

Stanovení senzibilizace na rekombinantní alergeny

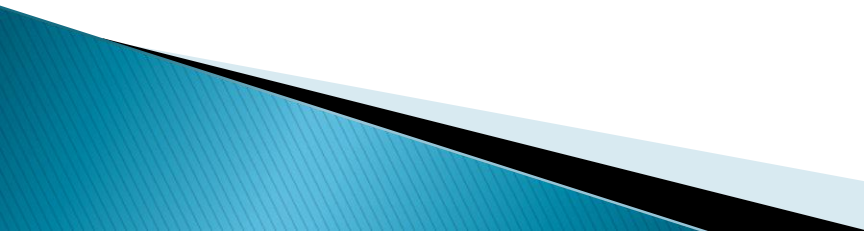
Veronika Janů
Šárka Kopelentová
Petr Kučera

Oddělení alergologie a klinické imunologie FNKV Praha

Antigen x protilátka

- interakce antigenu s protilátkou probíhá pouze v místech epitopů
- Jeden antigen může na svém povrchu nést různé množství epitopů – vyvolá polyklonální Ig odpověď
- Epitopy
 - Druhově specifické
 - Druhově nespecifické - Zkřížená reaktivita mezi nepříbuznými druhy
- Denaturace antigenicitu snižuje – potravinové alergeny

Alergenové extrakty

- Běžně používané při diagnostice alergické reakce I.typu
 - Extrakty z přírodního biologického materiálu – pylová zrna, potraviny, zvířecí srst
 - Velmi obtížná standardizace – obsah různého množství alergenů, včetně těch, na něž pacient nemusí být senzibilizován
 - Mimo hlavních alergenů obsahují i vedlejší látky - možná příčina nižší senzitivity a specifiity testu
 - Obsah nealergenních proteinů, glykoproteinů a sacharidů
 - Problém se stabilitou - obsah enzymů
- 

Izolované antigenní komponenty

- Přírodní
- Rekombinantní

Arašíd (*Arachis hypogea*)

- Ara h 1.....h 9

Ara h 2 x Ara h 8

Bříza (*Betula verrucosa*)

- Bet v 1.....v 6

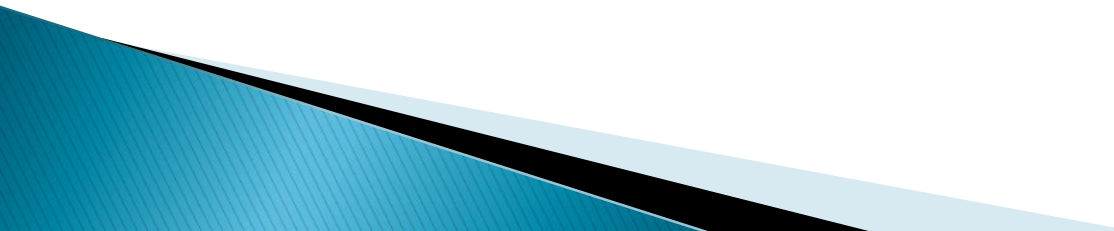
Bet v 1 x Bet v 2

Včela (*Apis mellifera*)

