

Ad informandum

Informační občasník laboratoře Interimun Pardubice

PROSINEC / 2023



V tomto čísle naleznete:

Přehledný článek:
**Laboratorní vyšetření
v alergologii**

**Jaké komponenty
vyšetřit?**

Průvodce molekulárními
alergeny,
díl 3. Pšenice

Téma:
Celiakie

Nová vyšetření:

**THDC
Anti-THSD7A**

Úvodní slovo prof. Ctirada Andryše:

Vážené kolegyně, vážení kolegové,
milí přátelé,

po delší odmlce Vám chceme nabídnout další číslo našeho občasníku. V tomto aktuálním čísle najdete doufáme pro Vás užitečné informace z našeho oboru. Z obsahu můžeme uvést například článek o pšenici a jejích alergenech a také článek o intoleranci lepku.

Přečkali jsme složité COVIDové období a následně dočasné výpadky v dodávkách některých reagentů, se kterými se bohužel stále potýkáme. Snad přežijeme i ekonomické a administrativní těžkosti, které na nás současná doba chystá.

Sektor klinických laboratoří čeká v následujících blízkých letech velká změna. Vejde v platnost nová evropská legislativa týkající se laboratorní diagnostiky v medicíně. Snahou Evropského společenství je zvýšit dohled nad diagnostickými prostředky *in vitro*. Smyslem celého procesu je sblížit podmínky, za jakých jsou na trh uváděny léky a laboratorní diagnostika. Hlavní tíže změn leží na výrobcích diagnostik. Budou muset podstatně podrobněji dokládat klinickou užitečnost svých výrobků formou klinických

studií tak, jak je zvykem u léků. Taktéž bude požadováno sledování výrobku po uvedení na trh a zavedení systému vigilance. To vše bude pro výrobce představovat výrazné navýšení nákladů a může se promítnout do zvýšení cen. To ale je jen část problému. Již teď firmy ukončují výrobu některých diagnostik, která se jim po zavedení nových postupů nebudou vyplácet vyrábět a prodávat. Postihne to především diagnostika pro speciální klinické případy, což je pro klinickou imunologii docela typické. Již teď máme signály, že dojde k ukončení výroby některých kitů, které používáme. Nedá se vyloučit, že ve výjimečných případech některý test z naší nabídky zmizí. Budeme se ale snažit většinu z nich nahradit jinými vhodnými diagnostiky, abychom neomezili Vaše možnosti. Prosíme o shovívavost v případech změn ve výsledcích vyšetření, jelikož nová diagnostika mohou dávat mírně odlišné výsledky, případně mohou mít jiné hodnocení pozitivitu apod..

Spolupráce s Vámi je pro nás klíčová a těšíme se, že bude dále pokračovat.

prof. RNDr. Ctirad Andryš, Ph.D.

Přehledný článek

Laboratorní vyšetření v alergologii

Úvod

Základy alergologie sahají do počátku 20. století, kdy pojem alergie poprvé vyslovil rakouský lékař Clemens von Pirquet. Za více než 100 let se alergická onemocnění postupně rozšířila do povědomí široké veřejnosti. O alergii hovoříme tehdy, reagují-li senzibilizovaní jedinci nepřiměřenou odpovědí na alergeny tvorbou alergen specifických IgE protilátek společně s klinickými projevy alergického zánětu (respirační, kožní, gastrointestinální aj.). Prevalence alergie za poslední desetiletí dynamicky vzrostla. Trpí jí okolo 25 až 30 procent dospělé populace.

V diagnostice alergie má stále nenahraditelnou roli důkladná anamnéza doplněná o fyzikální vyšetření. Ve většině alergologických ambulancí jsou pro diagnostiku IgE mediováných reakcí dostupné kožní prick testy se standardizovanými extrakty, jako jsou pylové alergeny, roztoči, hmyz, zvířecí epitelie. Při podezření na potravinovou alergii jsou z důvodu omezené dostupnosti diagnostických extraktů k testování používány potraviny jako takové (nativní prick testy). Součástí diagnostického postupu jsou také specifické provokační testy a ex-poziční testy s potravinou. V rámci *in vitro*

diagnostiky dominují serologické metody, zejména stanovení koncentrace alergen specifických IgE protilátek.

Diagnostika non-IgE mediováných reakcí je daleko obtížnější. V klinické praxi není dostupný standardizovaný marker využitelný pro rutinní diagnostiku. Lze provést kožní náplastové testy, případně omezené spektrum laboratorních testů (např. test blastické transformace lymfocytů), ne všechny jsou však validované pro *in vitro* diagnostiku.

Souhrnný přehled alergologických testů nabízených v laboratoři Interimun

Z venózní srážlivé krve, ze séra vyšetřujeme:

- Celkové IgE protilátky (tIgE)
- Specifické IgE protilátky (sIgE)
- Multiplexní analýzu ALEX
- Eosinofilní kationický protein (ECP)
- Tryptázu
- Celkovou kapacitu degradace histaminu (THDC)

Z periferní krve s EDTA provádíme:

- Buněčný test aktivace bazofilů (BAT)

Každé vyšetření je stručně popsáno společně s typem materiálu, metodou stanovení, hodnocením a interpretací výsledků. Výsledky jsou hodnoceny na základě aktuálních norem naší laboratoře.

Stanovení celkových IgE protilátek

IgE protilátky tvoří pouze malou část z celkových imunoglobulinů. Vznikají na základě rozsáhlých mechanismů vrozené a adaptivní imunity. Imunitní odpověď je směřována do Th2 fenotypu, který je typický pro alergický zánět. Produkované alergen specifické IgE protilátky jsou uvolňovány do krve, kde se váží na povrchové FcεRI receptory basofilních granulocytů, mastocytů a dalších buněk. Podílejí se na imunopatogenezi alergické reakce I. typu.



Vysoké hladiny celkových IgE protilátek (tIgE) bývají přítomné u alergických onemocnění, typicky u atopické dermatitidy. Zároveň jsou však nalézány i řady dalších klinických stavů, jako jsou aktivní parazitární infekce, aspergilózy, imunodeficience a další. Pro klinickou praxi je potřeba zmínit, že dle doporučení odborné společnosti má stanovení koncentrace tIgE v diagnostice alergie omezenou informační hodnotu, protože normální hodnoty nevylučují přítomnost klinicky významné alergie (část pacientů má hodnoty v normě) ani možný

Zádanka alergologická		INTERIMUN		verze 0023
Odesílatel (razítka, podpis):		Kontaktní adresa: Kámenka 438, 533 01 Pardubice 17 - Říše		
Odbornost:		Tel.: 495 544 300		
Jméno a příjmení pacienta:		E-mail: interimun@interimun.cz		
Číslo pojistnice / RČ:		Zadání a informace k provádění testů: www.interimun.cz		
Pohlaví: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> Ž		Kód diagnózy:		Pojistovna:
Kontakt na vzorek: <input type="checkbox"/> krev <input type="checkbox"/> jiný:		Doplňující údaje:		
Měsíc a čas odběru vzorku:		Odběr provedl:		
IgE celkové		Test aktivace bazofilů (střední, jiné dny po domluvě)		
		včela	I1	
ECP		vosa	I3	
THDC		Další alergeny po domluvě.		
(celková kapacita degradace histaminu)				
tryptáza				
Specifické IgE:				
ALEX (panel molekulárních alergenů a extraktů); složení viz. www.interimun.cz				
HMYZI JEDY				
čmelák	I8	ambrozie	W1	kočka
čmelák	I71	heřmáněk	W25	epi
čmelák	I4	jitrocel	W6	
čmelák m1	I75	kopřiva		
čmelák m2				
čmelák m3				
čmelák m4				
čmelák m5				
čmelák m6				
čmelák m7				
čmelák m8				
čmelák m9				
čmelák m10				
čmelák m11				
čmelák m12				
čmelák m13				
čmelák m14				
čmelák m15				
čmelák m16				
čmelák m17				
čmelák m18				
čmelák m19				
čmelák m20				
čmelák m21				
čmelák m22				
čmelák m23				
čmelák m24				
čmelák m25				
čmelák m26				
čmelák m27				
čmelák m28				
čmelák m29				
čmelák m30				
čmelák m31				
čmelák m32				
čmelák m33				
čmelák m34				
čmelák m35				
čmelák m36				
čmelák m37				
čmelák m38				
čmelák m39				
čmelák m40				
čmelák m41				
čmelák m42				
čmelák m43				
čmelák m44				
čmelák m45				
čmelák m46				
čmelák m47				
čmelák m48				
čmelák m49				
čmelák m50				
čmelák m51				
čmelák m52				
čmelák m53				
čmelák m54				
čmelák m55				
čmelák m56				
čmelák m57				
čmelák m58				
čmelák m59				
čmelák m60				
čmelák m61				
čmelák m62				
čmelák m63				
čmelák m64				
čmelák m65				
čmelák m66				
čmelák m67				
čmelák m68				
čmelák m69				
čmelák m70				
čmelák m71				
čmelák m72				
čmelák m73				
čmelák m74				
čmelák m75				
čmelák m76				
čmelák m77				
čmelák m78				
čmelák m79				
čmelák m80				
čmelák m81				
čmelák m82				
čmelák m83				
čmelák m84				
čmelák m85				
čmelák m86				
čmelák m87				
čmelák m88				
čmelák m89				
čmelák m90				
čmelák m91				
čmelák m92				
čmelák m93				
čmelák m94				
čmelák m95				
čmelák m96				
čmelák m97				
čmelák m98				
čmelák m99				
čmelák m100				

pozitivní nález specifického IgE. Vysoké hodnoty naopak nemusí znamenat přítomnost alergie. Z tohoto důvodu má v rámci screeningu atopických stavů vyšší přínos vyšetření specifických IgE protilátek proti směsi alergenů jako jsou například panely AlaTOP, Phadiatop nebo Phadiatop Infant, které v laboratoři nabízíme.

