

**ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI**  
**FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2020**

**Kristýna Procházková**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Kristýna Procházková**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**VLIV INHIBITORU CCD NA VÝSLEDKY STANOVENÍ  
MULTIPLOVÝCH METOD ISAC A ALEX**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2020

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kristýna PROCHÁZKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z17B0097P**  
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Vliv inhibitorů CCD na výsledky stanovení multiplových metod ISAC a Alex**  
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

### Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu



Rozsah bakalářské práce:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

**Seznam doporučené literatury:**

- ABBAS, Abul K., Andrew H. LICHTMAN a Shiv PILLAI. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. ISBN 978-1-4377-1528-6.
- HOŘEJŠÍ, Václav. Základy imunologie. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- JÍLEK, Petr. Základy imunologie. 2., přeprac. vyd. Praha: Ewopharma, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3.
- KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-X.
- ŠPIČÁK, Václav a Petr PANZNER. Alergologie. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-7262-265-X.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Bc. Tomáš Vlas**  
Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2020**



**PhDr. Lukáš Štich**  
děkan



**Mgr. Stanislava Reichertová**  
vedoucí katedry

### **Čestné prohlášení**

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

V Plzni dne 29. 4. 2020.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Procházková Kristýna

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Vliv inhibitoru CCD na výsledky stanovení multiplových metod ISAC a Alex

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 46

Počet stran – nečíslované: 16

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 15

Klíčová slova: ISAC, ALEX, CCD inhibitor, alergie, protilátky

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce se zabývá zhodnocením vlivu inhibitoru zkříženě reagujících sacharidových determinant (CCD) u metody ALEX na výsledky stanovení hladin specifických IgE protilátek proti různým alergenovým molekulám a srovnáním těchto výsledků s metodou ISAC. Zhodnocení vlivu CCD inhibice jsem prováděla pomocí porovnání četnosti pozitivních výsledků u shodných nativních alergenových molekul mezi metodami ISAC a ALEX. Při měření metodou ISAC jsem získala celkem 140 pozitivních výsledků a při měření metodou ALEX jsem naměřila celkem 133 pozitivních hodnot. Po vyhodnocení získaných výsledků jsem prokázala účinnou CCD inhibici, protože počet pozitivit při měření metodou ISAC byl vyšší než při měření metodou ALEX. Z tohoto důvodu je lepší využívat u vzorků sér, které mají vysoké riziko zkřížené reaktivity, vyšetření pomocí metody ALEX, která díky CCD inhibitoru snižuje množství falešně pozitivních výsledků.

## **Abstract**

Surname and name: Procházková Kristýna

Department: Department of Rescue, Diagnostics and Public Health

Title of thesis: Effect of CCD inhibitor on results determination of multiplex methods IS-AC and Alex

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 46

Number of pages – unnumbered: 16

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 15

Keywords: ISAC, ALEX, CCD inhibitor, allergy, antibodies

### Summary:

This bachelor thesis deals with the evaluation of the effect of an inhibitor of cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) in the ALEX method on the results of determining the levels of specific IgE antibodies against various allergen molecules and comparing these results with the ISAC method. I evaluated the effect of CCD inhibition by comparing the frequency of positive results for identical native allergen molecules between the ISAC and ALEX methods. When measured by the ISAC method, I obtained a total of 140 positive results, and when measured by the ALEX method, I measured a total of 133 positive values. After evaluating the obtained results, I demonstrated effective CCD inhibition, because the number of positives in the ISAC measurement was higher than in the ALEX measurement. For this reason, it is better to use ALEX testing of serum samples that have a high risk of cross-reactivity, which reduces the number of false-positive results due to a CCD inhibitor.

## **Předmluva**

Cílem této bakalářské práce je zjistit vliv CCD inhibitoru, užívaného u metody ALEX, na výsledky stanovení a jejich porovnání s výsledky zjištěnými metodou ISAC. Diagnostika alergií je dnes velmi rozšířená, a přestože existuje velké množství testů, interpretace výsledků je obtížná vzhledem k častým zkříženým reaktivitám. Tyto zkřížené reaktivity jsou často způsobeny podobnými sacharidovými strukturami v molekulách jednotlivých alergenů (CCD znaky). Vlivem těchto podobných domén reagují specifické IgE protilátky i s jinými alergeny na základě jejich podobnosti. Testování pomocí metody ALEX může zmírnit tuto komplikaci a usnadnit tak diagnostiku alergických onemocnění díky snížení falešných pozitivit způsobených zkříženou reaktivitou. Z tohoto důvodu je důležité zjistit, zda je CCD inhibice skutečně účinná.

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů.



# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	11
SEZNAM TABULEK .....	12
SEZNAM ZKRATEK .....	13
ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1 OBECNÁ IMUNOLOGIE .....	15
2 PROTILÁTKY .....	16
2.1 Typy protilátek.....	17
2.1.1 Imunoglobulin G .....	17
2.1.2 Imunoglobulin A .....	18
2.1.3 Imunoglobulin M.....	18
2.1.4 Imunoglobulin E.....	18
2.1.5 Imunoglobulin D .....	19
3 IMUNOPATOLOGICKÉ REAKCE.....	20
3.1 Imunopatologická reakce I. typu .....	20
3.2 Imunopatologická reakce II. typu .....	20
3.3 Imunopatologická reakce III. typu.....	21
3.4 Imunopatologická reakce IV. typu.....	21
4 ALERGIE A ATOPIE .....	23
4.1 Systémová anafylaxe .....	24
4.2 Alergeny.....	25
4.2.1 Inhalační alergeny.....	25
4.2.2 Potravinové alergeny .....	26
4.2.3 Hmyzí jedy .....	26
4.2.4 Lékové alergeny .....	26
4.3 Zkřížená reaktivita alergenů .....	27
4.3.1 Zkříženě reagující sacharidové determinanty.....	27
4.4 Diagnostika alergických onemocnění .....	28
4.4.1 Anamnéza .....	28
4.4.2 Klinický obraz .....	29
4.4.3 Kožní testy.....	30
4.4.4 Laboratorní stanovení koncentrace IgE protilátek.....	31
4.4.5 Expoziční testy .....	32
4.5 Léčba alergie.....	32
4.5.1 Eliminace alergenů .....	32

4.5.2	Farmakoterapie .....	32
4.5.3	Specifická alergenová imunoterapie.....	33
5	MULTIPLEXOVÉ METODY ISAC A ALEX.....	35
5.1	Metoda ISAC .....	35
5.2	Metoda ALEX.....	36
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	37
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	37
7	VÝZKUMNÉ OTÁZKY, VÝZKUMNÉ PROBLÉMY .....	38
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	39
9	METODIKA PRÁCE .....	40
9.1	ImmunoCAP ISAC .....	40
9.2	ALEX - Allergy Explorer .....	42
10	VÝSLEDKY/ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	46
10.1	Indikátory CCD reaktivity .....	47
10.2	Alergeny Act d 1 a Act d 2.....	48
10.3	Alergen Cor a 9 .....	49
10.4	Alergen Ara h 6 .....	50
10.5	Alergen Cup a 1.....	51
10.6	Alergen Ole e 1 .....	52
10.7	Alergen Gly m 6.....	53
10.8	Alergeny Jug r 1 a Jug r 2 .....	54
10.9	Alergen Ses i 1 .....	55
	DISKUZE .....	56
	ZÁVĚR.....	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	60
	SEZNAM PŘÍLOH .....	62
	PŘÍLOHY.....	63

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura imunoglobulinu .....	16
Obrázek 2 ImmunoCAP ISAC .....	40
Obrázek 3 ImmunoCAP ISAC – počítačové zobrazení .....	42
Obrázek 4 ALEX – Allergy Explorer.....	43
Obrázek 5 ALEX – Allergy Explorer – počítačové zobrazení.....	45
Obrázek 6 Srovnání četností pozitivit u indikátorů CCD reaktivity mezi metodami ISAC a ALEX .....	47
Obrázek 7 Srovnání četností pozitivit u alergenů Act d 1 a Act d 2 mezi metodami ISAC a ALEX .....	48
Obrázek 8 Srovnání četností pozitivit u alergenu Cor a 9 mezi metodami ISAC a ALEX.	49
Obrázek 9 Srovnání četností pozitivit u alergenu Ara h 6 mezi metodami ISAC a ALEX	50
Obrázek 10 Srovnání četností pozitivit u alergenu Cup a 1 mezi metodami ISAC a ALEX .....	51
Obrázek 11 Srovnání četností pozitivit u alergenu Ole e 1 mezi metodami ISAC a ALEX	52
Obrázek 12 Srovnání četností pozitivit u alergenu Gly m 6 mezi metodami ISAC a ALEX .....	53
Obrázek 13 Srovnání četností pozitivit u alergenů Jug r 1 a Jug r 2 mezi metodami ISAC a ALEX .....	54
Obrázek 14 Srovnání četností pozitivit u alergenu Ses i 1 mezi metodami ISAC a ALEX	55

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Rozdělení tříd jednotek ISU a jejich odpovídající hladina specifických IgE protilátek.....	42
Tabulka 2 Seznam vybraných alergenů nebo alergenových skupin a jejich výskyt .....	46

## SEZNAM ZKRATEK

Ab.....	Protilátka
Ag.....	Antigen
AIT.....	Specifická alergenová imunoterapie
CCD.....	Zkříženě reagující sacharidové determinanty
DTH.....	Imunopatologická reakce oddáleného typu
ECP.....	Eosinofilní kationický protein
Ig.....	Imunoglobulin
IS.....	Imunitní systém
MAC.....	Membrány atakující komplex
sIgE.....	Specifické imunoglobuliny E
SLE.....	Systémový lupus erytematodes

## ÚVOD

Jedním z nejvýznamnějších prostředků pro diagnostiku alergických onemocnění je laboratorní vyšetření. Vedle stanovení hladiny celkového IgE imunoglobulinu v séru se dnes velmi rozvíjí i stanovení specifických IgE protilátek proti celé řadě alergenových molekul. Od singleplexových metod, které testují pouze jeden vybraný alergen, jsme se postupně dostali až k multiplexovým metodám ISAC a ALEX, pomocí kterých dokážeme stanovit hladinu specifických IgE imunoglobulinů proti mnoha alergenům najednou. Nevýhodou těchto metod je zkřížená reaktivita. Specifické IgE protilátky reagují i s jinými alergeny, které v molekule obsahují podobné sacharidové determinanty. Z tohoto důvodu se mezi námi objevují polyvalentní alergici, u kterých je komplikované určit účinnou imunoterapii. Komplikaci zkříženě reagujícími sacharidovými determinantami se výrobci snažili vyřešit pomocí CCD inhibitoru u metody ALEX, který by měl vzniklou falešnou pozitivitu snižovat. Při hodnocení výsledků je třeba dbát na správnou interpretaci. Celá problematika je stále aktuální, jelikož CCD inhibice není stoprocentní.

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit vliv CCD inhibitoru u metody ALEX, a tedy zjistit, zda skutečně snižuje množství falešně pozitivních výsledků způsobených CCD reaktivitou.

V teoretické části je na úvod uvedena kapitola, která popisuje obecnou imunologii, a následuje základní popis a funkce protilátek a jejich rozdělení do tříd. Větší prostor je věnovaný protilátce IgE, která hraje hlavní úlohu při alergiích. Dále se budeme věnovat kapitole o imunopatologických reakcích, která je následována rozsáhlou kapitolou o alergiích a atopiích. Zde je popsán mechanismus vzniku alergických onemocnění, rozdělení alergenů, problematika zkřížené reaktivity, diagnostika a nakonec léčba alergií. Poslední kapitola teoretické části stručně popisuje multiplexové metody ISAC a ALEX.

V praktické části je uveden postup provedení těchto metod, způsob analýzy dat z vybraného souboru a jejich grafické zpracování a zhodnocení.

Posledními kapitolami této kvalifikační práce jsou diskuze a závěr, kde se budeme věnovat vyhodnocení a interpretaci výsledků, které jsme získali.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 OBECNÁ IMUNOLOGIE

Imunologie je věda, která se zabývá studiem imunitního systému (IS). Zajímá se o jeho strukturu, funkci a význam a dnes se rozšířila do několika podoborů jako je alergologie, molekulární imunologie, imunochemie, transplantační imunologie a mnoho dalších. (Göpfertová, 1999)

IS jako jeden ze základních homeostatických mechanismů organismu zajišťuje jeho integritu pomocí schopnosti rozpoznávat látky, které mohou být pro organismus škodlivé. Jednou z funkcí IS je tedy obranyschopnost. Chrání tak organismus proti různým patogenům a jejich toxinům nebo škodlivinám vnitřního prostředí. Naopak schopnost IS, která se nazývá autotolerance, slouží k rozpoznávání vlastních tkání a navození tolerance vůči nim. A třetí funkcí IS je takzvaný imunitní dohled, kdy tento systém odstraňuje staré nebo poškozené buňky vlastního těla. (Hořejší, 2009)

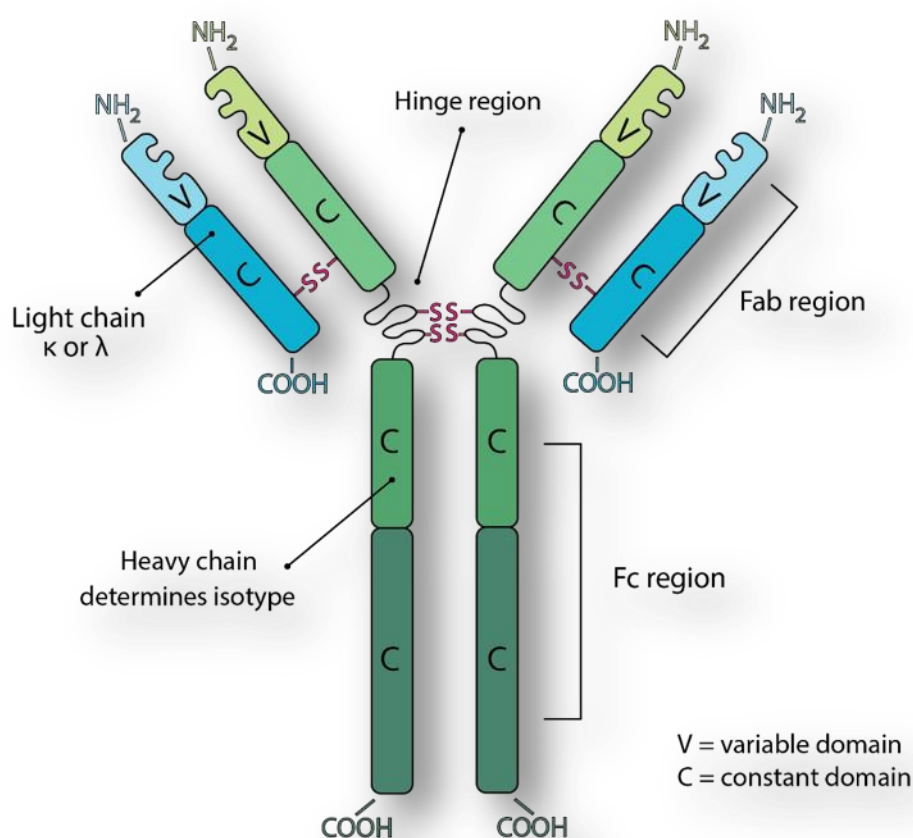
Imunitní mechanismy můžeme rozdělit na nespecifické, které jsou evolučně starší, a specifické. Oba mechanismy zastupuje složka humorální tvořená různými sérovými proteiny a molekulami, a složka buněčná tvořená buňkami. Nespecifická imunita je vrozená a neadaptivní. Reaguje na škodliviny rychle a stále stejným způsobem. Patří sem různé fagocytující buňky, komplement, NK (natural killer) buňky a jiné molekuly. Naproti tomu imunita specifická je adaptivní a reaguje na cizí látky vysoce specificky až po aktivaci rozpoznaným antigenem (Ag). Patří sem různé typy lymfocytů a protilátky (Ab) produkované plazmatickými buňkami. Pro specifickou imunitu je charakteristický vznik imunologické paměti. (Hořejší, 2009)