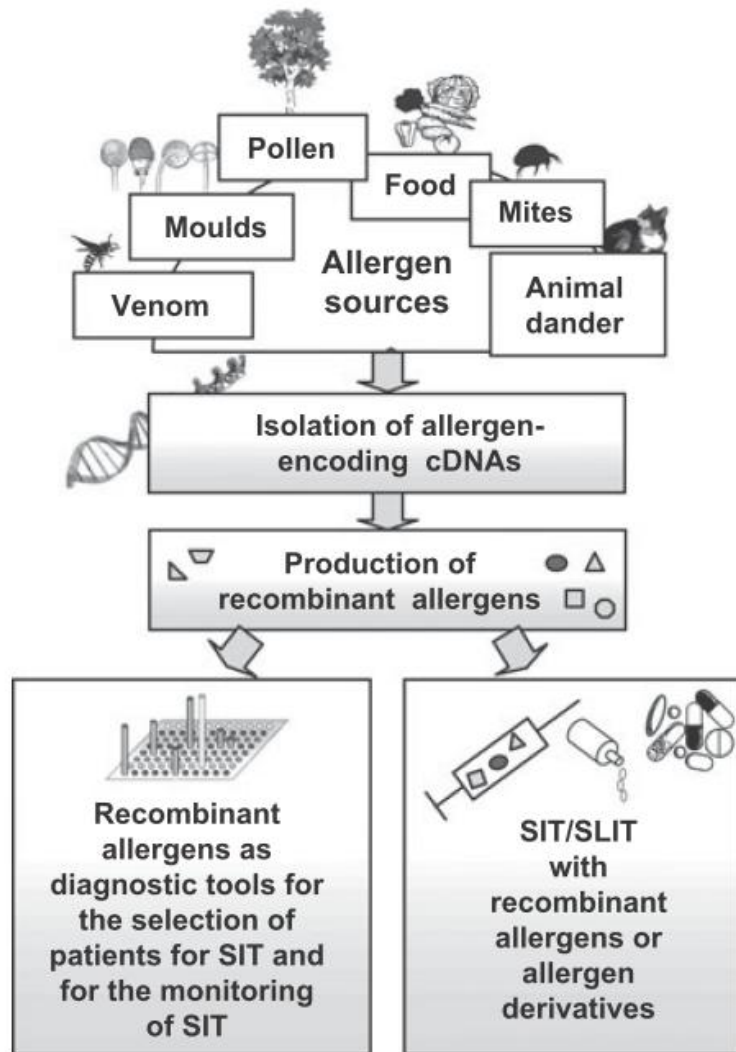
- Api m 1.....m 10

Api m 1

Rekombinantní komponenty

- Připravené molekulárně biologickými technologiemi dle přírodních alergenů
 - Vykazují specifickou reaktivitu srovnatelnou s přírodními alergeny
 - Přispívají k upřesnění diagnostiky a volby terapie
 - Nemají genetické a biologické variace – konstantní kvalita
 - Snadná standardizace
- 

Metody získávání rekombinantních alergenů



- Z přírodních alergenů pomocí molekulárně biologických technologií
- Izolace informační mRNA – zdroj k syntéze komplementární cDNA
- PCR - amplifikace genového kódování pro identifikovaný alergen
- Vložení do příslušného vektoru (plazmid) – exprese v hostiteli

Metody diagnostiky alergie

- In vivo – kožní testy, expoziční testy
- In vitro – Stanovení koncentrace specifických IgE
 - » ELISA - antigen v pevné fázi (CAP) , v kapalně fázi (Immulite)
 - » měří se fluorescence, chemiluminiscence
 - » Výsledky získané různými postupy nebo různými diagnostickými soupravami jsou obtížně srovnatelné
 - » Vyšetření je přínosné pouze tam, kde lze předpokládat alergickou reakci I.typu – zprostředkovanou IgE
 - » Při vyšetření směsi alergenů – snížení senzitivity – riziko falešně negativních nálezů
 - » Vysoké hodnoty celkového IgE – falešně pozitivní výsledky specifických IgE

Metody diagnostiky alergie

- **In vitro - Buněčné testy**

Principem je specifická stimulace buněk alergenem a následné hodnocení pochodů spojených s jejich aktivací a degranulací

- **Analýza mediátorů uvolněných při degranulaci**

Histamin, Sulfidoleukotrieny

- **BAT – Test aktivace bazofilů**

sledování znaků, které jsou charakteristické pro aktivované bazofily
CD63 a **CD203c** – průtoková cytometrie

