

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Srovnání dvou multiplexových metod pro průkaz
specifických IgE protilátek proti molekulárně
definovaným alergenům**

Bc. Denisa Velčovská

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Mé poděkování patří prof. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D. za skvělé odborné vedení, spoustu trpělivosti, cenné poznámky a možnost osobních konzultací při zpracování této diplomové práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 10.5.2023

Bc. Denisa Velčovská

OBSAH

ABSTRAKT	7
ABSTRACT	9
1 ÚVOD	11
2 ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	12
3 ALERGIE	13
3.1 Imunopatologická reakce I. typu	14
3.2 Epidemie alergie v posledních 100 letech	14
3.3 Klinické formy alergie	15
3.3.1 Atopický ekzém	15
3.3.2 Bronchiální astma	16
3.3.3 Alergická rýma	17
3.4 Potravinová alergie a intolerance	17
4 ALERGENY	18
4.1 Názvosloví alergenů	19
4.2 Biochemická struktura alergenů	20
4.3 Inhalační alergený	21
5 MOLEKULÁRNĚ DEFINOVANÉ ALERGENY	22
5.1 Lipokaliny	22
5.2 Tropomyosiny	23
5.3 Sérový albumin	23
.....	24
5.4 Zkříženě reagující determinanty	24
5.5 Zvířecí alergený	25
5.5.1 Pes domácí (<i>Canis familiaris</i>)	25
5.5.2 Kočka domácí (<i>Felis domesticus</i>)	25
5.5.3 Myš domácí (<i>Mus musculus</i>)	26
5.5.4 Kůň domácí (<i>Equus caballus</i>)	27
5.6 Inhalační komponenty roztočů a Rusa domácího	28

5.6.1	<i>Dermatophagoides</i> sp.	28
5.6.2	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	29
5.6.3	<i>Blomia tropicalis</i>	29
5.6.4	Rus domácí (<i>Blattella germanica</i>)	30
5.7	Inhalační komponenty spor plísní	30
5.7.1	<i>Alternaria alternata</i>	30
5.7.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	31
6	DIAGNOSTIKA ALERGICKÉHO ZÁNĚTU	32
6.1	Kožní testy	33
6.2	Laboratorní diagnostika alergií	33
6.2.1	Stanovení celkových IgE protilátek	33
6.2.2	Stanovení specifických IgE protilátek.....	33
6.2.3	Buněčné testy.....	34
6.2.4	Vyšetření rekombinantních alergenů.....	35
6.2.5	Multiplexové metody	36
7	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
7.1	Sběr anamnestických dat	39
7.2	Určení diagnózy astmatu a alergické rýmy	39
7.3	Stupnice závažnosti atopické dermatitidy	40
7.4	Odběr krevních vzorků	40
7.5	Vyšetření sérových IgE protilátek metodami ALEX a ISAC	40
7.5.1	Princip analýzy ISAC	41
7.5.2	Pracovní postup ISAC	42
7.5.3	Princip analýzy ALEX.....	43
7.5.4	Pracovní postup ALEX.....	43
7.6	Statistické zpracování dat a výsledky	45
7.6.1	Soubor pacientů pro statistické zpracování	45
8	VÝSLEDKY.....	47
8.1	Základní statistika souboru pacientů	47
8.2	Statistické vyhodnocení kvalitativních dat.....	48
8.2.1	Chí-kvadrát test pro jednotlivé třídy alergenů.....	48
8.2.2	Chí-kvadrát test pro četnost pozitivních a negativních výsledků alergenů	51

8.3	Statistické vyhodnocení kvantitativních dat	55
8.3.1	Testy nezávislosti – Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů plísni 55	
8.3.2	Testy nezávislosti – Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů roztočů a Rusa domácího	56
8.3.3	Testy nezávislosti – Spearmanův test korelačního koeficientu pro alergeny zvířat 58	
9	DISKUSE	60
10	ZÁVĚR	66
11	POUŽITÉ ZKRATKY	67
12	SEZNAM TABULEK	70
13	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
14	SEZNAM GRAFŮ	72
15	POUŽITÁ LITERATURA	73
16	SEZNAM PŘÍLOH	79

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor: Bc. Denisa Velčovská

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

Název diplomové práce: Srovnání dvou multiplexových metod pro průkaz specifických IgE protilátek proti molekulárně definovaným alergenům

Diplomová práce se zabývá srovnáním dvou multiplexových metod ALEX a ISAC při stanovení specifických IgE protilátek proti vybraným alergenům u pacientů s atopickou dermatitidou. Cílem této práce je statistické srovnání obou metod a zhodnocení získaných dat, zda obě metody poskytují podobné výsledky a jsou mezi sebou zaměnitelné, či poskytují významné rozdíly ve výsledcích statistického srovnání. Práce se soustřeďuje převážně na inhalační alergeny plísni, roztočů, Rusa domácího a zvířecích alergenů.

Teoretická část práce je zaměřena na alergie a jejich klinické formy. Dále jsou zde popsány alergeny, jejich názvosloví, biochemická struktura a také metody, které slouží k diagnostice alergického zánětu.

V experimentální části je zhodnocena základní statistika souboru, která obsahuje 96 pacientů z alergologické ambulance Kožní kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Statistické zkoumání je zaměřeno na kvantitativní a kvalitativní vyhodnocení dat. Pro kvalitativní analýzu byl vybrán chí-kvadrát test pro četnost jednotlivých alergenů ve třídách, a také pro četnost pozitivních a negativních výsledků. Pro kvantitativní vyhodnocení byla použita korelační analýza a Spearmanův korelační koeficient.

Při zhodnocení výsledků byla zjištěna velmi dobrá shoda mezi metodami ALEX a ISAC v kvalitativních výsledcích. Taktéž při srovnání kvantitativních hodnot pomocí korelační analýzy bylo u většiny alergenů dosaženo statisticky významné korelace mezi metodami.

Dané cíle byly splněny a lze říci, že obě metody se principiálně shodují a je možné je s jistou výhradou vzájemně zaměnit. Výhrada spočívá především v horší shodě ve vysokých hodnotách IgE u většiny alergenů, kdy metoda ALEX poskytuje nižší hodnoty než metoda ISAC.

Klíčová slova: *alergický zánět, alergeny, specifické IgE, atopická dermatitida, multiplexové metody ALEX, ISAC*

ABSTRACT

Charles University Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Subject of study: Bioanalytical laboratory diagnostics in health care

Author: Bc. Denisa Velčovská

Supervisor: prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

Title of diploma thesis: Comparison of two multiplex (biochip) methods for determination of specific IgE antibodies against food allergens in group of patients suffering from atopic dermatitis

This thesis deals with the comparison of two multiplex (biochip) methods ALEX and ISAC in the determination of specific IgE antibodies against selected allergens in patients with atopic dermatitis. The aim of this thesis is to statistically compare the two methods and perform an evaluation of the data obtained, to assess whether the two methods provide similar results and are interchangeable, or whether a statistically significant difference can be observed. This diploma thesis mainly focuses on inhalant allergens of moulds, mites, house dust mites and animal allergens.

The theoretical part of this diploma thesis is focused on allergies and their clinical forms. It also describes allergens, their nomenclature, biochemical structure and methods used to diagnose allergic inflammation.

In the experimental part, the basic statistics of the cohort, which includes 96 patients from the allergy outpatient clinic of the Skin Clinic of the University Hospital Hradec Králové, is evaluated. The statistical investigation focuses on a quantitative and qualitative data assessment. For the qualitative analysis, the chi-square test was chosen to assess for the frequency of individual allergens in the classes, as well as the frequency of positive and negative results. Correlation analysis and Spearman's correlation coefficient were used for quantitative evaluation.

Upon qualitative analysis of the results, there was a very positive link found between the ALEX and ISAC methods. Additionally, when comparing the quantitative values using

correlation analysis, a statistically significant correlation between these methods could be observed for most allergens. In conclusion, the given objectives were met, it can be deduced that the two methods are in principle identical and can, to a certain extent, be interchanged. The uncertainty lies mainly in the weaker association between the high IgE values for most allergens, with the ALEX method providing lower values than the ISAC method.

Keywords: *allergic inflammation, specific IgE, atopic dermatitis, multiplex methods, ALEX, ISAC*

1 ÚVOD

Alergická onemocnění jsou ve světě velmi rozšířená a představují závažný společenský a ekonomický problém. Postihují zejména obyvatele vyspělých zemí. Podle některých údajů trpí nějakým projevem alergického zánětu až 25 % obyvatelstva a toto číslo stále narůstá. Léčba alergického zánětu spotřebovává obrovské sumy ze společenských zdrojů. Velmi nákladná léčba je závislá na přesnosti a spolehlivosti klinické a laboratorní diagnostiky. Klinická diagnostika spočívá v podrobné anamnéze a vhodném testování v ambulanci alergologa. K dispozici jsou kožní testy, expoziční testy, epikutánní testy a při dýchacích projevech i spirometrie, rhinomanometrie nebo měření oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu (FENO). Významným pomocníkem alergologa, kožního či plicního lékaře je laboratorní diagnostika, kde je nejužívanějším testem stanovení specifických IgE protilátek proti alergenu (alergenům) způsobujícímu pacientovi obtíže. Nejčastějším cílem analýzy je najít specifický, příčinný alergen. K tomuto účelu slouží celá řada laboratorních metod. Komplexní pohled na pacienta umožňují multiplexové metody schopné změřit desítky až stovky různých specifit IgE protilátek a tím odhalit většinu klíčových alergenů. Nejužívanější multiplexové metody v Evropě i České republice jsou metoda ISAC od firmy ThermoFisher/Phadia a metoda ALEX od firmy MacroArrayDX. Obě tyto metody poskytují komplexní alergický profil vyšetřovaných pacientů. Otázkou je, zda poskytují srovnatelné výsledky a tím i srovnatelný diagnostický závěr. Porovnání obou metod na vhodném souboru pacientů je základním cílem této práce.

2 ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce je srovnání dvou multiplexových metod na stanovení specifických IgE protilátek, a to metody ISAC od firmy ThermoFisher/Phadia a metody ALEX od firmy MacroArray Diagnostics.

Srovnání bude provedeno na skupině pacientů s atopickou dermatitidou, kde jsou očekávány vyšší hodnoty specifických IgE protilátek a větší počet pozitivních nálezů ve srovnání s pacienty s jinými alergickými onemocněními.

Z celé palety vyšetřovaných IgE protilátek byly pro detailní srovnání vybrány zvířecí alergeny, alergeny roztočů a plísni.

Budou porovnány kvalitativní i kvantitativní hodnoty.

Pro srovnání budou vytipovány a použity vhodné statistické metody.

3 ALERGIE

Poprvé přispěl termínem „alergie“ v roce 1906 vídeňský lékař Clemens von Pirquet. Při pozorování přecitlivělosti svých pacientů zjistil, že typicky neškodné látky jako např. konkrétní potraviny, pyl či prach způsobují u pacientům potíže (Aldakheel, 2021).

Termín alergie zahrnuje chronické zánětlivé poruchy s abnormálními imunitními reakcemi na určité environmentální částice nazývané alergeny. Alergické příznaky jsou velmi různorodé od mírných až po život ohrožující reakce, které představují velké nebezpečí. Mezi alergie náleží široká škála různých reakcí. Příčiny alergického zánětu nejsou dosud objasněny. Předpokládá se, že u geneticky predisponovaných jedinců jsou vlivem dalších faktorů imunitním systémem rozpoznány zvířecí a rostlinné proteiny (alergeny), které zdraví lidé tolerují. Predispozice pro vznik alergického zánětu se nazývá atopie. Pokud se alergický zánět projeví klinicky v podobě onemocnění, hovoříme o alergii (Aldakheel, 2021).

Alergický zánět má celou řadu klinických projevů postihujících různé orgány. Příkladem může být kožní zánět (dermatitida), anafylaxe, alergická rýma, potravinová alergie a astma. Mezi spouštěče alergických reakcí můžeme zařadit chemické alergeny (např. barvy, krémy a produkty péče o pleť,...), potravinové alergeny (např. ořechy, arašídy, vejce,...) a aeroalergeny (např. roztoče, spory, pyly,...) (Aldakheel, 2021).

Dříve byl pojem alergie používán k popisu široké řady nevhodných zánětlivých hyperimunitních reakcí. Philip Gell a Robin Coombs navrhli nový systém kategorizace v roce 1963, který na základě imunitních mechanismů definoval reakce hypersenzitivity I. až IV. typu. Akutní hypersenzitivita I. typu zprostředkovaná IgE byla v tomto klasifikačním systému označena jako „alergie“. Vyznačuje se rychlým nástupem příznaků přecitlivělosti nebo alergie, a reakce se rozvinou za méně než 20 minut po alergické expozici. Klíčem bylo pochopení významu IgE protilátek a mechanismu alergického zánětu (Aldakheel, 2021).

Kimishige Ishizaka a jeho kolegové v roce 1960 zjistili, že třída protilátek IgE zprostředkovává alergickou přecitlivělost typu I. Bylo tak dokázáno že IgE alergická protilátka je klíčovou imunologickou složkou, která může způsobit atopii nebo alergii u vnímavých, predisponovaných jedinců (Aldakheel, 2021).

3.1 Imunopatologická reakce I. typu

Hypersenzitivní reakce I. typu jsou zprostředkované protilátkami typu IgE. Protilátky IgE se vytváří proti antigenu (nebo alergenu), přičemž tendence jednotlivce k tvorbě IgE je určována mnoha faktory, včetně genetiky, citlivosti T-lymfocytů a antigenní zátěže. Protilátky IgE se váží na vysokoafinitní IgE receptory na povrchu žírných buněk a bazofilů. Tyto buňky jsou následně připraveny reagovat, pokud se při další příležitosti dostanou do těsné blízkosti alergenu. Cross-linked IgE na povrchu buněk způsobuje rychlou buněčnou degranulaci a uvolnění řady chemických mediátorů. Mezi mediátory uvolněné degranulací žírných buněk patří předem vytvořené molekuly histamin, proteázové enzymy, proteoglykany (heparin) a chemotaktické faktory. Reakce antigenu s IgE na žírných buňkách také stimuluje syntézu a uvolňování destičkového aktivačního faktoru (PAF), leukotrienů (B₄, C₄ a D₄) a prostaglandinů (hlavně PGD₂). Účinky histaminu závisí na místě uvolnění. V dýchacích cestách vyvolává kontrakci hladkého svalstva, v kůži způsobuje charakteristický zánět. Široká aktivace žírných buněk vede k systémovým účinkům. Mezi ně patří oběhový šok, hypotenze, kolaps, tíseň na hrudi a v nejzávažnějších případech zástava dýchání a smrt neboli anafylaktický šok. Reakce přecitlivělosti I. typu se objevují rychle (přibližně do 20 minut) a nazývají se také „okamžité reakce přecitlivělosti“ (Sheldon, Wheeler a Riches, 2014).

3.2 Epidemie alergie v posledních 100 letech

V posledních 100 až 150 letech prodělala lidská civilizace významný vývojový skok. Změnou životního stylu, vyšší úrovní osobní i komunální hygieny spojené s aplikací vakcín a objevem antibiotik se podařilo výrazně omezit morbiditu a mortalitu na závažné infekční onemocnění bakteriálního i virového původu. Zároveň vlivem zlepšených hygienických podmínek a cílenou lékařskou péčí byl silně potlačen výskyt parazitárních onemocnění včetně helmintů. To vše přináší velké benefity pro lidskou populaci. Na druhé straně ale chybějící kontakt s infekčním agens vede k oslabení imunitní obranyschopnosti, jelikož imunitní systém potřebuje pro správné nastavení všech funkcí kontakt s infekčními podněty. Zejména jsou postiženy tělní bariéry jako je kůže, zažívací a dýchací trakt. To jednak vede k nižší odpovědi na infekci, ale také k rozvoji imunopatologických reaktivit včetně alergického zánětu. Zejména v rozvinutých zemích je

v posledních desetiletích pozorován trend k setrvalému nárůstu počtu alergických onemocnění. Postupně narůstá výskyt senné rýmy, související s pylem trav v Evropě a pylem ambrozií v USA. Před rokem 1960 bylo jen skromné povědomí o důležitosti role domácího prachu a do té doby ani nezačal nárůst dětského astmatu (Woodfolk et al., 2015).

Druhá alergická „epidemie“ začala poté co, byla alergická rýma plně rozvinuta. Nárůst astmatu nastal především u dětí, u kterých bylo toto onemocnění do té doby neobvyklé. Naopak ve vesnicích Keni, Ekvádoru a dalších chudých oblastech alergické astma u dětí zatím nepředstavuje problém. Společným rysem astmatu u dětí je senzibilizace primárně alergeny v interiéru. Hlavními důvody byly změny v podmínkách bydlení, kdy se zvýšil čas strávený uvnitř (Woodfolk et al., 2015).

Nejnovější epidemií je nárůst potravinové alergie, zejména na arašídů. Senzibilizace může nastat jak přes kůži, tak při vyhýbání expozici arašídům v raném dětství. Další otázkou je, zda pravidelné mytí pokožky zejména detergenty, nenarušuje některý prvek kožní bariéry. V současnosti existují důkazy o defektech ve strukturním proteinu filagrinu, zvyšujících senzibilizaci přes kůži a riziko ekzémů (Woodfolk et al., 2015).