K základním obranným mechanismům organismu také patří přirozené bariéry lidského těla. Jedná se o neporušený povrch kůže a sliznic, řasinky v dýchacích cestách, longitudinální tok vzduchu v dýchacím traktu a tekutin v cestách močových, kyselé prostředí žaludku, mastné kyseliny na kůži, lysozym ve slinách, slzách a potu, přirozená mikrobiální flóra, která soutěží s patogeny o receptorová místa a živiny a současně produkuje antimikrobiální látky. (Hořejší, 2009)

## 2 PROTILÁTKY

Protilátky neboli imunoglobuliny (Ig) jsou sérové glykoproteiny tvořené plazmatickými buňkami, což jsou plně diferencované B lymfocyty. B lymfocyty vznikají a zrají v kostní dřeni, fetálních játrech a slezině a svůj název nesou podle orgánu, který se nazývá Fabriciova bursa a je to místo vzniku B lymfocytů u ptáků. B lymfocyty mají na svém povrchu receptor BCR, který je tvořen částí imunoglobulinu a specificky reaguje s antigenem. Po aktivaci se B lymfocyt začne dělit a diferencovat v plazmatické buňky, které produkují protilátky specificky namířené proti antigenu, který jejich produkci vyvolal. Protilátky patří do humorální složky specifické imunity. (Bartůňková, 2011)

**Obrázek 1** Struktura imunoglobulinu



Zdroj: <https://bxcell.com/>

Na Obrázku 1 je zobrazená struktura imunoglobulinu. Ig mají tvar písmene Y a jsou tvořeny dvěma identickými lehkými a dvěma identickými těžkými polypeptidovými řetězci. Každý řetězec obsahuje konstantní a variabilní část. Řetězce jsou k sobě připoutány disulfidickými můstky mezi těžkými řetězci a mezi lehkým a těžkým řetězcem po každé



straně. (Abbas, 2016) Variabilní domény lehkých a těžkých řetězců se nacházejí na N – koncích řetězců a určují antigenní specifitu. Je to místo, kam se váže antigen. C – konec imunoglobulinu je tvořen konstantními doménami. Dle štěpení papainem se imunoglobulin dělí na Fab fragmenty a Fc fragment. Fab fragmenty obsahují variabilní domény, a tedy, jak už bylo řečeno, dokáží specificky vázat antigeny. Fc fragment zodpovídá za vazbu imunoglobulinu na komplementové receptory nebo Fc fragmenty fagocytujících buněk. Místo připojení těžkých řetězců se nazývá pantová oblast, která má schopnost ohybu. Imunoglobuliny se vyskytují buď ve formě monomerů, které se skládají pouze z jedné strukturální jednotky, nebo ve formě dimerů, trimerů či pentamerů, kde je spojeno více těchto jednotek. (Liška, 2014)

Protilátky jsou schopné vázat širokou škálu antigenů, včetně makromolekul a malých chemikálií. Části antigenů, které jsou zodpovědné za vazbu s protilátkami, se nazývají epitopy nebo determinanty. Tyto vazby jsou reverzibilní, nekovalentní a patří sem hlavně vodíkové a hydrofobní interakce. Síla, s níž se jeden antigen váže na příslušnou protilátku, se nazývá afinita reakce. Každá molekula protilátky se může vázat na 2 až 10 epitopů v závislosti na počtu vazebných míst. Jak už bylo řečeno, některé imunoglobuliny se vyskytují ve formě monomerů, které mají pouze dvě vazebná místa pro antigen, jiné ve formě dimerů, trimerů nebo dokonce pentamerů, které obsahují 10 vazebných míst pro epitopy antigenu nebo pro 2 a více epitopů různých sousedních antigenů. Protilátky produkované proti jednomu antigenu se mohou vázat na jiné strukturálně podobné antigeny a tomuto jevu říkáme zkřížená reaktivita protilátek. (Abbas, 2016)

## 2.1 Typy protilátek

Dle typu těžkých řetězců rozeznáváme pět izotypů imunoglobulinů. Imunoglobuliny s typem těžkého řetězce  $\gamma$  nazýváme IgG, s typem  $\alpha$  IgA, s typem  $\mu$  IgM, s typem  $\epsilon$  IgE a s typem  $\delta$  IgD. (Liška, 2014)

Každá protilátka obsahuje dva stejné druhy lehkých řetězců, které rozdělujeme na řetězce  $\kappa$  nebo  $\lambda$ . (Liška, 2014)

### 2.1.1 Imunoglobulin G

Imunoglobulin G je nejvíce zastoupený izotyp imunoglobulinu v lidském séru s nejdélsí dobou přežití. Tvoří až 80 % všech protilátek. IgG se rozděluje do čtyř podtříd – IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4, které jsou číslovány podle klesajících koncentrací v séru. IgG1, IgG3 a IgG4 jsou jediné imunoglobuliny, které dokáží projít placentou a chránit tak plod před infekcemi. IgG3, IgG1 a IgG2 jsou také účinné při aktivaci komplementu. IgG1 a

IgG3 se váže s vysokou afinitou k Fc receptorům fagocytů, a tak zprostředkovávají opsonizaci. Ostatní podtřídy tuto vlastnost nemají tak výraznou. IgG protilátky vznikají při infekci později než protilátky IgM, ale zůstávají v krevním oběhu delší dobu a neustále tak chrání náš organismus. (Parija, 2012)

### **2.1.2 Imunoglobulin A**

IgA protilátka je druhá nejvíce zastoupená Ab v séru (téměř 10 – 15 %) a vyskytuje se ve dvou formách. První forma, sérový IgA, je monomer s dvěmi podtřídami – IgA1 a IgA2. Druhá forma, sekreční IgA, je dimer nebo tetramer produkován epiteliálními buňkami sliznice a je to hlavní imunoglobulin, který se nachází v lidských sekretech jako je lidské mléko, sliny, slzy, hlen v dýchacích, urogenitálních a trávicích cestách. Chrání tak tyto sliznice před patogeny. IgA také aktivuje komplement alternativní cestou. (Parija, 2012)

### **2.1.3 Imunoglobulin M**

IgM je pentamer se dvěmi podtřídami IgM1 a IgM2 lišící se svým složením těžkých řetězců. Díky své struktuře s deseti vazebnými místy pro antigen je tato protilátka schopna vázat deset různých epitopů. Existuje i monomerní IgM, které je vázáno na membránu B lymfocytů. IgM protilátky jsou první imunoglobuliny, které vznikají po styku s cizorodým antigenem. (Parija, 2012)

### **2.1.4 Imunoglobulin E**

Imunoglobulin E byl poprvé objeven v roce 1966 v Japonsku jako nový typ protilátky, která dokázala vyvolat alergickou reakci na kůži. Pojmenovali ji  $\gamma$ E protilátka. O rok později ve Švédsku izolovali novou třídu imunoglobulinu, kterou pojmenovali IgND. Později se ukázalo, že se jednalo o jednu a tu samou protilátku a v roce 1968 dostal tento imunoglobulin svůj oficiální název IgE. (Balbino, 2018)

Imunoglobulin E se v krevním oběhu nachází v nejnižších koncentracích ze všech izotypů protilátek. Přesto dokáže při alergiích významně vystoupat. Množství alergen – specifických IgE protilátek je významným diagnostickým kritériem alergických onemocnění. (Balbino, 2018)

Imunoglobulin E existuje ve dvou formách. První se nazývá membránu vázající IgE a je exprimován B lymfocyty, které prošly izotypovým přesmykem. Membránu vázající IgE slouží jako specifický BCR receptor B lymfocytů a hraje roli při vazbě antigenu a jeho prezentaci. Druhou formou je sekretovaná IgE protilátka produkováná plazmatickými buňkami. Tato forma se váže na dva hlavní receptory Fc $\epsilon$ RI a CD23. Fc $\epsilon$ RI je více afinitní a

vyskytuje se na povrchu bazofilních granulocytů, tkáňových mastocytů a dalších buněk jako jsou neutrofilů či eozinofilů. Vazba vyvolá alergickou reakci aktivací bazofilů a mastocytů, které uvolňují preformovaná granula s histaminem, serotoninem, proteázami, prostaglandiny, leukotrieny, cytokiny a chemokiny. Méně afinitní receptor CD23 je exprimován hlavně B lymfocyty a v menší míře také jinými buňkami (např. neutrofilů, eozinofilů). Tento receptor funguje spíše jako negativní regulátor syntézy imunoglobulinu E. (Balbino, 2018)

### **2.1.5 Imunoglobulin D**

Imunoglobulin D tvoří méně než 1 % všech imunoglobulinů v séru. IgD je klasický monomer a je přítomen na povrchu B lymfocytů a společně s IgM slouží k rozpoznávání antigenů. (Parija, 2012)

### **3 IMUNOPATOLOGICKÉ REAKCE**

IS představuje obrannou linii organismu. Tato linie se ovšem může vymknout kontrole a poškozovat tak vlastní tkáň. Tyto imunitní reakce se nazývají imunopatologické. Imunopatologické reakce mohou nastat při nepřiměřené imunitní odpovědi na cizorodý antigen, převážně u opakovaných a slabě kontrolovaných infekcí, nebo mohou být přímo namířeny proti vlastním antigenům v důsledku selhání jedné ze základních funkcí IS, která se nazývá autotolerance. Onemocnění způsobená imunopatologickou reakcí proti vlastním tkáním a orgánům označujeme jako autoimunitní. (Abbas, 2016)

Imunopatologické reakce se klasifikují dle mechanismu poškození tkáň. Prvním typem imunopatologické reakce je reakce způsobená uvolněním mediátorů z mastocytů. Je také závislá na produkci IgE protilátek proti různým antigenům vnějšího prostředí, které se váží na tkáňové mastocyty a tím způsobují jejich aktivaci. Imunopatologická reakce II. typu je způsobena protilátkami ze třídy IgG a IgM, které jsou namířeny proti vlastním antigenům. Protilátky mohou také tvořit imunokomplexy se solubilními antigeny, které se ukládají ve tkáních a mohou tak způsobit poškození. Tato reakce se nazývá imunopatologická reakce III. typu. Posledním typem reakce je imunopatologická reakce IV. typu a je způsobena reakcí T lymfocytů proti vlastním antigenům. (Abbas, 2016)

#### **3.1 Imunopatologická reakce I. typu**

Imunopatologická reakce I. typu neboli IgE mediovaná imunopatologická reakce je zprostředkovaná IgE protilátkami a zahrnuje většinu běžných alergií. Vzniká během několika minut po vystavení antigenu a vždy vede k degranulaci mastocytů a bazofilů. IgE protilátka se váže na mastocyty nebo bazofily, aktivuje je a dochází k uvolnění preformovaných mediátorů. Tato reakce se vyskytuje ve dvou formách a těmi jsou anafylaktická reakce a atopie. (Parija, 2012)

#### **3.2 Imunopatologická reakce II. typu**

Imunopatologická reakce II. typu je humorální reakce s patogenetickým působením IgG a IgM protilátek, které se váží na příslušné antigeny a aktivují komplement, kdy dochází ke vzniku membrány atakujícího komplexu (MAC). MAC rozruší membránu protilátkou označené buňky a dochází k její lýze. IgG a IgM protilátky mohou také způsobovat reakci typu ADCC, což je buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách. Při ADCC se protilátky vázané na antigeny váží svými konstantními doménami na Fc receptory fagocytujících

cích a NK buněk, které následně způsobí lýzu takto označených, cílových buněk. (Bartůňková, 2019)

Tato imunopatologická reakce nastává v případě nekompatibility krevní transfúze v klasickém AB0 systému, Rh systému nebo vzácně v jiných erytrocytárních antigenech. Výsledkem je masivní intravaskulární hemolýza. (Parija, 2012) Dalším příkladem může být onemocnění myasthenia gravis, kdy dochází k vazbě autoprotilátky na acetylcholinový receptor a tím k blokaci nervosvalového přenosu. Také sem můžeme zařadit tvorbu protilátek proti vnitřnímu faktoru a tedy k poruše vstřebávání vitamínu B<sub>12</sub> a vzniku perniciózní anémie. (Bartůňková, 2019)

### **3.3 Imunopatologická reakce III. typu**

Imunopatologická reakce III. typu je charakteristická tvorbou imunokomplexů. V běžných podmínkách jsou vzniklé imunokomplexy v lidském těle odbourávány fagocytujícím systémem. V případě přetrvávající infekce, opakovaném setkání s běžnými antigeny či při autoimunitních onemocněních nedochází k eliminaci komplexů antigenu s protilátkou, ale místo toho se tyto komplexy ukládají v různých tkáních, kde působí patologicky. Místem jejich patologického hromadění jsou často stěny krevních cév, synoviální membrány kloubů, bazální membrány glomerulů v ledvinách nebo mozková tkáň. Patologické působení vzniklých imunokomplexů spočívá v jejich schopnosti aktivovat komplementovou kaskádu. (Parija, 2012)

Projevem této imunopatologické reakce je například autoimunitní onemocnění systémový lupus erytematodes (SLE), při kterém jsou autoantigenem složky buněčného jádra, nebo kryoglobulinémie, kdy dochází ke vzniku imunokomplexů mezi normálním a patologickým imunoglobulinem. (Bartůňková, 2019) Také sem můžeme zařadit sérovou nemoc, ke které dochází po aplikaci cizorodého séra třeba při očkování nebo po podání penicilinu. (Parija, 2012)

### **3.4 Imunopatologická reakce IV. typu**

Imunopatologická reakce IV. typu se nazývá reakce oddáleného typu (DTH), protože k odpovědi dochází hodiny až dny po primárním setkání s antigenem a často i déle přetrvává. Od ostatních imunopatologických reakcí se odlišuje tím, že se jedná, nikoliv o protilátkovou reakci, ale o reakci buněčně zprostředkovanou. DTH je tedy způsobena aktivací T lymfocytů. Jako první ji popsal Robert Koch u tuberkulózy jako tuberkulinovou

reakci. Později po zjištění, že tato reakce může nastat i u jiných patologických stavů, došlo k jejímu přejmenování. (Parija, 2012)

Dle druhu působících T lymfocytů ji můžeme rozdělit na dva podtypy. U prvního podtypu dochází k aktivaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které produkují interferon  $\gamma$ . Pokud je přítomen obtížně zpracovatelný antigen nebo pokud jsou porušeny eliminační procesy makrofágů, může docházet až k tvorbě granulomů. Tento podtyp převažuje u demyelinizačních a granulomatózních onemocnění včetně tuberkulózy, lepry a sarkoidózy. Druhý podtyp je charakteristický přítomností cytotoxických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, které jsou aktivovány pomocí Th1 lymfocytů. Tyto cytotoxické lymfocyty lyzují cílové buňky. K tomu dochází například u kontaktní dermatitidy, virových exantémů a rejekci transplantovaného orgánu. Při různých imunopatologických stavech se oba podtypy reakce kombinují. (Bartůňková, 2019)

## 4 ALERGIE A ATOPIE

V ekonomicky vyspělých státech v současné době trpí alergickými chorobami asi 20 % obyvatel. U velkých měst se toto číslo může ještě zvýšit. Z toho důvodu se alergické nemoci označují jako nejčastější porucha imunity. (Bartůňková, 2011)