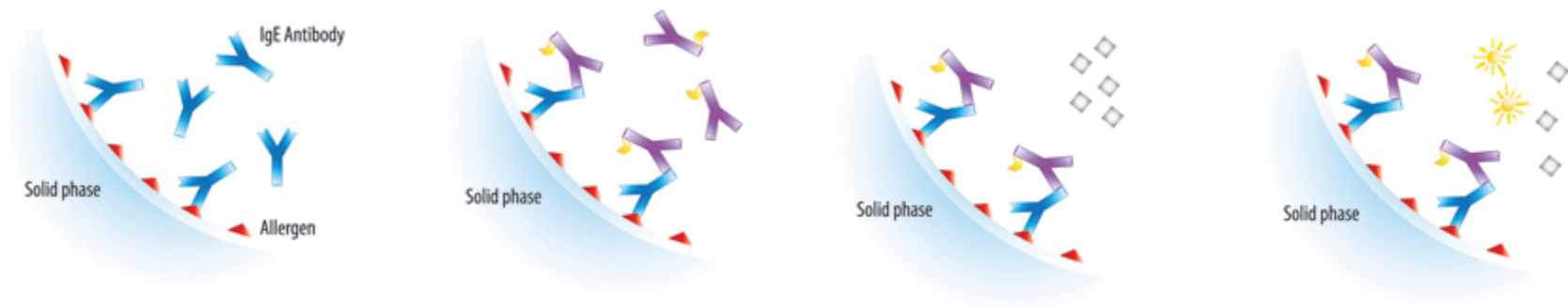
- **Alergen-specifické T – lymfocyty**

sledování aktivace lymfocytů pomocí cytokinů po stimulaci alergenem
Produkce cytokinů je pak stanovena metodou ELISPOT nebo ELISA

Metody diagnostiky alergie


- In vitro – vyšetření pomocí rekombinantních alergenů

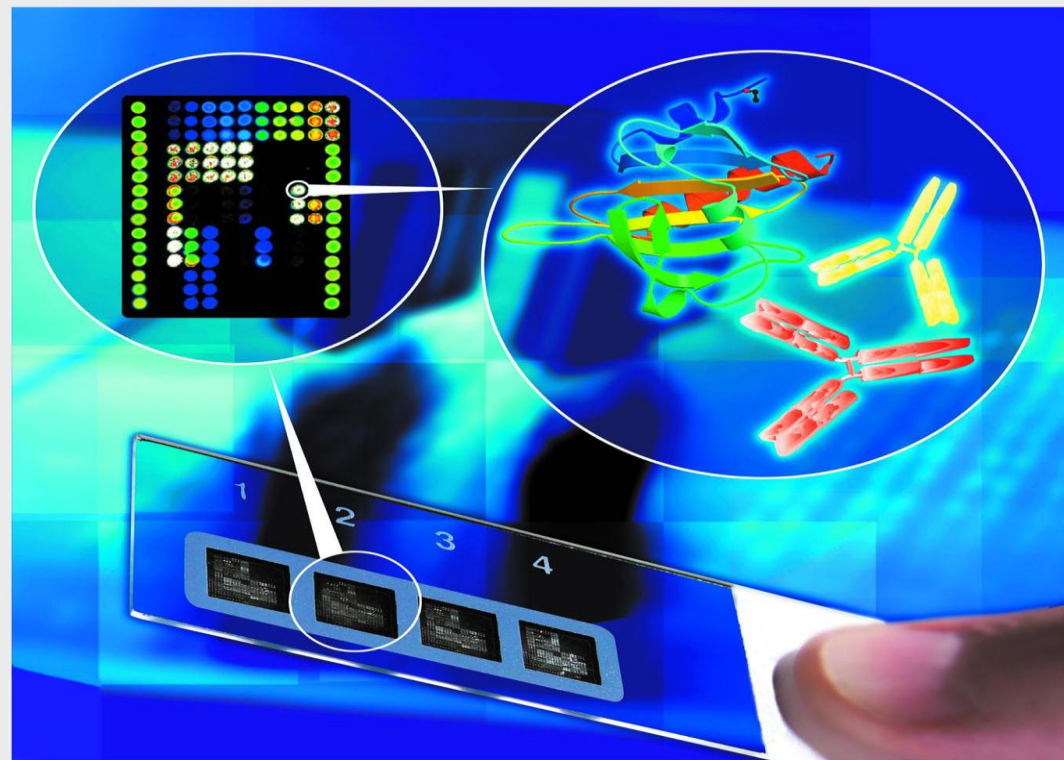
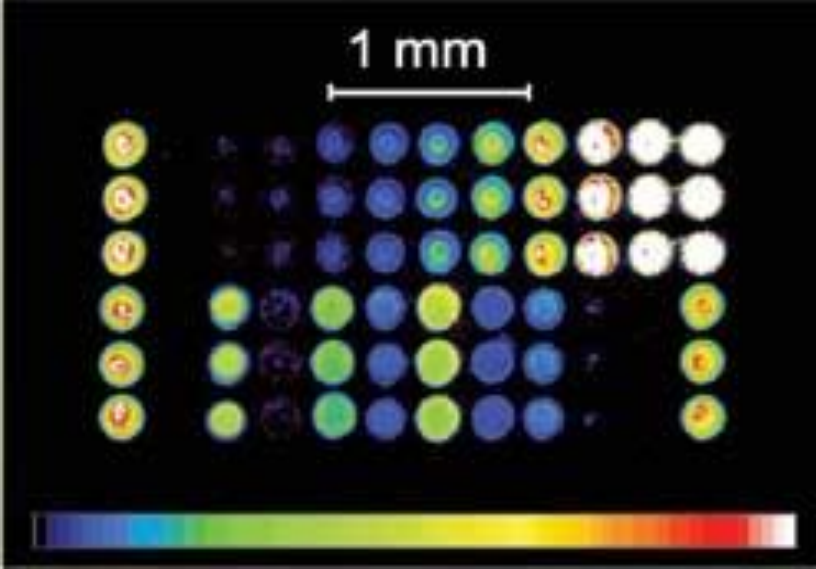
- **Phadia - ImmunoCAP**