3.3 Klinické formy alergie

3.3.1 Atopický ekzém

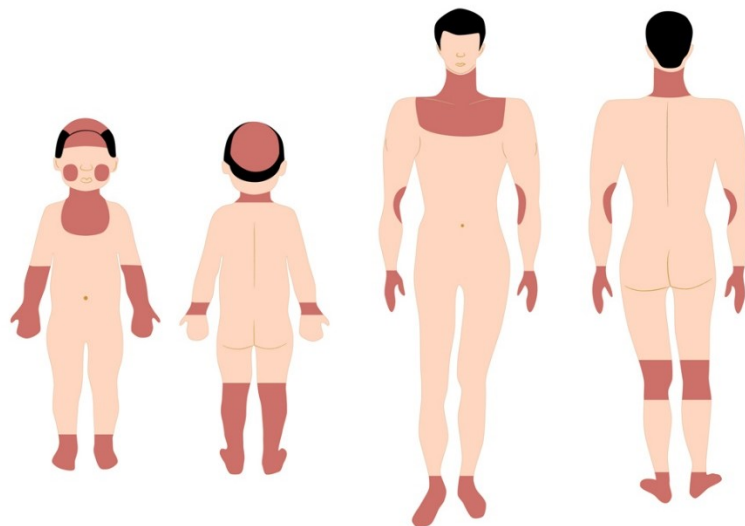
Atopická dermatitida (AD) známá také jako atopický ekzém je běžně se vyskytující chronické, recidivující a zánětlivé kožní onemocnění, které může významně ovlivnit kvalitu života postižených jedinců. Patogeneze tohoto onemocnění není zcela objasněna, ale předpokládá se jako výsledek komplexní souhry mezi defekty kožní bariérové funkce, environmentálními a infekčními agens a imunitní dysregulací (Kapur et al., 2018).

Onemocnění se nejčastěji vyvíjí v průběhu dětství a vyznačuje se recidivujícími ekzémovými lézemi tj. špatně definované, erytematózní (červené) skvrny s exsudací, puchýři a krustami v raných stádiích a šupinatěním, praskáním a lichenifikací (ztenčováním) v pozdějších fázích. Navíc tento stav doprovází intenzivní svědění

a nepohodlí. Tyto projevy mohou vést dokonce ke ztrátě spánku, sníženému sebevědomí a špatnému výkonu ve škole a v práci (Weidinger et al., 2018).

Jedná se o extrémně heterogenní onemocnění se širokým spektrem klinických příznaků od minimálního flexurálního ekzému vyskytujícího se v záhybech na těle až po erythrodermii (erytém/ zarudnutí postihující >90 % povrchu těla). Často se manifestuje jako ekzém omezený na ruce a pravděpodobně zahrnující různé podtypy s odlišnými a překrývajícími se patologickými mechanismy (Weidinger et al., 2018).

Nevyskytuje se jako samotné onemocnění, ale může koexistovat s jinými atopickými onemocněními závislými na protilátkách typu IgE, mezi které patří bronchiální astma, alergická rýma, katarální konjunktivitida a potravinová alergie (Nowicki et al., 2020).



Obrázek 1: Nejčastější místa výskytu atopického ekzému u dětí a dospělých (Colleyville Dermatology, c2023)

3.3.2 Bronchiální astma

V případě bronchiálního astmatu dochází k záchvatům dušnosti a pískotům. Tento stav je navozen jak po expozici alergenu, tak po námaze či vystavení emočnímu stresu. Typické je také narušení spánku pacienta a noční obtíže. V některých případech jsou u pacienta místo dušnosti tzv. astmatické ekvivalenty, mezi které patří epizody dráždivého a dusivého kašle (Litzman, 2007).

3.3.3 Alergická rýma

Jedná se o jedno z nejčastějších alergických onemocnění, které postihuje hlavně populaci v produktivním věku spíše než děti. Jelikož bývá velmi podceňovaná, hlavním problémem jsou následné komplikace vedoucí až k bronchiálnímu astmatu (Vernerová, 2012).

Zejména jde o vodnatou rýmu vyskytující se společně se svěděním, salvami kýchání či nosní obstrukcí. Na rozdíl od infekční rýmy přetrvává delší dobu a často je spojena s určitým ročním obdobím, při alergii na sezónní alergen (např. pyl). Mimo jiné je spojena s alergickou konjunktivitidou projevující se pálením a řezáním očí, slzením a světloplachostí (Litzman, 2007).

3.4 Potravinová alergie a intolerance

Potravinová alergie je patologická reakce imunitního systému vyvolaná požitím potravinového proteinového antigenu. Vystavení velmi malému množství alergenních potravin může vyvolat klinické projevy jako jsou gastrointestinální poruchy, kopřivka a záněty dýchacích cest. Rozsah projevů je od mírných až po život ohrožující (Yu, Freeland a Nadeau, 2016).

Alergie na potravinu je zprostředkována třemi typy imunopatologických mechanismů. Mezi první patří reakce zprostředkována protilátkami IgE s rychlým nástupem po konzumaci potravin obvykle do 2 hodin. Dále reakce nezprostředkována IgE, její nástup je viditelný po 2 a více hodinách po konzumaci. Této reakce se účastní antigen specifické T-lymfocyty a následují subkutánní projevy s přestupem do chronických obtíží. Poslední typ reakce kombinuje předchozí typy mechanismů, tedy je výsledkem kombinací IgE a non-IgE mechanismů (Yu, Freeland a Nadeau, 2016).

Mezi nejčastější potravinové alergen patří slepičí vejce, kravské mléko, sója, ořechy a ryby spolu s mořskými plody. Příznaky se mohou lišit od mírných až po závažné a v extrémních případech může potravinová alergie vést k anafylaxi, což je život ohrožující alergická reakce. Potravinové alergen mohou způsobovat i atopickou dermatitidu, kopřivku kůže či vedou k extrakutánním projevům. Reakce pozdního typu

potravinové alergie vede k exacerbaci AD a ekzematózním lézím, které se vyskytují po 6-48 hodinách (Dai, 2007).

Klinická anamnéza a fyzikální vyšetření jsou první volbou při diagnostice potravinové alergie. Anamnéza se soustřeďuje na identifikaci rizikových potravin na základě osobní a/nebo rodinné anamnézy. Fyzikální vyšetření hodnotí klinické projevy v zažívacím traktu, případně na kůži či v dýchacím systému. Při podezření na potravinovou alergii zprostředkovanou IgE se provádí měření sérové hladiny alergen-specifického IgE (sIgE) a kožní prick testy (SPT) (Ansotegui et al., 2020).

Často se pojmy potravinová alergie a potravinová intolerance neužívají správně. Je mezi nimi zásadní rozdíl v patofyziologii, diagnostice i léčebném postupu. Potravinová alergie je reakce zprostředkovaná imunitními mechanismy, zatímco potravinová intolerance je způsobená metabolickými poruchami, nejčastěji chyběním klíčového enzymu, který danou potravinu zpracovává. Například laktózová intolerance vzniká z neimunitních faktorů, jako je malabsorpce laktózy či nedostatek enzymu laktázy (Dai, 2007).

4 ALERGENY

Alergeny jsou cizí proteiny či glykoproteiny, které u vnímavého jedince vyvolávají imunitní odpověď charakteristickou tvorbou IgE protilátek a aktivací basofilních, eosinofilních granulocytů a žírných buněk. Nejčastěji se jedná o zvířecí nebo rostlinné proteiny, ale alergeny mohou být i některé chemické látky a léky. Expozice příčinnému alergenovi vyvolá často akutní reakci, opakovaná a/nebo trvalá expozice vede ke chronickému zánětu, jak můžeme vidět u astmatu, atopické dermatitidy a u určitých forem potravinové alergie (Woodfolk et al., 2015).

Problematika alergického zánětu se dostala do popředí zájmu zdravotnické veřejnosti zhruba před 100 lety v souvislosti s nárůstem případů, zlepšením systému lékařské péče a s pokrokem v poznání imunitního systému. Senzibilizace na pyly byla v té době dominantní formou. S civilizačními změnami, kdy celá řada činností byla přesunuta do vnitřních prostor, se spektrum rizikových alergenů změnilo ve prospěch inhalačních, vyskytujících se v interiéru. V neposlední řadě také přibývá potravinových alergií (Woodfolk et al., 2015).

4.1 Názvosloví alergenů

Názvosloví alergenů se vyvíjelo několik desítek let. V laboratorní praxi se používá označení velkým písmenem označujícím skupinu (F: potraviny, E: epitelie, T: stromy atd.) a číslo specifické pro alergen. Příkladem může být pyl břízy označován jako T3. Tato nomenklatura ovšem nevyhovovala pro označení molekulárně definovaných alergenů (komponent). Na počátku vzniku myšlenky o současném systému nomenklatury alergenů stojí lékaři David Marsh (USA), Henning Løwenstein (Dánsko) a Thomas Platts-Mills (UK). O této myšlence diskutovali během projížďky lodí po jezeře v roce 1980. Revidovaný systém nomenklatury byl poprvé popsán v Bulletinu Světové zdravotnické organizace výborem lékařů, kteří vstoupili do Mezinárodní unie imunologických společností (IUIS) (Pomés et al., 2018).

Současná nomenklatura se vyvinula až o několik let později, a to konkrétně v roce 1994. Názvy alergenů se přestaly psát kurzivou a nyní se skládají z prvních tří písmen rodu, jednoho písmena z druhu a za nimi následuje arabská číslice, která nahradila číslici psanou římsky. Např. myší alergen *Mus musculus* je označen jako Mus m 1. V některých případech se do rodu přidalo ještě další písmeno např. Sola pro rajče (*Solanum lycopersicum*) z důvodu, že Sol byl použit alergeny mravenců (*Solenopsis* sp.). Také označení Hel (Hel as 1) se používá pro hlemýžď (*Helix aspersa*) a Hela se používá pro slunečnici (*Helianthus annuus*). Jedině tak bylo možné jednoznačně odlišit jinak shodné názvy alergenů od různých druhů (Pomés et al., 2018).

Alergeny ze stejného zdroje jsou zařazeny do biochemických skupin (označené arabskou číslicí, která obsahuje dvě číslice), obvykle podle pořadí, ve kterém byly identifikovány např. Der p 1 nebo Bet v 1. Pokud je to možné, alergeny z různých druhů, příbuzné až k taxonomické úrovni čeledi nebo řádu, které patří do stejné proteinové rodiny, mají přiděleny stejné číslo napříč druhy. Nicméně, vzhledem k historické konvenci pojmenování, některé alergeny stejné biochemické proteinové rodiny mají přiřazeny různá čísla (např. pektátové lyázy Amb a 1 a Art v 6, PR-10 proteiny Bet v 1 a Ara h 8, nebo profiliny Amb a 8, Bet v 2, Phl p 12 a Art v 4) (Pomés et al., 2018).

Detailní poznání struktury alergenních proteinů umožnilo definovat izoalergeny a varianty (izoformy) v závislosti na shodě jejich aminokyselinové sekvence. Izoalergeny

patří mezi homologní alergeny sdílejí společné biochemické vlastnosti. Mezi tyto vlastnosti náleží obdobná velikost molekul, podobná nebo identická biologická funkce a také identita aminokyselinové sekvence alespoň v 67 %. Každý izoalergen může mít více forem s vysoce identickými sekvencemi (>90 %), typicky se lišícími pouze několika aminokyselinami, které jsou označovány jako varianty (příp. izoformy). Takto definované izoalergeny a jejich varianty jsou rozlišeny číselnými příponami za tečkou na konci označení alergenu. První dvě číslice 01–99 označují konkrétní izoalergen (např. Amb a 1.01 a Amb a 1.02) a dvě následující číslice 01–99 definují každou variantu konkrétního izoalergenu (např. Amb a 1.0101 a Amb a 1.0102) (Pomés et al., 2018).

4.2 Biochemická struktura alergenů

Po purifikaci byly alergeny definovány na základě své molekulové hmotnosti a pomocí specifických protilátek. Následovala produkce monoklonálních protilátek, sekvenování a rentgenová krystalografie. Dnes je známa úplná struktura mnoha stovek alergenů a je možné tyto alergeny připravovat pomocí rekombinantních technologií. V laboratorní diagnostice alergií to znamená velký pokrok, kdy je možné testovat IgE protilátky proti specifickým proteinům alergenů místo dříve používaných extraktů z rostlin nebo živočichů. Pro řadu alergenů existuje dostatek důkazů pro doporučení stanovení IgE proti molekulárně definovaným alergenům, kdy jsme schopni odlišit zkříženě reagující proteiny od druhově specifických, rizikové alergeny od méně nebezpečných apod. (Woodfolk et al., 2015).

Většina dosud identifikovaných alergenů jsou proteiny rozpustné ve vodě a jejich molekulová hmotnost je v rozmezí 5 kDa až 50 kDa. Mnoho z těchto proteinů je glykosylovaných, ale obecně tato glykosylace nehraje roli v jejich alergenicitě. V minulosti se považovalo za fakt, že bazální membrána nosu je propustná pouze pro molekuly menší než 60 kDa. Nyní je však jasné, že dendritické buňky mohou odebírat vzorky proteinů rozšířením svých dendritů přes membránu, a tak jsou schopny shromáždit větší molekuly. Příkladem může být senzibilizace alergenem Der p 11, jehož molekulová hmotnost se pohybuje okolo 100 kDa a navíc tvoří agregáty s násobně větší molekulovou hmotností. I přes svou velikost vyvolává alergický zánět a je spojen typicky s atopickou dermatitidou. (Woodfolk et al., 2015).

4.3 Inhalační alergen

Inhalační alergen se běžně vyskytují v ovzduší a dle jejich umístění se dělí na alergen venkovního prostředí mezi které patří pyl stromů, trav, obilnin a také vzdušné plísň. Další skupinu tvoří alergen vyskytující se v prostředí budov a mezi ně náleží alergen roztočů domácího prachu a alergen domácích zvířat (Vydláková, 2010).

Začátek purifikace alergenů začal v 60. letech 20. století u ambrozií a pylu trav, které byly hlavní příčinou senné rýmy u pacientů v USA, jak již bylo zmíněno výše. V té době již bylo chápáno, že expozice závisí jak na povaze proteinů, tak na vlastnostech částic, které tvoří. Jediným relevantním zdrojem vzdušných alergenů jsou tedy částice, které se mohou dostat do vzduchu. Pro hodnocení venkovní expozice je tedy možné identifikovat a spočítat pylová zrna či spory hub. Naproti tomu vnitřní prostředí se vyznačuje daleko menší rychlostí pohybu vzduchu a velké částice, jako výkaly roztočů či pylová zrna rychle sedimentují. Mezi částicemi, které se dostávají v interiéru snadno do vzduchu, jsou velké rozdíly ve velikosti i rychlosti sedimentace. To vede k rozdílným výsledkům výpočtů dávky alergenů, který byl vdechnut. Nemalá část alergenů, které jsou vdechnuty ústy, je také spolknuta. Nejlépe prozkoumanými alergenovými částicemi v interiéru jsou výkaly a části těl roztočů (Woodfolk et al., 2015).

5 MOLEKULÁRNĚ DEFINOVANÉ ALERGENY

Alergie na proteiny a glykoproteiny z živočišných zdrojů je důležitým problémem veřejného zdraví, který postihuje děti i dospělé. Expozice zvířecím alergenům je klíčovým faktorem pro rozvoj alergie, zejména pro rozvoj alergických onemocnění dýchacích cest, jako je astma a rýma. Mezi mnoha částicemi a molekulami živočišného původu přítomnými v našem prostředí, mají některé tu vlastnost, že vyvolávají alergickou senzibilizaci a reakce zprostředkované protilátkami IgE. Hlavní zástupci zvířecích alergenů sdílejí společné proteinové charakteristiky, protože patří do specifických proteinových rodin. Většina inhalačních savčích alergenů jsou lipokaliny a sérové albuminy (Kuehn, Hilger, 2015).

Velkou zátěží pro organismus alergika je tedy všudypřítomnost zvířecích alergenů. Lidský imunitní systém je vystaven těmto proteinům nejen prostřednictvím dýchacího traktu, ale také přes střeva a kůži. Rozsáhlé studie Zahradníka a Raulfa se zaměřují na zvířecí alergenů ze srstí zvířat ve vnitřním (kočka, pes) i venkovním prostředí (kůň, skot). Alergie na tyto živočišné bílkoviny jsou veřejným problémem, protože expozice není omezena na blízké okolí původního zdroje, ale tyto molekuly jsou přenášeny vzduchem nebo ulpívají na oblečení a dalších předmětech a tím se dostávají do kontaktu s dalšími osobami (Kuehn, Hilger, 2015).

Dále je uveden výběr nejvýznamnějších skupin alergenních komponent zvířat, roztočů, plísní a Rusa domácího, kterými se tato diplomová práce zabývá.

5.1 Lipokaliny

Do této rodiny patří většina hlavních alergenů pocházejících ze zvířat, které způsobují respirační senzibilizaci. Jejich sekvenční identita se liší, ale trojrozměrná struktura zůstává zachována. Jsou přítomny v tělesných tekutinách a sekretech. Struktura lipokalinů je různorodá, některé jako Bos d 5 a Equ c 1, jsou přítomny v dimerním stavu, zatímco jiné lipokaliny, jako Bos d 2, existují jako monomery. Části lipokalinových alergenů jsou neglykosylované (Bos d 2, Bos d 5, Mus m 1), jiné naopak mají na svém povrchu N-glykosylační místo (Can f 1, Can f 2, Equ c 1 a Bla g 4). Většina lipokalinů je produkována v játrech nebo sekrečních žlázách. Jejich funkcí je přenos retinolu,

odorantů, steroidů, lipidů a feromonů. Je také známo, že některé lipokaliny se podílí na stresu, zánětlivých reakcích či dokonce při regulaci buněčného růstu a proliferace (Virtanen, 2001).