Alergie je ve skutečnosti skupina chorob, které jsou charakteristické zvýšenou přecitlivělostí k neškodným antigenům zevního prostředí, které v tomto případě nazýváme alergeny. Po jejich opakované expozici dochází u vnímavých jedinců k zánětlivým změnám a později k poruše funkce a struktury tkání a orgánů. Alergie může být buď lokalizovaná na určitý orgán, nebo je systémová, kdy tento stav označujeme jako anafylaxi. Pojem atopie je často s alergií zaměňován. Nejedná se ale o skupinu onemocnění, ale o genetickou predispozici jedince k tvorbě nadměrného množství specifických IgE protilátek na základě vystavení extrémně nízkým dávkám běžným alergenům zevního prostředí. Až po následné interakci těchto vzniklých protilátek s vyvolávajícím exoalergenem dochází k rozvoji zánětu označovaného jako alergické onemocnění. (Hořejší, 2009)

Nejvýznamnější mechanismus vzniku velké části alergií je imunopatologická reakce I. typu, neboli IgE mediovaná reakce, kdy dochází k tvorbě velkého množství IgE protilátek, které se převážně váží na vysoce afinitní FcεRI receptory bazofilů a mastocytů. Následně se na receptorová místa pro antigen na těchto protilátkách naváže alergen, kterému je náš organismus opakovaně vystaven. Tím dojde k přemostění IgE alergenem a bazofilní granulocyty s mastocyty se aktivují a uvolňují prozánětlivé mediátory, které jsou z velké části již preformované. Také dochází k aktivaci metabolismu kyseliny arachidonové, ze které vznikají mediátory zánětu de novo. Jedná se hlavně o prostaglandiny a leukotrieny. Všechny tyto látky působí stejným mechanismem. Dochází k vazodilataci, zvýšení cévní permeability, konstrikce hladké svaloviny a dalším jevům, které jsou charakteristické pro alergické choroby. (Bartůňková, 2019)

Alergická onemocnění, zejména ta chronická, jsou doprovázena také aktivací eosinofilních granulocytů a jejich vycestováním do tkání, kde uvolňují toxické mediátory a dochází k rozvoji eosinofilního zánětu. Nejznámějším mediátorem je eosinofilní kationický protein (ECP), který spolu s dalšími toxickými produkty, způsobuje poškození struktury tkáně. (Bartůňková, 2019)

Obecná příčina obou těchto mechanismů je nerovnováha mezi Th1 a Th2 lymfocyty, která je z největší části dána genetickou predispozicí k Th2 hyperaktivitě. Tento stav nazýváme tedy atopie. Mezi vnější faktor Th2 hyperaktivity patří nedostatečná stimulace

Th1 lymfocytů antigeny mikroorganismů. Toto nastává například u přehnané snahy o sterilitu prostředí a potravin u dětí v útlém věku. Dalším vnějším činitelem u dětí může být naopak nadměrná stimulace IS některými alergeny. Tento faktor je ale velmi individuální u různých osob i alergenů. (Bartůňková, 2019)

Alergická onemocnění mohou být ovšem způsobena i jiným typem imunopatologické reakce než tím IgE mediováným. Příkladem je kontaktní dermatitida, která je založena na reakci IV. typu. Často se také může jednat o kombinaci několika typů imunopatologických reakcí. (Bartůňková, 2019)

#### **4.1 Systémová anafylaxe**

Systémová anafylaxe je akutním projevem imunopatologické reakce prvního typu, tedy reakce alergické. Tato manifestace může vzácně končit smrtí pacienta. Objevuje se po vazbě antigenu na specifickou IgE protilátku, která je navázána na povrchu mastocytů, a dochází k uvolnění preformovaných mediátorů anafylaxe. Na základě přítomnosti cizího antigenu dochází k aktivaci specifických Th2 lymfocytů, které stimulují B lymfocyty k tvorbě specifických IgE protilátek. Tyto imunoglobuliny se naváží na FcεRI receptory mastocytů a bazofilů a při opětovném vystavení vyvolávajícímu antigenu (alergenu) jsou tzv. překlenuty a aktivovány. To vede k degranulaci těchto buněk a uvolnění mediátorů během několika minut. Navázání specifických IgE protilátek na povrch mastocytů a bazofilů se nazývá senzibilizace a tento komplex je připraven k aktivaci při dalším setkání s příčinným antigenem. (Parija, 2012)

Anafylaxi vyvolávající alergen bývá nejčastěji pyl, proteiny cizího séra a vakcín, potraviny (mléko, vejce, ořechy, mořské plody), léky jako je penicilin a lokální anestetika, hmyzí jedy a zvířecí alergeny. (Parija, 2012)

Časná fáze anafylaxe je charakteristická vyplavením aktivních mediátorů z mastocytů a bazofilů v řádu několika minut po opakovaném vystavení určitému antigenu. Histamin jako jeden z hlavních mediátorů způsobuje zvýšenou cévní permeabilitu, vazodilataci a brochokonstrikci. To samé způsobují i ostatní vyplavené látky jako prostaglandiny a leukotrieny, dále podporují chemotaxi neutrofilů a jejich shlukování v místě zánětu. (Parija, 2012)

Čtyři až šest hodin po časně fázi systémové anafylaxe nastupují mechanismy fáze pozdní. Ta trvá 1 – 2 dny a dochází při ní k infiltraci místa zánětu neutrofilů, makrofágy, eozinofily a lymfocyty, což způsobuje zesílení zánětlivých změn, které nastaly již v časně fázi. Buňky po degranulaci dále vytváří prozánětlivé substance, jako například některé ty-



py leukotrienů, proagregační destičkový faktor a cytokiny z mastocytů, a uvolňují je do svého okolí, tím anafylaxi dále podporují. (Parija, 2012)

Anafylaxe jako systémové poškození zasahuje mnoho orgánů. V dýchacím traktu nalézáme edém hrtanu a bronchospasmy, postižení kardiovaskulárního systému je doprovázeno hypotenzí a srdeční arytmii a kůže je začervenalá a objevuje se svědění. Existuje mnoho dalších klinických manifestací, ale nejzávažnější je otok hrtanu, bronchospasmus, srdeční arytmie a hypotenze, což jsou nejčastější příčiny úmrtí při anafylaxi. (Parija, 2012)

Prevenčí systémové anafylaxe je podávání malých dávek příčinných antigenů, tzv. desensitizace. Antigeny podáváme buď krátkodobě jako akutní prevenci, které vyvolají vyplavení pouze malého množství mediátorů, nebo dlouhodobě v rámci chronické prevence, kdy příčinné antigeny podáváme vždy v intervalu několika týdnů a dochází tak k tvorbě IgA a IgG protilátek blokujících vazbu antigenů na mastocyty a bazofily. (Parija, 2012)

Léčbou již rozvinuté anafylaxe je podávání léků mírnící účinek vyplavených mediátorů a léků podporující dýchací a kardiovaskulární trakt. (Parija, 2012)

## 4.2 Alergeny

Alergeny jsou proteinové molekuly schopné vazby na specifické IgE protilátky a ve většině případech také dokáží indukovat tvorbu těchto imunoglobulinů imunitním systémem. Těmto proteinům se říká primární senzibilizátory. Existují však alergeny, které se umí vázat na IgE protilátky, ale nedokáží vyvolat jejich tvorbu. V tomto případě se jedná o zkříženou reaktivitu alergenů, kdy se molekuly proteinů strukturálně i funkčně podobají primárním senzibilizátorům a dokáží se tak vázat na IgE protilátky, které vznikly na podkladě přítomnosti jiných alergenů. Tuto dovednost mají například alergeny z ovoce, zeleniny a ořechů. (EAACI, 2014)

Máme i alergeny anorganického původu (např. kovy), které na rozdíl od alergenů organických nevyvolávají protilátkovou odpověď, ale indukují odpověď buněčnou. (Hořejší, 2009)

Dle působení alergenů na lidský organismus je můžeme rozdělit na inhalační, potravinové alergeny, hmyzí jedy, lékové a kontaktní alergeny. (Bartůňková, 2019)

### 4.2.1 Inhalační alergeny

Inhalační alergeny (aeroalergeny) se dále dělí na sezónní a celoroční, nebo také na alergeny vnějšího či vnitřního prostředí. Tyto alergeny nejčastěji způsobují problémy dýchacích cest, které označujeme jako respirační alergózy. Patří sem například alergická rhinokonjunktivitida a průduškové astma. (Bartůňková, 2019)

Aeroalergeny, které nejčastěji způsobují sezónní alergické onemocnění, jsou pyly rostlin, zejména pyly trav a pyly břízovitých stromů. Jiné pyly alergizují méně a v některých případech dokonce ojedinele. Při diagnostice pylových alergií je nutné pracovat s pyly jednoho druhu z důvodu velmi vysoké pravděpodobnosti vzniku zkřížené reaktivity. (Bartůňková, 2019)

Dalšími inhalačními alergeny jsou plísně, které mohou vyvolávat celoroční i sezónní alergie, všudypřítomný prach s prachovými roztoči v lůžkovinách i srsti zvířat a peří ptáků. Dalšími alergizujícími složkami v prachu jsou spóry plísní, hmyzí alergeny (např. šváb) a zvířecí alergeny. (Bartůňková, 2019)

Zvířecí alergeny nacházíme v srsti, epitelích a zvířecích výměšcích jako například sliny nebo moč. U nás je nejvíce alergizujícím zvířetem kočka a poté pes. Tyto alergeny mají lepivou strukturu a přenášejí se tak na oděvu, prachu a na dalších médiích a z tohoto důvodu nemusí alergické onemocnění vznikat pouze při přímém kontaktu se zvířetem. (Bartůňková, 2019)

#### **4.2.2 Potravinové alergeny**

Nejvýznamnější potravinové alergeny u dospělých a starších dětí jsou ořechy, ovoce a zelenina, semena jako je mák či sezam, a také ryby a mořské plody, které z důvodu stravovacích návyků nejsou v naší zemi tak časté. V kojeneckém věku se mnohdy také objevuje alergie na kravské mléko, v dospělosti je spíše výjimečná. Děti dále mohou trpět alergií na vejce, sóju a pšeničnou mouku. Tyto převážně „dětské“ alergeny mohou vyvolávat non-IgE reakce, které komplikují diagnostiku. (Bartůňková, 2019)

K potravinovým alergenům můžeme dále zařadit potravinová aditiva jako barviva a konzervanty, stopy antibiotik v mase, pesticidy a jiné chemické látky na rostlinných potravinách. Stejně jako u „dětských“ alergenů vyvolávají tyto alergizující látky jiné než reakce I. typu a stanovení je tudíž obtížnější. (Bartůňková, 2019)

#### **4.2.3 Hmyzí jedy**

Složky, které jsou obsaženy v jedu vosy, sršně, včely a čmeláka, mohou indukovat alergickou reakci až anafylaktický šok. Další přítomné látky mohou mít enzymatické a toxické vlastnosti způsobující přímou degranulaci žírných buněk a bazofilních granulocytů. (Bartůňková, 2019)

#### **4.2.4 Lékové alergeny**

Problematika lékových alergenů bývá komplikovaná. Většina polékových reakcí není vyvolaná IgE protilátkami a řadí se tedy mezi imunopatologické reakce jiného než I.

typu. Z tohoto důvodu je obtížné provádět diagnostiku a klinicky ani nelze odlišit skutečně alergické reakce a nežádoucí reakce, které nejsou imunologického charakteru. Potenciální alergeny jsou penicilinová antibiotika, lokální anestetika, kontrastní látky a mnoho dalších. (Bartůňková, 2019)

### **4.3 Zkřížená reaktivita alergenů**

Alergeny se rozdělují do několika málo proteinových rodin na základě jejich podobnosti, jako je například podobná aminokyselinová sekvence či trojrozměrná konformace. Členové stejné rodiny mohou sdílet stejné nebo velmi podobné epitopy pro specifické IgE protilátky nebo T lymfocyty a způsobovat tak alergické reakce vlivem zkřížené reaktivity. (EAACI, 2014)

Velmi dobře prostudovaným příkladem je forma potravinové alergie, kterou trpí více než 70 % pacientů s diagnostikovanou alergií na pyl břízy. Tento alergen se nazývá Bet v 1 a řadí se dle procesu patogeneze do proteinové rodiny 10. Stejná molekula se nachází i ve struktuře různých potravinových alergenů (např. Mal d 1 v jablku, Pru av 1 ve višni, Gly m 4 v sóji, Ara h 8 v arašídě), které sice pocházejí z jiných stromů než je bříza, ale alergenům Bet v 1 jsou velmi podobné svou primární a terciární strukturou. Tyto alergeny tak mohou být pomocí podobného epitopu rozeznávány Bet v 1 – specifickými IgE protilátkami a vyvolávat alergické reakce. (EAACI, 2014)

Destrukce terciární struktury alergenů žaludeční šťávou nebo teplem dochází k redukci nežádoucí zkřížené reaktivity vlivem snížení vazebné kapacity na IgE protilátku. Z tohoto důvodu alergici na březový pyl dobře tolerují uvařené potraviny obsahující problematické zkříženě reagující struktury. (EAACI, 2014)

Podobná nebo stejná primární struktura alergenů (tj. aminokyselinová sekvence) také zkříženě reaguje a vede k aktivaci T lymfocytů. Aktivace, která je způsobena zkříženě reagujícími alergeny (např. potravinové alergeny podobné Bet v 1), může vést ke zhoršení atopického ekzému u pacientů s alergií na březový pyl. (EAACI, 2014)

V současnosti probíhají výzkumy o možném použití mechanismu zkřížené reaktivity jako léčby alergických onemocnění. Pacientům se podávají zkříženě reagující regulační T lymfocyty nebo zkříženě reagující blokující IgG<sub>4</sub> protilátky. (EAACI, 2014)

#### **4.3.1 Zkříženě reagující sacharidové determinanty**

Zkříženě reagující sacharidové determinanty (CCD), které se svou strukturou podobají mnoha skupinám alergenů, ovlivňují výsledky alergologických stanovení (způsobují falešnou pozitivitu). Tyto struktury se dokáží vázat na specifické IgE imunoglobuliny a

způsobovat tak zkříženou reaktivitu. (Sinson, 2019) CCD molekuly se vyskytují ve struktuře alergenů rostlin, hmyzích jedů a roztočů a zkřížená reaktivita byla prokázána u alergií na pyl, ovoce a zeleninu, hmyzí jedy a roztoče. (Gattinger, 2019)

#### **4.4 Diagnostika alergických onemocnění**

K určení správné diagnózy alergického onemocnění je třeba stanovit vyvolávající alergen. Dle toho se volí vhodná kauzální terapie, která tkví v eliminaci příčinných alergenů a nasazení specifické alergenové terapie. Kauzální léčba se doplňuje jinými léčebnými postupy, které ale pouze zmírňují symptomy daného alergického onemocnění. (Bartůňková, 2011)

Základním kamenem laboratorní diagnostiky alergických chorob je rozbor rodinné a osobní anamnézy, popis obtíží a zhodnocení klinického stavu. Dále se provádějí kožní testy pomocí standardizovaných diagnostických alergenů. Poté dochází k laboratorním testům a někdy i testům expozičním. Dle typu onemocnění se můžou indikovat různé další vyšetření jako třeba rentgenové vyšetření plic a vedlejších paranazálních dutin, vyšetření plicních funkcí, kultivace výtěru nosu a další. (Bartůňková, 2011)

##### **4.4.1 Anamnéza**

Vzhledem k tomu, že alergie je systémové postižení, často dochází k výskytu různých alergických onemocnění u jedné osoby. Tento výskyt může být současný nebo následný, kdy dochází k rozvoji chorob u jedinců, kteří v dětství trpěli například atopickým ekzémem či jinou atopií. Tento jev nazýváme atopickým pochodem. Při rozboru osobní anamnézy je tedy důležité zjišťování různých symptomů, které s onemocněním, pro které pacient přichází, zdánlivě nesouvisí. (Bartůňková, 2019)