Materiál: venózní srážlivá krev, sérum.

Metoda stanovení: FEIA, systém Phadia200.

Hodnocení: Výsledky tIgE jsou uváděny v jednotkách kU/l. Hladina tIgE věkem postupně vzrůstá. U novorozenců a malých dětí jsou typické velmi nízké hladiny tIgE. Normální hodnoty tIgE jsou u dospělých udávány do 200 kU/l.

Stanovení specifických IgE protilátek

Nejrozšířenějším diagnostickým *in vitro* testem IgE mediované alergie je stanovení koncentrace alergen specifických IgE protilátek (sIgE) v séru. Je snadno dostupné a krevní odběr lze provést v jakémkoli věku bez vysazení medikace. Vyšetření je zejména vhodné u pacientů, u kterých nelze provést kožní testy nebo pokud nelze vysadit potenciálně interferující léčbu. Obecně nelze říci, vůči kolika alergenům je stanovení sIgE protilátek racionální a klinicky relevantní. Indikace laboratorního stanovení musí být posuzována individuálně a odpovědně. Z důvodu možné falešné negativity výsledků by vyšetření sIgE nemělo být prováděno bezprostředně po alergické reakci, ale měl by být zacho-
ván odstup 3–6 týdnů.

V ČR je v současné době dostupné vyšetření specifických IgE protilátek proti řádově stovkám alergenů. Lze vyšetřit sIgE proti směsi alergenů z příbuzných zdrojů (směs trav, stromů, mouky, zeleniny, ořechů aj.) nebo směsi alergenů z nepříbuzných zdrojů (AlaTOP, Phadiatop, dětské potraviny aj.). Alergenové směsi je možné následně roztestovat na jednotlivé extraktové alergeny (břída, bojínky, roztoči a další). Alergenové extrakty jsou získávány purifikací z přirozených zdrojů, které obsahují velmi komplexní směs alergenů i nealergenních bílkovin. Některé složky jsou druhově specifické, jiné zkříženě reagující. Některé mohou vyvolat závažné klinické komplikace, jiné ne. Diagnostika založená na alergenových

extraktech není na tyto otázky schopna odpovědět.

Zásadní přínos pro diagnostiku IgE mediovaných alergických stavů přinesl pokrok v technologiích genového inženýrství a ve výzkumu alergenů na molekulární úrovni v 80. letech 20. století. Pro vyšetření alergen specifických IgE protilátek proti molekulárně definovaným alergenům, tzv. komponentám se vžil termín molekulární komponentová diagnostika (CRD), nověji precizní molekulární diagnostika alergií (PAMD). Blíže byla tato diagnostika komentována v dubnovém čísle Ad informandum z roku 2014. V současné době se PAMD uplatňuje zejména při diagnostice potravinových alergií, alergie na jed blanokřídlého hmyzu a jeví se přínosná při indikaci alergenové imunoterapie u polysenzibilizovaných pacientů. V rutinní diagnostice je k dispozici mnoho desítek molekulárních komponent využitelných v *in vitro* testech. Rámcový výčet alergenů (směsi, extrakty, komponenty), které máme v laboratoři k dispozici, je uveden na webových stránkách Interimun v přehledu vyšetření – alergologie. Požadavek proti dalším alergenům je možné na žádanku doplnit uvedením slovního názvu alergenu.

S ohledem na celou řadu komerčně dostupných *in vitro* diagnostik pro stanovení sIgE je standardizace metodiky a následně srovnání výsledků často obtížné. Pro sledování dynamiky sIgE v čase je proto vhodné provádět vyšetření stejnou analytickou technikou a ideálně v jedné laboratoři.

Materiál: venózní srážlivá krev, sérum; objem séra záleží na počtu požadovaných alergenů, např. 5 alergenům odpovídá zhruba 0,5 ml séra (3 ml srážlivé krve).

Metoda stanovení: Pro stanovení sIgE protilátek máme k dispozici celkem čtyři technologie. Prvním systémem je vysoce citlivý analyzátor Phadia200 (FEIA, firma Thermo Fisher Scientific/Phadia), který využíváme převážně pro stanovení sIgE proti molekulárním alergenům. Kvalitě stanovení odpovídá i vyšší bodové ohodnocení v sazebníku výkonů ZP. Druhou technologií je systém Immulite XPi 2000 (LEIA, firma Siemens Healthcare Diagnostics), také s vysokou citlivostí, používaný pro stanovení sIgE protilátek proti extraktovým alergenům a alergenovým směsím. Pro málo frekventní extraktové alergeny využíváme techniku enzymoimunoanalýzy (EIA, firma Dr. Fooke Laboratorien GmbH). Poslední technikou je multiplexní systém Allergy Explorer (ALEX²,

firma Macro Array Diagnostics), který umožňuje v rámci jedné analýzy simultánně stanovit sIgE proti extraktovým a molekulárním alergenům.



Hodnocení: Hladina specifických IgE protilátek je udávána v jednotkách U/ml. Techniky systému Phadia200 a Immulite jsou schopny kvantifikovat velmi nízké koncentrace 0–0,35 U/ml. Za zvýšené jsou považovány hladiny sIgE vyšší než 0,1 U/ml. V případě méně citlivé techniky EIA (Dr. Fooke) jsou za normální považovány hodnoty sIgE do 0,35 U/ml. Systém ALEX² uvádí normální hodnoty sIgE do 0,3 kU_A/l. Další doporučenou možností vyjádření hladin sIgE jsou semikvantitativní třídy positivity, které zjednodušují interpretaci výsledků a částečně stírají rozdíly mezi jednotlivými metodikami stanovení sIgE. Je třeba zdůraznit, že samotný průkaz senzibilizace (pozitivní výsledek sIgE) nemusí znamenat průkaz klinicky významné alergie, zvláště



v případě slabší positivity. Při interpretaci výsledku je vždy nutné zohlednit klinický stav pacienta v kontextu dalších výsledků (kožní testy a další).

Alergenové směsi pro screening atopie

AlaTOP Allergy Screen

Screeningový panel AlaTOP® Allergy Screen od firmy Siemens je navržený pro odlišení atopiků od jedinců ne atopických. Test měří IgE protilátky proti 12 inhalačním extraktovým alergenům. Tato směs obsahuje roztočové alergeny (D1), epitelie kočky (E1) a psa (E5), pyl troskutu (G2) a bojínku (G6), pyl břízy (T3) a cedru (T17), pyl ambrózie (W1), jitrocelu (W9) a drnavce (W19), spory plísní rodu *Penicillium* (M1) a *Alternaria* (M6). Při správné indikaci vyšetření vycházející z anamnézy pacienta dosahuje v řadě studií senzitivita testu téměř 100 % a specifita 90 %. V případě pozitivního výsledku je možné směs roztést proti jednotlivým alergenům. Negativní výsledek i přes vysokou citlivost metody nevylučuje, že se nemůže jednat o atopickou reakci. Některé alergeny mohou být ve směsi zastoupeny v menším množství, proto je při podezření alergie na konkrétní alergen doporučováno



vyšetřit sIgE proti alergenu jako takovému, nikoli ve směsi. AlaTOP má v porovnání s vyšetřením celkového IgE lepší parametry pro potvrzení nebo vyloučení atopie. Finanční náročnost obou testů je srovnatelná.

Materiál: venózní srážlivá krev, sérum; potřebný objem séra na test je 100 µl.

Metoda stanovení: LEIA, systém Immulite 2000 XPI.

Hodnocení: Normální hodnoty sIgE proti AlaTOPu jsou uváděny ve formě indexu 0-1,1.

