třída pozitivita	Hodnota specifických IgE protilátek
< 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

■ Velmi vysoké hodnoty celkového IgE v séru mohou zapříčinit falešně pozitivní výsledky při vyšetření specifických IgE. Tento jev souvisí s nespecifickou vazbou IgE v testu. S tímto jevem se můžeme častěji setkat při vyšetření na potravinové alergen.

Vyšetření specif. IgE jako screening atopie

Screeningové testy bývají využívány pro zjištění časně sensibilizace, k průkazu atopie zejména u malých dětí (4). Tato vyšetření bývají indikována u pacientů s atopickým ekzémem, s podezřením na potravinovou alergii, ale i alergi na inhalační alergen (5, 6).

Využití směsi alergenů v jednom stanovení je sice ekonomické, ale přináší řadu problémů, které jsou spojeny se snížením senzitivity, ale i specifity vyšetření. Při interpretaci výsledků existuje zejména riziko falešně negativního nálezu. V případě positivity se skupinovými alergen následuje konkrétní roztestování s jednotlivými alergen ve směsi.

Ke screeningu lze využít vyšetření specifických IgE pomocí **multiplexových metod**. Multiplexové metody dovolují stanovit několik analytů v jednom reakčním objemu. Výhodou oproti klasickým laboratorním postupům je, že nepotřebují screeningové vyšetření. Výhoda multiplexu je tím větší, čím více alergenů je ve screeningu zahrnuto. Budoucnost patří **microarray systémům**, které mohou zachytit z jedné kapky materiálu (např. séra) specifické IgE protilátky proti desítkám až stovkám alergenů (7). Význam tohoto způsobu detekce specifických IgE protilátek ukáže až budoucnost. Jejich nevýhodou je zatím vysoká cena vyšetření. Základním a dosud nevyřešeným problémem těchto široce screeningových testů zůstává jejich neschopnost odlišit klinicky významné protilátky od klinicky nevýznamných, které jsou pouze známkou senzibilizace, či jsou detekovány laboratorním vyšetřením jako důsledek zkřížené reakce na příbuzné alergen.

Buněčné testy

Vyšetření specifických IgE zachycuje pouze cirkulující IgE protilátky. Většina IgE protilátek je navázána ve tkáních, na žírných buňkách a bazofilech, proto vznikly v posledních letech techniky, jejichž cílem je přiblížit se více situacím, které se odehrávají v průběhu alergického onemocnění. Mezi tato vyšetření patří testy, které detekují pochody spojené s aktivací bazofilů periferní krve a uvolnění mediátorů alergické reakce.

Bazofily jsou buňky, které váží IgE protilátky na svém povrchu prostřednictvím vysokoafinitního receptoru pro IgE. V případě IgE zprostředkované alergické reakce dochází na membráně bazofilů k přemostění sousedních molekul specifických IgE alergenem. Tento pochod indukuje splynutí cytoplazmatických granul s plazmatickou membránou s následným uvolněním mediátorů alergické reakce. Tento děj je označován termínem degranulace bazofilů. Principem laboratorních buněčných testů je specifická stimulace krevních bazofilů alergenem a následné hodnocení pochodů spojených s jejich aktivací a degranulací (8, 9).

Testy, které detekují aktivaci bazofilů, jsou založeny buď na analýze mediátorů, které tyto buňky uvolňují do svého okolí, nebo na sledování membránových znaků charakterizujících aktivované bazofily s využitím průtokové cytometrie. Z uvolněných mediátorů byl sledován histamin (test uvolnění histaminu) a sulfidoleukotrieny, tzv. **CAST ELISA** (cellular alergen stimulation test). Nevýhodou testů, které měří uvolnění histaminu či leukotrienů buňkami do okolního prostředí, je nutnost izolace buněk na hustotním gradientu. Tento postup může způsobit nespecifickou stimulaci bazofilů a tím zkreslit výsledek vyšetření. Pokud jsou tyto testy prováděny s plnou krví, pak nevýhodou je, že se neměří uvolněné mediátory pouze z bazofilů, ale i z dalších buněk (např. monocytů, eozinofilů). Většina těchto testů je určena zatím pro výzkumné účely. Pro klinickou praxi je nejvíce údajů o využití CAST ELISA testu k průkazu lékové alergie.

Druhým postupem je hodnocení aktivizačních znaků na bazofilech pomocí průtokové cytometrie. Jedná se o různé modifikace tzv. **testu aktivace bazofilů (BAT)** (8, 10).