5.2 Tropomyosiny

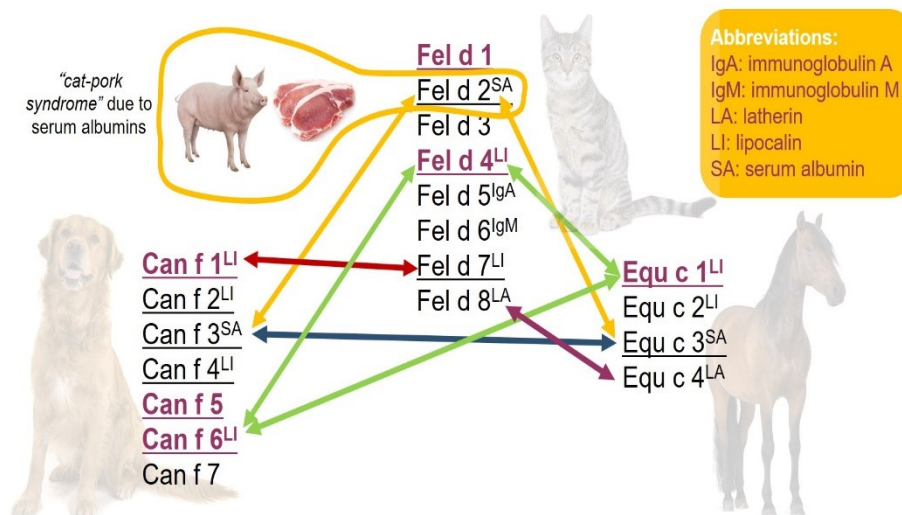
Tropomyosin a podjednotky troponinu C, I a T regulují kontrakci kosterního svalstva. Cytosolická Ca^{2+} koncentrace ovlivňuje polohu těchto proteinů na tenkých aktinových vláknech, která zase řídí interakce. Tropomyosin byl identifikován jako hlavní a běžný alergen korýšů a měkkýšů. Dále byl navržen jako alergen bezobratlých na základě vysoké sekvenční identity a zkřížené reaktivity mezi bezobratlými. Mimo jiné jsou tropomyosiny součástí prachu, kdy byly získány z roztoče *Dermatophagoides farinae* (Der f 10) a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 10) (Jeong, Hong a Yong, 2006).

Mezi tropomyosiny z roztočů domácího prachu a měkkýši byla dobře prokázána zkřížená reaktivita. Tropomyosiny z roztočů domácího prachu a švábů sdílejí vysokou sekvenční homologii s tropomyosiny měkkýšů až s 81% podobností sekvence aminokyselin mezi krevetami a roztoči domácího prachu a 82% podobnost mezi krevetami a švábem (Wong, Huang a Lee, 2016).

5.3 Sérový albumin

Jedná se o multifunkční α -helikální protein s několika disulfidickými můstky, které stabilizují strukturu. Molekula má tři domény, je velmi flexibilní a může snadno měnit svou konformaci, aby navázala mnoho různých ligandů. Také jsou sérové albuminy termolabilní a podléhají denaturaci. Sérové albuminy jsou přítomny ve zvířecích produktech a jsou tedy hlavní složkou lidské stravy. Také jsou zdrojem zdravotních problémů při kontaktu se srstí zvířat. Zdroj sérového albuminu je maso hovězího dobytka (Bos d 6), Pes domácí (Can f 3), Kůň domácí (Equ c 3), Kočka domácí (Fel d 2), Kur domácí (Gal d 5) a Morče domácí (Cav p 4) (Chruszcz et al., 2013).

Se sérovým albuminem souvisí i výskyt zkřížených reakcí, a to v případě syndromu „cat-pork“. Nejpravděpodobnější primární senzibilizace je v tomto případě kočka se sérovým albuminem, který je aeroalergen a následuje zkřížená senzibilizace na potravinový alergen prasečího sérového albuminu (Chruszcz et al., 2013).



Obrázek 2: Zkřížená reaktivita "cat-pork syndrome" (Alliance, c2023)

5.4 Zkříženě reagující determinanty

Přítomnost ko-senzibilizace či alergenní zkřížené reaktivity na alergeny nebo epitopy z nesouvisejících zdrojů může dále komplikovat diagnózu. To platí zejména v případě přítomnosti sacharidových determinant, protože tyto struktury jsou jedním z nejběžnějších epitopů pro IgE, a proto byly pojmenovány jako zkříženě reaktivní determinanty sacharidů (CCD). CCD jsou komplexy glykanů obsažené v glykoproteinech rostlin a některých bezobratlých živočichů, tj. hmyzu (Quirce a Salcedo, 2010).

Ukázalo se, že tyto glykoepitopy interferují v IgE-specifických testech a je dokázáno, že nesrovnalosti mezi negativními reakcemi kožních testů a pozitivním stanovením IgE (falešně pozitivní) mohou být spojeny s přítomností IgE s CCD. Specifické IgE vůči CCD mohou být vysoce zkříženě reaktivní a často se vyskytují u pacientů senzibilizovaných na běžné aeroalergeny. Předpokládá se, že IgE protilátky proti CCD mají slabou biologickou aktivitu, vyvolávají jen omezenou degranulaci mastocytů a basofilů a postrádají klinickou relevanci. Na druhou stranu glykoepitopy mohou vyvolat odpověď na buněčné úrovni, což naznačuje, že by mohly hrát roli *in vivo* (Quirce a Salcedo, 2010).

V systému ImmunoCAP ISAC® sIgE 112 a ALEX (Allergy Explorer), které byly využity k analýze v této práci je zkřížená reaktivita, tedy přítomnost anti-CDD protilátek v patientských sérech detekována pomocí molekulární komponenty nMUXF3. Tento sacharidový epitop je součástí ananasu a následně je purifikován z jeho enzymu bromelainu (Aberer et al., 2017).

5.5 Zvířecí alergen

5.5.1 Pes domácí (*Canis familiaris*)

Alergie na domestikovaného psa (*Canis familiaris*) je významná celosvětově. Psí alergen nejsou detekovány pouze v domácnostech, kde se psi vyskytují jako domácí mazlíčci, ale také na místech, jako jsou školy či další veřejné budovy, kde se psi běžně nevyskytují. Dlouhodobá expozice psím alergenům u senzibilizovaných jedinců vede k astmatu, alergické rýmě a souvisí také s atopickou dermatitidou (RubyDuke Communications, c2023b).

Psí alergenní komponenty jsou rozděleny do několika rodin. Nejvýznamnější alergen Can f 1 a Can f 2 společně s dalšími alergenem Can f 4 a Can f 6 patří do skupiny lipokalinů. Méně významnými jsou alergen Can f 3 patřící mezi sérové albuminy, Can f 5 mezi kalikreiny a Can f 7 do skupiny MD-2 related lipid recognition (ML) nebo epididymal secretory protein E1 (Chan a Leung, 2018).

Extrakt z psích chlupů a srsti jsou komplexní směsí obsahující alergenní proteiny. Hlavní alergen, které jsou obsaženy v psích chlupcích a srsti byly purifikovány pomocí imunoafinitní chromatografie a následně charakterizovány. Patří zde *Canis familiaris* alergen 1 (Can f 1). Jedná se o protein s molekulovou hmotností 21-25 kDa vážící imunoglobulin E (IgE) jako jedna z hlavních psích alergenních molekul. Can f 1 se vylučuje z mazových žláz a nachází se v srsti a slinách (RubyDuke Communications, c2023b).

Dalším alergenem s četným výskytem je *Canis familiaris* alergen 2 (Can f 2) s molekulovou hmotností 19 kDa nebo 27 kDa. Tento alergen byl purifikován s využitím speciálních monoklonálních protilátek a 66 % pacientů s alergií na psy tvoří proti němu IgE protilátky (Konieczny et al., 2003).

5.5.2 Kočka domácí (*Felis domesticus*)

Významným zdrojem alergenů podobně jako u psů jsou taktéž domestikované kočky. Alergeny kočky patří k nejvýznamnějším inhalačním alergenům v interiéru na celém světě. Pacienti s alergií na kočky mají různé alergické projevy včetně respiračních příznaků, astmatu, konjunktivitidy a různých kožních projevů jako jsou kopřivka či atopická dermatitida (Riabova et al., 2003).

Částice kočičí srsti můžeme charakterizovat jako tzv. lepkavé a lze je nalézt na površích v budovách i na oděvech. Částice kočičí srsti jsou také velmi rozšířeny i v budovách, kde nejsou přítomna zvířata (školy) a mnoho dětí, které nikdy nežily v domě s kočkou, je senzibilizováno na Fel d 1. To vyvolává otázku, do jaké míry je komunitní expozice ovlivněna prevalencí vlastnictví koček v komunitě (Woodfolk et al., 2015).

Mezi kočičí alergeny patří významný kočičí alergen Fel d 1 (uteroglobin), který je bezpochyby nejdůležitějším kočičím alergenem vykazujícím vysokou IgE reaktivitu u většiny pacientů senzibilizovaných kočkou. Dále Fel d 2 kočičí albumin, Fel d 3 cystatin A, Fel d 4 a Fel d 7 dva odlišné lipokainy a Fel d 8 latherin-like protein. Molekuly kočičího alergenu Fel d 5 a Fel d 6 obsahují sacharid α -1,3-galaktózu a Fel d 2 kočičí albumin a mimo jiné mohou vykazovat zkříženou reaktivitu imunoglobulinu IgE s některými potravinovými alergeny (Riabova et al., 2022)

Fel d 1 je nejdůležitější a hlavní alergen pro kočky, protože byl pozorován až u 95 % jedinců s alergií na kočky. 60 až 90 % veškeré reaktivity IgE na kočičí srst je proti Fel d 1. Primární produkce Fel d 1 probíhá v mazových, análních a slinných žlázách a jeho nejvyšší koncentraci lze nalézt v srsti a v kožních šupinkách kočky. Fel d 1 se velmi snadno dostává do vzduchu a poté je unášen malými prachovými částicemi, které jej následně přenášejí do prostředí, které nebylo vystaveno kočce. Fel d 1 je uteroglobin, ale biologická role zůstává záhadou. Alergenicitu inhalovaného Fel d 1 se zvyšuje poté, co se mu podaří navázat na manózoové receptory přítomné na dendritických buňkách. Tato vazba iniciuje produkci IgE a IgG1 specifických pro Fel d 1. Vyšší hladiny IgE specifického pro Fel d 1 byly pozorovány u dětí alergických na kočky s alergickým astmatem ve srovnání s dětmi pouze s rýmou. To naznačuje, že zvýšené riziko astmatu lze předvídat z vysokých hladin IgE protilátek proti Fel d 1 (Riabova et al., 2022; Fischer, c2023a).

5.5.3 Myš domácí (*Mus musculus*)

Myš domácí se vyskytuje všude na světě jako komenzál lidí. Myší alergeny jsou přítomny na pracovištích, zejména v laboratořích, dále v domácnostech a komunitních zařízeních, jako jsou školy, kde jsou nejčastěji detekovaným alergenem. Myší moč je hlavním zdrojem alergenů, které se při zasychání moči v prostředí dostávají do vzduchu na prachových částicích, ale nacházejí se také v myších slinách, na chlupcích a úlomcích

epitelu. Expozice myším alergenům je spojována s astmatem u dospělých a dětí. Mezi další příznaky alergie na myši patří rinokonjunktivitida, ekzém a kopřivka (RubyDuke Communications, c2023c).

Hlavním myším alergenem je Mus m 1, který patří do skupiny lipokalinových proteinů, které se podílí na transportu a metabolismu lipidů s nízkou molekulovou hmotností a stejně jako feromony se nacházejí ve vysokých koncentracích a jsou vylučovány močí. Jako lipokalin vykazuje Mus m 1 určitý stupeň zkřížené reaktivity s jinými zvířaty, jako je kůň, pes, kráva a šváb. U většiny pacientů senzibilizovaných na hlodavce koexistuje senzibilizace potkanů a myší (Múnera et al., 2019).

Mus m 2, méně významný alergen než Mus m 1, je neurinární alergen, který je přítomen na myším epitelu (RubyDuke Communications, c2023c).

5.5.4 Kůň domácí (*Equus caballus*)

Alergie na koně a koňské alergeny jsou méně prozkoumány než alergeny srsti jiných domácích zvířat jako například u koček či psů. Mezi koňské alergeny patří Equ c 1 a Equ c 2 (lipokaliny), Equ c 3 (sérový albumin), Equ c 4 (laterin) a Equ c 6 (lysozym) (Victor et al., c2022).

Equ c 1 je považován za hlavní koňský alergen a je spojován s těžkým astmatem u dospělých i dětí. Nachází se ve slinách, srsti a do určité míry v moči koní. Je to homodimer, glykosylovaný lipokalinový protein (182 aminokyselin) o hmotnosti kolem 22 kDa s vlastnostmi surfaktantu. Senzibilizace na koňské alergeny byla hlášena mezi 3,6 % a 16,5 % u jedinců spojených s povoláním souvisejícím s koňmi, zatímco senzibilizace 5,38 % byla hlášena u jedinců s respirační alergií. Údajně však převládá u astmatických jedinců ve srovnání s náhodně vybranými jedinci. Dále se také uvádí, že je senzibilizace významně spojena se středně těžkou až těžkou rhinitidou u pacientů senzibilizovaných na koně. Hlavní cestou expozice tomuto koňskému alergenů je inhalace, i když nebylo zjištěno, že by se ve velké míře šířil vzduchem. Equ c 1 je druhově specifický marker senzibilizace. Bylo však zjištěno, že Equ c 1 zkříženě reaguje s jinými lipokaliny, jako je Can f 6 (pes), Fel d 4 (kočka) a Mus m 4 (myš) díky sekvenční homologii. Tuto zkříženou reaktivitu je třeba zahrnout v úvaze při interpretaci senzibilizace na Equ c 1 (Turacoz Healthcare Solutions, c2023f).

Koňské sporty jsou populární po celém světě a např. ve Švédsku je to po fotbale druhým největším sportem ve kterém se angažuje více než půl milionu lidí. Koně se také ukázali být důležití pro různé terapie, například pro lidi se spektrem autismu. Nicméně, mnoho lidí se nemůže věnovat koňským aktivitám kvůli alergiím, což podnítilo probíhající výzkum, aby zjistil, zda existují plemena koní vhodnější pro alergiky na koně tzv. hypoalergenní plemena. Z tohoto důvodu byla navržena hypoalergenní plemena koní, jako je např. americký Curly horse. Bohužel však v nedávné studii Curly koně nebyli spojeni s nižšími hladinami alergenu v srsti a ve vzorcích vzduchu, ve srovnání s jinými plemeny (Victor et al., c2022).

5.6 Inhalační komponenty roztočů a Rusa domácího

5.6.1 *Dermatophagoides* sp.

Dermatophagoides pteronyssinus je jedním ze skupiny roztočů vyskytující se prachu domácností. Mezi domácí roztoče patří roztoči domácího prachu a roztoči skladů. Tyto druhy jsou vysoce alergenní. Atopická reaktivita na jejich produkty je jednou z nejčastějších příčin alergických onemocnění ve světě, postihuje horní a dolní cesty dýchací, oči, kůži, méně často i gastrointestinální trakt a může vyvolat anafylaxi (Fischer, c2023b).

Der p 1 je jedním z hlavních alergenů roztočů domácího prachu, s hlášenou prevalencí u pacientů senzibilizovaných *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) mezi 70–100 %. Expozice Der p 1 je prostřednictvím inhalace exkrementů roztočů. Včasná expozice antigenu prachových roztočů Der p 1 zvyšuje riziko astmatu až pětinasobně. Snížení expozice alergenu Der p 1 u pacientů alergických na roztoče znamenalo snížení příznaků rýmy a astmatu. Uvádí se vysoký stupeň zkřížené reaktivity s alergenem Der f 1 (*Dermatophagoides farinae*) (Turaco HealthCare Solutions, c2023c).

Dalším velmi významným alergenem roztočů domácího prachu je Der p 2 s uváděnou prevalencí u pacientů senzibilizovaných *Dermatophagoides pteronyssinus* mezi 80-100 %. Expozice Der p 2 je rizikovým faktorem pro pacienty s alergickými příznaky ve více orgánech. Bylo zjištěno, že IgE Der p 2 je vysoce prediktivní pro okamžitou astmatickou odpověď vyvolanou alergenem. Uvádí se vysoký stupeň zkřížené reaktivity

s Der f 2 (*Dermatophagoides farinae*). Taktéž zkříženě reagují s roztoči skladů a roztočem *Blomia tropicalis* (Blo t 2) (Turacoz Healthcare Solutions, c2023c).

Méně významným alergenem roztočů domácího prachu je Der p 10 s uváděnou prevalencí u pacientů senzibilizovaných *Dermatophagoides pteronyssinus* mezi 5-18 %. Specifický imunoglobulin E (sIgE) k Der p 10 je spojen s respiračními symptomy včetně rýmy, konjunktivitidy, kašle, dušnosti a astmatu. Ovšem je pozorován vysoký stupeň zkřížené reaktivity mezi Der p 10, Der f 10 a Blo t 10 a Lep d 10. Der p 10 je tropomyosin a může tedy způsobit zkříženou reakci s tropomyosinem korýšů (krevety, krab, humr, kreveta, šneci, raci aj.) a měkkýšů (slávky, ústřice, hřebenatka, hlemýždi, ušeň, chobotnice, sépie aj.) (Turacoz Healthcare Solutions, c2023e).

Domácí prach následně obsahuje roztoče *Dermatophagoides farinae* a jeho hlavními alergeny jsou Der f 1, Der f 2, Der f 11 a Der f 23. Vysoký stupeň zkřížené reaktivity je zaznamenán mezi extrakty *D. pteronyssinus* a *D. farinae*, zatímco reaktivita mezi *Dermatophagoides* a *Blomia tropicalis* je omezená. Kromě toho je také pozorován vysoký stupeň zkřížené reaktivity mezi Der p 1 a Der f 1, Der p 2 a Der f 2 a mezi Der f 23 a Der p 23. Dále bylo zjištěno, že Der f 10 je zkříženě reaktivní s Blo t 10, Lep d 10, Pen a 1, Per a 7 a Hom a 1 (Turacoz Healthcare Solutions, c2023a).