Phadiatop, Phadiatop infant

Další možností pro rozlišení atopiků od ne atopických jedinců jsou testy ImmunoCAP™ Phadiatop™ a Phadiatop™ Infant, které nabízí firma Thermo Fisher Scientific. Výhody vyšetření byly zmíněny v prosincovém čísle Ad Informandum 2017. Test Phadiatop obsahuje směs běžných inhalačních alergenů. Phadiatop Infant je určen převážně pro děti do 5 let věku, kromě inhalačních alergenů je obohacen o základní potravinové alergeny. Přesné složení alergenů v testech zůstává výrobním tajemstvím firmy. V případě positivity testu Phadiatop je výrobcem doporučováno následné roztěstování směsi zaměřit na jednotlivé extraktové alergeny: roztočů, epitelie kočky a psa, pyly trav, bylin a stromů a spory plísní.

Materiál: venózní srážlivá krev, sérum; potřebný objem séra na test je 100 µl.

Metoda stanovení: FEIA, systém Phadia200.

Hodnocení: Normální hodnoty sIgE proti Phadiatop/Phadiatop inf. jsou do 0,35 U/ml.

ALEX (Allergy Explorer)

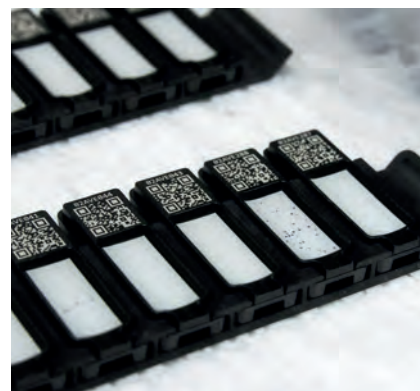
V současné době jsou v klinických laboratorích nejvíce rozšířené dvě multiplexní analýzy. Jako první byla dostupná mikročipová technika ImmunoCAP™ ISAC od firmy Thermo Fisher Scientific, která je zaměřená na stanovení sIgE protilátek proti 112 molekulárním alergenům. Novější technikou je systém ALEX® (Allergy Explorer) od firmy MacroArray Diagnostics, kterou je

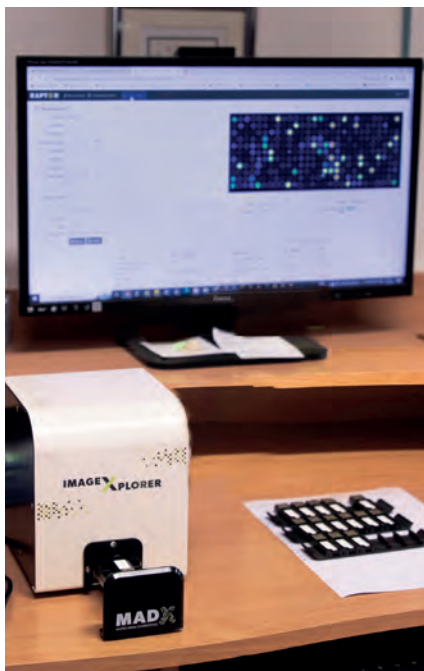
možné vyšetřit sIgE proti 295 extraktovým a molekulárním alergenům. V laboratoři Interimun je systém ALEX dostupný od dubna 2019. Nová verze multiplexu ALEX², která oproti původní verzi obsahuje širší zastoupení molekulárních alergenů, je v laboratoři dostupná od ledna 2020.

Test ALEX² využívá kolorimetrické enzymoimunoanalýzy na pevné fázi. Umožňuje stanovení sIgE proti 178 molekulárním alergenům a 117 extraktovým alergenům na jedné reakční ploše. Alergeny jsou navázány na nanočástice, které jsou systematicky naneseny v podobě spotů na pevnou fázi membrány testovací kazety. V testu jsou zastoupeny inhalační a potravinové alergeny, jako jsou pyly trav, stromů a bylin; spory plísní a kvasinky; roztoči a švábi; zvířecí srst a epitelie; jed blanokřídlého hmyzu; cereálie a semena; vejce a mléko; ovoce, luštěniny a ořechy; mořské plody, koření, maso, zelenina a ostatní. Seznam všech alergenů ALEX² je uveden na webových stránkách laboratoře.

Výhodou tohoto testu je, že před zahájením reakce jsou vzorky ředěny inhibičním roztokem, který blokuje vazbu IgE na zkříženě reagující cukerné determinanty (CCD), a tím je dosaženo vyšší specifity testu. Tyto oligosacharidové složky bývají součástí struktury glykoproteinů obsažených v nativních alergenech pylů, potravin rostlinného původu a hmyzích jedů. Indikátorem CCD reaktivity v testu je molekula Hom s LF (humanizovaný glykoprotein laktoferin). Obecně je přijímán názor, že protilátky sIgE proti CCD jsou považovány za klinicky nevýznamné.

Limitací tohoto testu je nižší citlivost a pevně dané složení alergenů. Nicméně některé molekulární alergeny jsou zastoupeny pouze v testu ALEX² a nelze je vyšetřit jednotlivě. Metoda je poměrně pracná a finančně nákladná, bodové ohodnocení





odpovídá ceně vyšetření sedmi molekulárních alergenů vysokoafinní technikou FEIA.

Indikace vyšetření ALEX² je velmi individuální. Test můžeme uplatnit u neshod mezi výsledky získanými základními přístupy (kožní testy a sIgE proti extraktovým alergenům). U polysenzibilizovaných pacientů lze získat komplexní senzibilizační profil a odhalit případné potenciálně rizikové alergeny vyvolávající závažné alergické reakce. Negativní výsledek testu může být přínosný pro vyloučení alergické etiologie.

Materiál: venózní srážlivá krev, sérum; potřebný objem séra na test je 100 µl (odpovídá zhruba 1-2 ml srážlivé krve).

Hodnocení: Měřící rozsah metody je udáván 0–50 kU_A/l. Výsledky sIgE větší než 0,3 kU_A/l jsou považovány za pozitivní. Součástí výsledkového listu je interpretační podpora ve formě komplexního reportu zaměřeného na jednotlivé pozitivní nálezy sIgE protilátek.

Stanovení eosinofilního kationického proteinu

Eosinofilní kationický protein (ECP) je jedním z hlavních proteinových mediátorů, který je produkován aktivovanými eosinofilními granulocyty. ECP se nalézá v matrix eosinofilních granul, má vysoce cytotoxické účinky a patří do skupiny ribonukleáz A. V případě, že jsou eosinofilní granulocyty aktivovány,

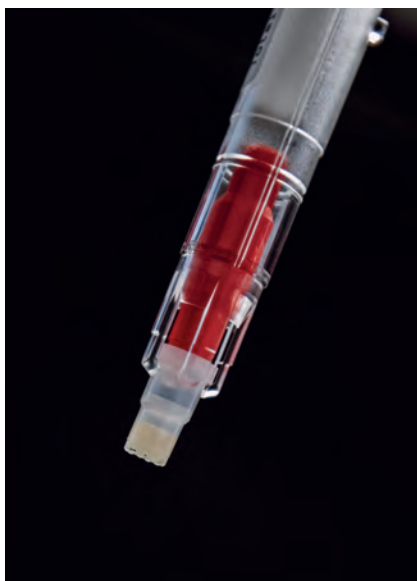
dochází k jejich degranulaci a následně k poškození a deskvamaci epitelových buněk. Tímto je zároveň zvyšována hyperreaktivita dýchacích cest a postupně se rozvíjí chronický alergický zánět. ECP je vylučován aktivovanými eozinofily do krevního oběhu.

V současné době můžeme stanovení ECP využít především ke sledování zánětlivé aktivity u pacientů s bronchiálním astmatem a dále také ke sledování průběhu a tíže chronického alergického zánětu.

Materiál: srážlivá venózní krev, sérum. Odběr vzorku je ideální provést do zkumavky Becton Dickinson Vacutainer SST II Advance (s aktivátorem krevního srážení), kterou Vám na vyžádání dodáme. Vzorek srážlivé krve je nutné maximálně 2 hodiny od odběru stočit a oddělit sérum. Podmínky preanalytické fáze je třeba dodržet, protože hemolýza znehodnocuje výsledek analýzy.

Metoda: FEIA, systém Phadia200.

Hodnocení: normální hodnoty u neotopiků jsou uváděny do 0-15 µg/l.



Stanovení tryptázy

Tryptáza je enzym ze skupiny serinových proteáz, který je spolu s histaminem a s dalšími působky uvolňován ze žírných buněk po jejich aktivaci. Stanovení tryptázy je indikováno zejména při diagnostice anafylaktické reakce, a to i post mortem, případně při podezření na mastocytózu. Tryptáza se vyskytuje ve dvou hlavních formách

alfa a beta. Alfa forma je uvolňována kontinuálně, zatímco beta forma je součástí cytoplazmatických granul a je vylučována až po aktivaci žírných buněk.

Laboratorně je stanovována celková tryptáza (alfa i beta forma). Dle metodických pokynů je pro stanovení tryptázy při anafylaktické reakci doporučováno odebrat vzorek krevního séra co nejdříve (15 min – 3 hod.) po reakci a následně odběr opakovat s odstupem 24 hodin nebo později po odeznění příznaků (bazální tryptáza). Krátkodobě zvýšená hladina sérové tryptázy je považována za klinický marker potvrzující závažnou systémovou alergickou reakci až anafylaktický stav.