Dále se provádí vyšetření rodinné anamnézy. Výskyt alergické choroby v rodině zvyšuje riziko vzniku onemocnění u daného vyšetřovaného jedince. (Bartůňková, 2011) U blízkých rodinných příslušníků může být alergické onemocnění příčinou vzniku atopie u jejich potomků. (Bartůňková, 2019)

Sledují se projevy onemocnění jako je například rýma, kašel, ekzémy, svědění, vyrážka, jejich trvání a reakce na léčbu. Dále je nutné myslet na to, že existují i choroby bez podkladu atopie, a to jsou kontaktní dermatitidy, nežádoucí reakce po požití potravin a podání léků a po bodnutí hmyzem. (Bartůňková, 2011)

Pacienti na alergologii dostávají dotazníky, kde odpovídají na otázky týkající se jejich domova a přítomnosti zvířat, pracovního prostředí, koníčků, stravovacích návyků a

užívání léků a návykových látek. (Bartůňková, 2011) U pylových alergií je důležité období výskytu obtíží a porovnání údajů s pylovým kalendářem. (Bartůňková, 2019)

#### **4.4.2 Klinický obraz**

Alergická reakce může postihnout řadu různých orgánů. Pokud alergen požijeme či aplikujeme pomocí injekce, dochází častěji k systémové reakci. Lokální reakce nastává převážně po vdechnutí či kontaktem i s nepatrnou dávkou alergenu. (Bartůňková, 2011)

Mezi nejčastější projevy alergického onemocnění patří alergická rýma, která může být buď sezónní u pylových alergií, nebo celoroční při přecitlivělosti na roztoče a zvířecí alergeny. Projevem je vodnatý výtok z nosu, svědění, kýchání a nadměrná produkce slz. (Bartůňková, 2011)

Druhým nejčastějším projevem onemocnění je atopický ekzém, jehož etiologie je multifaktoriální. (Bartůňková, 2011) V etiopatogenezi se uplatňuje geneticky vrozená atopie a porušená bariérová funkce, která usnadňuje průnik alergenů do vnitřního prostředí a nedostatečně chrání před jejich škodlivým působením. Ekzém se vyskytuje převážně v loketních a podkolenních jamkách, na zápěstí a krku, dále na prsních bradavkách a na očních víčkách. Tyto projevy bývají doprovázeny enormním svěděním a suchostí kůže. (Bartůňková, 2019)

Astma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, které se projevuje dušností, hvízdavým dýcháním, kašlem a pocitem tíže na hrudi. Příčinou záchvatu může být alergen, tělesná námaha, virová infekce, chlad, chemické látky a další. (Bartůňková, 2011) Zánětu s alergickým podkladem se nejvíce účastní eosinofilní granulocyty a nastupuje na IgE zprostředkovanou reakci po kontaktu s vyvolávajícím alergenem. Existuje i zánět nealergický, který je ale méně častý. (Bartůňková, 2019)

Alergie na hmyzí bodnutí se projevuje převážně pouze lehkou lokální formou jako je otok, zarudnutí a svědění. Může ale i dojít k závažnějšímu postižení, kdy reakce zasahuje i jiné orgány, a dochází ke vzniku projevů na kůži i sliznicích. Mezi příznaky se řadí rýma, kašel, bolesti břicha, průjem, zvracení, závratě a další. Nejzávažnější systémovou reakcí, kdy je vlivem poruchy prokrvení centrálního nervového systému způsobena ztráta vědomí, je anafylaktický šok. (Bartůňková, 2011)

U potravinových alergií se setkáváme s celou řadou projevů. Mezi nejčastější obtíže patří atopický ekzém, edémy a gastrointestinální potíže. Objevuje se ale i astma, alergická rýma, celková anafylaxe a migréna. Projevy této alergie často vymizí v dětství po specifické dietě, známy jsou ale i celoživotní potravinové alergie, které se týkají například

ořechů a mořských plodů. Tento typ alergického onemocnění je velmi obtížně diagnostikován. (Bartůňková, 2011)

#### 4.4.3 Kožní testy

Kožní testy jsou základním diagnostickým vyšetřením k průkazu senzibilizovaných mastocytů v kůži. Provádějí se za pomoci podezřelého alergenu a sleduje se, zda došlo k tvorbě komplexu se specifickým receptorem IgE protilátky, která je navázaná na žírnou buňku (mastocyt). Pokud dojde k vazbě, alergen přemostí dvě sousední molekuly a aktivuje mastocyt, který reaguje vyplavením mediátorů. Pozitivní test se tedy projevuje otokem, začervenaním a svěděním kůže. Kožní testy se hodnotí 5 až 20 minut po aplikaci alergenu, případně až druhý den k testování pozdní reakce. (Bartůňková, 2011)

Základním a nejužívanějším alergologickým kožním testem je takzvaný prick test, který se provádí na volární straně předloktí, výjimečně na zádech. Nejdříve se kůže vydesinfikuje alkoholem a poté se tam umístí kapka standardizovaného alergenového extraktu. Lancetou se provede vpich přes tuto kapku a dojde k porušení kůže. Alergen tak pronikne do místa reakce. (Bartůňková, 2019) Doporučená vzdálenost mezi jednotlivými vpichy je 5 cm. (Bartůňková, 2011)

Intradermální test je prováděn za pomoci intradermálních injekcí s dávkou standardizovaného alergenového extraktu. (Bartůňková, 2011) Dnes se provádí k diagnostice alergií na hmyzí jedy a některé léky. (Bartůňková, 2019) Vzdálenost mezi jednotlivými intradermálními testy by měla být 6 cm. (Bartůňková, 2011)

V obou případech hodnotíme, zda došlo k vytvoření pupenu. U prick testů vznikají v případě positivity puchýřky o velikosti 2 – 3 mm v průměru a u testů intradermálních by mělo dojít k tvorbě pupenu o velikosti 5 mm a většího. (Bartůňková, 2011) Při testování by se také vždy měla provádět pozitivní a negativní kontrola. Jako negativní kontrolu lze použít roztok, ve kterém je alergen rozpuštěn a jako pozitivní kontrola se používá například histamin. (Bartůňková, 2019)

Kožními testy diagnostikujeme nejčastěji alergie způsobené vzdušnými alergeny a alergeny jedu blanokřídlého hmyzu. U jiných alergií mají kožní testy nižší specifitu. (Bartůňková, 2019)

Kožní testy mají také oproti stanovení sIgE v séru (viz dále) vyšší senzitivitu a jejich provedení je levnější a rychlejší. Mezi nevýhody patří nižší specifita a riziko nežádoucí reakce či přímo anafylaxe. Z tohoto důvodu se neprovádějí u pacientů s vážnými chorobami a nemocemi kůže. (Bartůňková, 2011)

#### 4.4.4 Laboratorní stanovení koncentrace IgE protilátek

Stanovení koncentrace celkové hladiny IgE v krvi patří k orientačním vyšetřením. Ačkoliv tento parametr úzce souvisí s přítomností alergického onemocnění u vyšetřovaného jedince, zvýšené hodnoty nalézáme i u jiných onemocnění jako je například alergická bronchopulmonální aspergilóza, AIDS, hyper IgE syndrom a parazitární onemocnění. Celkové IgE v séru má specifitu 90 %, ale senzitivita je pouze 30 – 40 %. Vzhledem k nízké senzitivitě tohoto stanovení nemusí mít řada alergiků celkové IgE v séru zvýšeno, IgE navázané ve tkáních takto nezměříme. Fyziologické hodnoty celkového IgE v séru u dospělých jsou 50 – 150 IU/ml, u dětí se liší dle věku. (Bartůňková, 2011)

Lepší senzitivity docílíme stanovením specifických IgE protilátek (sIgE). (Bartůňková, 2011) Takto můžeme detekovat senzibilizaci IgE protilátek k jednotlivým alergenům. (Bartůňková, 2019) Pro diagnostiku se využívají nativní alergeny nebo rekombinantní alergeny. Nativní alergeny jsou izolovány z původních přírodních zdrojů a vysoce purifikovány. Jedná se tedy o přírodní extrakty alergenových molekul. Tento způsob získání alergenů ale není vždy možný nebo vhodný, a tak se vyvinuly rekombinantní alergeny. Vznikají odvozením aminokyselinové sekvence požadované antigenové molekuly a její umělou syntézou in vitro, která je buď chemická, nebo se provádí pomocí genového inženýrství, kdy je gen pro určitý antigen vnesen do produkční buňky, ve které pak probíhá proteosyntéza. Produktem je vysoce čistá molekula, což ale může být zároveň nevýhodou. Většina rekombinantních alergenů je totiž lineárních a s původní alergenovou molekulou se shoduje pouze v primární a maximálně sekundární konformaci. Pokud jsou tedy vyšetřované protilátky namířené proti konformačnímu epitopu, nelze je pomocí rekombinantních alergenů detekovat. (Bartůňková, 2011) Testy se dále rozdělují dle počtu vyšetřovaných alergenů na tzv. singleplex metody, kdy se stanovuje sIgE pouze proti jednomu konkrétnímu alergenovému extraktu nebo komponentě, a tzv. multiplex metody, u kterých dokážeme stanovit sIgE vůči několika alergenům najednou. Multiplexové metody se provádějí ve formě micro-arraye nebo macro-arraye, kde můžeme najednou stanovit koncentraci sIgE proti několika stovkám alergenům a molekulám. Vzhledem k tomu, že tyto rozsáhlé metody se u nás v současné době používají stále častěji a získáváme tak velké množství výsledků, je nutné zvládat správnou interpretaci umět rozlišit asymptomatickou senzibilizaci a senzibilizaci s přítomností alergických projevů. (Bartůňková, 2019)

Stanovení sérových sIgE je bezpečnější a specifitější než klasické kožní testy, zároveň je ale méně citlivé a nákladnější. Vzhledem k tomu, že nemají žádné kontraindikace,

bývají používány zejména u dětských pacientů, pacientů s atopickým ekzémem a pacientů s jiným závažným onemocněním. (Bartůňková, 2011)

#### **4.4.5 Expoziční testy**

Expoziční testy jsou takzvaným zlatým standardem při diagnostice pacientů s potravinovými alergiemi. Vzhledem k velké rizikovosti stanovení provádíme expoziční testy ve zdravotnických zařízeních pod dohledem odborníka na poskytování první pomoci. (Bartůňková, 2011)

Pacientovi se podá standardní množství podezřelé potravin v želatinové kapsli a stejné množství placebo, jako je například cukr, tak, že pacient ani přítomný zdravotník neví, ve které kapsli je placebo, a ve které je vyšetřovaný alergen. Hodnotí se případná klinická reakce a spirometrie. (Bartůňková, 2011)

### **4.5 Léčba alergie**

Alergie se léčí pomocí tří základních postupů. První je eliminace příčinného alergenu, druhý je farmakoterapie a třetím postupem je alergenová imunoterapie. Tyto postupy se liší dle konkrétního alergenu a onemocnění. (Bartůňková, 2019)

#### **4.5.1 Eliminace alergenu**

Základním kamenem účinné terapie všech alergických onemocnění je snaha o eliminaci alergenů zodpovědných za potíže pacienta. U některých alergenů lze eliminace poměrně snadno dosáhnout, u jiných to už může být problém. Jedná se například o inhalační alergeny, kdy můžeme vystavení alespoň omezit. U pylových alergií se jedná o omezení pobytu ve volné přírodě v době příslušné sezony. (Bartůňková, 2019)

Při alergii na roztoče prachu se musí dbát na zařízení bytu a jeho úklid. Roztoče dále nacházíme v lůžkovinách, v srsti a peří zvířat. Nutností je tak využívat speciální povlaky či alespoň jejich časté praní a odstranění zvířete. Je důležité mít na paměti, že k alergickým projevům dochází i nepřímým kontaktem se zvířecími alergeny, které mohou v prostředí a na oděvech přetrvávat poměrně dlouhou dobu. (Bartůňková, 2019)

Dominance eliminace alergenu se dále objevuje u profesionální alergie, kdy je často nutné trvat na změně zaměstnání, u potravinové alergie a u přecitlivělostí na určité léky. (Bartůňková, 2019)

#### **4.5.2 Farmakoterapie**

Farmakoterapie alergií je vzhledem k různorodosti těchto onemocnění velmi rozsáhlá. (Bartůňková, 2019)



Nejdůležitějšími zástupci jsou antihistaminika, což jsou léky inhibující receptory pro histamin a blokují tak zánětlivé procesy. Dělíme je na antihistaminika první a druhé generace, kdy v současné době používáme spíše ta druhé generace, jelikož antihistaminika první generace vykazují sedativní účinky a užívají se pouze v určitých případech, kdy je tento účinek spíše žádoucí (například pruritus u atopického ekzému). Nejčastěji se užívají perorálně, ale jsou případy, kdy může být podání i parenterální. Existují i lokální antihistaminika ve formě očních kapek, mastí či nosních sprejů. Ve všech případech by se antihistaminika měla podávat pouze v době výskytu alergických projevů. (Bartůňková, 2019)

Dalším užívaným farmakem při alergiích jsou kortikoidy. Kortikoidy mají silný protizánětlivý účinek a při alergických onemocněních je používáme spíše lokálně, protože dlouhodobé systémové podávání má závažné nežádoucí účinky. Toto podání se krátkodobě užívá pouze při anafylaxi, dlouhodobě u těžkých forem astmatu, atopického ekzému a chronické urtikárie. V těchto případech se snažíme o maximální zmírnění nežádoucí účinků. Jak již bylo řečeno, u většiny alergií si vystačíme pouze s lokálním užitím kortikoidů ve formě mastí či inhalační, intranazální a oční aplikace. (Bartůňková, 2019)

Stabilizátory membrány žírných buněk jsou léky, které inhibují degranulaci mastocytů a zamezují tak vyplavení prozánětlivých mediátorů. Tyto léky podáváme nejčastěji ve formě očních kapek a nosních sprejů. (Bartůňková, 2019)

U alergického průduškového astmatu dále využíváme antileukotrieny, které nejčastěji působí na receptor pro leukotrieny. Tento lék se dá ale použít i u jiných alergických onemocnění. (Bartůňková, 2019)

#### **4.5.3 Specifická alergenová imunoterapie**

Specifická alergenová imunoterapie (AIT) je pro některé alergické onemocnění jedinečnou možností, jak docílit zmírnění příznaků a tím omezit částečně či trvale potřebu farmakoterapie. AIT dokáže zlepšit celkový zdravotní stav pacienta i po ukončení této léčby a působit preventivně proti zhoršování alergické choroby. (Bartůňková, 2019)

AIT spočívá v subkutánním či sublingválním podávání příčinného alergenového extraktu v přesně daných množstvích dle schématu. V konečném stadiu léčby dosáhneme takzvané udržovací dávky, kterou je nejvyšší tolerovaná dávka alergenu. Tato dávka je podávána dlouhodobě (většinou po dobu 3 let) k navození imunologických změn. (Bartůňková, 2019)

AIT je nejčastěji indikována u anafylaxe při alergii na jed blanokřídlého hmyzu, alergické rhinokonjunktivitidy a u alergického průduškového astmatu. Tento postup má ale

také určité kontraindikace jako je například maligní onemocnění či těžké imunodeficitní stavy. AIT také neprovádíme u dětí do 5 let a u těhotných žen, kdy je vyšší riziko nežádoucích reakcí. (Bartůňková, 2019)

Vzhledem k tomu, že AIT zabraňuje rozvoji alergické nemoci či jejímu zhoršení, je důležité zahájit léčbu již v raných stádiích nemoci, aby byl zajištěn maximální účinek. Tato terapie by měla být ukončena po jednom roce, kdy nedosahujeme žádných výsledků, při nespolupráci pacienta a při vzniku nežádoucích reakcí. (Bartůňková, 2019)