5.6.2 *Lepidoglyphus destructor*

Lepidoglyphus destructor je jedním z čeledi roztočů *Glycyphagidae*. Je součástí skladů a taktéž známý jako tzv. „cukrový“ nebo tzv. „potravinářský“ roztoč. Roztoči skladů jsou tradičně spojovány s pracovní expozicí venkovských pracovníků a v poslední době také s mimopracovní senzibilizací v městském prostředí, což způsobuje rinokonjunktivitidu, astma, stejně jako atopickou dermatitidu. Jedna z molekul, Lep d 2, je považována za hlavní alergen, který vykazuje vysokou IgE reaktivitu jak *in vitro*, tak *in vivo* (RubyDuke Communications, c2023a).

5.6.3 *Blomia tropicalis*

Blomia tropicalis je jedním z nejrozšířenějších druhů roztočů domácího prachu, který se vyskytuje po celém světě. Vyskytuje se převážně v tropických a subtropických oblastech a je známo, že koexistuje s *Dermatophagoides pteronyssinus* či *Dermatophagoides*

farinae. Fekální částice *Blomia tropicalis* jsou považovány za hlavní zdroj alergenu ve vzduchu, který způsobuje alergické reakce po vdechnutí. Mezi různými alergeny charakterizovanými pro *B. tropicalis* jsou hlavními nalezenými alergeny Blo t 1, Blo t 5 a Blo t 21. Mezi nejčastější klinické projevy alergie na *B. tropicalis* patří alergická rýma, astma a atopická dermatitida. Bylo zjištěno, že alergeny z *B. tropicalis* jsou zkříženě reaktivní s druhy *Dermatophagoides* a *Tyrophagus putrescentiae* (Turaco Healthcare Solutions, c2023b).

5.6.4 Rus domácí (*Blattella germanica*)

Rus domácí (řád švábi – *Blattodea*) se vyskytuje v celé řadě vnitřních městských lokalit, včetně potravinářských zařízení, nemocnic, pečovatelských domů, domácností a hotelů, kde se živí vyřazenou lidskou potravou. Hlavními zdroji alergenů švábů jsou švábí sliny, výkaly, vajíčka a epitelie, které mohou tvořit složky prachu. Vdechování alergenů švábů v prachu je hlavní cestou expozice a může vést k rozvoji astmatu a alergické rýmy. V současné době bylo identifikováno 11 alergenů Rusa domácího. Mezi nejvýznamnější patří Bla g 1, Bla g 2 a Bla g 5 (RubyDuke Communications, c2023d).

5.7 Inhalační komponenty spor plísní

5.7.1 *Alternaria alternata*

Alternaria alternata je převážně venkovní plíseň, ale lze ji nalézt i v interiéru. Rod *Alternaria*, člen čeledi *Pleosporaceae*, zahrnuje více než 270 druhů dermatózních (černých) hyfomycet. Spory *A. alternata* se široce šíří v suchých, teplých a větrných dnech a obvykle vrcholí během léta a začátkem podzimu. *A. alternata* je kosmopolitní plíseň a jeden z nejčastějších alergenů plísní, s prevalencí senzibilizace kolísající od 0,2 % do 14,4 % po celém světě. Inhalace spor *A. alternata* je spojena s přecitlivělostí horních a dolních dýchacích cest, zejména astmatem a alergickou plísníovou rinosinuitidou. Může se také vyvinout alergická bronchopulmonální mykóza a hypersenzitivní pneumonitida (Turaco Healthcare Solutions, c2023g).

Alt a 1 je hlavní alergen a marker skutečné senzibilizace na *A. alternata*. Senzibilizace k *A. alternata* je často spojena se senzibilizací k jiným plísním a jiným vzduchem

přenášeným alergenním zdrojům, jako jsou pyly a roztoči. Rovněž byla hlášena kosenzitivace a zkřížená reaktivita na některé potravinové alergeny. Maximálními množství koncentrace vzdušného Alt a 1 vrcholí v létě a shoduje se s vrcholy exacerbace astmatu (Vitte, c2023a).

5.7.2 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus je saprotrofní a oportunní vláknitá patogenní houba kosmopolitně rozšířená v životním prostředí. Také je sporotvorná, termotolerantní houba, která se nepohlavně rozmnožuje prostřednictvím spor ve formě konidií. Inhalace je hlavní cestou expozice spor zástupců rodu *Aspergillus* (Vitte, c2023b).

A. fumigatus je původcem alergických a infekčních onemocnění postihujících desítky milionů lidí na celém světě. Alergická bronchopulmonální aspergilóza (ABPA) je nejzávažnější alergické onemocnění související se zástupci rodu *Aspergillus*, které během života postihne 1–2,5 % astmatických pacientů a až 10 % pacientů s cystickou fibrózou. Dalšími významnými alergickými onemocněními souvisejícími s rodem *Aspergillus* jsou alergická plísňová rhinosinusitida a těžké astma s plísňovou senzibilizací. Dosud bylo charakterizováno 23 alergenů *A. fumigatus*. Mezi nimi jsou hlavní alergeny se zkříženou reaktivitou Asp f 1 a Asp f 2, Asp f 3. Alergeny Asp f 4 a Asp f 6 jsou spojeny s diagnózou alergické bronchopulmonální aspergilózy. Navíc Asp f 1 a Asp f 2 jsou markery skutečné senzibilizace k *A. fumigatus*. Zkřížená reaktivita byla pozorována hlavně mezi *A. fumigatus* a jinými druhy hub (Vitte, c2023b).

6 DIAGNOSTIKA ALERGICKÉHO ZÁNĚTU

Prvním krokem je vyšetření v ambulanci alergologa, který na základě znalostí získaných při fyzikálním vyšetření a při odběru pacientovy anamnézy s ohledem na okolnosti expozice alergenu, rozsahu a závažnosti alergických příznaků spolu s posouzením pacientovy rodinné anamnézy je schopen dále indikovat vhodnou léčbu. V ambulanci alergologa a klinického imunologa se běžně používají kožní prick testy, nasální provokační testy, případně potravinové expoziční testy. Spolupracující kožní lékař provádí navíc epikutánní testy. V případě podezření na respirační formu alergického zánětu je vhodné zařadit spirometrické vyšetření. Pro zpřesnění diagnózy, případně pro monitorování závažnosti alergického zánětu může lékař využít i laboratorní vyšetření (Hamilton a Oppenheimer, 2015).

V laboratorním nálezu se očekává tvorba protilátek typu IgE proti alergenům vyvolávajícím klinické potíže u konkrétního pacienta. Lze vyšetřit IgE protilátky proti směsím alergenů, jednotlivým alergenovým extraktům i proti molekulárně definovaným alergenům. Reaktivitu na konkrétní alergen lze testovat i pomocí buněčných testů. Nejrozšířenější je test aktivace basofilů (basotest), který je vhodný pro alergické reakce časně (IgE mediované) i pozdní (non-IgE mediované) (Lochman et al., 2005).

U chronických alergií či při sledování úspěšnosti alergenové imunoterapie mají zásadní roli testy hodnotící specifické IgG nebo specifické IgG4 protilátky proti alergenům (Lochman et al., 2005).

Alergeny jsou zejména antigeny s proteinovou strukturou a po delším působení v organismu je na ně vyvolána protilátková odpověď třídy IgG v podtřídě IgG1 a IgG4. U atopiků je zvýšená hlavně odpověď ve třídě IgE. V mnohem vyšším množství, než IgE jsou však produkovány protilátky typu IgG a IgA u potravinových alergenů a při stanovení může být problémem interference. Z tohoto důvodu je ve vyšší míře využíváno tzv. „capture“ technik, kdy imunosorbent v prvním kroku váže celkové množství IgE vzorku a v následujících krocích je redukováno ovlivnění ostatních tříd IgG (Lochman et al., 2005).

6.1 Kožní testy

Při diagnostice *in vivo* nachází využití několik typů kožních testů. Mezi tyto testy patří kožní prick test (SPT), které jsou schopny detekovat reakci I. typu, kdy je alergie zprostředkována pomocí IgE, ale i non-IgE reaktivitu (pozdní typ přecitlivělosti). SPT je bezpečný, má vysokou citlivost a dobrou specifitu při správném provedení. Variantou kožních testů je testování z prick-to-prick (PPT) s nativními alergeny. Intradermální test (IDT) lze použít k vyhodnocení jak IgE zprostředkované alergie, tak k přecitlivělosti opožděného typu, podle času odečtu. Má zvýšenou citlivost a nižší specifitu ve srovnání s SPT (Ansotegui et al., 2020).

Kožní testy se v posledních letech potýkají se zásadním problémem, a to je omezená dostupnost a malá nabídka testovacích alergenů. Posledním typem je patch test pro opožděný typ buněčně zprostředkované hypersenzitivní reakce. Nemá však žádný význam pro alergie zprostředkovanou IgE (Ansotegui et al., 2020).

6.2 Laboratorní diagnostika alergií

6.2.1 Stanovení celkových IgE protilátek

Stanovení celkových protilátek IgE není zcela jednoznačné a není doporučováno pro screeningové vyšetření atopie. Důvodem je výskyt zvýšené hladiny IgE protilátek také u parazitárních onemocnění, mnohočetného myelomu a dalších onemocnění. Také u mnoha pacientů s alergií zprostředkovanou protilátkami IgE nedochází ke zvýšení celkových protilátek IgE při jejich detekci (Chang et al., 2015; Hawarden, 2014).

6.2.2 Stanovení specifických IgE protilátek

Mezi základní a nejpoužívanější laboratorní vyšetření u stavů s časnou přecitlivělostí, tedy alergické reakce I. typu patří průkaz a stanovení specifických IgE protilátek (sIgE) v séru. Testy na stanovení sIgE jsou založeny na imunochemickém principu, kdy jsou alergeny ukotveny na pevné sorbenty a při pozitivní reakci vzniká imunokomplex s sIgE. Následně je přidán značený anti-IgE konjugát a probíhá reakce, kterou jsme schopni detekovat pomocí fotometrie, fluorimetrie či luminometrie (Lochman et al., 2003).

Metoda firmy Pharmacia označovaná jako CAP System™, resp. UniCAP™ detekuje enzymatickou reakci pomocí fluorescence a oproti jiným metodám je považována za „zlatý standard“. Její hlavní předností je využití vysokokapacitního vazebného sorbentu, který se nachází uvnitř speciálních kalíšků tzv. caps, kde se naváží alergeny a dojde k reakci (Lochman et al., 2003).

K dalším velmi využívaným metodám patří systém Immulite 2000 (Siemens) detekující chemiluminiscenci, a Hytec-288 Plus (Hycor), měřící barevnou odezvu fotometricky (Goikoetxea et al., 2013).

Problém nastává při interpretaci výsledků, které mohou být odlišné jak mezi metodami, tak mezi laboratořemi. Pro zlepšení interpretace výsledků bylo zavedeno hodnocení IgE reaktivity ve třídách positivity, přičemž třída 0 znamená žádná hladina specifického IgE a třída 6 maximální hladina. Dále je možno využít specifické protilátkové aktivita, která je definována jako poměr specifického IgE a celkového IgE. Tento přístup se osvědčil zejména při interpretaci extrémně nízké hladiny celkových IgE protilátek (např. <20 kU/L, <10 kU/L, <5 kU/L), u atopických pacientů s neobvykle nízkou hladinou celkového IgE a v dalších případech (Kleine-Tebbe a Jakob, 2015).

Správná interpretace výsledků testů sIgE často vyžaduje pečlivé prozkoumání, protože přítomnost sérových specifických IgE odhalí i senzibilizaci, která mohla být vyvolána nespecifickými alergeny (CCD determinanty) či případnou zkříženou reaktivitou. Ta může, ale nemusí být klinicky relevantní (Goikoetxea et al., 2013).

6.2.3 Buněčné testy

Při vyšetření specifických protilátek jsou zachyceny pouze IgE protilátky vyskytující se v séru, ale k detekci většiny IgE protilátek navázaných ve tkáních, žírných buňkách a bazofilech nedochází. Z tohoto důvodu byly vyvinuty testy, které měří aktivaci buněk alergického zánětu. Mezi tato vyšetření patří test schopný zaznamenat aktivaci bazofilů periferní krve spojenou s uvolněním mediátorů alergické reakce (Honzová, 2009).

Test aktivace bazofilů (BAT) je laboratorní test využívající průtokovou cytometrii. Je schopen měřit expresi aktivačních markerů na povrchu bazofilů v periferní krvi. BAT lze použít, pokud jsou rutinní klinické (kožní prick testy) a laboratorní analýzy (sIgE)

nejednoznačné a v rozporu s anamnézou. Tento test se zaměřuje na populaci bazofilů na úrovni jednotlivých buněk pomocí průtokové cytometrie a hodnotí stav aktivace těchto buněk před a po stimulaci alergeny nebo kontrolami. BAT se obvykle provádí s použitím plné krve. Bazofily lze identifikovat pomocí řady téměř jedinečných selekčních markerů: CD193+ (také exprimovaný na eozinofilech), CD123+ (také exprimovaný na plazmocytoidních dendritických buňkách HLA-DR+) a CD203c a FcεRI (jsou také exprimovány na pluripotentních progenitorech žírných buněk). Tento test lze tedy využít k potvrzení alergie, způsobilost ke specifické terapii či sledování odpovědi na terapii nebo přirozené vymizení alergie (Santos, Alpan a Hoffman, 2021).

K dalším parametrům alergického zánětu patří histamin, tryptáza, eosinofilní kationický protein (ECP), interleukiny a další. Bohužel tyto látky jsou eliminovány, pokud vzroste jejich vzdálenost od místa, kde byly vyprodukovány z důvodu zachování homeostázy. Naopak při aktivaci žírných buněk se v krvi zvyšuje hladina tryptázy po 15-30 minutách a její koncentrace se udržuje v krvi po delší dobu, a z tohoto důvodu slouží jako významný marker monitoringu anafylaktické reakce i po několika hodinách či post mortem (Lochman et al., 2005).

6.2.4 Vyšetření rekombinantních alergenů

U diagnostických testů alergie při stanovení specifického IgE či u buněčných technik se využívají alergenové extrakty, které jsou připraveny z různých biologických materiálů jako např. pylová zrna, různé druhy potravin, zvířecí srsti apod. Bohužel je však velký problém ve standardizaci těchto extraktů a ta může mít vliv na snížení senzitivity i specifity testu. Naopak alergeny připravené rekombinantními technikami jsou standardizované a čím dál tím více jsou využívány jak v oblasti klinického výzkumu, tak v klinické praxi při diagnostice alergických onemocnění. Připravené rekombinantní alergeny jsou pak označovány dle mezinárodně platné nomenklatury, např. hlavní alergen břízy (*Betula verrucosa*) rBet v1 nebo vedlejší alergen břízy (profilin) rBet v2. Pomocí rekombinantních alergenů je možné vyšetřit v séru specifická IgE či je využít při buněčných technikách např. v testu aktivace bazofilů (BAT) (Honzová, 2009).

Rekombinantní alergeny také přispěly k využití tzv. „component-resolved *in vitro* diagnosis“ (CRD), kdy je možné velmi přesně definovat a charakterizovat alergické

onemocnění pacienta. CRD používá čištěné, popř. rekombinantní alergeny (jako je rAra h 2) k identifikaci alergen-specifických IgE a IgG4 protilátek proti druhově specifickým, zkříženě reagujícím a více či méně rizikovým alergenům (Ahn, 2014; Honzová, 2009).

Využití CRD je zaměřeno rozlišení skutečné a zkříženě reaktivní senzibilizace u polysenzibilizovaných pacientů, čímž se zlepší znalost skutečných spouštěcích alergenů. Dále lze CRD použít k posouzení rizika závažných, systémových versus mírných lokálních reakcí u potravinové alergie. Sníží se tak zbytečná úzkost pacienta a nutnost provádět orální potravinové provokační testy. Dále CRD identifikuje příčinný alergen a umožní indikaci alergenové imunoterapie (Peveri et al., 2019).

6.2.5 Multiplexové metody

Diagnostika založená na specifických IgE proti molekulárním alergenům výrazně zlepšila kvalitu diagnostiky alergie tím, že dává příležitost rozlišit skutečné senzibilizace od zkřížených reakcí. V současné době lze IgE proti molekulárním alergenům testovat singleplexními nebo multiplexními testy. Singleplex testy měří IgE proti jednotlivým molekulárním alergenům. Při této strategii alergolog přechází na základě klinické anamnézy, kožního prick testu a stanovení IgE proti extraktovým alergenům k detailnímu studiu IgE odpovědi na jednotlivé definované alergenní proteiny (komponenty) s cílem odhalit zkřížené reaktivity nebo potenciálně nebezpečné senzibilizace na alergeny vyvolávající závažné reakce. Zaměřuje se na konkrétní alergeny a konkrétní molekulární cíle. Singleplex testy jsou kvantitativní, s možností automatizace. Jejich nevýhoda je v tom, že pokud lékař přesně neodhadne příčinný alergen, jiná závažná senzibilizace může být přehlédnuta nebo podceněna (Buzzulini et al., 2019).

Multiplexní testy na druhé straně nabízejí širší pohled na senzibilizační profil pacienta. Využití nachází zejména u polyvalentních alergiků, kdy je potřeba otestovat více než 12-13 molekul či u dětských pacientů pro malou spotřebu vzorku (séra). Jsou vhodné jako screening u nových pacientů, na základě kterého bude poté detailně testována senzibilizace na konkrétní vybrané alergeny. (Buzzulini et al., 2019).

Dostupné multiplexní testy mají limit, že jsou semikvantitativní a méně citlivější než singleplexní metody. První multiplexní test dostupný na trhu a v současnosti používaný

je microarray ISAC (ISAC[®], ThermoFisher, Švédsko), který umožňuje testovat 112 různých molekul, rekombinantních i nativních, v malém množství séra (30 μ l). Další multiplexní metodou je ALEX (Allergy Explorer, MacroArray Diagnostics, Wien, Rakousko). Na rozdíl od metody ISAC obsahuje jak alergenové extrakty (157), tak molekulární složky (125). Specificita čipu je zlepšena inhibicí reaktivity zkříženě reaktivních sacharidových determinant (CCD). ALEX má barevnou (fotometrickou) detekci výsledného signálu a každý alergen testuje jednou, zatímco ISAC má fluorimetrickou koncovku a pracuje v triplikátech (Buzzulini et al., 2019).