Materiál: srážlivá venózní krev, sérum.

Hodnocení: Při podezření na anafylaktickou reakci je doporučováno posouzení rozdílu hodnoty tryptázy při reakci a hodnoty bazální tryptázy. Jako pozitivní je považován výsledek, který je vyšší než 1,2násobek bazální tryptázy + 2 µg/l.

Metoda: FEIA, automatické analyzátoři od firmy Thermo Fisher Scientific. Výrobce reagentie v listopadu 2022 celosvětově doporučil pozastavit vyšetřování tryptázy na analyzátoři Phadia200. Z tohoto důvodu požadavky na vyšetření dočasně přeposíláme do jiné laboratoře. V současné době není dostupný ekvivalent se srovnatelnou citlivostí a specifitou testu. O případném znovu zavedení vyšetření Vás budeme informovat.

Test aktivity bazofilů

Diagnostiku IgE mediované alergie lze rozšířit o doplňkový test aktivity bazofilů (BAT), který patří mezi funkční buněčné testy prováděné z periferní krve. Principem testu je detekce exprese aktivačních povrchových molekul bazofilních granulocytů po kontaktu s alergenem pomocí průtokové cytometrie.

Bazofilní granulocyty lze v periferní krvi detekovat pomocí povrchového značení molekul CCR3 a CD63 fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami. Chemokinový receptor CCR3 slouží k identifikaci populace bazofilů. Molekula CD63 je aktivační znak, který je v klidovém stavu exprimován na povrchu intracelulárních granul bazofilů. Při aktivaci buňky se

cytoplazmatická granula spojují s povrchovou membránou a dochází tak k expresi znaku CD63 na povrchu bazofilu. Tato molekula je asociována s rychlou degranulací buňky, resp. s uvolněním sekrečních granul obsahujících histamin a další prozánětlivé mediátory.

V diagnostice alergie se může BAT uplatnit zejména v situacích, kdy klinické vyšetření (kožní testy) a základní laboratorní vyšetření (stanovení sIgE) jsou pro určení diagnózy nedostatečné. Velmi nadějně se jeví tyto testy při diagnostických nejasnostech u alergie na hmyzí jedy, u lékové alergie a alergie na latex. V laboratoři Interimun provádíme BAT test s komerčně dostupnými alergeny od firmy Bühlmann. Aktuální seznam alergenů je uveden v odkazu na webových stránkách laboratoře v sekci přehled vyšetření – alergologie, test aktivity bazofilů. Běžně máme v laboratoři k dispozici alergeny jedu blanokřídlého hmyzu (včela, vosy) a léků (penicilin V). Ostatní alergeny objednávatel po telefonické domluvě.

Materiál: periferní krev s EDTA, vzorek je třeba dopravit do laboratoře v den odběru. Z důvodu časové náročnosti provedení testu, preferujeme plánovat krevní odběry na středu, jiné dny po domluvě.



Metoda stanovení: povrchové značení aktivovaných bazofilů po expozici alergenem (Bühlmann) metodou průtokové cytometrie (Navios Ex, Beckman Coulter).

Hodnocení: Výsledkem bazotestu je procentuální zastoupení aktivovaných bazofilů po expozici alergenem. Pro každý alergen je uvedena hodnota cut-off, díky které je test hodnocen jako pozitivní nebo negativní. Normální hodnoty aktivovaných bazofilů jsou udávány pro jednotlivé alergeny, tj. pro potravinové a inhalační alergeny do 15 %, hmyzí jedy a latex do 10 %, léky a potravinová aditiva do 5 %. Součástí testu

jsou také negativní kontrola (zkumavka bez stimulace) a pozitivní kontrola (stimulace anti-FcεRI a fMLP). V případě, že je procento aktivovaných bazofilních granulocytů po stimulaci anti-FcεRI menší než 10 % (ověření imunologické aktivity buněk), je pacient považován za IgE non-respondera a výsledky testu nelze vyhodnotit.

Potravinová intolerance

Samostatnou kapitolu tvoří potravinové intolerance. Jedná se o nežádoucí reakce na potraviny enzymové nebo farmakologické příčiny, resp. o neimunologicky podmíněné reakce. Typickým příkladem je **laktózová intolerance**, která je způsobena poklesem aktivity enzymu laktázy v tenkém střevě. Dále sem patří histaminoliberační účinky některých potravin bohatých na biogenní aminy (např. uzeniny, sýry, kyselé zelí, víno, pivo a další), které mohou vyvolat tzv. **histaminovou intoleranci (HIT)**. Klinickými příznaky HIT připomíná alergickou reakci, avšak spouštěčem není imunopatologická reakce, ale metabolicky podmíněná neschopnost organismu inaktivovat exogenní histamin (přijímaný perorálně) nebo další biogenní aminy endogenního původu. Na degradaci exogenního histaminu se podílí řada enzymů; hlavními jsou diaminooxidáza (DAO) a histamin N-metyltransferáza (HNMT). Rutinně lze v laboratoři stanovit sérovou koncentraci DAO nebo funkční test: stanovení kapacity degradace histaminu, viz sdělení o THDC v tomto čísle.

Závěr

Laboratoř Interimun se pravidelně úspěšně účastní externího hodnocení kvality v ČR (SEKK) v cyklu stanovení tIgE protilátek a mezinárodní externí kontroly kvality referenčního ústavu pro bioanalytiku (RfB) v cyklu stanovení sIgE protilátek.

Laboratorní diagnostika alergií byla prezentována v rámci semináře pro praktické lékaře a pro praktické lékaře a dorost začátkem letošního roku. Přednáška je přístupná elektronicky na webových stránkách laboratoře v sekci aktuality – přednášky z našich seminářů. Naleznete zde například cenu a časovou náročnost jednotlivých testů.

Mgr. Radka Vaňková, Ph.D.

Fotografie: Bc. Eva Kubátová

Literatura:

1. Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I. *Imunologie člověka*. Gramon, Hradec Králové, 2016.
2. Špičák V., Panzner P. *Alergologie, Galén, Praha, 2004.*
3. Bělohávková S, Kopelentová E, Šetinová I, Liška M, Fuchs M. *Doporučené postupy pro provádění expozičních testů s potravinami. Alergie Suppl. 2018;1:1-43.*
4. Fuchs M. *Potravinová alergie a intolerance. Edice postgraduální medicíny: Mladá fronta, Praha, 2016.*
5. Hozová S. *Možnosti laboratorní diagnostiky alergie. Interní Med. 2009;11(4):168-170.*
6. McGowan EC, Saini S. *Update on the performance and application of basophil activation tests. Curr Allergy Asthma Rep. 2013;13(1):101-109.*
7. Petřů V., *Doporučený postup léčby anafylaktické reakce – update 2019, ČSAKI. 2019.*
8. Teřl M., Čáp P., Dvořáková R. et al. *Doporučený postup diagnostiky a léčby bronchiálního astmatu, ČSAKI, ČPFS. Geum, Semily, 2015.*
9. Ansotegui IJ, Melioli G, Walter G et al. *Open Access A WAO—ARIA—GAZLEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. World Allergy Organ J. 2020;13(2):1-46.*
10. Dramburg S., Hilger Ch., Santos A. F. et al. *EAACI Molecular Allergy User's Guide 2.0. Pediatric Allergy and Immunology. 2023; 34(S28):1-386.*
11. *How to use ImmunoCAP™ Phadiatop™ testing, firemní materiály Thermo Fisher Scientific. 2022.*

Jaké komponenty vyšetřit?

Malý průvodce laboratorní diagnostikou alergického zánětu pomocí stanovení specifického IgE proti molekulárně definovaným alergenům (komponentám)

Část III. Pšenice – náš přítel či nepřítel?

Pšenice patří k nejdéle domestikovaným plodinám. Její význam pro lidskou výživu je zásadní. Spolu s rýží a kukuřicí tvoří nejméně pěstované kulturní rostliny na Zemi. Poznáání jejích užitných vlastností sahá hluboko do minulosti. Lidská civilizace je od svého vzniku do značné míry závislá na cíleném pěstování obilnin. Pšenice, ječmen, žito, oves, rýže, kukuřice i další rostliny z čeledi Poaceae (lipnicovitých) se podílejí na výživě lidstva minimálně ze 60–70 %. V oblasti východního Středomoří a Blízkého východu lidé sbírali obilniny dávno předtím, než je domestikovali někdy v 9. tisíciletí před naším letopočtem. Tento přelomový počín lidstva je připisován kulturám jihovýchodního Turecka. V souvislosti s tím nelze nezmínit světoznámé sídliště Göbekli Tepe, kde bylo cílené pěstování pšenice jednoznačně doloženo. Zhruba ve stejné době se podařilo domestikovat tuto obilninu i v oblasti Jericha v Palestině. V průběhu následujících tisíciletí lidstvo cíleně zasahovalo do genomu původních pšenic s cílem zvýšit výnos a zlepšit organoleptické vlastnosti. Nyní existuje několik desítek tisíc kultivarů pšenice vhodných pro pěstování v různých klimatických oblastech. Pšenice je významným zdrojem rostlinných bílkovin a má vysokou nutriční hodnotu.