AIT se neprovádí u potravinových alergií, tato oblast je stále ve výzkumu. (Bartůňková, 2019)

## 5 MULTIPLEXOVÉ METODY ISAC A ALEX

Kvalita diagnostiky alergií se významně zlepšila díky znalostem o molekulové struktuře alergenů. Tyto znalosti umožnily rozeznávání skutečné senzibilizace od zkřížené reaktivity. V současné době může být testování prováděno singleplexovými nebo multiplexovými metodami. (Buzzulini, 2019)

Singleplexové metody indikuje lékař po zhodnocení anamnézy, klinických příznaků, výsledků kožních testů a hodnot specifických IgE proti alergenovým extraktům. Na základě toho alergolog rozhodne, proti kterým molekulám alergenu bude probíhat singleplexové stanovení. Tato metoda může být kvantitativní, je snadno automatizovaná, ale některé senzibilizace mohou uniknout. (Buzzulini, 2019)

Multiplexové metody nabízí širší pohled na senzibilizaci pacienta. Provádí se v případech, kdy chce lékař vyšetřit více než 12 – 13 alergenových molekul, nebo u dětí z důvodu malé spotřeby séra. Na rozdíl od singleplexových metod jsou multiplexové metody indikovány jako první testování pacienta. Lékař tak nejdříve získá široký panel výsledků. Nevýhodou multiplexových metod je nižší senzitivita a možnost pouze semikvantitativního hodnocení. (Buzzulini, 2019)

### 5.1 Metoda ISAC

První multiplexovou metodou je tzv. micro-array stanovení ISAC, které umožňuje testování 112 různých rekombinantních i nativních alergenových molekul z malého množství patientského séra. (Buzzulini, 2019) Stanovuje se tedy přítomnost specifických IgE imunoglobulinů proti všem těmto molekulám. (Van Hage, 2017)

Princip metody ISAC je podobný principu singleplexových metod. Rozdílné alergenové molekuly jsou v malém množství ukotveny v tripletech na skleněném sklíčku s polymerizovaným povrchem (singleplexové metody spočívají v ukotvení jednoho imobilizovaného alergenu na velkou celulóзовou matrix). Po inkubaci s patientským sérem, kdy dojde k případnému navázání specifických IgE protilátek na příslušné alergenové molekuly, se na vzniklé imunokomplexy naváže přidaná značená protilátka proti lidskému IgE. (Van Hage, 2017)

Průběh reakce je sledován pomocí speciálního scanneru, který vytváří obrazové zpracování. Obrázky naskenovaného čipu jsou analyzovány příslušným softwarem MIA (Microarray Image Analysis Software) a výsledky se vydávají ve formě takzvaných ISU

jednotek (The ISAC Standardized Units for specific IgE). (Phadia AB U, 2009) Měří se intenzita vzniklé fluorescence. (Van Hage, 2017)

Velkou výhodou této metody je minimální množství potřebného séra. Mezi nedostatky se řadí možnost pouze semikvantitativního hodnocení v podobě ISU jednotek, nízký lineární rozsah, nedostupnost všech alergenových zdrojů a vysoká cena jednoho stanovení. (Van Hage, 2017)

## 5.2 Metoda ALEX

Alex je diagnostická metoda ve formě čipu, která byla vynalezena rakouskou firmou MacroArrayDX. Čip obsahuje 157 alergenových extraktů a 125 molekulárních komponent a stává se tak metodou s nejširším rozsahem testování. Velikou výhodou metody ALEX je inhibice CCD reaktivity. (Heffler, 2018)

Různé alergenové extrakty a komponenty jsou ukotveny na nitrocelulóзовou membránu v kazetě čipu. Při inkubaci roztoku složeného z patientského séra a diluentu, jenž obsahuje CCD inhibitor, dochází k navázání specifických IgE protilátek k příslušným molekulám. Poté je na řadě promývání a přidání značené protilátky proti lidskému IgE. Značkou je v tomto případě alkalická fosfatáza. Po další inkubaci a promývání se přidává enzymový substrát a intenzita zbarvení je měřena pro každý alergen zvlášť CCD kamerou. Vyhodnocení je prováděno pomocí speciálního softwaru a hodnoty vycházejí ve speciálních jednotkách ( $kU_A/mL$ ). Pomocí metody Alex se také změří hodnota celkového IgE. (Heffler, 2018)

Na rozdíl od metody ISAC je zde, kromě inhibice zkřížené reaktivity CCD molekulami, měřena každá alergenová molekula zvlášť (ISAC měří triplety molekulárních komponent) a výsledky jsou kvantifikovány. (Buzzulini, 2019)

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

Praktická část mé bakalářské práce obsahuje postup stanovení specifických IgE imunoglobulinů proti různým alergenovým molekulám v patientských vzorcích pomocí metody ImmunoCAP ISAC<sup>®</sup> od švédské firmy Thermo Fisher Scientific a metody ALEX<sup>2</sup><sup>®</sup> - Allergy Explorer od rakouské firmy Macro Array Diagnostics GmbH. Součástí je také grafické porovnání četností pozitivních výsledků mezi oběma metodami pro vybrané alergeny a jejich zhodnocení.

## **6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE**

Cílem této bakalářské práce je zjistit účinnost CCD inhibitoru, použitého u metody ALEX, srovnáním četností pozitivních výsledků hladin specifických IgE imunoglobulinů proti různým alergenovým molekulám naměřených dvěma různými metodami.

## **7 VÝZKUMNÉ OTÁZKY, VÝZKUMNÉ PROBLÉMY**

Výzkumná otázka č. 1: Je výskyt positivity u nativních alergenů shodný mezi metodou ISAC a ALEX?

Výzkumná otázka č. 2: Snižuje přítomnost CCD inhibitoru u metody ALEX četnost pozitivních výsledků u nativních alergenů?

Výzkumná otázka č. 3: Má přítomnost CCD inhibitoru vliv na četnost pozitivit u alergenů testujících přítomnost anti-CCD protilátek?

## **8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

K vypracování této bakalářské práce byly využity výsledky z Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň získané měřeními pacientů pomocí vyšetřovacích metod ISAC a ALEX.

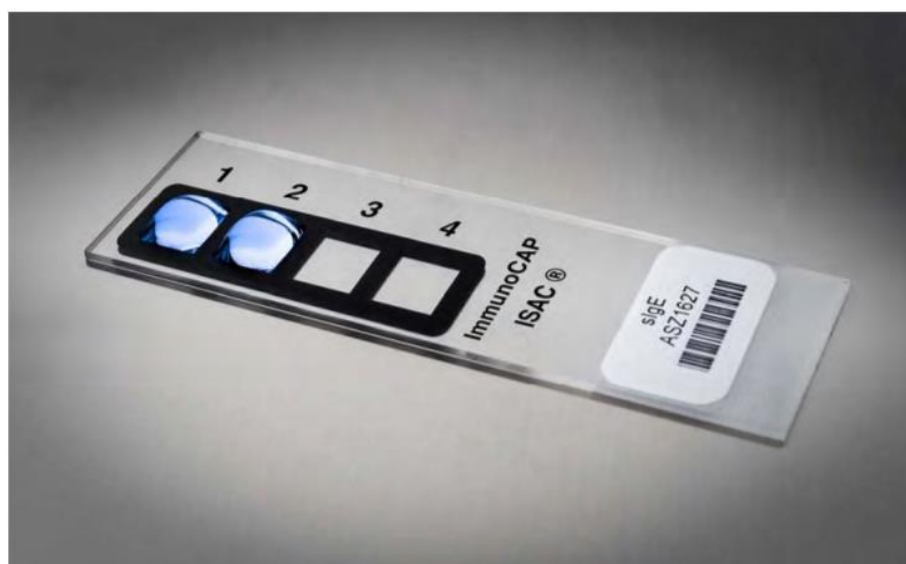
Celý soubor tvoří výsledky hladin specifických IgE imunoglobulinů proti různým alergenovým molekulám naměřených metodami ISAC a ALEX u celkem 199 pacientů FN Plzeň.

## 9 METODIKA PRÁCE

### 9.1 ImmunoCAP ISAC

ImmunoCAP ISAC je in vitro test na semikvantitativní vyšetření specifických IgE protilátek v lidském séru nebo plazmě. Jedná se o imunoanalýzu na pevné fázi.

Obrázek 2 ImmunoCAP ISAC



Zdroj: <https://phadia.com/>

K vyšetření se používá sérum nebo plazma žilní či kapilární krve, které jsou po krátkou dobu skladovány při pokojové teplotě. V případě, že krev potřebujeme skladovat po dobu maximálně jednoho týdne, je nutné poskytnout prostředí s teplotou 2 – 8 °C. Při delším skladování je potřebná teplota skladování – 20 °C. Při skladování je třeba se vyhnout opětovnému zmrazování a rozmrazování vzorku.

Test se provádí pomocí komerčně vyráběného kitu (ImmunoCAP ISAC Starter Kit IgE a ImmunoCAP ISAC Assay Kit IgE), který obsahuje 5 čipů se čtyřmi reakčními ploškami. Jeden kit se tedy dá využít na 20 stanovení. Dále jsou součástí kitu potřebné reagenzie a to pufr Component A, lahvička s protilátkou proti lidskému IgE značená fluorescenční značkou (detekční IgE protilátka) a lahvička s lidským kontrolním sérem. Lahvičky s detekční protilátkou a kontrolním sérem jsou připraveny k použití, pufr Component A je nutné před použitím naředit destilovanou vodou v poměru 1:20 za vzniku roztoku A. Na jednu analýzu je třeba připravit 700 ml tohoto roztoku smícháním 35 ml pufru Component



A a 665 ml destilované vody. ImmunoCAP ISAC Starter Kit IgE obsahuje navíc dvě promývací nádoby (každá pro 10 čipů), magnetickou míchací tyčinku a vlhkou komůrku s kapacitou pro 26 čipů.

Čipy se před samotným stanovením musí promýt v promývací nádobě s vyjímatelným držákem pro 10 čipů. Čipy se do tohoto držáku položí a spolu s 220 ml roztoku A a magnetickou míchací tyčinkou se uloží na dno promývací nádoby. Celá nádoba se vloží na magnetické míchadlo a obsah se nechá důkladně míchat po dobu 60 minut. Po uplynuté době se držák s čipy přemístí do druhé promývací nádoby, která obsahuje 220 ml destilované vody a magnetickou míchací tyčinku. Nádoba se opět položí na magnetické míchadlo a obsah se nechá promíchávat po dobu 5 minut. Poté se držák s čipy vyjme a položí se na buničitou vatu, kde se sklíčka nechají uschnout. Bezprostředně po uschnutí jsou čipy připravené k následnému zpracování a testování.

Připravené čipy se umístí do vlhké komůrky reakčními ploškami směrem vzhůru. Na každou reakční plošku se napipetuje 20  $\mu$ l patientského vzorku (na jednom čipu se testují 4 různé patientské vzorky) tak, aby nedošlo ke styku pipetovací špičky a reakční plošky, a aby bylo sérum nebo plazma rozprostřeno po celé ploše reakčního místa. S každou sérií je doporučeno také použití jedné reakční plošky na testování kontrolního séra. Vlhká komůrka se opatrně uzavře tak, aby nedošlo ke smíchání jednotlivých vzorků, a inkubuje se při pokojové teplotě 120 minut.

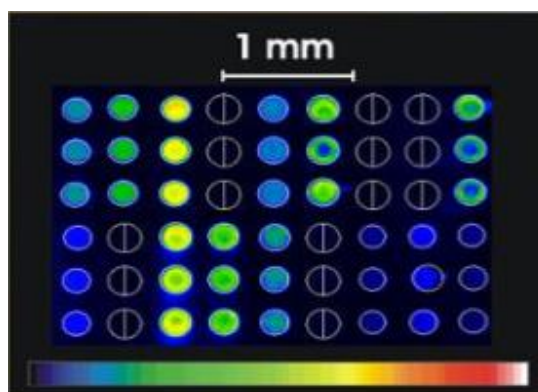
Po inkubaci se sklíčka z vlhké komůrky opatrně vyjmou a poklepáním na dlouhou stranu čipu dojde ke stékání jednotlivých vzorků na buničitou vatu. Dbá se při tom na to, aby se vzorky nedostaly na jinou reakční plochu. Čipy se opět stejným způsobem promyjí nejdříve v promývací nádobě s roztokem A po dobu 10 minut, dále v promývací nádobě s 220 ml destilované vody po dobu 5 minut. Poté se sklíčka opět nechají kompletně uschnout na vzduchu.

Dalším krokem je navázání detekční protilátky. Suché čipy se umístí do vlhké komůrky reakčními ploškami vzhůru. Na každou reakční plošku se napipetuje 20  $\mu$ l detekční protilátky a vlhká komůrka se uzavře. Následuje 60 minut inkubace v temnu.

Po uplynutí doby se čipy z komůrky vyjmou a opět se poklepáním na dlouhou stranu sklíčka odstraní detekční protilátka. Další možností je jemné opláchnutí čipu destilovanou vodou. Dále se provádí promytí čipů stejným postupem jako v předešlých krocích, tedy 10 minut v 220 ml roztoku A a 5 minut v 220 ml destilované vody. Nakonec se sklíčka nechají kompletně uschnout na vzduchu a pak jsou čipy připravené pro snímání scannerem a k vyhodnocení výsledků.

Jak již bylo řečeno, naskenované obrázky čipu jsou analyzovány speciálním softwarem MIA, který je instalován servisními specialisty.

**Obrázek 3 ImmunoCAP ISAC – počítačové zobrazení**



Zdroj: <https://docplayer.net/>

Výsledky jsou semikvantitativní a vyjadřují se pomocí hodnoty ISU jednotek. Tyto hodnoty se dělí na čtyři třídy a to způsobem, který je znázorněn v Tabulce 1.

**Tabulka 1 Rozdělení tříd jednotek ISU a jejich odpovídající hladina specifických IgE protilátek**

Třída ISU jednotek	Hodnoty	Hladina specifických IgE
0	< 0,3	Nedetekovatelná nebo velmi
1	≥ 0,3 - < 1,0	Nízká
2	≥ 1,0 - < 15	Vyšší až vysoká
3	≥ 15	Velmi vysoká

Zdroj: <https://phadia.com/>

Výsledky testování nad 0,3 ISU se dají považovat za hodnoty potvrzující alergii. Lidé, kteří mají u každého alergenu hodnoty ISU jednotek nižší než 0,3, pravděpodobně žádnou přecitlivělostí na testované alergeny netrpí.

## 9.2 ALEX - Allergy Explorer

Metoda ALEX je kvantitativní in vitro diagnostický test pro měření alergen-specifických IgE protilátek a semikvantitativní in vitro diagnostický test pro měření celkového IgE v lidském séru nebo plazmě. Také se jedná o imunoanalýzu na pevné fázi.

#### Obrázek 4 ALEX – Allergy Explorer



Zdroj: <https://macroarraydx.com/>

K vyšetření se používá sérum nebo plazma žilní či kapilární krve odebrané do zkumavky s heparinem nebo citrátem, které se může skladovat maximálně po dobu jednoho týdne při teplotě 2 – 8 °C. Pro delší skladování je třeba zajistit prostředí s teplotou -20 °C. Před vyšetřováním je třeba vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu.

Stanovení se provádí pomocí komerčně vyráběného kitu ALEX<sup>2</sup> Kit, jehož součástí je ALEX<sup>2</sup> Cartridge (dva blistry po 10 čipech) již připravená k použití. Z jednoho kitu je tedy možno provést 20 stanovení. Další součástí je ALEX<sup>2</sup> Sample Diluent, ALEX<sup>2</sup> Washing Solution, ALEX<sup>2</sup> Detection Antibody, ALEX<sup>2</sup> Substrate Solution a ALEX<sup>2</sup> Stop Solution. Toto všechno je již připravené k použití a celý kit by se měl skladovat při teplotě 2 – 8 °C. Mezi další vyžadované zařízení patří Arrayholder, Lab Rocker, ImageXplorer, vlhká inkubační komůrka, software Raptor analysis a počítač.