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na statistické srovnání výsledků stanovení specifických IgE protilátek metodami ALEX a ISAC pomocí biomedicínského softwaru Medcalc. Pro srovnání byl využit soubor pacientů z Kožní kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové trpících atopickou dermatitidou odebíraný v letech 2018-2019. Celkem bylo vyšetřeno 104 pacientů s klinickými projevy atopické dermatitidy. Diagnóza byla stanovena pomocí Hanifin–Rajkových kritérií (Hanifin a Rajka, 1980).

Tato diplomová práce se však zaměřuje zejména na inhalační alergeny ze zvířat, roztočů, plísní a Rusa domácího.

Do studie mohli být zařazeni pacienti splňující určitá kritéria. Pacient se nemohl dlouhodobě léčit léčivými cyklosporinem, metotrexátem, azatrioprinem či systémovými kortikoidy. Mimo jiné nemohli být do studie zařazeni pacienti s biologickou léčbou. Rovněž studie nebyla vhodná pro těhotné a kojící ženy. Do studie rovněž nebyly zařazeni pacienti s atopickou dermatitidou, kteří mají navíc jiné systémové onemocnění či jsou onkologicky nemocní.

Pacienti, kteří splnili následující kritéria a mohli být tedy zařazeni od studie, čekala řada vyšetření, a to vyšetření u dermatologa a alergologa a laboratorní *in vitro* vyšetření specifických IgE protilátek namířených proti molekulárně definovaným alergenům pomocí multiplexových metod ALEX a ISAC.

Pacienti, kteří byli vybráni do této studie byli zapojeni dobrovolně a mimo jiné byli obeznámeni s účelem a cílem tohoto výzkumu, a vše potvrdili informovaným souhlasem. Taktéž byla tato studie schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a platnost této studie má jednacím číslo 201806 S04P; 201911 I01P.

V jednotlivých souborech byli pacienti rozděleni do skupin podle indexu SCORAD do tří kategorií dle formy atopické dermatitidy. Pacienti s mírnou formou atopické dermatitidy, pacienti se středně těžkou formou AD a pacienti s těžkou formou AD. Další dělení pacientů proběhlo do dvou skupin dle přítomnosti bronchiálního astmatu nebo alergické rýmy. V případě výskytu obou onemocnění u pacientů, byli zařazeni do obou skupin. V rámci studie nebyla sledována závažnost bronchiálního astmatu ani alergické rýmy.

Tabulka 1: Charakteristika souboru 100 pacientů s atopickou dermatitidou

Počet pacientů	100 pacientů (48 mužů, 52 žen)
Věk	průměrný věk 40,9 roků
Index SCORAD	průměrná hodnota 39,0 bodů (SD = 13,1)
Pozitivní výsledky sIgE ve sledovaném souboru	96 pacientů (96 %)
Mírná forma AD	14 pacientů (14 %)
Středně těžká forma AD	58 pacientů (58 %)
Těžká forma AD	28 pacientů (28 %)
Počet pacientů s AB	55 pacientů (55 %)
Počet pacientů s AR	78 pacientů (78 %)

Vysvětlivky: AD – atopická dermatitida, AR – alergická rhinitida, AB – bronchiální astma, SD – směrodatná odchylka

7.1 Sběr anamnestických dat

Data jednotlivých anamnéz byla získávána po zařazení pacientů do studie v ambulanci dermatologa. Cílem bylo získat údaje o průběhu onemocnění a konkrétní popis klinických potíží. Kromě nežádoucích reakcí na potraviny a další alergeny byly do anamnézy zaznamenány také další onemocnění doprovázející atopickou dermatitidu, a to konkrétně alergická rýma a bronchiální astma.

7.2 Určení diagnózy astmatu a alergické rýmy

Diagnóza bronchiálního astmatu byla stanovena na základě splnění kritérií Globální iniciativy pro astma (GINA), a také na základě z bohatých zkušeností odborníků z Ústavu klinické imunologie a alergologie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

U alergické rýmy je tomu podobně, avšak doporučení pro správnou diagnostiku vychází z kritérií ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Astma) spolupracující rovněž s odborníky oddělení Klinické imunologie a alergologie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

7.3 Stupnice závažnosti atopické dermatitidy

Index SCORAD je velmi dobrým ukazatelem závažnosti atopické dermatitidy, který pomocí výpočtu určí velikost postižené plochy konkrétních částí těla na frontální a dorzální straně ve stupnici od 0 do 100. Každé postižení jako erytém, edém, mokvání, exkoriaci, lichenifikaci a suchost kůže je hodnoceno od 0 do 3 bodů. Subjektivní obtíže zahrnující nespavost a svědění kůže byly zaznamenány taktéž. U pacientů byly zaznamenány postižené plochy a jejich velikost, jak moc je toto postižení intenzivní či další parametry, které pacient subjektivně vnímá. Výsledek vyšetření je výpočet pomocí matematického vzorce SCORAD: $A/5 + 7B/2 + C$. Schéma A představuje rozsah postižení (0-100 bodů), B intenzitu onemocnění (0-18 bodů) a C subjektivní parametry (0-20 bodů). Také je následovně posuzována závažnost atopické dermatitidy. Mírná forma je hodnocena do 25 bodů, nad 25 do 50 bodů jde o středně těžkou formu a nad 50 bodů se jedná o těžkou formu atopické dermatitidy. Vyšetření probíhalo každé 2 měsíce v průběhu jednoho roku s výpočtem průměrné hodnoty SCORAD (Oranje et al., 2007; Stalder et al. c1993, Vaňková, 2021).

7.4 Odběr krevních vzorků

Pacientům s atopickou dermatitidou byl proveden odběr periferní krve z kubitální žíly do odběrových zkumavek obsahující aktivátor krevního srážení (BD Vacutainer®, Becton Dickinson). Centrifugace (10 min při 2500 g) byla provedena po předchozí koagulaci a následně došlo k oddělení krevního séra od krevních elementů. Poté bylo zmrazeno na -80 °C až do provedení samotné analýzy. Při pokojové teplotě proběhlo rozmrazení vzorků před analýzou.

7.5 Vyšetření sérových IgE protilátek metodami ALEX a ISAC

Analýza krevních vzorků byla provedena na Ústavu klinické imunologie a alergologie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové metodami ImmunoCAP ISAC® a ALEX® Allergen Explorer.

7.5.1 Princip analýzy ISAC

U každého pacientů byla naměřena hladina sérových sIgE protilátek pomocí laboratorní diagnostické soupravy ImmunoCAP ISAC® sIgE 112 od firmy Thermo Fisher Scientific (©Phadia AB, Uppsala, Švédsko). ImmunoCAP ISAC IgE je multiplexová imunoanalýza na pevné fázi, která je schopna detekovat až 112 odlišných komponent nejčastějších alergenů z 51 zdrojů. Molekulární komponenty alergenů, které jsou obsaženy v diagnostické soupravě jsou potraviny, inhalační alergeny pylů, plísní, roztočů, dále molekulární komponenty zvířat, hmyzích jedů a latexu atd. Také systém rozlišuje alergeny druhově specifické či zkříženě reagující. Aby byla zachována reprodukovatelnost metody jsou jednotlivé alergeny jsou aplikovány v triplikátech. Celý systém se skládá ze skleněné destičky, která má 4 reakční pole tzv. biočip a každé slouží pro 1 pacienta. Celkem tedy můžeme stanovit 4 vzorky (4 pacienty). Dále je součástí systému je skener a software určený k vyhodnocení výsledků (Vaňková, 2021).

Samotný čip obsahuje 67 rekombinantních složek alergenů a dalších 45 složek je purifikovaných z přírodních extraktů (označených předponou „n“, např. nMUXF3 pro glykanový epitop z bromelainu). Předchozí studie ukázaly, že nMUXF3 a glykoproteiny z pylu (nPhl p 4, nCyn d 1, nPla a 2, nCry j 1, nCup a 1) a potraviny vlašského ořechu (nJug r 2) obsahují CCD determinanty, zatímco ostatní alergeny na destičce ISAC ne (Vaňková, 2021; Nkurunungi et al., 2021).



Obrázek 3: Metoda ISAC (London Allergy and Immunology Centre, c2023)

7.5.2 Pracovní postup ISAC

Z jednoho balení soupravy (ImmunoCAP ISAC® sIgE 112) je možno vyšetřit 20 vzorků, kdy 1 pole slouží jako pozitivní a kalibrační kontrola. Do odpovídajících reakčních polí bylo přidáno 30 µl patientských sér a kontrola a následně probíhala 2 hodiny inkubace, kdy na molekulární komponenty alergenů byly vycytávány specifické IgE protilátky. Nenavázané byly následovně odstraněny promytím. Po usušení biočipu bylo opět napipetováno 30 µl, ale sekundárních fluorescenčně značených protilátek, které se váží na pacientovy IgE. Poté následovala půlhodinová inkubace, promytí a vysušení biočipu. K vyhodnocení intenzity fluorescence imunokomplexů je zapotřebí mikročipový laserový scanner LuxScan 10K/A (Capitalbio, Peking, Čína) a také speciální software Phadia MIA (Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Švédsko). Výstupem jsou hodnoty specifického IgE proti jednotlivým alergenům ve standardizovaných jednotkách specifického IgE (ISU-E). Součástí diagnostické soupravy je i kontrolní vzorek sloužící pro kalibraci. Číselné hodnoty výsledků sIgE mohou být poté převedeny na semikvantitativní třídy viz. tabulka. Pomocí MIA softwaru jsou automaticky převedeny na tyto hodnoty (Vaňková, 2021; Phadia, 2009).

Tabulka 2: Semikvantitativní třídy ISAC (Phadia, 2009)

ImmunoCAP ISAC IgE třída (hladina IgE protilátek)	(ISU-E hodnoty)
0 (negativní, velmi nízká pozitivita)	<0,3
1 (nízká pozitivita)	≥0,3<1
2 (střední pozitivita)	≥1<15
3 (vysoká pozitivita)	≥15

7.5.3 Princip analýzy ALEX

Ve stejných vzorcích byly naměřeny hladiny specifických protilátek (sIgE) metodou ALEX® Allergen Explorer od firmy MacroArray Diagnostics (MADx, Vídeň).

Allergen Explorer je *in-vitro* multiplexní systém, který je schopen měřit jak celkové IgE (tIgE) tak specifické IgE (sIgE) proti značnému množství alergenových extraktů a molekulárních alergenů v lidském séru či plasmě (kromě EDTA plasmy) (Vaňková, 2021).

Celkem je použito 117 extraktů a 178 molekulárních alergenů (pyly – trav, stromů, bylin, plísně a kvasinky, roztoči a švábi, srst a epitel, jedy blanokřídleho hmyzu a potravin). Při inkubaci je v systému ALEX využíváno inhibitorů sacharidových determinant (CCD), vedoucí k nižšímu podílu falešně pozitivních výsledků u pacientů s protilátkami proti CCD a je dosaženo vyšší specifické výsledků (Vaňková, 2021).

7.5.4 Pracovní postup ALEX

Na membránu umístěnou ve speciální kazetce jsou ve výrobě nanášeny jednotlivé extrakty či molekulární antigeny v podobě přesně umístěných skvrn (spotů). Po přidání vzorku pacienta do kazetky dochází k navázání specifických IgE protilátek na spoty obsahující jednotlivé alergeny. Po inkubaci jsou nenavázané nespecifické IgE protilátky odstraněny promytím. Poté jsou přidány enzymem značené detekční protilátky, které se vážou na specifické IgE protilátky. Opět je provedeno promytí a přidán substrát. Ten je pomocí enzymu, který váže protilátku je pozměněn na nerozpustný barevný precipitát v místě alergenového spotu. Tato reakce je následně zastavena blokujícím činidlem. Množství tohoto vzniklého precipitátu je úměrné množství specifického IgE ve vzorku pacienta. Po dokončení tohoto testu je na skeneru ImageXplorer pořízen snímek, který je následně analyzován pomocí software Raptor MADx výsledky specifického i celkového IgE jsou uvedeny v jednotkách (kU_A/L) a také řazeny do 4 tříd positivity (Vaňková, 2021).



Obrázek 4: Metoda ALEX (Palliance, c2023)



Obrázek 5: ALEX cartridge s panelem alergenů (ALPCO, c2023)

7.6 Statistické zpracování dat a výsledky

Pro statistické zpracování souboru pacientů byly použity programy Microsoft Excel a MedCalc.

7.6.1 Soubor pacientů pro statistické zpracování

Statistické zpracování dat bylo provedeno pro alergenní komponenty zvířat, roztočů, plísní a Rusa domácího. Celkem bylo provedeno statistické zpracování dat u 96 pacientů z toho u 45 mužů a 51 žen. Jejich průměrný věk činil 42 let s věkovým rozpětím 10-82 let. Dále byla hodnocena přítomnost astma bronchiale, alergické rhinitidy a závažnost atopické dermatitidy. U reakce na potravinové alergeny byly k dispozici i výsledky expozičních testů. Jelikož tato studia byla zaměřena na alergenní komponenty zvířat, roztočů, švába a plísní, údaje expozičního testu nebyly využity. U třech pacientů bohužel nebyly k dispozici údaje o přítomnosti AB, AR a závažnosti AD.

Cílem práce bylo srovnání obou multiplexových metod. Bylo tedy vybráno 20 alergenů zvířat, roztočů, plísní a Rusa domácího, které se vyskytovaly v obou biočipech. Dle hladiny specifického IgE jednotlivých alergenů proběhla následovná klasifikace dle stupně senzibilizace do třídy 0-6 viz. následující tabulka

Tabulka 3: Semikvantitativní hodnocení hladiny specifického IgE ÚKIA FNHK

Rozmezí (kU/l)	Třída	Stupeň senzibilizace dle RAST tříd
<0,35	0	(1) Žádný (negativní)
0,35 – 0,71	1	(2) Nízký
0,72 – 3,59	2	(3) Střední
3,60 – 17,99	3	(4) Vysoký
18,00 – 49,99	4	(5) Velmi vysoký
50,00 – 99,99	5	
>100	6	

Tabulka 4: Charakteristika souboru pacientů

Počet pacientů	96
Počet mužů	45 (46,9 %)
Počet žen	51 (53,1 %)
Věkové rozpětí	10-82 let
Průměrný věk	42 let
Počet pacientů s astma bronchiale (vztaženo na 93 pacientů)	53 (57,0 %)
Počet pacientů s alergickou rhinitidou (vztaženo na 93 pacientů)	73 (78,5 %)
Počet pacientů se slabou formou atopické dermatitidy (vztaženo na 93 pacientů)	57 (61,3 %)
Počet pacientů se střední formou atopické dermatitidy (vztaženo na 93 pacientů)	11 (11,8 %)
Počet pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy (vztaženo na 93 pacientů)	25 (26,9 %)

8 VÝSLEDKY

Tato diplomová práce je zaměřena zejména na molekulární komponenty alergenů plísni, roztočů, zvířat a Rusa domácího. K testování statistických parametrů v této práci bylo nakonec vybráno 96 pacientů z důvodu kompletních informací o pacientech a výsledcích. Bylo vybráno celkem 20 zástupců zmíněných skupin zástupců molekulárních komponent alergenů.

8.1 Základní statistika souboru pacientů

Tabulka základní statistiky popisuje základní statistické parametry jednotlivých alergenních komponent ze souboru 96 pacientů. K těmto parametrům patří minimum, maximum, průměr hodnot, medián, směrodatná odchylka, rozmezí kvartilů (25 a 75 percentil) a údaj o normálním rozložení dat.

V tabulkách č. 5 a č.6, které byly vytvořeny zvlášť pro metodu ALEX a ISAC je souhrn základních statistických parametrů.