Nutričně vysoce kvalitní bílkoviny získané z této obilniny jsou součástí nepřeberné škály pokrmů a potravin. Zrno pšenice obsahuje celou řadu bílkovin s různými nutričními i biologickými vlastnostmi. Proteiny představují cca 10–15 % sušiny zrna. Nejčastěji jsou tříděny podle své extrahovatelnosti (rozpuštěnosti) v solných roztocích na solubilní albuminy a globuliny, které se podílejí zhruba 15–20 %, a na nerozpustné prolaminy, označované též souborným názvem lepek (gluten). Prolaminy pšenice můžeme rozdělit na gliadiny a gluteniny. Představují hlavní zásobní proteiny zrna a díky nim je možné využívat pšeničnou mouku k pečení. Mezi zásobními proteiny pšenice můžeme najít velmi významné alergeny.

alergen	skupina	vstup do organismu	klinický význam
Tri a 14	LTP	ingesce a/nebo inhalace	potravinové alergie pekařské astma, WDEIA
Tri a 17	β -amyláza	ingesce	závažné potravinové reakce
Tri a 19 tepelně stabilní	ω -5-gliadin (zásobní protein)	ingesce	HLAVNÍ ALERGEN závažné potravinové reakce WDEIA
Tri a 20	γ -gliadin	ingesce	závažné potravinové reakce
Tri a 21	α/β -gliadin	ingesce	závažné potravinové reakce, WDEIA
Tri a 26	HMW glutenin	ingesce	HLAVNÍ ALERGEN závažné potravinové reakce WDEIA
Tri a 27	Triol reductase homologue	inhalace	pekařské astma
Tri a 28 tepelně stabilní	α -amylázový inhibitor	ingesce a/nebo inhalace	závažné potravinové reakce pekařské astma
Tri a 29 tepelně stabilní	α -amylázový inhibitor	inhalace	pekařské astma
Tri a 36	LMW glutenin	ingesce	HLAVNÍ ALERGEN WDEIA
Tri a 37 tepelně stabilní	α -purothionin	ingesce	závažné potravinové reakce

obr. 1: Přehled nejvýznamnějších molekulárně definovaných alergenů pšenice

Alergeny pšenice *Triticum aestivum* jsou molekulárně definované (obr. 1). Patří k nim zejména gliadiny, a to tepelně stabilní ω -5-gliadin, nesoucí mezinárodní označení **Tri a 19**, dále pak termolabilní α - β -gliadin (**Tri a 21**) a γ -gliadin **Tri a 20**. **Tri a 19** (ω -5-gliadin) je odpovědný za celou řadu alergických projevů včetně závažných systémových reakcí. Tento alergen se také vyznačuje výraznou zkříženou reaktivitou s jinými prolaminami obsaženými v dalších cereáliích, zejména se sekaliny žita a hordeiny ječmene. Specifickou podobou alergie na bílkoviny pšenice je **WDEIA** (anafylaxe na pšenici spuštěná fyzickou aktivitou) (obr. 2) vyvolaná cvičením, tělesnou námahou nebo také některými léky ve spojení s konzumací potravin obsahujících větší množství pšeničných bílkovin. K typickým spouštěcím alergenům tohoto onemocnění řadíme právě **Tri a 19** (ω -5-gliadin). Gliadiny se

také uplatňují v dětském věku jako agens spojené s kožními alergickými projevy, které následují po kožní nebo gastro-intestinální expozici. Rovněž pekařské astma, jako typická choroba spojená s profesionální expozicí prachu při manipulaci s moukou a dalšími syrkými pšeničnými surovinami, je vyvoláno alergeny pšenice. Na prvním místě stojí ω -5-gliadin **Tri a 19**, ale pekařské astma a rinitidu mohou vyvolat i alfa-amylázové inhibitory **Tri a 28** a **Tri a 29**, stejně tak jako alergen **Tri a 27**. Kromě gliadinů obsahuje pšenice také gluteniny s nízkou (LMW) a vysokou (HMW) molekulovou hmotností. Tyto alergeny nesou označení **Tri a 36** a **Tri a 26**. Expozice **Tri a 36** může vyvolat anafylaxi spojenou s fyzickou námahou (WDEIA).

Z alergenů obsažených v rozpustné frakci bílkovin pšeničného zrna můžeme uvést v první řadě skupinu α amylázových inhi-

bitorů. Patří k nim zejména **Tri a 28**, **Tri a 29**, ale také **Tri a 15**. Tyto alergeny se do organismu dostávají převážně respirační cestou a jsou odpovědné za závažné anafylaktické reakce i za vznik astmatu. Jsou termostabilní a vysoce odolné vůči působení proteáz. Navíc bylo zjištěno, že tato skupina proteinů z pšenice je schopna aktivovat mechanismy vrozené imunity a stimulovat produkci prozánětlivých cytokinů v zažívacím traktu. To může vést k infiltraci střevní sliznice imunitními buňkami a k zánětu. Tento mechanismus je pravděpodobně jednou z příčin neceliakální glutenové sensitivity (**NCGS**).

Pšenice obsahuje také alergeny ze skupiny LTP (lipid transfer protein), jako je **Tri a 14** nebo ze skupiny profilinů (**Tri a 12**). Obě skupiny mohou způsobovat klinické komplikace. Významné klinické potíže mohou vyvolat i alergeny **Tri a 17** (beta-amyláza), **Tri a 27** (protein homologický s thiolreduktázou) a **Tri a 37** (alfa-purothionin). Do mezinárodní nomenklatury bylo zařazeno 28 molekulárně definovaných alergenů pšenice. Pouze použití CRD diagnostiky se stanovením IgE protilátek proti jednotlivým molekulárně definovaným

alergenům umožní lékaři orientovat se v této složité situaci, správně odhadnout cestu expozice i riziko závažnosti alergického zánětu.

V současné době jsou pro běžné klinické využití k dispozici jen některé molekulární alergeny pšenice. Jsou součástí multiplexových alergologických vyšetření jako ISAC a ALEX nebo je možné stanovit specifické IgE protilátky proti jednotlivým komponentám. Pro zhodnocení rizika závažných systémových reakcí včetně WDEIA je na prvním místě vyšetření IgE proti ω -5-gliadinu (**Tri a 19**). Někteří pacienti mohou reagovat i na LTP protein **Tri a 14**, který může být spojen s pekařským astmatem. Je možné vyšetřit i IgE proti amylázovým inhibitorům, ovšem nikoli konkrétně proti **Tri a 28**, **Tri a 29** ani **Tri a 15**.

Antigeny pšenice mohou vyvolávat i non IgE mediované typy přecitlivělosti (obr. 3), ke kterým patří eosinofilní ezofagitida (**EoE**) a eosinofilní gastritida (**EG**) charakteristické eosinofilní infiltrací trávicí trubice. Jelikož v patogenezi těchto onemocnění nehrají IgE protilátky žádnou významnou úlohu, vyšetřovat specifické IgE proti pře-

ničným antigenům nemá v tomto případě význam. Diagnostika stojí na eliminační dietě a bioptickém vyšetření.

Zcela zvláštní kapitola je otázka gliadinu a gliadinových peptidů ve spojení s tkáňovou transglutaminázou jako spouštěčů autoimunitních imunopatologických onemocnění celiakie a dermatitis herpetiformis Dühring. O ní je pojednáno v jiném příspěvku v tomto čísle.

prof. RNDr. Ctirad Andrys, Ph.D.