Toto vyšetření je založeno na sledování znaků, které se objevují po inkubaci bazofilů s alergenem. Tyto znaky jsou značeny monoklonálními protilátkami a jsou detekovány pomocí průtokového cytometru. Nejčastěji sledovanými znaky na bazofilech jsou CD63 a CD203c. Výsledkem vyšetření je procento aktivovaných bazofilů nebo výsledek vyjádřený pomocí stimulačního indexu (tabulka 2) (10). Vyšetření lze provádět z plné krve, není tedy náročné na množství odebraného materiálu, jako protisrážlivé činidlo je používán heparin. Přestože tento test má ještě řadu nevyřešených problémů, existuje řada modifikací vyšetření, které se postupně dostávají do klinické praxe (9).

BAT patří mezi vysoce specializovaná vyšetření, která hledají své postavení v klinické diagnostice. Na základě dosud publikovaných

srovnávacích studií lze konstatovat, že metoda BAT má vyšší senzitivitu než široce užívané vyšetření specifických IgE i poměrně vysokou specifitu (11). V diagnostice alergie se může uplatnit zejména v situacích, kdy klinické vyšetření (kožní testy) a základní laboratorní vyšetření (stanovení alergen specifického IgE) jsou pro stanovení diagnózy nedostatečné. Velmi nadějně se jeví tyto testy při diagnostických nejasnostech u alergie na hmyzí jedy (12), u lékové alergie a alergie na latex (13). Jsou popsána využití těchto testů u senzibilizace a alergie na roztoče, pyly i potraviny (9, 14, 15). Při vyšetření BAT lze použít i rekombinantní alergen např. k odhalení polysenzibilizace a k objasnění zkřížených reakcí.

Vyšetření pomocí rekombinantních alergenů

V klasických diagnostických testech alergie (stanovení specifického IgE, ale i u buněčných technik) jsou používány **alergenové extrakty**. Alergenové extrakty jsou připravovány z různých biologických materiálů, např. z pylových zrn, travin, zvířecích srstí apod. Alergenové extrakty je proto obtížné standardizovat. Tyto extrakty obsahují mimo vlastních alergenů řadu dalších látek, které mohou být příčinou nižší senzitivity i specifity testu.

Na rozdíl od alergenových extraktů jsou alergen připravené rekombinantními technikami přesně definované, je u nich zaručena standardizace. **Rekombinantní alergen** se začaly v posledních letech více využívat v oblasti klinického výzkumu a postupně se dostávají i do klinické praxe zejména v oblasti diagnostiky alergických onemocnění (16).

Označení takto připravených alergenů vychází z latinských názvů, např. hlavní alergen břízy (Betula verrucosa) rBet v1, vedlejší alergen břízy (profilin) rBet v2. Je možné vyšetřit ze séra specifická IgE proti některým rekombinantním

Tabulka 2. Doporučené hodnoty pozitivních nálezů testu aktivace bazofilů pro jednotlivé typy alergenů (v %), v léků vyjádření pomocí stimulačního indexu (SI) (10)

Alergen	Pozitivní nález
Inhalační alergen	> 15 %
Potraviny	> 15 %
Latex	> 15 %
Hmyzí jedy	> 10 %
Léky	> 5 % a SI > 2 až > 5
Acylpyrin	> 5 % a SI > 2
Pozitivní kontrola (anti IgE)	> 15 %

Tabulka 3. Možnost vyšetření specifického IgE proti rekombinantním alergenům

Pylové alergen	bojíněk	Phleum pratense	rPhl 1, rPhl 2, rPhl 4, rPhl 6 rPhl 7, rPhl 11, rPhl 12
	bříza	Betula verrucosa	rBet v1, rBet v2, rBet v4, rBet v6
Zvířecí alergen	kočka	Felis domesticus	rFel d1, rFel d2
	pes	Canis familiaris	rCan f1, rCan f2, rCanf3
Vzdušné plísně	alternaria	Alternaria alternata	rAlt a1
Potravinové alergen	celer	Apium graveolens	rApi g1
	burák	Arachis hypogaea	rAra h1, rAra h2, rAra h3, rAra h8, rAra h9
	liskový oříšek	Corylus avellana	rCor a 1, rCor a8
	broskev	Prunus persica	rPru p1, rPru p3, rPro p4
	pšenice	Tritium aestivum	rTri a 19
	sója	Glycine max	rGly m4
Ostatní	latex	Hevea brasiliensis	rHev d1, rHev b3, rHev b5, rHev b 8, rHev b 9, rHev b 11