Tabulka 5: Základní statistika (ALEX)

Alergen (ALEX)	n	Min	Max	Průměr	Medián	SD	25 – 75 P	P-hodnota
Alt a 1	96	0,000	49,610	8,428	0,000	15,7551	0,000 to 5,835	<0,0001
Asp f 1	96	0,000	5,600	0,132	0,000	0,7178	0,000 to 0,0150	<0,0001
Asp f 3	96	0,000	18,980	0,420	0,000	2,0444	0,000 to 0,0200	<0,0001
Asp f 6	96	0,000	37,360	2,141	0,000	6,1643	0,000 to 0,0600	<0,0001
Bla g 1	96	0,000	0,490	0,0197	0,000	0,06297	0,000 to 0,000	<0,0001
Bla g 2	96	0,000	10,550	0,268	0,000	1,4619	0,000 to 0,000	<0,0001
Bla g 5	96	0,000	0,310	0,0371	0,000	0,06049	0,000 to 0,0600	<0,0001
Blo t 5	96	0,000	36,610	1,399	0,000	6,0181	0,000 to 0,0400	<0,0001
Can f 1	96	0,000	44,930	7,349	0,000	13,7334	0,000 to 6,405	<0,0001
Can f 2	96	0,000	42,200	3,763	0,000	10,3281	0,000 to 0,000	<0,0001
Der f 1	96	0,000	44,090	5,334	0,000	11,4526	0,000 to 3,905	<0,0001
Der f 2	96	0,000	51,510	17,894	0,000	21,5542	0,000 to 45,260	<0,0001
Der p 1	96	0,000	48,030	6,898	0,000	13,3356	0,000 to 6,515	<0,0001
Der p 2	96	0,000	50,680	17,348	0,0550	21,1287	0,000 to 43,055	<0,0001
Der p 23	96	0,000	46,510	9,015	0,000	15,6189	0,000 to 13,580	<0,0001
Equ c 1	96	0,000	45,960	6,587	0,000	13,1861	0,000 to 2,580	<0,0001
Fel d 1	96	0,000	49,690	12,852	0,000	18,4206	0,000 to 30,085	<0,0001
Fel d 4	96	0,000	41,160	3,292	0,000	8,1107	0,000 to 0,720	<0,0001
Lep d 2	96	0,000	46,840	5,537	0,000	11,5576	0,000 to 5,990	<0,0001
Mus m 1	96	0,000	28,870	2,726	0,000	6,8190	0,000 to 0,165	<0,0001

Vysvětlivky: n (počet pacientů v souboru), min (minimum), max (maximum), SD (směrodatná odchylka), 25 – 75 P (rozmezí kvartilů, 25 a 75 percentil)

Tabulka 6: Základní statistika (ISAC)

Alergen (ISAC)	n	Min	Max	Průměr	Median	SD	25 – 75 P	P-hodnota
Bla g 5	96	0,000	0,800	0,0167	0,000	0,1002	0,000 to 0,000	<0,0001
Der f 1	96	0,000	92,000	8,215	0,000	20,6872	0,000 to 3,000	<0,0001
Der p 1	96	0,000	100,000	11,484	0,000	26,7603	0,000 to 5,650	<0,0001
Mus m 1	96	0,000	85,000	5,634	0,000	15,6502	0,000 to 0,000	<0,0001
Alt a 1	96	0,000	100,000	8,209	0,000	19,0268	0,000 to 3,650	<0,0001
Asp f 1	96	0,000	4,800	0,116	0,000	0,6681	0,000 to 0,000	<0,0001
Asp f 3	96	0,000	15,000	0,274	0,000	1,6492	0,000 to 0,000	<0,0001
Asp f 6	96	0,000	27,000	1,509	0,000	4,3698	0,000 to 0,000	<0,0001
Bla g 2	96	0,000	1,600	0,0333	0,000	0,1988	0,000 to 0,000	<0,0001
Bla g1	96	0,000	0,800	0,0135	0,000	0,09583	0,000 to 0,000	<0,0001
Blo t 5	96	0,000	23,000	0,718	0,000	3,2268	0,000 to 0,000	<0,0001
Can f 1	96	0,000	100,000	9,844	0,000	23,1023	0,000 to 5,250	<0,0001
Can f 2	96	0,000	100,000	4,068	0,000	14,0272	0,000 to 0,000	<0,0001
Der f 2	96	0,000	100,000	17,461	0,000	27,6414	0,000 to 30,500	<0,0001
Der p 2	96	0,000	100,000	21,031	0,000	32,5705	0,000 to 37,500	<0,0001
Equ c 1	96	0,000	58,000	5,284	0,000	12,1802	0,000 to 1,050	<0,0001
Fel d 1	96	0,000	100,000	11,532	0,000	21,7484	0,000 to 12,000	<0,0001
Fel d 4	96	0,000	64,000	4,251	0,000	11,1975	0,000 to 1,400	<0,0001
Lep d 2	96	0,000	64,000	2,151	0,000	9,2770	0,000 to 0,000	<0,0001

Vysvětlivky: n (počet pacientů v souboru), min (minimum), max (maximum), SD (směrodatná odchylka), 25 – 75 P (rozmezí kvartilů, 25 a 75 percentil)

8.2 Statistické vyhodnocení kvalitativních dat

Prvním krokem při srovnávání dvou metod bylo porovnání kvalitativních výsledků. V této práci bylo provedeno srovnání kvalitativních výsledků (pozitivní/negativní) i semikvantitativních výsledků ve třídách positivity. Pro tato testování byl použit chí-kvadrát test pro testování nezávislosti. Nejprve byla zjišťována shoda ISAC a ALEX pro jednotlivé alergeny ve třídách positivity a následně v pozitivních a negativních výsledcích.

8.2.1 Chí-kvadrát test pro jednotlivé třídy alergenů

Množství IgE protilátek bylo hodnoceno semikvantitativně pomocí tříd positivity 0 – 6 (viz. výše). Byly zjištěny četnosti výsledků v jednotlivých třídách u všech 20 vybraných alergenů. Následně byly vypracovány kontingenční tabulky pro všechny zkoumané alergeny a pomocí chí-kvadrát testu byla zjištěna úroveň shody mezi oběma zkoumanými metodami. K tvorbě kontingenčních tabulek i pro výpočet chí-kvadrát testu

byl použit software Medcalc. Čím vyšší je hodnota parametru chí-kvadrát, tím těsnější vztah je mezi použitými metodami. Hladina významnosti pod 0,05 znamená statisticky významnou shodu metod ISAC a ALEX.

V následující tabulce č.7 je pro ukázkou uvedena jedna kontingenční tabulka pro alergen Alt a 1 (*Alternaria alternata*) a výsledek chí-kvadrát testu v tabulce č.8. Další tabulky obsahují souhrnné výsledky chí-kvadrát testu pro všechny testované molekulární komponenty vybraných skupin.

Tabulka 7: Kontingenční tabulka pro Alt a 1

Alt a 1 Třída	Metoda		Četnost
	ALEX	ISAC	
0	69	69	138 (71,9 %)
1	1	0	1 (0,5 %)
2	0	3	3 (1,6 %)
3	5	10	15 (7,8 %)
4	21	8	29 (15,1 %)
5	0	5	5 (2,6 %)
6	0	1	1 (0,5 %)
Četnost	96 (50,0 %)	96 (50,0 %)	192

Tabulka 8: Chí-kvadrát test pro Alt a 1

Chí-kvadrát	17,494
DF (stupně volnosti)	6
Hladina významnosti	p=0,0076

8.2.1.1 Chí-kvadrát test pro molekulární komponenty plísní

Tabulka 9: Chí-kvadrát test – plísně (třídy)

Alergen	Chí-kvadrát	DF	P-hodnota	Vzájemný vztah
Alt a 1	17,494	6	0,0076	+
Asp f 1	3,049	3	0,3841	-
Asp f 3	9,081	4	0,0591	-
Asp f 6	1,840	5	0,8708	-

Vysvětlivky: + (pozitivní vztah metod ALEX a ISAC), - (negativní vztah metod ALEX a ISAC)

V tabulce č.9 je uvedeno srovnání obou metod pro molekulární komponenty alergenů plísní. Pomocí chí-kvadrát testu byla zjištěna těsná statistická závislost pro alergen Alt a 1 plísně *Alternaria alternata*. U molekulárních alergenů odvozených od plísně *Aspergillus fumigatus* nebyl vztah mezi hodnotami získanými oběma metodami nalezen.

8.2.1.2 Chí-kvadrát test pro molekulární komponenty roztočů a Rusa domácího

Tabulka 10: Chí-kvadrát test – roztoči a Rus domácí (třídy)

Alergen	Chí-kvadrát	DF	P-hodnota	Vzájemný vztah
Blo t 5	0,785	4	0,9404	-
Bla g 1	1,355	2	0,5080	-
Bla g 2	3,716	3	0,2938	-
Bla g 5	2,021	2	0,3640	-
Der f 1	9,161	5	0,1028	-
Der f 2	20,323	6	0,0024	+
Der p 1	13,097	6	0,0415	+
Der p 2	46,084	6	<0,0001	+
Der p 23	44,308	4	<0,0001	+
Lep d 2	29,781	5	<0,001	+

Vysvětlivky: + (pozitivní vztah metod ALEX a ISAC), - (negativní vztah metod ALEX a ISAC)

V tabulce č.10 jsou v uvedeny jednotlivé molekulární komponenty alergenů roztočů a Rusa domácího (Bla g 1, Bla g 2 a Bla g 5). Významný vztah mezi hodnotami získanými oběma metodami byl prokázán u molekulárních komponent Der p 1, Der p 2 a Der p 23 roztoče *Dermatophagoides pteronyssinus*, Der f 2 roztoče *Dermatophagoides farinae* a Lep d 2 roztoče *Lepidoglyphus destructor*. Zcela rozdílné výsledky poskytují metody pro všechny 3 alergenové komponenty Rusa domácího, Bla g 1, Bla g 2 a Bla g 5.

8.2.1.3 Chí-kvadrát test pro molekulární komponenty alergenů zvířat

Tabulka 11: Chí-kvadrát test – zvířata (třídy)

Alergen	Chí-kvadrát	DF	P-hodnota	Vzájemný vztah
Can f 1	9,781	6	0,1342	-
Can f 2	3,676	6	0,7204	-
Equ c 1	8,192	5	0,1460	-
Fel d 1	20,933	6	0,0019	+
Fel d 4	2,255	5	0,8128	-
Mus m 1	7,045	5	0,2173	-

Vysvětlivky: + (pozitivní vztah metod ALEX a ISAC), - (negativní vztah metod ALEX a ISAC)

V tabulce č.11 jsou uvedeny jednotlivé molekulární komponenty alergenů zvířat. Z hodnocených molekulárních alergenů psa, kočky, koně a myši byla významná shoda mezi metodami nalezena pouze u alergenů Fel d 1 Kočky domácí. Ostatní výsledky vyjádřené jako třídy positivity se lišily.

8.2.2 Chí-kvadrát test pro četnost pozitivních a negativních výsledků alergenů

Obdobně jako u hodnocení shody ve třídách positivity byla vyhodnocena i shoda v pozitivitě/negativitě výsledků. Statisticky byly zpracovány četnosti pozitivních a negativních výsledků u všech 20 vybraných alergenů u metod ALEX a ISAC. K analýze kvalitativních dat byla sestavena kontingenční tabulka pro zástupce molekulárních komponent ze skupiny zvířat, roztočů, plísní a Rusa domácího, a k vyhodnocení byl použit chí-kvadrát test pro testování nezávislosti. Hodnocení chí-kvadrátu bylo doplněno ještě o výpočet kontingenčního koeficientu, který může nabývat hodnot do 1,0. Čím vyšší hodnota, tím těsnější vztah mezi metodami. V následující tabulce je pro ukázkou sestavena kontingenční tabulka (tabulka č.12) pro alergen Mus m 1 Myši domácí a její zhodnocení. Další tabulky shrnují zhodnocení výsledků pro každou vybranou molekulární komponentu vybraných skupin.

Tabulka 12: Četnost pozitivních a negativních výsledků (ALEX a ISAC) pro Mus m 1

	Alergen Mus m 1 (ALEX)		
Alergen Mus m 1 (ISAC)	Negativní	Pozitivní	Četnost
Negativní	71	5	76 (79,2 %)
Pozitivní	3	17	20 (20,8 %)
Četnost	74 (77,1 %)	22 (22,9 %)	96

Tabulka 13: Chí-kvadrát test Mus m 1

Chí-kvadrát	54,548
DF (stupeň volnosti)	1
P-hodnota	P <0,0001
Kontingenční koeficient	0,602

8.2.2.1 Chí-kvadrát test pro četnost pozitivních a negativních výsledků alergenů plísni (ALEX a ISAC)

Tabulka 14: Chí-kvadrát test – plísně (poz., neg.)

Alergen	Chí-kvadrát	DF	P-hodnota	Kontingenční koeficient	Vzájemný vztah
Alt a 1	90,175	1	<0,0001	0,696	+
Asp f 1	55,774	1	<0,0001	0,606	+
Asp f 3	28,187	1	<0,0001	0,476	+
Asp f 6	89,078	1	<0,0001	0,694	+

Vysvětlivky: + (pozitivní vztah metod ALEX a ISAC), - (negativní vztah metod ALEX a ISAC)

Tabulka 15: Zastoupení výsledků alergenů plísni (ALEX a ISAC)

Alergen	% zastoupení + výsledků ALEX	% zastoupení + výsledků ISAC	% zastoupení - výsledků ALEX	% zastoupení - výsledků ISAC
Alt a 1	27,1	28,1	72,9	71,9
Asp f 1	3,1	5,2	96,9	94,8
Asp f 3	15,6	5,2	84,4	94,8
Asp f 6	20,8	19,8	79,2	80,2

V tabulce č. 14 je uvedeno srovnání pozitivních a negativních výsledků pořízených oběma hodnocenými metodami pro molekulární komponenty alergenů plísni. Byly zhotoveny kontingenční tabulky a vyhodnocen test chí kvadrát. Byla dosažena statisticky významná shoda mezi metodami pro všechny uvedené alergeny plísni *Alternaria*

alternata a *Aspergillus fumigatus*. V tabulce č.15 je uvedeno procentuální zastoupení pozitivních a negativních výsledků pro metody ALEX a ISAC jednotlivých alergenů plísní.

8.2.2.2 Chí-kvadrát test pro četnost pozitivních a negativních výsledků alergenů roztočů a *Rusa domácího* (ALEX a ISAC)

Tabulka 16: Chí-kvadrát test – roztoči a *Rus domácí* (poz., neg.)

Alergen	Chí-kvadrát	DF	P-hodnota	Kontingenční koeficient	Vzájemný vztah
Blo t 5	66,736	1	<0,0001	0,640	+
Bla g 1	47,000	1	<0,00001	0,573	+
Bla g 2	45,968	1	<0,0001	0,569	+
Bla g 5	88,167	1	<0,0001	0,692	+
Der f 1	86,164	1	<0,0001	0,688	+
Der f 2	91,103	1	<0,0001	0,698	+
Der p 1	90,742	1	<0,0001	0,697	+
Der p 2	91,103	1	<0,0001	0,698	+
Der p 23	6,000	1	0,0143	0,243	-
Lep d 2	16,492	1	<0,0001	0,383	+

Vysvětlivky: + (pozitivní vztah metod ALEX a ISAC), - (negativní vztah metod ALEX a ISAC)

Tabulka 17: Zastoupení výsledků alergenů roztočů a *Rusa domácího* (ALEX a ISAC)

Alergen	% zastoupení + výsledků ALEX	% zastoupení + výsledků ISAC	% zastoupení - výsledků ALEX	% zastoupení - výsledků ISAC
Blo t 5	11,5	8,3	88,5	91,7
Bla g 1	1,0	2,1	99,0	97,9
Bla g 2	6,2	3,1	93,7	96,9
Bla g 5	0	2,1	100	97,9
Der f 1	32,3	32,3	67,7	67,7
Der f 2	46,9	45,8	53,1	54,2
Der p 1	34,4	35,4	65,6	64,6
Der p 2	45,8	46,9	54,2	53,1
Der p 23	37,5	0	62,5	100
Lep d 2	42,7	11,5	57,3	88,5

Obdobná situace byla i pro alergenů roztočů *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor* a *Blomia tropicalis*, kde všechny měřené molekulární alergenů vykazovaly statisticky významnou shodu pro obě metody. Stejných výsledků bylo dosaženo i u alergenů *Rusa domácího*. V tabulce č.17 je

uvedeno procentuální zastoupení pozitivních a negativních výsledků pro metody ALEX a ISAC jednotlivých alergenů roztočů a Rusa domácího.

8.2.2.3 Chí-kvadrát test pro četnosti pozitivních a negativních alergenů zvířat (ALEX a ISAC)

Tabulka 18: Chí-kvadrát test – zvířata (poz.,neg.)

Alergen	Chí-kvadrát	DF	P-hodnota	Kontingenční koeficient	Vzájemný vztah
Can f 1	87,000	1	<0,0001	0,689	+
Can f 2	69,779	1	<0,0001	0,649	+
Equ c 1	90,375	1	<0,0001	0,696	+
Fel d 1	83,435	1	<0,0001	0,682	+
Fel d 4	71,906	1	<0,0001	0,654	+
Mus m 1	54,548	1	<0,0001	0,602	+

Vysvětlivky: + (pozitivní vztah metod ALEX a ISAC), - (negativní vztah metod ALEX a ISAC)

Tabulka 19: Zastoupení výsledků alergenů zvířat (ALEX a ISAC)

Alergen	% zastoupení + výsledků ALEX	% zastoupení + výsledků ISAC	% zastoupení - výsledků ALEX	% zastoupení - výsledků ISAC
Can f 1	37,5	39,6	62,5	60,4
Can f 2	17,7	17,7	82,3	82,3
Equ c 1	30,2	29,2	69,8	70,8
Fel d 1	45,8	44,8	54,2	55,2
Fel d 4	27,1	28,1	72,9	71,9
Mus m 1	22,9	20,8	77,1	79,2

V tabulce č.18 jsou uvedeny jednotlivé molekulární komponenty alergenů zvířat. Pro všechny testované alergeny kočky, psa, koně i Myši domácí byla pomocí chí kvadrátu nalezena těsná a významná závislost výsledků pořízených oběma testovanými metodami ISAC a ALEX. V tabulce č.19 je uvedeno procentuální zastoupení pozitivních a negativních výsledků pro metody ALEX a ISAC jednotlivých molekulárních komponent alergenů zvířat.

8.3 Statistické vyhodnocení kvantitativních dat

Porovnání metod založené na hodnocení shody kvantitativních výsledků poskytuje více informací než srovnání dat kvalitativních. V této práci byly metody porovnány pomocí korelační analýzy. Výsledkem je korelační koeficient, jehož hodnota nepřesahuje 1,000. Čím více se hodnota korelačního koeficientu porovnávaných dat blíží 1,000; tím je těsnější závislost (shoda) mezi metodami. V případě porovnání metod na stanovení specifického IgE, kde v optimálním případě se číselné výsledky shodují, nepředpokládáme hodnoty korelačního koeficientu nižší než 0, což by svědčilo o nepřímé úměrnosti výsledků obou metod. Korelační koeficienty lze počítat pro data s normálním i nenormálním rozložením. V prvním případě použijeme Pearsonův korelační koeficient, ve druhém případě Spearmanův korelační koeficient.