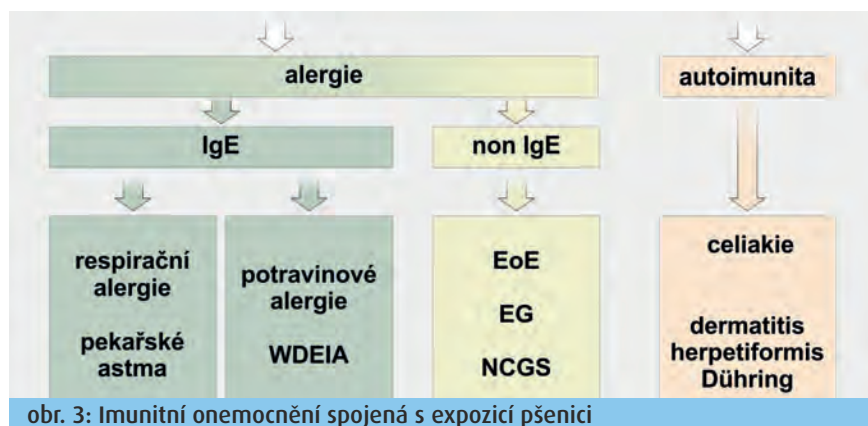
Ilustrace: Hana Kotlandová

Literatura:

1. Cianferoni, A. *Wheat Allergy: diagnosis and management. Journal of Asthma and Allergy. 2016, 9, 13-25. DOI:10.2147/JAA.S81550.*
2. Samasca, G., Sur, G., Iancu, M., Lupan, I., Deleanu, D. *Current trends and investigative developments in wheat allergy. International Reviews of Immunology, 2015, 34, 538-541. DOI: 10.3109/08830185.2015.1065827.*
3. Matricardi, P.M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H.J., Valenta, R., Ollert, M. *Molecular Allergology, John Wiley, 2016, Vienna, 212-223. ISBN 978-3-033-05653-4.*
4. Pahr, S., Constantin, C., Mari, A., Scheibhofer, S., Thalhammer, J., Ebner, C., Vrtala, S., Mittermann, I., Valenta, R. *Molecular characterisation of wheat allergens specifically recognized by patients suffering from wheat-induced respiratory allergy. Clinical and Experimental Allergy, 2012, 42, 597-609. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2012.03961.x.*
5. Procházková, V., Sánchez, D., Štěpánová Honzová, S., Hospodková, M., Hoffmanová, I. *Neglutenové proteiny pšeničného zrna v imunopatogenezi onemocnění zažívacího traktu, Alergie, 2018, 3, 156-161.*
6. Vaňková, R. *Analysis of sensitization to molecular components determined by the multiplex system ImmunoCAP ISAC in patients with atopic dermatitis, Disertační práce Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2021.*



obr. 2: Alergie na proteiny *Triticum aestivum*



obr. 3: Imunitní onemocnění spojená s expozicí pšenici

Intolerance lepku; celiakie, imunopatogeneze

Intolerance lepku je oprávněně ve středu pozornosti lékařů mnoha odborností. Již řadu let se dostává i do povědomí veřejnosti. Je pro to řada příčin, jak odborných, tak i zavádějících, které se rychle šíří ve společenském prostoru. Pokusíme se podat stručný vhled na současné znalosti příčin intolerance lepku a z ní resultující celiakie. Poukážeme na možnosti, jak určením jednoduchých imunologických biomarkerů lze přispět k diagnostice intolerance lepku.

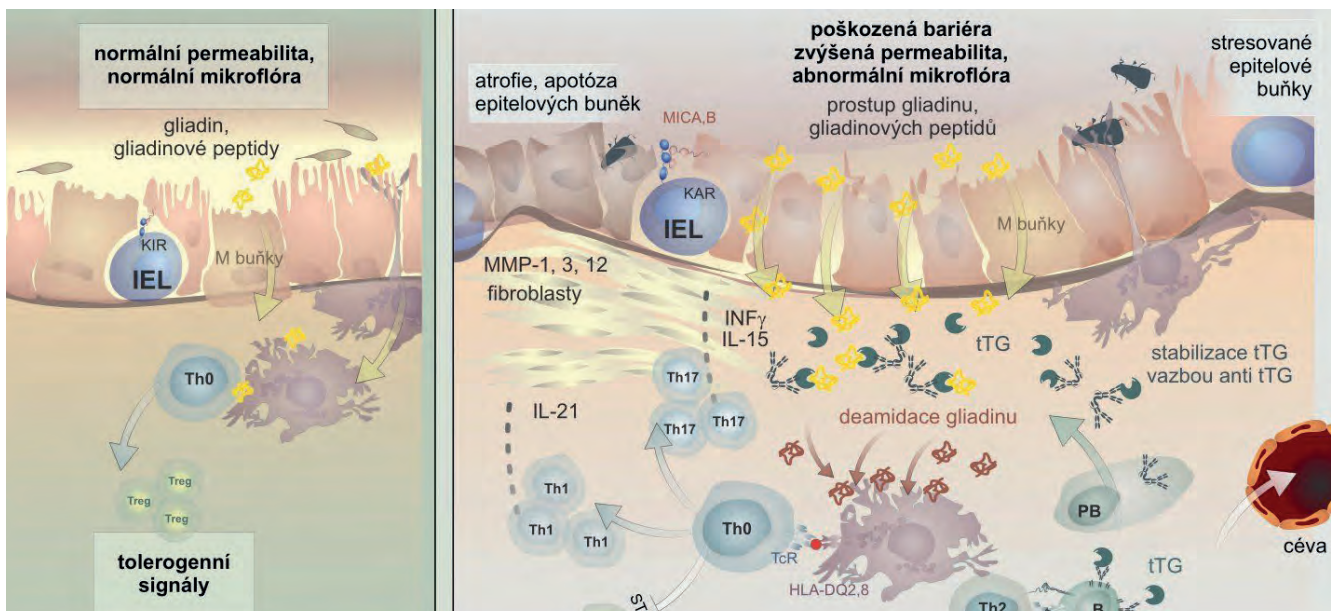
Lepek, gliadin, je součást zásobních proteinů obilného zrna pšenice (*Triticum*). Pšenice představuje pro lidstvo jeden z nejvýznamnějších zdrojů potravy. Postupy molekulární biologie v kombinaci s pokrokem v metodách archeologického výzkumu dokládají, že v současnosti nejvíce pěstovaná pšenice *Triticum aestivum* je hexaploidní hybrid, který vznikl postupným šlechtěním a má kořeny v neolitické revoluci. Byl pěstován již kolem roku 1350 př. n.l. na Balkánu. Počátky kultivace pšenice a jiných plodin spolu s domestikací zvířat, lze poprvé nalézt v tzv. „úrodném

půlměsíci“, který zahrnuje území táhnoucí se od Íránu přes severní Irák, jižní Turecko až po Palestinu. Původně pěstovaná pšenice jednozrnka byla dále šlechtěna s cílem vyšších výnosů a také zlepšení organoleptických vlastností zrna, které mimo jiné určuje právě obsah lepku. Ten je v současné pšenici nejvyšší. Intolerance lepku vede ke vzniku onemocnění, celiakie. Toto onemocnění není nové. Lze jej prokázat na kosterních pozůstatcích nyní i s pomocí genetických analýz již v době neolitu. První popisy nemoci jsou v antické lékařské literatuře. Pozornost jí byla věnována již od zhruba 18. století. Vztah mezi konzumací potravin obsahujících pšeničnou mouku a celiakií našel na konci 2. světové války holandský lékař dr. Dicke. Ten si povšiml, že děti trpící celiakií v období „velkého hladu“, kdy okupanti zabavili v roce 1944 v Nizozemí pšenici a základem potravy se staly brambory, dosáhly remise. Po přechodu na běžnou stravu obsahující pšeničnou mouku, došlo naopak ke zhoršení klinického stavu. Toto klinické pozorování bylo základem pro

další klinické bádání a stimulovalo také základní výzkum. Výsledkem je současné chápání patofyziologie celiakie.

Pšeničné zrno ve své struktuře obsahuje řadu definovaných chemických substancí. Patří mezi ně prolaminy, které zahrnují i gluten. Gluten je rozpustný v alkoholu a je možné identifikovat několik odlišných frakcí. Podobně jako pšenice gliadin, obsahují také další obiloviny prolaminy, které mohou mít podobné negativní dopady na zdraví, jako má gliadin. Jedná se o hordeiny ječmene, sekaliny žita a aveniny ovsa. Všechny jmenované základní obiloviny mohou u disponovaných osob rozvinout celiakii. Mezi základní obiloviny, které jsou v tomto ohledu bezpečné, patří rýže, kukuřice a řada dalších méně používaných „obilovin“.

Gliadin a další prolaminy jsou charakterizovány vysokým obsahem prolinu a glutaminu. Ty jsou v trávicím traktu pouze částečně rozloženy žaludečními enzymy, pankreatickými enzymy a enzymy epitelu



obr.1: Celiakie, imunopatogenetické mechanismy

Za normálních okolností jsou gliadinové štěpy zpracovány dendritickými buňkami střevní sliznice tak, aby byl preferenčně stimulován subset Treg T lymfocytů a další složky slizniční imunity, které vytvářejí homeostatické tolerogenní signály. U geneticky disponovaných jedinců, u kterých dojde ke zvýšení střevní permeability pravděpodobně v důsledku narušené střevní mikrobioty, pronikají gliadinové štěpy do lamina propria. Zde jsou chemicky modifikovány (deamidace) působením tkáňové transglutaminázy (tTG) za vzniku abnormálních imunogenních gliadinových peptidů, které jsou zpracovány dendritickými buňkami. Vzniklé štěpy navázané na molekuly HLA-DQ2, DQ8 jsou prezentovány T lymfocytům. Výsledkem je abnormální preferenční diferenciací do subsetů Th17 a Th1, které jsou ústřední složkou komplexního poškozujícího zánětu ve střevní sliznici u nemocných s celiakií. Jeho prostřednictvím jsou cytotoxicky likvidovány epitelové buňky. Výsledkem je atrofie střevní sliznice. Významné postavení zaujímají autoprotilátky proti tTG. Jejich vazba na enzym zvyšuje tvorbu deamidovaných gliadinových fragmentů a vede k zesílení poškozujícího zánětu.

tenkého střeva. Jejich neúplný rozklad vede ke vzniku zhruba 200 potenciálně imunogenních peptidů, které mohou u disponovaných osob vést k rozvoji imunopatologických dějů. Aby se staly plně imunogenními, musí dojít k jejich chemické modifikaci působením enzymu tkáňové transglutaminázy (tTG). Tkáňová transglutamináza je vyjádřena ve všech buněčných strukturách a tkáních těla. Je zapojena do mnoha fyziologických procesů, které souvisejí s přenosem signálů z buněčných receptorů, buněčnou proliferací, pohybem, procesy endocytózy, tvorbou extracelulární buněčné hmoty a hojení. Za fyziologických podmínek je aktivita tkáňové transglutaminázy na mnoha úrovních regulována. Tkáňová transglutamináza katalyzuje deamidaci a transamidaci gliadinu za vzniku plně imunogenních peptidových fragmentů.