Nejdříve je třeba připravit vlhkou komůrku tak, že se na dno inkubační nádoby vloží buničitá vata a nechá se nasáknout destilovanou vodou. Nádoba se pak uzavře víkem. Požadované množství čipů se umístí na držák (Arrayholder) a na každý se napipetuje 400 µl ředící roztok (ALEX<sup>2</sup> Sample Diluent). Dále se na čip přidá 100 µl patientského séra či plazmy a je třeba zajistit, aby výsledný roztok v čipu byl rovnoměrně rozprostřený. Držák s čipy se umístí na míchadlo a nechá se 2 hodiny inkubovat při 8 rpm v inkubační nádobě. Po uplynutí této doby se vzorky z čipů opatrně slijí do odpadní nádoby. Tento postup zajistí CCD inhibici na 85 %, pokud je vyžadována inhibice vyšší, je třeba 100 µl patientského

vzorku zředit 400  $\mu$ l ředícím roztokem a poté inkubovat 30 minut. Dále se postupuje stejně. Toto ředění navíc může zvýšit inhibici až na 95 %.

Dalším krokem je promývání. Na každý čip se přidá 500  $\mu$ l promývacího roztoku (ALEX<sup>2</sup> Washing Solution) a nechá se inkubovat na míchadle při 8 rpm 5 minut. Promývací roztok se z čipů opatrně slije do odpadní nádoby a zbytky roztoku v čípech se důkladně vyklepají na suchou buničinu. Promývání se ještě dvakrát zopakuje.

Pak je na řadě přidat 500  $\mu$ l roztoku detekční protilátky (ALEX<sup>2</sup> Detection Antibody) a opět vložit čipy do inkubační komůrky na míchadlo a inkubovat při 8 rpm 30 minut. Po inkubaci se roztoky z čipů slijí do odpadní nádoby a opět se opatrně setřou kapky v okolí reakční plošky pomocí buničiny.

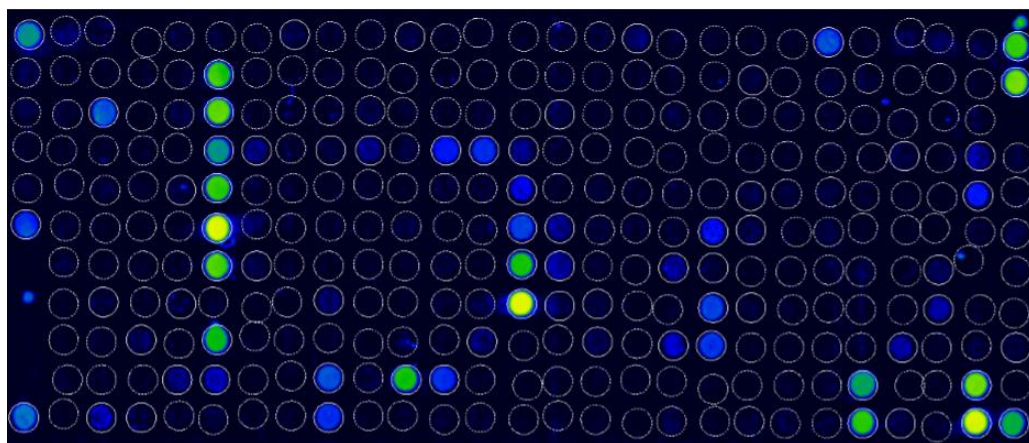
Čipy se opět promyjí, ale tentokrát se postup zopakuje pětkrát.

Na promyté čipy se napipetuje 500  $\mu$ l roztoku substrátu (ALEX<sup>2</sup> Substrate Solution) tak, aby byla roztokem pokryta celá reakční ploška, a nechá se to inkubovat 8 minut bez míchání. Časovač je třeba zapnout již při plnění prvního čipu. Přesně po 8 minutách je třeba přidat 100  $\mu$ l ALEX<sup>2</sup> Stop Solution na čipy ve stejném pořadí, jako byl pipetován roztok substrátu. S čipy se pak opatrně zatřeše, aby se zajistilo rovnoměrné rozprostření obou roztoků. Nakonec se roztoky z čipů slijí a setřou se přebývající kapky.

Poté se na každý čip napipetuje 500  $\mu$ l promývacího roztoku a na míchadle v inkubační nádobě se nechají inkubovat při 8 rpm po dobu 30 sekund. Promývací roztok se z čipů opatrně slije do odpadní nádoby a zbytky roztoku v čípech se důkladně vyklepají na suchou buničinu. Čipy se nechají uschnout na vzduchu při pokojové teplotě, to může trvat až 45 minut. Jen kompletně suché čipy mohou poskytnout správné výsledky.

Suché čipy jsou skenovány pomocí ImageXplorer a analyzovány softwarem Raptor analysis. Alergen-specifické IgE protilátky jsou vyjádřeny jako hladiny IgE v kU<sub>A</sub>/ml, celkové IgE v kU/ml. Pacientům, kteří netrpí alergií, vycházejí výsledky pod 0,3 kU<sub>A</sub>/ml pro jednotlivé alergeny.

**Obrázek 5 ALEX – Allergy Explorer – počítačové zobrazení**



Zdroj: <https://macroarraydx.com/>

## 10 VÝSLEDKY/ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Zhodnocení účinnosti CCD inhibice použité u metody ALEX jsem provedla pomocí porovnání četností pozitivních výsledků u vybraných alergenů mezi metodami ISAC a ALEX.

Ve sledovaném souboru 199 pacientů FN Plzeň byly výsledky stanovení hladin specifických IgE protilátek proti různým alergenovým molekulám získané měřením pomocí obou metod. Z alergenů měřených pomocí metody ISAC jsem vybrala pouze ty, které jsou nativní. To znamená, že se jedná o přírodní, vysoce čištěné alergenové molekuly, u kterých hrozí vysoká CCD reaktivita. U výsledků získaných měřením pomocí metody ALEX jsem také vybrala pouze ty alergeny, které jsou ve formě extraktů, a je zde vysoké riziko CCD reaktivity. Z těchto všech potenciálně zkříženě reagujících alergenů jsem vybrala ty, které jsou oběma metodám společné. Získala jsem tak několik alergenů, které se stanovují pomocí obou metod a v obou případech je zde vysoké riziko zkřížené reaktivity. Seznam vybraných alergenů je uveden v Tabulce 2.

**Tabulka 2 Seznam vybraných alergenů nebo alergenových skupin a jejich výskyt**

Alergen nebo alergenová skupina	Výskyt
Act d 1, Act d 2	Kiwi
Cor a 9	Lískový ořech
Ara h 6	Arašíd
Cup a 1	Pyly stromů
Ole e 1	
Gly m 6	Sója
Jug r 1, Jug r 2	Vlašský ořech
Ses i 1	Sezam

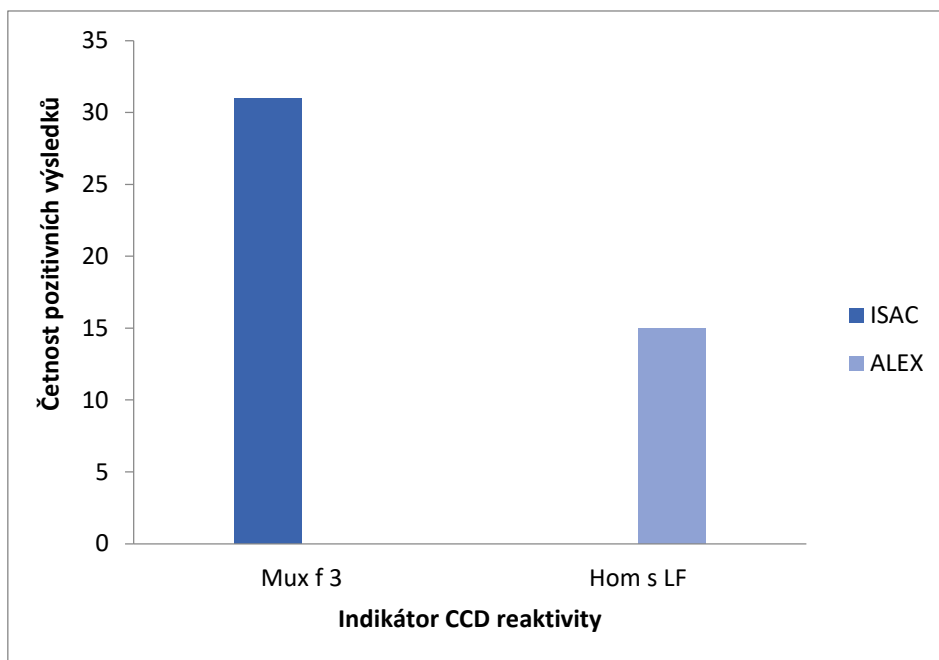
Zdroj: vlastní

Dalším krokem bylo zjištění množství pozitivních výsledků u jednotlivých alergenů měřených oběma metodami. Jako pozitivní výsledek se bere hladina specifických IgE protilátek  $\geq 0,35$  ISU u metody ISAC a  $\geq 0,35$  kU<sub>A</sub>/mL u metody ALEX. Množství pozitivních výsledků u metody ISAC jsem porovnávala s množstvím pozitivních výsledků u metody ALEX u každého alergenu a toto srovnání jsem graficky zpracovala a zhodnotila.

Úplně to samé srovnání jsem provedla i s indikátory CCD reaktivity, abych porovnála, kolik vzorků je pozitivních na CCD reaktivitu u metody ISAC a kolik jich je pozitivních u metody ALEX. Indikátor CCD reaktivity pro metodu ISAC se nazývá Mux f 3 a pro metodu ALEX to je molekula Hom s LF.

## 10.1 Indikátory CCD reaktivity

**Obrázek 6 Srovnání četností pozitivit u indikátorů CCD reaktivity mezi metodami ISAC a ALEX**

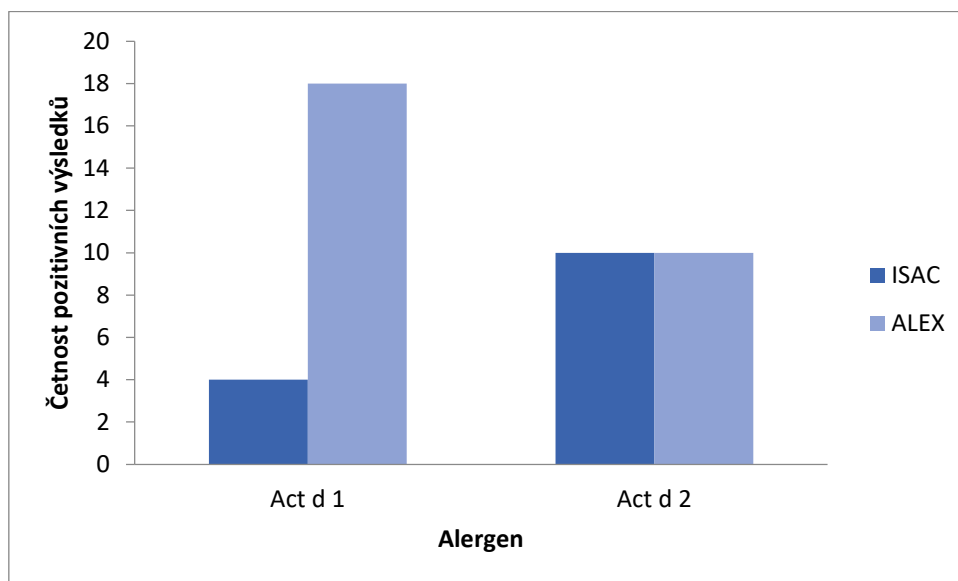


Zdroj: vlastní

Na Obrázku 6 jsem porovnávala četnosti pozitivních hodnot u indikátorů zkřížené CCD reaktivity mezi metodami. Indikátorem pro metodu ISAC je molekula zvaná Mux f 3 a pro metodu ALEX se indikátorová molekula nazývá Hom s LF. Z grafu můžeme vyčíst, že množství pozitivních výsledků je vyšší u měření metodou ISAC než u měření metodou ALEX. Metoda ISAC nám poskytla 31 pozitivních výsledků se svojí příslušnou indikátorovou molekulou, zatímco metodou ALEX jsme naměřili pouze 15 pozitivních výsledků pro CCD reaktivitu. Z toho vyplývá, že CCD inhibice, která je součástí postupu metody ALEX, je účinná a dochází ke snížení zkřížené reaktivity a tím pádem i falešné positivity.

## 10.2 Alergeny Act d 1 a Act d 2

Obrázek 7 Srovnání četností pozitivit u alergenů Act d 1 a Act d 2 mezi metodami ISAC a ALEX



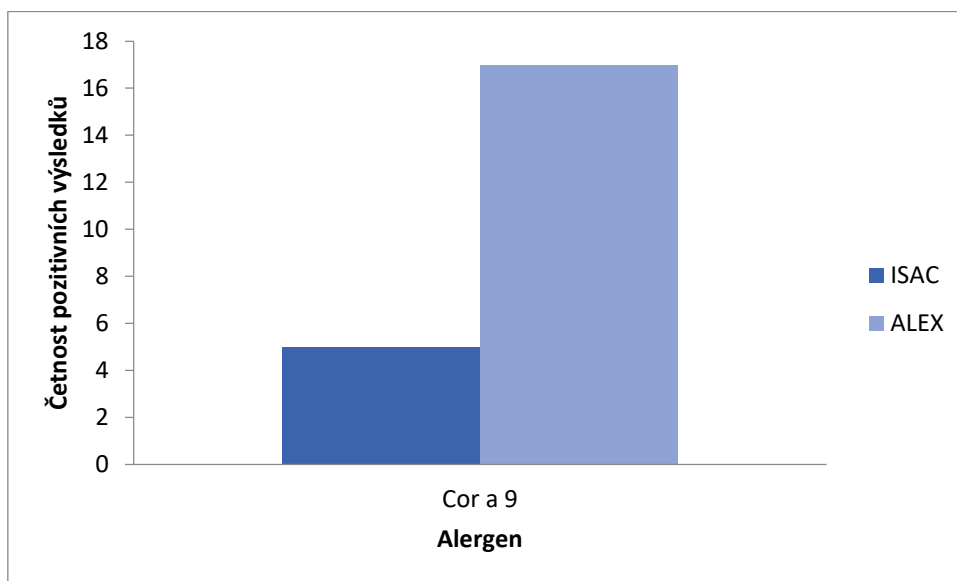
Zdroj: vlastní

Na Obrázku 7 jsem porovnávala alergeny patřící do jedné skupiny. Jedná se o alergeny vyskytující se v ovoci kiwi. Z grafického zpracování je patrné, že u alergenu Act d 1 je více pozitivních hodnot naměřeno metodou ALEX. Jedná se o 18 pozitivních hodnot, zatímco metodou ISAC jsme naměřili pouze 4 pozitivní výsledky, což je o 14 méně. U alergenu Act d 2 jsme u obou metod získali 10 pozitivních výsledků. Z výsledků hodnot pro alergeny Act d 1 a Act d 2 lze, na rozdíl od měření indikátorů CCD reaktivity, usuzovat, že CCD inhibice, prováděná při postupu metody ALEX, je neúčinná.