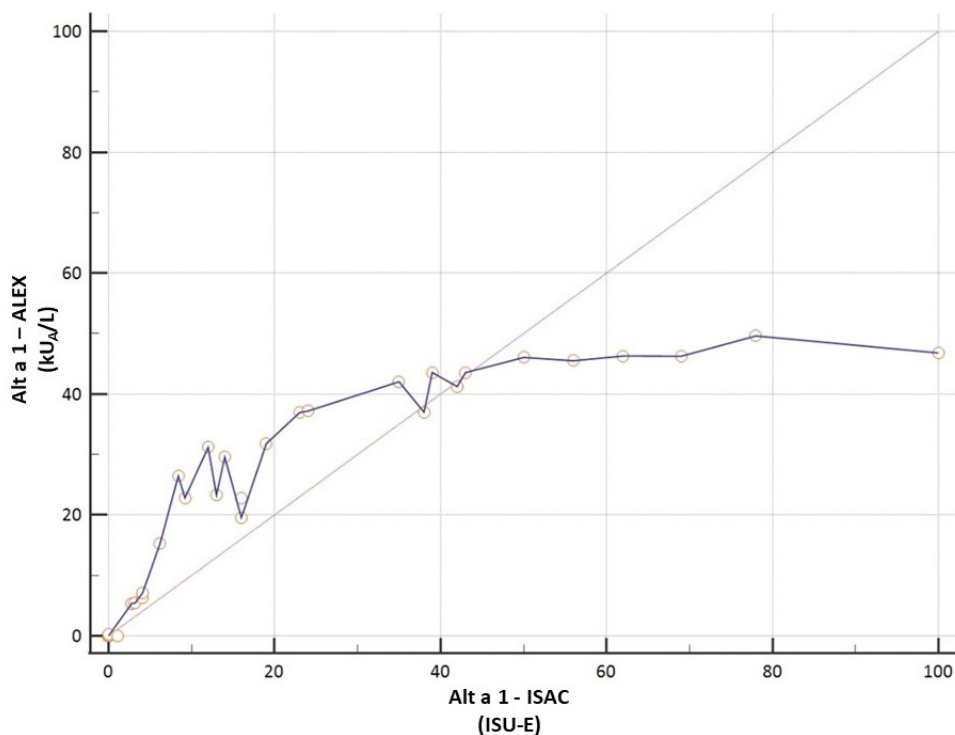
8.3.1 Testy nezávislosti – Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů plísni

Tabulka 20: Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů plísni (ALEX a ISAC)

Alergen (ALEX)	Alergen (ISAC)	Korelační koeficient	P-hodnota
Alt a 1	Alt a 1	0,972	<0,0001
Asp f 1	Asp f 1	0,367	0,0002
Asp f 3	Asp f 3	0,484	<0,0001
Asp f 6	Asp f 6	0,774	<0,0001

V tabulce č.20 jsou uvedeny výsledky korelační analýzy pro alergeny plísni a to konkrétně alergenní komponenty *Aspergillus fumigatus* a *Alternaria alternata*. Nejvyšší shodu mezi metodami vykazuje IgE proti *Alternaria alternata*, kde hodnota korelačního koeficientu přesahuje hranici 0,9. To je považováno za výbornou korelaci mezi metodami. IgE proti alergenů Asp f 6 plísně *Aspergillus fumigatus* s hodnotou 0,774 také obstojně koreluje mezi metodami. Výrazně horší výsledky poskytují alergeny *Aspergillus fumigatus* Asp f 1 a Asp f 3, kde jsou sice statisticky významné korelační závislosti, ale hodnoty korelačních koeficientů jsou nízké (pod 0,5).

V grafu č. 1 je grafická podoba korelační závislosti mezi výsledky Alt a 1 získanými oběma metodami. V grafu je dobře vidět, že metody dobře korelují v nižších hodnotách a rozcházejí se ve vyšších hodnotách zhruba nad 50 jednotek, kde závislost přestává být lineární.



Graf 1: Korelace alergenu Alt a 1

8.3.2 Testy nezávislosti – Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů roztočů a Rusa domácího

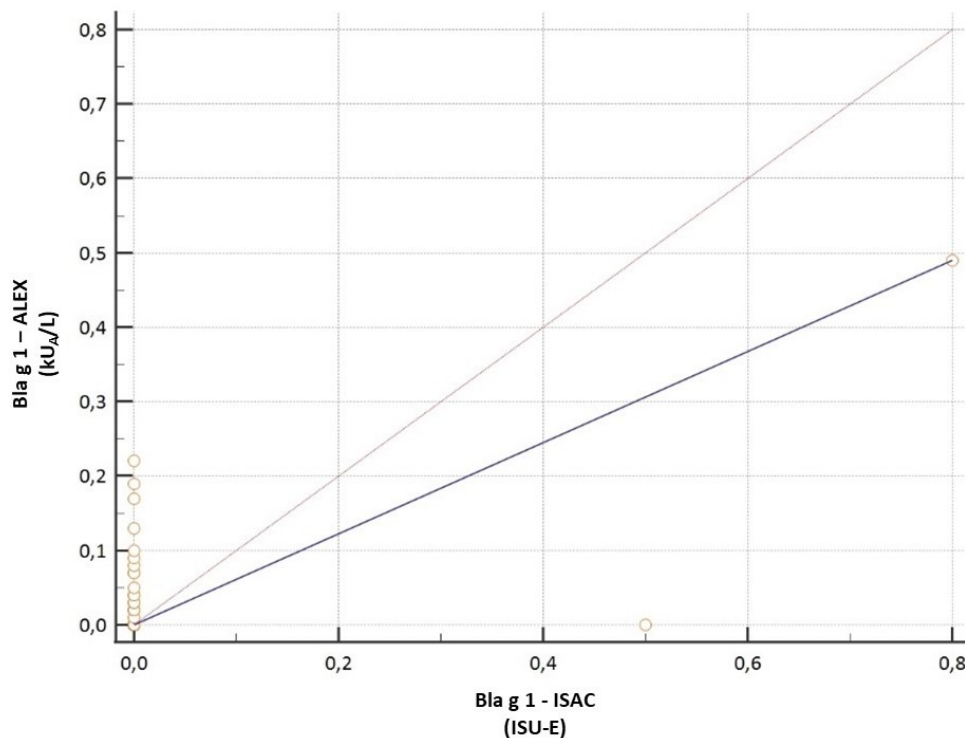
Tabulka 21: Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů roztočů a Rusa domácího (ALEX a ISAC)

Alergen (Alex)	Alergen (ISAC)	Korelační koeficient	P-hodnota
Blo t 5	Blo t 5	0,573	<0,0001
Bla g 1	Bla g 1	0,141	0,1698
Bla g 2	Bla g 2	0,491	<0,0001
Bla g 5	Bla g 5	0,187	0,0684
Der f 1	Der f 1	0,943	<0,0001
Der f 2	Der f 2	0,976	<0,0001
Der p 1	Der p 1	0,965	<0,0001
Der p 2	Der p 2	0,935	<0,0001
Lep d 2	Lep d 2	0,581	<0,0001

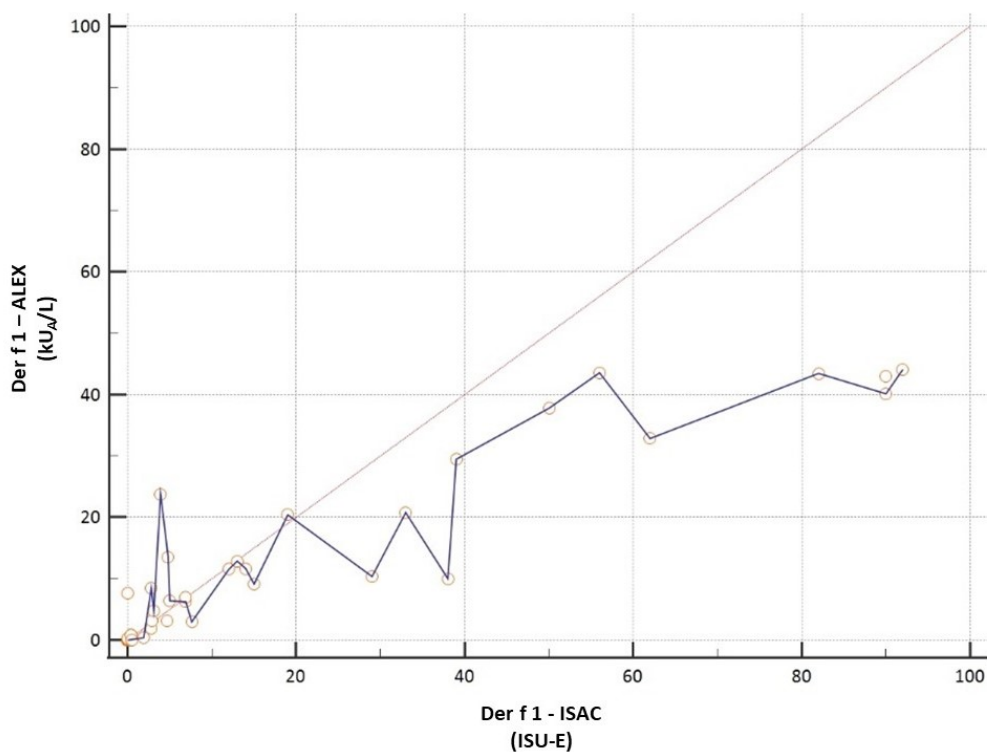
V tabulce č.21 jsou shrnuty výsledky korelační analýzy pro alergeny roztočů *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* a *Lepidoglyphus destructor*. Dále jsou do této tabulky zařazeny alergenní komponenty Rusa domácího (*Blattella germanica*).

Z tabulky je dobře vidět, že výborně korelují výsledky stanovení IgE proti alergenům roztočů *Dermatophagoides pteronyssinus* a *Dermatophagoides farinae*, kde hodnoty korelačních koeficientů přesahují 0,9. Hraniční hodnoty korelačních koeficientů bylo dosaženo u alergenů Blo t 5 roztoče *Blomia tropicalis* a Lep d 2 *Lepidoglyphus destructor* a také u alergenu Rusa domácího Bla g 2. Hodnoty kolem 0,5 ukazují na slabou korelaci. IgE proti alergenům Bla g 1 a Bla g 5 nevykazují žádnou závislost mezi metodami a obě metody dosáhly zcela odlišných výsledků. Tento jev je možné pozorovat pro případ alergenu Bla g 1 v grafu č.2.

Z grafu č. 3 je vidět, podobně jako v předchozím případě u Alt a 1, že i zde, u Der f 1 se obě metody rozcházejí ve vyšších hodnotách, v tomto případě již nad 20.



Graf 2: Korelace alergenu Bla g 1



Graf 3: Korelace alergenu Der f 1

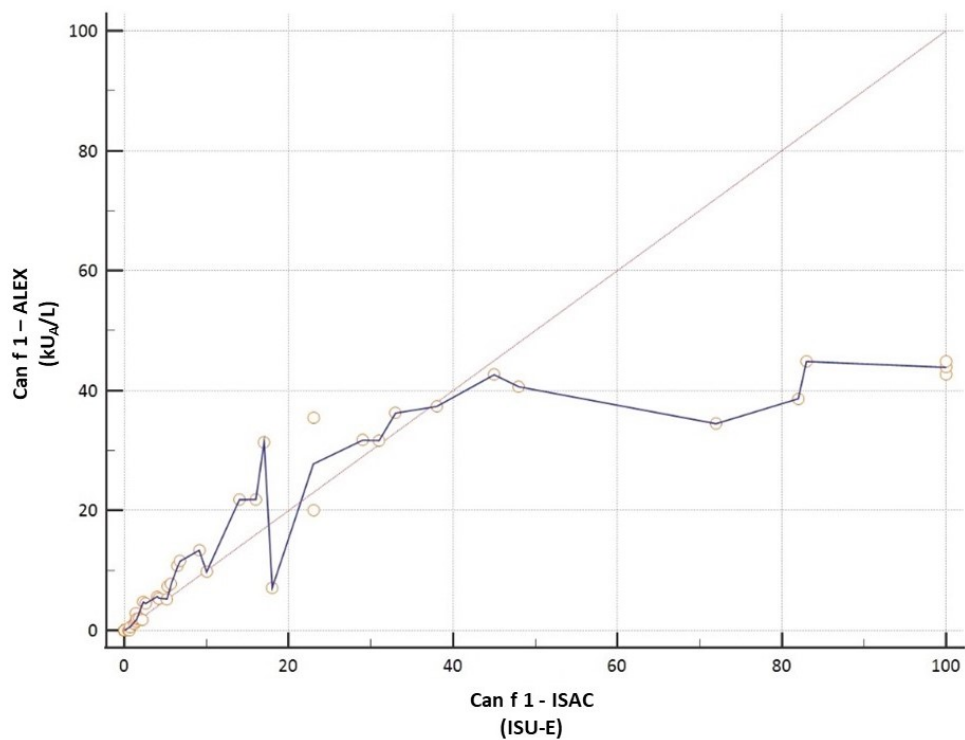
8.3.3 Testy nezávislosti – Spearmanův test korelačního koeficientu pro alergeny zvířat

Tabulka 22: Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů zvířat (ALEX a ISAC)

Alergen (Alex)	Alergen (ISAC)	Korelační koeficient	P-hodnota
Can f 1	Can f 1	0,983	<0,0001
Can f 2	Can f 2	0,862	<0,0001
Equ c 1	Equ c 1	0,926	<0,0001
Fel d 1	Fel d 1	0,972	<0,0001
Fel d 4	Fel d 4	0,928	<0,0001
Mus m 1	Mus m 1	0,822	<0,0001

Korelační analýza byla provedena i pro alergeny zvířat *Mus musculus*, *Felis domesticus*, *Canis familiaris*, *Equus caballus*. Dle Spearmanova testu hodnoty korelačních koeficientů vykazují výbornou korelaci mezi metodami u všech hodnocených alergenů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u Can f 1 psa a Fel d 1 kočky, kde se koeficienty blíží 1,000. V případě těchto alergenů lze považovat výsledky obou metod za shodné.

Trend, kdy ve vyšších hodnotách se obě metody rozcházejí, lze pozorovat i u zvířecích alergenů. Potvrzuje to graf č.4 s výsledky Can f 1.



Graf 4: Korelace alergenu Can f 1

9 DISKUSE

Atopická onemocnění představují velkou zátěž pro jedince i celou společnost a v posledních desetiletích dochází k velkému nárůstu počtů nemocných zejména v industrializovaných vyspělých zemích, ale tento trend byl zaznamenán také v rozvojových zemích (Thomsen, 2015).

Stanovení specifických protilátek třídy IgE je významným laboratorním ukazatelem, který využívají lékaři odbornosti alergologie a klinické imunologie, ale také dětské lékaři, pneumologové, gastroenterologové a dermatologové. Tento laboratorní ukazatel doplňuje klinické vyšetření a významně pomáhá zejména s detailním určením alergenů, které vyvolávají u pacientů klinické obtíže. Přístup k vyšetřování specifických IgE protilátek je diferencovaný a odvíjí se od konkrétních potřeb lékaře. Základní stupeň je stanovení IgE proti směsím alergenů, který vytipuje rizikové skupiny. Testovat je možno směsi ořechů, obilovin, ovoce, zeleniny, peří a mnoho dalších. Dalším krokem je analýza IgE proti jednotlivým alergenům získaným z přírodních zdrojů (extraktům). K dispozici je několik stovek alergenů, proti kterým může klinická laboratoř vyšetřit IgE protilátky. Patří mezi ně velké množství potravin, epitelíí, pylů, léků a dalších alergenů. V řadě případů tyto údaje postačí k určení příčinného alergenu a další analýza není nutná. Pokud tomu tak není, je možno provést detailní vyšetření pomocí molekulárních alergenů, tzv. komponent. Tato analýza poskytuje velmi konkrétní informace o zkřížené reaktivitě, rizikovosti a přesné druhové příslušnosti vyšetřovaných IgE protilátek. K dispozici je několik desítek molekulárních alergenů pro rutinní testování. Diagnostika molekulární alergie se dostává čím dál více do běžné péče. Tento typ diagnostiky pomáhá při mapování alergenové senzibilizace u pacientů na molekulární úrovni. V komerčně dostupných testech se využívají jak rekombinantní, tak přírodní, purifikované alergenové složky. Alergenní molekuly jsou klasifikovány do proteinových rodin dle jejich struktury a také podle jejich biologické funkce. Znalost struktury molekul pak dále slouží jako pomoc lékařům při diagnostice alergie (Matricardi et al., 2016).

Zcela specifický přístup vyšetřování IgE protilátek je použití multiplexových metod. Ty poskytují při jednom odběru krve a v jedné analýze výsledky až stovek různých specifit IgE protilátek. Tyto metody mají řadu výhod i nevýhod. Zásadní výhoda je získání velkého množství výsledků z jednoho měření s minimální spotřebou materiálu (krve, séra).

V současnosti jsou v klinických laboratořích pro stanovení IgE protilátek používány dvě multiplexní metody, a to ISAC od firmy Phadia a ALEX od firmy MacroArray Diagnostics. Obě poskytují výsledky IgE proti několika desítkám molekulárně definovaných alergenů, metoda ALEX obsahuje navíc možnost stanovení IgE proti několika desítkám extraktivních alergenů. První zmíněný je alergenový čip ISAC (Phadia/Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden), který je dostupný od roku 2001. Současná verze tohoto čipu je schopna detekovat specifické IgE (sIgE) ke 112 rozdílným molekulám z 51 rostlin a zvířecích zdrojů alergenů. Nedávno novou multiplexní dostupnou platformu představuje ALEX (Macroarray Diagnostics, Vienna), která obsahuje 156 extraktů alergenů a 126 molekulárních komponent (Bojcukova et al., 2019).