U lidí, u kterých se vyvine intolerance lepků, jsou typicky přítomny autoprotilátky proti tkáňové transglutamináze. O příčinách tvorby zmíněných autoprotilátek zatím nemáme dostatek informací. Je pravděpodobné, že se vytvářejí u disponovaných osob, kteří byli vystaveni ve zvýšené (nenormální) míře glutenu, velmi pravděpodobně již v časném postnatálním období. Může to souviset s narušením integrity slizničních povrchů, např. virovou infekcí. Podstatné je také časování expozice lepků v rámci ontogenetického vývoje. Autoprotilátky anti-tTG se váží na tkáňovou transglutaminázu. Výsledkem je její stabilizace a zesílená aktivita vedoucí k podstatné produkci chemicky modifikovaných imunogenních peptidů. Imunogenní peptidy jsou prezentovány dendritickými buňkami v kontextu HLA molekul II. třídy, konkrétně HLA-DQ2 a HLA-DQ8 T lymfocytům. Tento fakt je kritický, protože pouze osoby nesoucí tyto HLA molekuly mohou efektivně prezentovat imunogenní peptidy odvozené od gliadinu (a jiných prolaminů) T lymfocytům. Jmenované molekuly HLA mají totiž ve své struktuře vzájemně vazebné aminokyseliny nutné pro jejich efektivní prezentaci. Osoby s jinou výbavou HLA II. třídy nemohou efektivně prezentovat imunogenní peptidy odvozené od gliadinu a jejich expozice gliadinu nemůže vést k rozvoji imunopatologického procesu.

Aktivované T lymfocyty, které se nacházejí v lamina propria střevní sliznice klonálně expandují a funkčně se polarizují především do subsetu Th1. Prostřednictvím cytokinů stimulují intraepitelové T lymfocyty CD8+ k aktivaci a cytotoxické aktivitě, která se obrací proti epitelovým struktu-

rám. Ty jsou přímo poškozovány např. prostřednictvím perforinů nebo je v nich stimulována apoptóza. Stresované epitelové buňky uvolňují působky, které stimulují proliferaci TcR $\gamma\delta$ + T lymfocytů, které následně přispívají k likvidaci epitelových buněk. Celý proces je dlouhodobý. Výsledkem je atrofie sliznice tenkého střeva. Poškozující zánět není lokalizován pouze na střevní sliznici, protože T i B lymfocyty cíleně migrují do sekundárních lymfatických orgánů. Takto je zajištěna systémová odpověď. Projeví se např. i tvorbou komplexů mezi tkáňovou transglutaminázou a autoprotilátkami v kůži s kožními projevy, které jsou charakteristické pro M. Duhring.

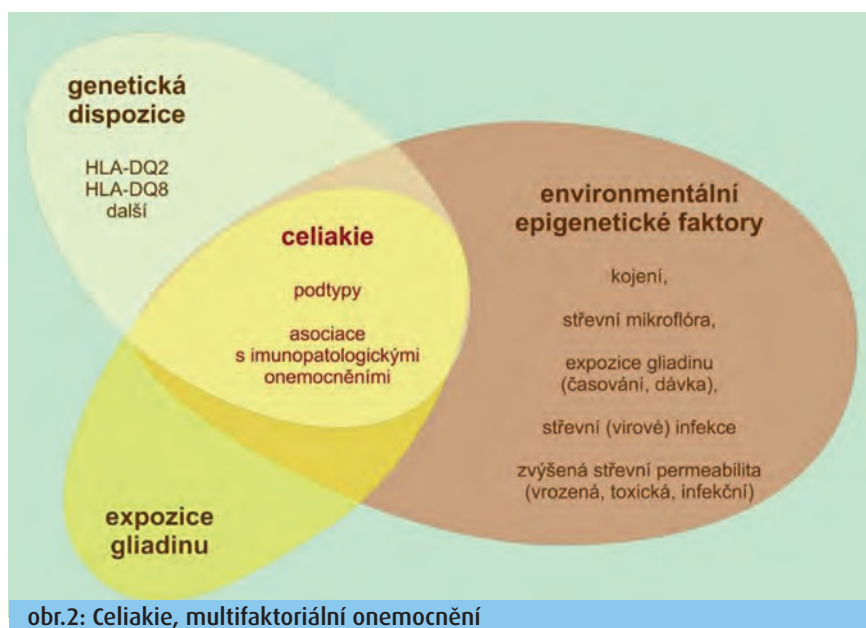
Celiakie je typickým příkladem multifaktoriálního onemocnění. Je jasně geneticky determinovaná prostřednictvím molekul HLA-DQ2, 8. Je však významně ovlivněna řadou vnějších faktorů, které souvisí např. s expozicí lepků v časném období ontogenetického vývoje. Podle současných návodů má být kojeneckému dítěti v období ne dříve než ukončený 4. měsíc a ne později než ukončený 6. měsíc, postupně zařazována pevná strava, včetně lepků. Tato časově optimální expozice přiměřenému a zvyšujícímu se množství lepků vede k nastavení tolerizace. Ta je charakterizována funkční polarizací T lymfocytů k subsetu Treg, který brání rozvoji imunopatologických procesů. Osoby s intolerancí lepků tyto regulační homeostatické mechanismy postrádají. Podmínkou pro rozvoj poškozujícího zánětu je jednoznačně expozice gliadinu (a jiným prolaminům). Toto je základem pro léčebná doporučení pacientů s celiakií, kteří musí dodržovat důsledně a celoživotně „bezlepkovou dietu“.

Celiakie byla po dlouhou dobu považována za nemoc dětského věku. Není tomu tak. Celiakie se může projevit v jakémkoliv věku. Bohužel, její příznaky jsou velmi nespecifické a obtížně definované. Opřít se lze o fakt, že celiakie má rodinný výskyt a je často spojena s jinými imunopatologickými nemocemi. O kožní prezentaci jsme se již zmínili. Celiakie však může ovlivňovat i plodnost. Mnozí nemocní udávají pouze pocity trvalé únavy, často spojené s psychickými problémy.

Na opačném pólu jsou lidé, kteří se pod tlakem informací kolujících ve veřejném prostoru obávají škodlivosti lepků. Často důsledně omezují příjem lepků v domnění, že se zlepší jejich zdravotní stav. Není to pravda. Naopak, lepek je kvalitní bílkovinou, jejíž bezdůvodná eliminace z jídelníčku představuje ztrátu. I u těchto osob je jednoduchým řešením stanovení autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze. Je-li výsledek testu negativní, eliminace lepků z výživy neznamená žádný zdravotní benefit.

Praktická doporučení do klinické praxe

Diagnostika se kromě anamnézy a zhodnocení klinického stavu opírá o biopsii tenkého střeva. Toto vyšetření je invazivní a není vždy snadno dostupné. Velmi užitečnými testy, zvláště pro screening celiakie, jsou metody průkazu autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG) a proti endomysiu (EMA), obě ve třídě IgA. Oba testy se dobře doplňují a společně dosahují téměř stoprocentní sensitivity a specificity pro celiakii. Mají však dvě omezení.



První je u pacientů se selektivním deficitem tvorby IgA protilátek, kde je nutné hledat autoprotilátky proti tkáňové transglutamináze a endomysiu ve třídě IgG, případně i protilátky proti deamidovaným gliadinovým peptidům (anti-DGP) ve třídě IgG. Druhým omezením anti-tTG IgA a EMA IgA je možnost falešně negativního nálezu u pacienta, který je již na bezlepkové dietě. Striktní dodržování bezlepkové diety snižuje hodnoty protilátek až k negativitě. Slabě pozitivní hodnoty klesnou do negativy během několika týdnů, vyšší hodnoty klesnou u 80 % pacientů po 6-12 měsících

důsledné diety. Této skutečnosti lze využít pro kontrolu adherence k dietě. Vyšetření všech typů protilátek se provádí ze vzorku séra a finančně není náročné.