Tabulka 4. Dostupné klinicky významné rekombinantní alergen

Pylové alergen	bojíněk	Phleum pratense	Phl p1, Phl p2, Phl p5, Phl p6, Phl p7
	bříza	Betula verrucosa	Bet v1, Bet 2
	olše	Alnus glutinosa	Aln g1
	líška	Corylus avellana	Cor a1
	pelyněk	Artemisia vulgaris	Art v1
Potravinové alergen	celer	Apiumgraveolens	Api g1
	mrkev	Daucus carota	Dau c1
	jablko	Malus domestica	Mal d1
Vzdušné plísně	alternaria	Alternaria alternata	Alt a1, Alt a6
Ostatní	latex	Hevea brasiliensis	Hev b1, Hev b3, Hev b5 Hev b6, Hev b8, Hev b9, Hev b10, Hev b 11

alergenům nebo použít rekombinantní alergen pro buněčné techniky, např. v testu aktivace bazofilů (BAT). Rekombinantní technikou byla připravena řada klinicky významných alergenů. Seznam důležitějších dostupných rekombinantních alergenů uvádějí tabulky 3 a 4. Díky rekombinantním alergenům se začíná objevovat při diagnostice alergického onemocnění termín **„component-resolved in vitro diagnosis“**, zkratka CRD, což vyjadřuje snahu co nejpřesněji definovat a charakterizovat alergické onemocnění pacienta pomocí vyšetření s rekombinantními alergen

Závěr

Stejně jako v jiných oborech, tak se i v oblasti alergických chorob objevují nové diagnostické

možnosti, rozšiřuje se nabídka laboratorních testů. Nesmíme však zapomínat, že žádný test nenahradí klinické vyšetření. Při interpretaci alergologických laboratorních nálezů zůstává hlavním problémem odlišení klinicky nevýznamných pozitivních nálezů (tj. senzibilizace bez klinického významu nebo jen nespecifická laboratorní pozitivita v důsledku zkřížené reakce mezi alergen) od průkazu alergie. S tímto se setkáváme nejčastěji při řešení potravinové alergie. Další riziko existuje v nález

Literatura

1. Paulík M. Metody užívané k vyšetřování složek humorální imunity. In: Bartůňková J, Paulík M. Vyšetřovací metody v imunologii. Grada 2005, s. 43–63.

2. Panzner P. Laboratorní diagnostika alergie. In: Špičák V, Panzner P. Alergologie. Galén 2004, s. 115–119

3. Spickett GP. Allergy tests. In: Oxford Handbook of Clinical Immunology and Allergy. Oxford Univ. Press 2006: 461–480.

4. Niggemann B, Nilson M, Friedrich F. Paediatric allergy diagnosis in primary care is improved by in vitro allergen-specific IgE testing. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 325–331.

5. Lau S, Nilsson M, Sulser C, et al. Use of Phadiatop \ninfant in diagnosis of specific sensitization in young children with wheeze or eczema. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 337–341.

6. Wahn U, Warner J, Simons FER, et al. IgE antibody responses in young children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 332–336.

7. Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, et al. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 7–13.

8. Honzová S, Havranová M. Test aktivace bazofilů, jeho přínos pro klinickou praxi. *Alergie* 2003; 4: 292–297.

9. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, et al. Diagnostic tests based on human basophils: More potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146: 177–189.

10. de Weck AL, Sanz ML. Flow cytometric cellular allergen stimulation test (FAST/FLOW-CAST). Technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudoallergy. *ACI International* 2002; 14: 204–215.

11. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; 61: 1028–1039.

12. Erdmann SM, Sachs B, Kwicien R, et al. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 2004; 59: 1102–1109.

13. Ebo DG, Lechkar B, Schuerwegh AJ, et al. Validation of two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy. *Allergy* 2002; 57: 706–712.

14. Erdmann SM, Heussen N, Moll-Sladowy S, et al. CD63 expression on basophils as a tool for then diagnosis ef pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 607–614.

15. González-Munoz M, Villota J, Moneo I. Analysis of basophil activation by flow cytometry in pediatric house dust mite allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 342–347.

16. Valenta R, Lindholm J, Niederberger V, et al. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 896–904.

17. Ballmer-Weber BK, Wangorsch A, Bohle B, et al. Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: Does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 970–978.

MUDr. Stanislava Honzová
Imunologické centrum, Imumed s.r.o.
Mlýnářská 4, 110 00 Praha 1
honzova@imumed.cz