- » **Rekombinantí** alergen navázán na pevnou fázi
- » Hodnoceno fluorescenčně

Multialergenové testy „Microarray“

- ImmunoCAP ISAC - Phadia
 - Vysoce pokročilý diagnostický test in vitro využívající technologie biočipu
 - Měření více specifických IgE současně z několika μ l séra
 - V současné době více než 100 složek z 50 alergenových zdrojů
 - Výsledky testu jsou měřeny laserovým snímačem a vyhodnoceny pomocí Phadia MIA software
 - **Složitá interpretace**
- 



ISAC (Immuno Solid-phase Allergen Chip)

Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Phadia

Využití rekombinantních alergenů v diagnostice

- Potravinová alergie – Arašíd
 - anti **Ara h 2** - těžká systémová reakce
 - méně se denaturuje v GIT
 - anti **Ara h 8** - důsledek zkřížené reaktivity
 - lehká reakce – orální alergický syndrom
 - větší míra denaturace v GIT
- Rozdílné klinické a imunologické vzorce v různých zeměpisných oblastech
- USA - 90% senzibilizace na Ara h 2
- Španělsko - 60% senzibilizace na Ara h 9

Využití rekombinantních alergenů v diagnostice

- Blanokřídlý hmyz – včela, vos

Anti **Api m 1** + Anti **Ves v 5**

- » **Obě komponenty pozitivní**

pacienti se skutečnou senzitivitou vůči peptidovým epitopům hmyzích jedů x zkřížená reaktivita proti sacharidům (bromelain)

- » **Směs pozitivní (i1 nebo i3) + hlavní komponenta negativní**

pacient senzibilizován na vedlejší komponentu
není velké riziko anafylaxe

- » **Směs negativní + komponenta pozitivní**

falešně negativní výsledek
nízký obsah hlavní složky alergenu ve směsi

Závěr

- ▶ Použití rekombinantních alergenů je přínosné pro přesnou diagnostiku zejména v případech falešné negativity specifického IgE v důsledku nízkého zastoupení hlavní složky alergenu ve směsi a při odhadu rizika anafylaxe.

Děkuji za pozornost