Moderními metodami molekulární biologie je možno prokázat přítomnost HLA DQ2/DQ8. Test slouží především pro vyloučení celiakie v případě negativního nálezu. U pacientů, kteří nemají HLA DQ2/DQ8, je celiakie vyloučena a další testování je zbytečné. Naopak pozitivita testu znamená, že pacient může onemocnět, ale výsledek neprokazuje přítomnost one-

mocnění. Je velká skupina osob, kteří nesou HLA DQ2/DQ8, ale celiakii nemají. Z tohoto důvodu není toto vyšetření vhodné pro první linii diagnostiky. Molekulárně biologické testy jsou však řádově nákladnější při porovnání s imunologickým testováním.

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
prof. RNDr. Ctirad Andrys, Ph.D.
Ilustrace: Hana Kotlandová

Literatura u autorů

Nová vyšetření

Test schopnosti séra degradovat histamin – THDC Total Histamine Degradation Capacity

Vyšetření THDC se provádí pro doplnění diagnostiky onemocnění zvaného histaminová intolerance (HIT). Jedná se o druh potravinové intolerance, jehož patologickou podstatou je neschopnost těla odbourat potravou přijatý nebo v těle nahromaděný histamin. Odbourání histaminu v těle zajišťují dva enzymy: diaminoxidáza (DAO) a histamin N-metyltransferáza (HNMT). Obě enzymové dráhy se navzájem doplňují. Enzym DAO rozkládá převážně exogenní histamin (přijatý v potravě) a HNMT histamin endogenní. Aktivita DAO je ovlivněna mnoha různými faktory jako jsou např.: těhotenství, stravovací návyky (konzumace alkoholu) nebo genetické předpoklady.

Test THDC je založen na porovnání množství odbouraného histaminu mezi dvěma alikvoty patientského séra. Do jednoho podílu je přidáno výrobcem dané množství roztoku obsahujícího určitou koncentraci histaminu. Tento vzorek je ponechán 24 h inkubovat při 37 °C. Do druhého podílu je stejné množství téhož roztoku přidáno až dodatečně (před samotným stanovením). Pokud má testované sérum schopnost odbourávat histamin, dojde u prvního podílu v průběhu inkubace k rozložení množství histaminu úměrného aktivitě výše popsaných degradačních mechanismů. Koncentrace zbylého histaminu v obou podílech testovaného vzorku je stanovena pomocí ELISA testu v kompetitivním uspořádání. Jako výsledek je vydáváno vypočítané procento degradovaného histaminu v séru. Dle referenčního rozmezí, udávaného výrobcem, je výsledná hodnota > 40 % interpretována jako dostatečná schopnost

séra degradovat histamin, při hodnotách 25 – 40 % je degradace histaminu omezena a hodnoty 0 – 25 % naznačují sníženou nebo žádnou schopnost vzorku odbourat histamin.

Vyšetření provádíme z běžného odběru srážlivé krve (sérum) a není potřeba, aby pacient vysazoval nízkohistaminovou dietu. Vzhledem k tomu, že se jedná o stanovení funkční aktivity enzymu, neprovádíme vyšetření ze znovu rozmrazeného séra. Výsledky by mohly být falešně patologické. Vyšetření tedy neprovádíme jako dodatek k předchozímu odběru.

Naše laboratoř se úspěšně pravidelně účastní cyklů externího hodnocení kvality, který je pořádán výrobcem soupravy FROST Diagnostika GmbH.

Test THDC je v naší laboratoři dostupný od března 2021. Další užitečné informace,

nejen ohledně tohoto testu, najdete na webových stránkách laboratoře: www.interimun.cz.

Mgr. Barbora Těšpílová
Fotografie: Bc. Eva Kubátová

Další informace:

1. Hakl R, Litzman J, *Histaminová intolerance, Vnitř Lék.* 2023; 69(1): 37-40
2. Hrubisko M, R Danis et al, *Histamine Intolerance - The More We Know the Less We Know. A Nutrients, Review* 2021, 13, 2228.
3. Lochman I, Soukupová M et al, *Význam stanovování histamin-degradační aktivity séra v diagnostice histaminové intolerance, Alergie* 1/2017: 9-17



Nová vyšetření

THSD7A – nový biomarker v sérologické diagnostice glomerulopatií

Membranózní nefropatie je spjata s tvorbou protilátek proti antigenům na povrchu podocytů. Hlavní lidský podocytární antigen, který indukuje autoimunitní reakci spojenou s tvorbou autoprotilátek, namířených proti antigenu M-typu receptoru pro fosfolipázu A₂ (anti-PLA₂R protilátky), je znám od roku 2009. Tento typ protilátek charakterizuje specifickou podskupinu pacientů, s tzv. anti-PLA₂R pozitivní membranózní nefropatií. Sérové hladiny anti-PLA₂R protilátek mohou však být nedetekovatelné u části pacientů s vysoce avidními protilátkami, které mohou být vyvážány na glomerulech.

Existují však pacienti s idiopatickou membranózní nefropatií, kteří tvoří autoprotilátky proti jiným antigenním strukturám. V této souvislosti byl v roce 2014 identifikován nový podocytární antigen THSD7A (thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A). Jedná se o N-glykosylovaný, vysoce molekulární protein, exprimovaný na membráně podocytů (obr. 1). Protilátky proti THSD7A byly prokázány u 10% pacientů s idiopatickou membranózní nefropatií, kteří byli všichni anti-PLA₂R negativní (tab. 1).

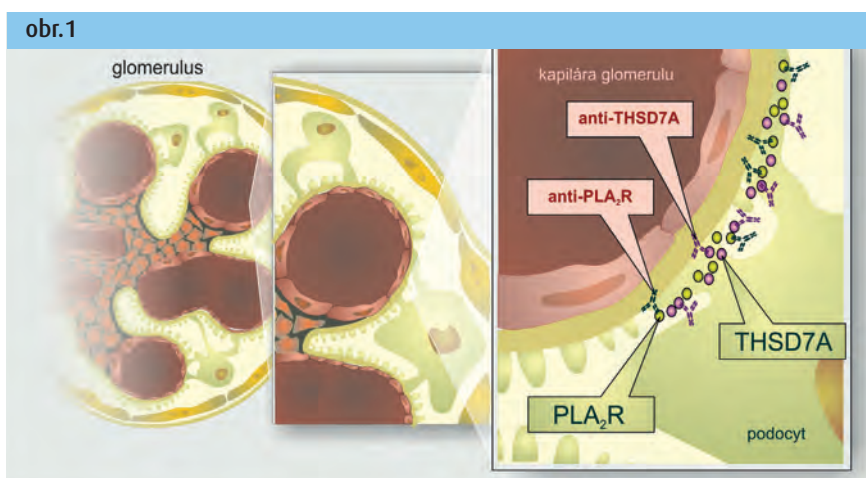
K průkazu anti-THSD7A protilátek lze využít metodu nepřímé imunofluorescence na substrátu THSD7A transfekovaných buněk (obr. 2).

Průkaz protilátek proti THSD7A představuje další doplňující marker pro sérologickou neinvazivní diagnostiku primární membranózní nefropatie (obr. 3).

RNDr. Marcela Drahošová
Ilustrace: Hana Kotlandová

Literatura:

1. Tomas NM, Beck Jr. LH, Meyer-Schwesinger C, et al. *Trombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. N Engl J med 2014; 371:2277-2287*
2. Prof. MUDr. Vladimír Tesář, DrSc., MBA. *Postgraduální nefrologie 2015, roč. 13, č. 1, s. 2-3*



tab. 1: Prevalence anti-THSD7A protilátek

Kohorta n=348	n	Anti – THSD7A pozitivní
Anti-PLA ₂ R negativní MN	154	15
Anti-PLA ₂ R pozitivní MN	74	0
Jiná glomerulární onemocnění	76	0
Zdravá kontrola	44	0

Tomas et al. 2014

obr. 2: Imunofluorescenční nález u anti-THSD7A pozitivního vzorku

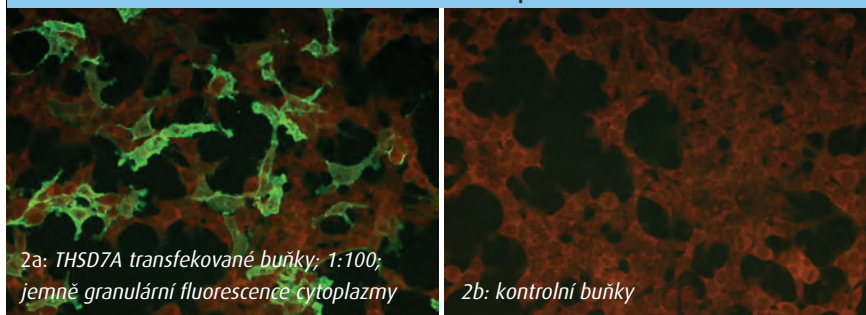


foto: Euroimmun