### 10.3 Alergen Cor a 9

Obrázek 8 Srovnání četností pozitivit u alergenu Cor a 9 mezi metodami ISAC a ALEX

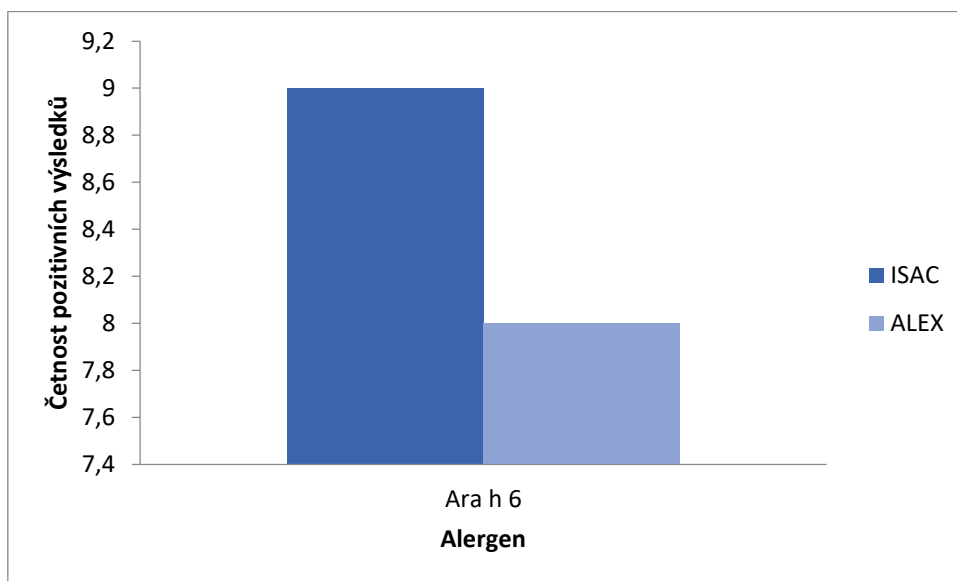


Zdroj: vlastní

Na Obrázku 8 jsem porovnávala četnosti pozitivních výsledků u alergenu ze skupiny ořechů. Tento alergen je přítomný v lískovém ořechu a nazývá se Cor a 9. Metodou ISAC jsme získali 5 pozitivních výsledků a metodou ALEX jsme získali 17 pozitivních výsledků, což je o 12 více. I v tomto případě je patrné, že CCD inhibice nesnižuje falešnou pozitivitu naměřenou metodou ISAC.

## 10.4 Alergen Ara h 6

Obrázek 9 Srovnání četností pozitivit u alergenů Ara h 6 mezi metodami ISAC a ALEX

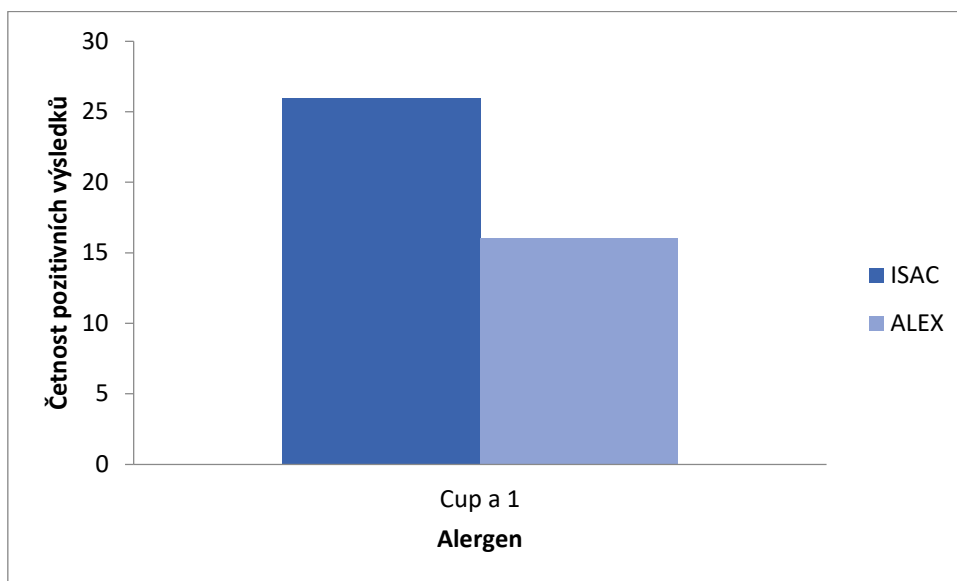


Zdroj: vlastní

Na Obrázku 9 jsem porovnávala četnosti pozitivit u alergenů, který se vyskytuje v arašídech. Jedná se o alergen Ara h 6. Metodou ISAC jsem naměřila celkem 9 pozitivních hodnot a metodou ALEX jsem získala pouze 8 pozitivních výsledků. U tohoto alergenů je patrné, že CCD inhibice zafungovala, protože více pozitivních výsledků jsem získala při měření metodou ISAC, která je zkříženou reaktivitou více ovlivněna.

## 10.5 Alergen Cup a 1

Obrázek 10 Srovnání četností pozitivit u alergenu Cup a 1 mezi metodami ISAC a ALEX

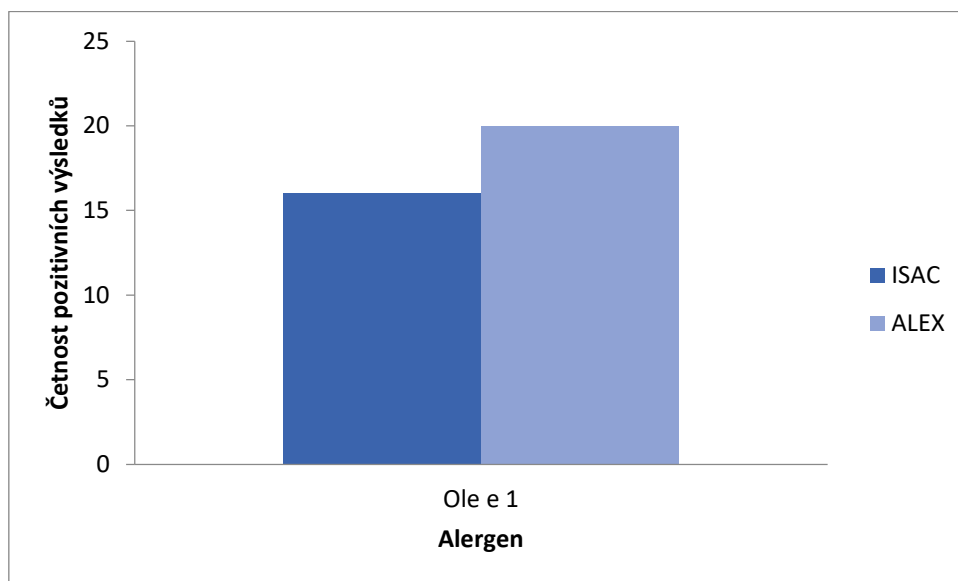


Zdroj: vlastní

Na Obrázku 10 je znázorněno porovnání četností pozitivit zjištěných měřením metodami ISAC a ALEX u alergenu ze skupiny pylů stromů. Alergen Cup a 1 je ze stromu cypřiš. Pozitivní hodnota u tohoto alergenu byla prokázána při měření metodou ISAC celkem 26krát, metodou ALEX jsme získali jen 16 pozitivních výsledků, což je o 10 méně. Z těchto výsledků lze usuzovat, že CCD inhibice u metody ALEX skutečně funguje, protože poskytla menší množství pozitivních výsledků.

## 10.6 Alergen Ole e 1

Obrázek 11 Srovnání četností pozitivit u alergenu Ole e 1 mezi metodami ISAC a ALEX

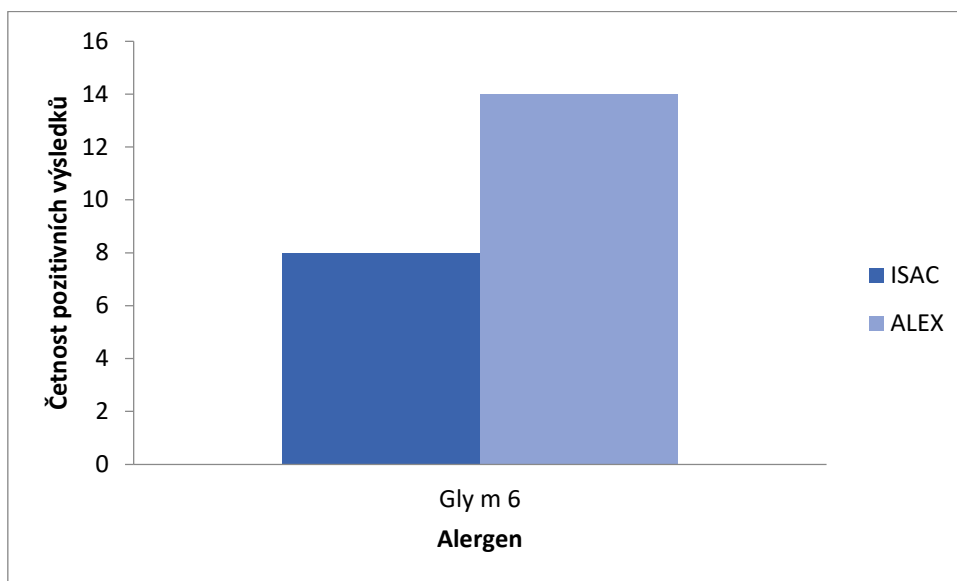


Zdroj: vlastní

Na obrázku 11 jsem porovnávala četnosti pozitivních výsledků u alergenu Ole e 1 mezi metodami ISAC a ALEX. Tento alergen je další ze skupiny pylů stromů a pochází ze stromu olivovníku. Pomocí metody ISAC jsem získala celkem 16 pozitivních výsledků a metodou ALEX jsem naměřila celkem 20 pozitivních hodnot, tedy o 4 více. CCD inhibitor nebyl v tomto případě příliš účinný vzhledem k vyššímu počtu pozitivních výsledků získaných měření metodou ALEX.

## 10.7 Alergen Gly m 6

Obrázek 12 Srovnání četností pozitivit u alergenu Gly m 6 mezi metodami ISAC a ALEX

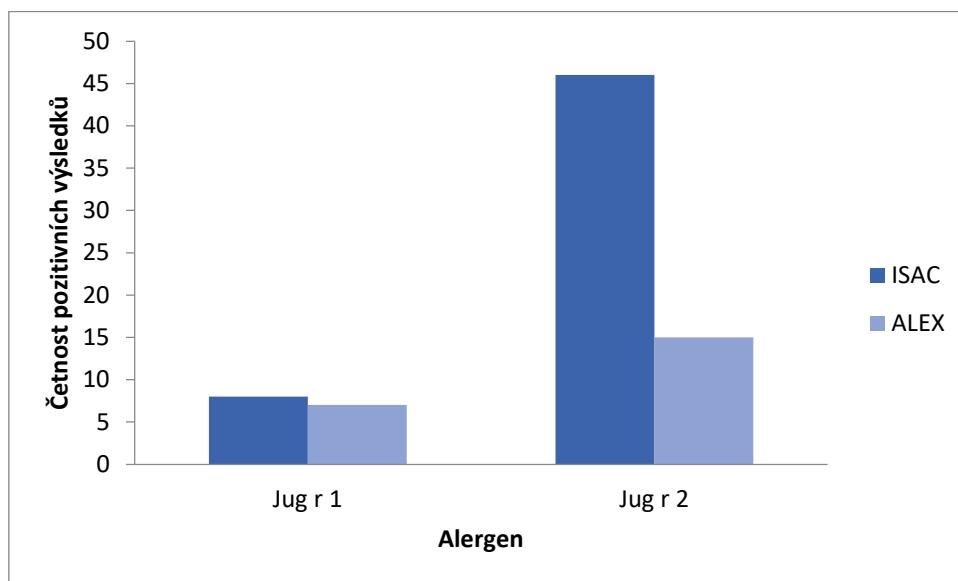


Zdroj: vlastní

Na Obrázku 12 jsem porovnávala četnosti pozitivních výsledků mezi metodami ISAC a ALEX při měření specifických protilátek proti alergenu obsaženým v sóje. Jedná se alergen Gly m 6. U tohoto alergenu bylo naměřeno metodou ISAC 8 pozitivních hodnot a metodou ALEX o 6 více, tedy celkem 14 pozitivních vzorků. K zamezení nežádoucí falešné positivity pomocí CCD inhibice tedy nedošlo.

## 10.8 Alergeny Jug r 1 a Jug r 2

Obrázek 13 Srovnání četností pozitivit u alergenů Jug r 1 a Jug r 2 mezi metodami ISAC a ALEX

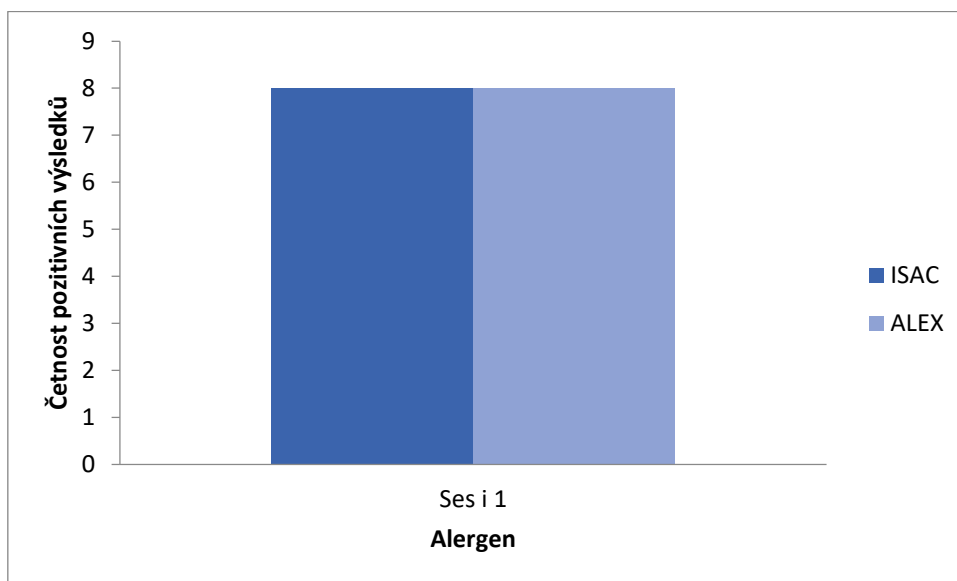


Zdroj: vlastní

Na Obrázku 13 jsem porovnávala četnosti pozitivních výsledků mezi metodami ISAC a ALEX při měření specifických IgE protilátek proti alergenům Jug r 1 a Jug r 2, které jsou obsaženy ve vlašském ořechu. U alergenů Jug r 1 jsem při měření metodou ISAC získala celkem 8 pozitivních hodnot a při měření metodou ALEX jen 7 pozitivních hodnot. U alergenů Jug r 2 jsem měřením metodou ISAC získala celkem 46 pozitivních hodnot a pomocí metody ALEX bylo pozitivních výsledků o 31 méně, tedy 15 pozitivit. Účinná CCD inhibice se tedy projevila při měření specifických IgE protilátek proti alergenům Jug r 1 i Jug r 2.

## 10.9 Alergen Ses i 1

**Obrázek 14** Srovnání četností pozitivit u alergenu Ses i 1 mezi metodami ISAC a ALEX



Zdroj: vlastní

Na Obrázku 14 je znázorněno porovnání četností pozitivních výsledků mezi metodami ISAC a ALEX u měření alergenu Ses i 1. Tento alergen se vyskytuje v sezamu. Při měření bylo zjištěno, že počet pozitivit je stejný u obou vyšetřujících metod. V obou případech jsme naměřili 8 pozitivních výsledků. To může znamenat, že zde nebyl žádný případ falešné positivity, nebo že CCD inhibice není účinná.

## DISKUZE

Tato bakalářská práce měla za cíl zjistit vliv inhibitoru CCD na četnost pozitivních výsledků u metody ALEX a srovnání s četností pozitivit u metody ISAC. V souvislosti s tímto cílem jsem stanovila celkem tři výzkumné otázky.

První otázka je zaměřena na srovnání četností pozitivit u nativních alergenů mezi multiplovými metodami ISAC a ALEX. Z naměřených dat je patrné, že se počet pozitivních výsledků mezi metodami neshoduje, ale nejedná se o příliš markantní rozdíl. Jak jsem již zmiňovala, srovnávání probíhalo pouze mezi nativními alergenovými molekulami a nativními alergenovými extrakty, u kterých hrozí nechtěná zkřížená reaktivita s podobnými sacharidovými strukturami. Při měření metodou ISAC jsem získala celkem 140 pozitivních hodnot. Jedná se o množství hladin specifických IgE proti vyšetřovaným nativním alergenům, které byly vyšší nebo rovné 0,35 ISU. Při měření stejných vzorků metodou ALEX jsem získala celkem 133 pozitivních výsledků. Opět se jedná o množství hladin specifických IgE imunoglobulinů proti stejným vyšetřovaným nativním alergenovým molekulám, které byly vyšší nebo rovné 0,35 kU<sub>A</sub>/ml. Četnosti pozitivních výsledků se liší o 7 hodnot, kdy vyšší množství pozitivit bylo naměřeno metodou ISAC. Metoda ALEX využívá během zpracování CCD inhibitor, jehož účinnost jsem při porovnání četností pozitivit mezi metodami prokázala. Dle výrobce by CCD inhibice při běžném zpracování vzorků měla dosáhnout hodnoty 85 %. Očekával se tedy snížený výskyt falešně pozitivních výsledků, které se často objevují při zpracování vzorků metodou ISAC, který žádnou CCD inhibici neposkytuje a je jí tak velmi ovlivněn. Více pozitivních výsledků naměřených metodou ISAC bylo u alergenů Cup a 1, Jug r 1, Jug r 2 a Ara h 6. U alergenů Cup a 1 jsem pomocí metody ISAC naměřila 26 pozitivních výsledků a pomocí metody ALEX jsem naměřila 16 pozitivit. U alergenů Jug r 1 jsem naměřila pomocí metody ISAC celkem 8 pozitivních hodnot a pomocí metody ALEX jsem získala jen 7 pozitivit. U alergenů Jug r 2 jsem pomocí metody ISAC naměřila 46 pozitivních výsledků a pomocí metody ALEX jsem naměřila celkem 15 pozitivních hodnot. U alergenů Ara h 6 jsem naměřila pomocí metody ISAC 9 pozitivit a pomocí metody ALEX jsem získala jen 8 pozitivních výsledků. Stejné množství pozitivních výsledků bylo u alergenů Act d 2 a Ses i 1. U alergenů Act d 2 jsem naměřila pomocí metody ISAC i ALEX celkem 10 pozitivních výsledků a u alergenů Ses i 1 jsem pomocí obou metod naměřila 8 pozitivních hodnot. Vyšší množství pozitivit u metody ALEX bylo naměřeno ve čtyřech případech a to u alergenů Act d 1, Cor a 9, Ole e 1 a Gly m 6. U alergenů Act d 1 jsem naměřila pomocí metody ISAC celkem 4 pozitivní výsledky a metodou



ALEX jsem získala 18 pozitivních hodnot. U alergenu Cor a 9 jsem pomocí metody ISAC naměřila celkem 5 pozitivit, zatímco metodou ALEX jsem získala celkem 17 pozitivních výsledků. U alergenu Ole e 1 jsem naměřila metodou ISAC 16 pozitivních hodnot a pomocí metody ALEX jsem získala celkem 20 pozitivních výsledků. A u alergenu Gly m 6 jsem získala měřením metodou ISAC celkem 8 pozitivit a měřením metodou ALEX jsem získala 14 pozitivních výsledků.

Předchozím odstavcem jsem odpověděla i na druhou výzkumnou otázku, která se ptá, zda přítomnost CCD inhibitoru snižuje výskyt pozitivních výsledků naměřených metodou ALEX. Z výsledků lze usuzovat, že tomu tak skutečně je. Více pozitivních výsledků jsem naměřila metodou ISAC. To znamená, že CCD inhibice u metody ALEX skutečně snižuje množství pozitivních výsledků při měření specifických IgE protilátek proti nativním alergenovým molekulám, které jsou náchylné ke zkřížené reaktivitě vlivem podobných sacharidových determinant. Buzzulini (2019) ve své studii, kde porovnávala metody ISAC a ALEX v různých ohledech, dospěla k podobnému závěru. Při stanovení specifických IgE protilátek proti různým alergenům získala více pozitivních výsledků při měření metodou ISAC. U extraktů inhalačních alergenů získala celkem 51 hodnot, které byly při měření metodou ISAC pozitivní a negativní při měření metodou ALEX (ISAC +; ALEX -), a pouze 2 hodnoty, které byly pozitivní při měření metodou ALEX a negativní při měření metodou ISAC (ISAC -; ALEX +). U skupiny ořechových alergenů získala celkem 13 výsledků, které byly pozitivní při měření metodou ISAC a negativní při měření metodou ALEX (ISAC +; ALEX -), a žádný vzorek nebyl vyhodnocen jako negativní při měření metodou ISAC a pozitivní při měření metodou ALEX. Takových porovnání se ve studii vyskytuje víc, ale všechny poukazují na to, že CCD inhibitor skutečně snižuje množství falešně pozitivních výsledků. Toto tvrdí i pan Heffler (2018) ve své studii o hodnocení metody ALEX.

Třetí otázka se týká samotných inhibitorů CCD reaktivity. Jedná se o alergeny Mux f 3 a Hom s LF, které testují přítomnost anti-CCD protilátek. Mým cílem bylo tedy zjistit, zda CCD inhibitor snižuje pozitivitu u alergenu Hom s LF, což je indikátor pro metodu ALEX. Počet pozitivit u alergenu Hom s LF bylo 15 a u indikátoru anti-CCD protilátek pro metodu ISAC bylo 31. Dle těchto hodnot tedy inhibice pomocí CCD inhibitoru u metody ALEX skutečně zabírá a snižuje počet falešně pozitivních výsledků. Stejného výsledku dosáhla i Buzzulini (2019) ve studii, kterou jsem již představila v předchozím odstavci. Do studie zahrнула mimo jiné i CCD analýzu, kterou prováděla pouze s vzorky sér pacientů, jenž byli senzibilizováni specifickými IgE protilátkami proti inhalačním alergenům. Těchto

sér bylo 33. Po měření oběma postupy došla k závěru, že 11 z 33 sér bylo pozitivních na anti-CCD protilátky při měření metodou ISAC a kompletně negativní při měření metodou ALEX vlivem CCD inhibice. Zbýlých 22 vzorků bylo negativních na anti-CCD protilátky při obou měřících postupech.

V mé bakalářské práci jsem tedy prokázala účinnost CCD inhibitoru u metody ALEX, protože celkový počet pozitivních výsledků u shodných alergenových molekul byl u metody ALEX nižší než u metody ISAC. U alergenů Cup a 1, Jug r 1, Jug r 2 a Ara h 6, které byly více pozitivní u metody ISAC, to znamená, že některé vzorky byly falešně pozitivní vlivem CCD reaktivity a CCD inhibice při postupu metody ALEX tuto falešnou pozitivitu eliminovala. Z tohoto důvodu byla četnost pozitivních výsledků u těchto alergenů vyšší při měření metodou ISAC. U alergenů Act d 2 a Ses i 1, které měly stejné množství pozitivních výsledků při měření oběma metodami, to může mít dva důvody. Prvním důvodem je, že v těchto případech se nevyskytnul žádný případ falešné positivity vlivem zkřížené reaktivity a obě metody nám tak poskytly stejné množství pozitivit. Druhým důvodem stejného množství pozitivit může být i fakt, že v těchto případech CCD inhibice není dostatečná a některé vzorky tak mohou být falešně pozitivní. V tomto případě bych doporučila vyzkoušet při postupu metody ALEX dodatečnou počáteční inkubaci, která by již měla zajistit CCD inhibici na 95 %. U alergenů Act d 1, Cor a 9, Ole e 1 a Gly m 6, které byly více pozitivní při měření metodou ALEX, je možné, že metoda ALEX je více citlivá a zachytí tak více pozitivních výsledků. Důvodem může být samozřejmě i nedostatečná inhibice a opět bych doporučila dodatečnou preinkubaci, která by nám důvod ozřejmila.

Závěrem tedy mohu říct, že CCD inhibitor skutečně snižuje množství pozitivních výsledků a pro zajištění menšího ovlivnění zkříženou reaktivitou bych doporučila při postupu u metody ALEX provádět navíc preinkubaci, která by měla zajistit CCD inhibici na 95 %. Ačkoliv je CCD inhibice u metody ALEX nespornou výhodou při diagnostice alergií, celkový počet pozitivit se nijak extrémně nelišil a dle zmíněných studií mají tyto dvě metody dobrou korelaci. Metoda ALEX by ale měla mít přednost při vyšetřování vzorků sér s vysokou pravděpodobností zkřížené reaktivity, aby se zamezilo vzniku falešně pozitivních výsledků.

## ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se věnovala zkřížené reaktivitě, která je hlavním problémem v diagnostice alergií u velmi využívaných multiplexových metod ISAC a ALEX. Zkřížená reaktivita, vzniklá vlivem sacharidových komponentů, způsobuje časté falešně pozitivní výsledky. CCD inhibitor, který se využívá u metody ALEX, slibuje snížení četnosti těchto falešně pozitivních výsledků a zjednodušuje tak interpretaci.

V kapitolách v teoretické části mé kvalifikační práce jsem se věnovala nejdřív obecné imunologii a základnímu popisu struktury a funkce protilátek. Dále pak imunopatologickým reakcím, mechanismu vzniku alergie, skupinám alergenů a jejich zkřížené reaktivitě, diagnostice a léčbě alergických onemocnění a nakonec popisu multiplexových metod ISAC a ALEX a jejich principům.

Praktická část obsahuje samotný postup multiplexových metod ISAC a ALEX, postup zpracování získaných dat a jejich grafické zpracování s hodnocením. Jednalo se o srovnání četností pozitivních výsledků u shodných alergenových molekul mezi metodami ISAC a ALEX.

Mým úkolem bylo zjistit, jak CCD inhibice skutečně ovlivňuje výsledky stanovení u metody ALEX, a zhodnotit tak, jestli použití této metody je lepší než použití metody ISAC s ohledem na zkříženou reaktivitu. Při měření metodou ISAC jsem získala celkem 140 pozitivních výsledků a při měření metodou ALEX jsem získala celkem 133 pozitivních hodnot. Při měření indikátorů CCD reaktivity jsem získala při měření metodou ISAC 31 pozitivních výsledků a při měření indikátoru pro metodu ALEX jsem získala celkem 15 pozitivních hodnot. Ze získaných výsledků jsem zjistila, že CCD inhibitor u metody ALEX opravdu snižuje množství falešně pozitivních výsledků. Pro přesnější vyhodnocení bych pro praxi doporučila do postupu metody přidat preinkubaci, která dle výrobce zajistí až 95% CCD inhibici.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**ABBAS, Abul K., Andrew H. LICHTMAN a Shiv PILLAI. 2016.** *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Fifth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier, [2016]. ISBN 9780323390828.

**BALBINO, Bianca, Eva CONDE, Thomas MARICHAL, Philipp STARKL a Laurent L. REBER. 2018.** Approaches to target IgE antibodies in allergic diseases. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2018, **191**, 50-64 [cit. 2019-05-17]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.015. ISSN 01637258. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725818301037>

**BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. 2011.** *Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

**BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Petr PANZNER. 2019.** *Klinická imunologie a alergologie: pro všeobecné praktické lékaře*. Praha: Raabe, [2019]. Ediční řada pro všeobecné praktické lékaře. ISBN 978-80-7496-423-7.

**BUZZULINI, Francesca, Mirella DA RE, Enrico SCALA, Paola MARTELLI, Mariaelisabetta CONTE, Ignazio BRUSCA a Danilo VILLALTA. 2019.** Evaluation of a new multiplex assay for allergy diagnosis. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2019, **493**, 73-78 [cit. 2019-11-22]. DOI: 10.1016/j.cca.2019.02.025. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898119300877>

**EAACI: EUROPEAN ACADEMY OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY. 2014.** *Global Atlas of Allergy*. 2014. [cit. 2019-11-11]. Dostupné z: <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/140934/1/GlobalAtlasAllergy.pdf>

**GATTINGER, Pia, Irene MITTERMANN, Christian LUPINEK, et al. 2019.** Recombinant glycoproteins resembling carbohydrate-specific IgE epitopes from plants, venoms and mites. *EBioMedicine* [online]. 2019, **39**, 33-43 [cit. 2019-11-11]. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.12.002. ISSN 23523964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396418305735>

**GÖPFERTO VÁ, Dana a Karel DOHNAL. 1999.** *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. Vyd. 2. Praha: Triton, 1999. ISBN 8072540491.

**HEFFLER, Enrico, Francesca PUGGIONI, Silvia PEVERI, Marcello MONTAGNI, Giorgio Walter CANONICA a Giovanni MELIOLI. 2018.** Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organization Journal* [online]. 2018, **11** [cit. 2019-11-22]. DOI: 10.1186/s40413-018-0186-3. ISSN 19394551. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1939455118301637>

**HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. 2009.** *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.

**LIŠKA, Martin, Jitka OCHOTNÁ a Petr PANZNER. 2014.** Základy alergologie a klinické imunologie pro studenty lékařských fakult - III.část. *Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni* [online], 2014, [cit. 2019-05-17]. Dostupné z: <https://mefanet.lfp.cuni.cz/clanky.php?aid=322>. ISSN 1804-4409.

**PARIJA, Subhash Chandra. 2012.** *Textbook of Microbiology & Immunology*. 2nd Edition. India: Elsevier, 2012. ISBN 9788131228104.

**PHADIA AB U, Sweden ImmunoCAP ISAC. 2009.** [cit. 2020-03-10]; Dostupné z: <http://www.phadia.com/Global/Corporate%20Allergy/Files/DfU/Assay%20Kit%20IgE/DfU-ImmunoCAP-ISAC-20-01-02-3-RUO.pdf>

**SINSON, Edsel, Camille OCAMPO, Steven NGUYEN, Lauren DINH, Cindy LIAO a Kelline RODEMS. 2019.** Cross-Reactive Carbohydrate Determinants (CCDs) Interference with Component Resolved Diagnosis on NOVEOS™\*, ImmunoCAP® and IMMULITE® 2000. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2019, **143**(2) [cit. 2019-10-05]. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.12.698. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674918324400>

**VAN HAGE, Marianne, Carl HAMSTEN a Rudolf VALENTA. 2017.** ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2017, **140**(4), 974-977 [cit. 2019-11-22]. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.05.008. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674917308448>

# **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha A – Souhlas s výzkumným šetřením

# PŘÍLOHY

## Příloha A – Souhlas s výzkumným šetřením



Vážená paní  
Kristýna Procházková  
Studentka oboru Zdravotní laborant  
Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví  
Západočeská univerzita v Plzni

### **Povolení sběru informací ve FN Plzeň**

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „Vliv inhibitoru CCD na výsledky stanovení multiplových metod Isac a Alex“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka ÚIA souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené odborné praxe na ÚIA a **pod přímým vedením** oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým **je Ing. Bc. Tomáš Vlas, odborný pracovník v laboratorních metodách ÚIA FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová  
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP  
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň  
tel.: 377 103 204, 377 402 207  
e-mail: [chabrovas@fnplzen.cz](mailto:chabrovas@fnplzen.cz)

15. 11. 2019