Multiplexové vyšetření poskytuje klinikovi komplexní informaci o reaktivitě daného pacienta na celou škálu alergenů, tzv. sensibilizační profil. Tuto možnost lékaři hojně využívají. Vzhledem k tomu, že multiplexní vyšetření je poměrně nákladné (několik tisíc Kč za jednoho pacienta/vzorek), je třeba vymezit indikační kritéria pro toto vyšetření. Nejčastější indikací multiplexu je neshoda v ostatních výsledcích (anamnéza, kožní testy, případně vyšetření jednotlivých IgE protilátek). Dalším důvodem může být vyloučení alergické etiologie pacientových problémů. Pokud všechny specifity IgE v multiplexu budou negativní, je velká pravděpodobnost, že pacient není alergik a jeho potíže jsou jiné etiologie. Dalším možným využitím multiplexu je analýza rizikových alergenů u konkrétního pacienta. O některých alergenech obsažených v multiplexu je známo, že s přítomností IgE proti nim výrazně roste riziko závažných klinických projevů alergie, včetně anafylaxe (Nerelius et al., 2020, Bojcukova et al., 2019).

Výsledky multiplexních metod ALEX i ISAC v rutinním klinickém prostředí je vhodné nadále konfirmovat nejlépe pomocí stanovení specifických IgE protilátek proti jednotlivým alergenům, vytipovaným z výsledků multiplexu. Tento postup zajišťuje maximální spolehlivost získaných dat (Bojcukova et al., 2019).

Multiplexní metody mají ale své podstatné nevýhody. Zásadní je skutečnost, že neposkytují srovnatelné hodnoty s vyšetřením jednotlivých IgE specifit. Jednotky, používané v multiplexech, jsou relativní, specifické pro danou firmu a neodpovídají přesně mezinárodním jednotkám pro specifické IgE. Zároveň se alergeny vázané na velmi malém prostoru biočipu mohou vzájemně ovlivňovat a snižovat tak spolehlivost

vyšetření. Důležitý je také samotný princip měření. Multiplex ISAC má všechny alergeny na biočipu nanesené v triplikátech a výsledný měřený signál je fluorescenční. Triplikáty výrazně zvyšují spolehlivost měření a fluorescenční detekce umožňuje velký rozsah měření včetně zachycení výrazně pozitivních patologických hodnot. Multiplex ALEX na svém biočipu obsahuje každý alergen jen na jediném spotu, což zvyšuje riziko nesprávného vyhodnocení z důvodu možné nečistoty (smítka prachu) nalézajícího se v místě alergenového spotu. Navíc je u ALEX detekován fotometrický signál (zbarvení) jednotlivých spotů. Fotometrie neumožňuje velký rozsah měření srovnatelný s fluorescencí. Tato skutečnost se projevuje v rozdílných naměřených hodnotách oběma metodami, což bylo jasně potvrzeno i v této práci. Většina specifických IgE vykazovala odlišné výsledky ve vyšších hladinách. Metoda ISAC, která je založena na fluorescenční detekci, poskytovala výrazně vyšší hodnoty nad cca 40-50 jednotek než metoda ALEX. Tento rozdíl se projevil v korelační analýze, ale také při srovnání výsledků v podobě semikvantitativních tříd positivity. Rozdíly byl pozorovány i u alergenů, jejichž výsledky spolu dobře korelovaly (Matricardi et al., 2016, Bojcukova et al., 2019).

Srovnáním obou multiplexů se zabývala Jana Bojcuková se spolupracovníky z imunologického a alergologického pracoviště v Plzni. Na 198 pacientech porovnávali vybrané alergeny. Použili kromě korelační analýzy také Cohenovo kappa na hodnocení shody. U hodnocených alergenů pylů, roztočů a epitelů dosáhli vysokých korelačních koeficientů (nad 0,9) a velmi dobré shody v kappa koeficientu (nad 0,8). V této diplomové práci byly vysoké korelační koeficienty zjištěny jen u části hodnocených alergenů. Zároveň autoři upozorňují na odlišnost obou metod v případě vysokých hodnot IgE v některých vzorcích, což je ve shodě s výsledky této diplomové práce (Bojcukova et al, 2019).

Problematikou porovnání výsledků ALEX a ISAC se zabýval i kolektiv autorů v čele s Enrico Hefflerem. Použili vzorky 43 pacientů s alergickým zánětem a porovnávali alergeny z různých skupin, inhalační i potravinové. Použili především korelační analýzu. Většina alergenů vykazovala velmi dobrou korelaci (s koeficientem nad 0,8), ale některé, jako např. latex, arašíd, líska nebo vlašský ořech korelovaly výrazně hůře. Zajímavým přístupem bylo provést korelační srovnání všech alergenů pro 12 vybraných typických pacientů. U 10 z 12 pacientů byl celkový korelační koeficient statisticky významný

a pouze u dvou pacientů nikoliv. Oba měřicí systémy došly u těchto dvou pacientů k diametrálně odlišným výsledkům u většiny hodnocených alergenů. Autoři také hodnotili vliv inhibice IgE proti nespecifickým CCD alergenním determinantám u systému ALEX na vybraných vzorcích pacientům. Inhibice je účinná především u nativních extraktů a molekulárních alergenů ve srovnání s alergeny rekombinantními (Heffler et al. 2018).

Velmi zajímavé výsledky poskytuje práce Chalotte Nerelieu a jejích spoluautorů. Tématem je srovnání systémů ALEX a ISAC s výsledky IgE proti jednotlivým alergenům získaných pomocí metody ImmunoCAP (ThermoFisher Scientific/Phadia). Použili 11 alergenů (extraktů i jejich molekulárních protějšků) a hodnotili je u 66 vzorků pacientů. Při srovnání systému ALEX s měřením jednotlivých IgE proti extraktovým alergenům zjistili, že ALEX poskytl 55 % falešně negativních výsledků a při hodnocení molekulárních alergenů 33 % falešně negativních výsledků. To znamená, že pozitivní výsledky ImmunoCAP IgE byly v systému ALEX negativní. Zároveň autoři potvrdili spolu s jinými vědeckými skupinami (a v souladu s pozorováními v této diplomové práci), že systém ALEX má menší dynamický rozsah, tzn. vyšší hladiny specifického IgE zkresluje směrem dolů. To zhoršuje zaměnitelnost obou metod (ALEX i ISAC). Citovanou práci je třeba kriticky okomentovat ze dvou pohledů. První je střet zájmů, autoři jsou zaměstnanci koncernu ThermoFisher Scientific/Phadia, který vyrábí systém ISAC. Druhý problém je srovnání ALEX se stanovením jednotlivých IgE metodou ImmunoCAP a ne se systémem ISAC. Porovnání multiplexů je věnována v práci jen okrajová pozornost (Nerelius et al., 2020).

Enrico Scala se svými spolupracovníky porovnával kvalitativní i kvantitativní výsledky obou multiplexů na skupině 140 pacientů s anamnézou atopické dermatitidy. Pozoroval podstatnou a někdy i vysokou shodu mezi těmito metodami poté, co byly výsledky dichotomizovány na negativní nebo pozitivní: v 94 % z více než 10 000 měření byly testy shodné. Autoři se domnívají, že výsledky jsou významně ovlivněny velkým počtem hodnocení, která byla v obou testech negativní. Pokud byly porovnávány pouze "pozitivní" výsledky, shoda mezi testy klesla na 71 %. Podobné výsledky v kvalitativním hodnocení dosáhla i tato diplomová práce. Metoda ISAC se zdá být robustnější při porovnání IgE proti alergenům obsaženým v obou multiplexech, ale přítomnost většího

množství alergenů a zajímavých nových komponent dostupných pouze na ALEX může být přínosem při rozhodování lékaře ve zvláště obtížných situacích a poskytovat komplexnější obraz. Navíc přítomnost efektivní blokády reaktivity na CCD determinanty u testu ALEX v 60% případů vzorků s IgE proti CCD poskytlo kvalitnější výsledky než ISAC. Autoři očekávají, že výrobci zlepší jak kvalitu jednotlivých alergenů, tak i počet molekul dostupných na čipech. Obecně chybí detailnější data ohledně molekulárního profilování pacientů, stratifikace rizika závažných alergických reakcí na nové alergenní molekuly podílející se na respirační a potravinové alergii (Scala et al., 2021).

Další studie by se měly zaměřit zejména na optimalizaci metod, analytickou citlivost (zejména pro limit detekce) a diagnostickou citlivost a senzitivitu. Kromě toho je třeba mít na paměti, že lidská imunitní odpověď zprostředkovaná IgE je polyklonální a podléhá genetickým a environmentálním vlivům. Alergenové extrakty mohou být heterogenní a obtížné standardizovatelné na molekulární úrovni. V každém případě přítomnost nového multiplexního testu založeného na solidních vědeckých údajích dává impuls výzkumu molekulární alergie (Scala et al., 2021).

Molekulární alergologie se celosvětově stále více používá v klinické praxi a poskytuje lékařům velmi účinný nástroj pro lepší diagnostiku alergických onemocnění. V souladu s rostoucím využíváním molekulární alergologie existuje potřeba relevantních informací potřebných ke správné interpretaci výsledků. Dle autorů dokumentů o diagnostických postupech WAO-ARIA-GALEN je molekulární alergologie považována za třetí linii přístupu, který se má používat v případě diagnostického neúspěchu v první a druhé linii vyšetření (klinické vyšetření, expoziční testy a IgE proti extraktovým alergenům), které obvykle poskytují dostatečné informace u většiny pacientů. Nedávno publikovaný průvodce diagnostiky molekulární alergie zdůrazňuje mnoho výhod testování pomocí molekulárních alergenů. Jeden zajímavý aspekt, který byl pomocí molekulární diagnostiky odhalen, je ten, že senzibilizace na určité molekuly alergenu je více asociována s konkrétními klinickými projevy alergického zánětu než s jinými (Bojcukova et al., 2019).

Při porovnání obou metod ALEX a ISAC je třeba brát v úvahu, že pevné fáze jsou rozdílné, stejně tak ředění séra, detekční protilátka a enzymové substráty. Navíc ALEX využívá CCD inhibitor, zatímco ISAC ne. Navzdory technickým rozdílům však výsledky ukázaly

podstatnou shodu mezi těmito metodami a toto zjištění je v souladu s pracemi jiných autorů. Obě metody jsou zaměnitelné s tím, že výsledky se rozcházejí ve vyšších hodnotách specifického IgE díky značně příznivějšímu dynamickému rozsahu metody ISAC a obě metody mají také výrazně rozdílný počet alergenů na biočipu, což ALEX silně zvyhodňuje (Bojcukova et al, 2019).

10 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá srovnáním dvou multiplexových metod pro stanovení specifických IgE protilátek. Pro porovnání byl využit dobře klinicky charakterizovaný soubor pacientů s atopickou dermatitidou, kteří jsou v péči Kliniky nemocí kožních a pohlavních FN v Hradci Králové. Z naměřených dat byly pro hodnocení vybrány alergeny plísní, roztočů, Rusa domácího a zvířecích alergenů. Byly porovnány kvalitativní výsledky pozitivní/negativní, semikvantitativní výsledky v podobě kategorií, tříd pozitivity, a výsledky kvantitativní. Shoda mezi metodami v kvalitativních výsledcích byla velmi dobrá, většinou ve více než 90 procentech případů. Shoda v kategoriích již je výrazně horší a je způsobena rozdíly zejména ve vyšších hladinách IgE, kde metoda ISAC poskytuje vyšší výsledky než metoda ALEX. Při srovnání kvantitativních metod pomocí korelační analýzy bylo u většiny alergenů dosaženo statisticky významné korelace. V některých případech hodnoty korelačních koeficientů výrazně přesáhly 0,9; což ukazuje na výbornou shodu mezi metodami. I korelační analýza je ovlivněna faktem, že ISAC poskytuje ve vysokých hladinách IgE odlišné výsledky.

Závěrem je možno říci, že obě metody se principiálně shodují a je možno je vzájemně zaměnit s výhradou. U vysokých koncentrací specifických IgE lze očekávat odlišné výsledky, kdy metoda ISAC poskytuje výrazně vyšší hodnoty než metoda ALEX.

11 POUŽITÉ ZKRATKY

AB	Astma bronchiale
AD	Atopická dermatitida
ALEX	Multiplexová metoda Allergy Explorer
Anti-CCD protilátky	Protilátky proti reaktivním determinantám sacharidů
AR	Atopická rhinitida
ARIA	Allergic Rhinitis and its Impact on Astma
BAT	Test aktivace bazofilů
Ca ²⁺	Vápenatý kationt
CCD	Cross-reactive carbohydrate determinants - reaktivní determinanty sacharidů
CD193+	Molekula CCR3, chemokinový receptor exprimovaný na klidových lidských bazofilech a eosinofilech
CD123+	Podjednotka IL-3 receptoru, exprimován na bazofilech a plazmacytoidních dendritických buňkách
CD203c	Transmembránový glykosylovaný protein typu II exprimovaný na populaci bazofilů a mastocytů
CRD	Component-resolved in vitro diagnosis
DF	Stupně volnosti
E1	Epididymální sekretorický protein E1
ECP	Eosinofilní kationický protein
EDTA	Organická sloučenina kyseliny ethylendiamintetraoctové a její soli
FcεRI	Vysokoafinitní IgE receptor
FENO	Měření oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu
GALEN	European Asthma & Allergy Network
GINA	Globální iniciativy pro astma

HLA-DR+	Buněčný povrchový receptor MHC II. třídy
IDT	Intradermální test
IgA	Imunoglobulin třídy A
IgE	Imunoglobulin typu E
IgG (1,4)	Imunoglobulin třídy G
ISU-E	ISAC Standardized Units for specific IgE - standardizované jednotky pro specifické IgE stanovené metodou ISAC
protilátky	
<i>In vivo</i>	V živém
<i>In vitro</i>	Ve zkumavce
IUIS	International Union of Immunological Societies – Mezinárodní unie imunologických společností
ISAC	Multiplexová metoda Immuno Solid-phase Allergen Chip
kU _A /L	Kilojednotky alergen specifického IgE na litr
MD-2 related lipid recognition (ML)	Myeloid differentiation factor 2
MADx	MacroArray Diagnostics
max	Maximum
min	Minimum
nMUXF3	Marker glykoproteinu pro CCD reaktivitu
PAF	Destičková aktivační faktor
PGD2	Prostaglandin D2
Post mortem	Po smrti
PPT	Prick to prick
PR-10	Pathogenesis-related protein 10 - protein 10 spojený s patogenezí
RAST	Radioalergosorbentní test
SCORAD index	Scoring Index of Atopic Dermatitis - index k hodnocení závažnosti atopické dermatitidy
SD	Směrodatná odchylka

sIgE	Sérové alergen specifické IgE
SPT	Kožní prick testy
tIgE	Celkové IgE
USA	United States of America - Spojené státy americké
UK	United Kingdom – Velká Británie
WAO	World Allergy Organization

12 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Charakteristika souboru 100 pacientů s atopickou dermatitidou	39
Tabulka 2: Semikvantitativní třídy ISAC (Phadia, 2009).....	42
Tabulka 3: Semikvantitativní hodnocení hladiny specifického IgE ÚKIA FNHK	45
Tabulka 4: Charakteristika souboru pacientů	46
Tabulka 5: Základní statistika (ALEX)	47
Tabulka 6: Základní statistika (ISAC)	48
Tabulka 7: Kontingenční tabulka pro Alt a 1	49
Tabulka 8: Chí-kvadrát test pro Alt a 1	49
Tabulka 9: Chí-kvadrát test – plísňe (třídy).....	49
Tabulka 10: Chí-kvadrát test – roztoči a Rus domácí (třídy).....	50
Tabulka 11: Chí-kvadrát test – zvířata (třídy)	51
Tabulka 12: Četnost pozitivních a negativních výsledků (ALEX a ISAC) pro Mus m 1	52
Tabulka 13: Chí-kvadrát test Mus m 1	52
Tabulka 14: Chí-kvadrát test – plísňe (poz., neg.).....	52
Tabulka 15: Zastoupení výsledků alergenů plísňí (ALEX a ISAC).....	52
Tabulka 16: Chí-kvadrát test – roztoči a Rus domácí (poz., neg.).....	53
Tabulka 17: Zastoupení výsledků alergenů roztočů a Rusa domácího (ALEX a ISAC)	53
Tabulka 18: Chí-kvadrát test – zvířata (poz.,neg.)	54
Tabulka 19: Zastoupení výsledků alergenů zvířat (ALEX a ISAC)	54
Tabulka 20: Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů plísňí (ALEX a ISAC) ...	55
Tabulka 21: Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů roztočů a Rusa domácího (ALEX a ISAC).....	56
Tabulka 22: Spearmanův test korelačního koeficientu alergenů zvířat (ALEX a ISAC) ...	58

13 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Nejčastější místa výskytu atopického ekzému u dětí a dospělých (Colleyville Dermatology, c2023)	16
Obrázek 2: Zkřížená reaktivita "cat-pork syndrome" (Alliance, c2023)	24
Obrázek 3: Metoda ISAC (London Allergy and Immunology Centre, c2023)	41
Obrázek 4: Metoda ALEX (Palliance, c2023)	44
Obrázek 5: ALEX cartridge s panelem alergenů (ALPCO, c2023)	44

14 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Korelace alergenu Alt a 1	56
Graf 2: Korelace alergenu Bla g 1.....	57
Graf 3: Korelace alergenu Der f 1	58
Graf 4: Korelace alergenu Can f 1	59

15 POUŽITÁ LITERATURA

ABERER, W., F. HOLZWEBER a W. HEMMER et al., 2017. Inhibition of cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) enhances the selectivity of in vitro allergy diagnosis. *Allergologie select* [online]. Germany: Dustri Verlag, **1**(2), 141-149 [cit. 2023-03-01]. ISSN 2512-8957. Dostupné z: doi:10.5414/ALX01638E

AHN, Kangmo, 2014. The Usefulness of Component-Resolved Diagnostics in Food Allergy. *Allergy, Asthma & Immunology Research* [online]. Seoul: The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology and The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease, **6**(2), 103-104 [cit. 2023-03-01]. ISSN 2092-7355. Dostupné z: doi:10.4168/air.2014.6.2.103

ALDAKHEEL, Fahad M., 2021. Allergic Diseases: A Comprehensive Review on Risk Factors, Immunological Mechanisms, Link with COVID-19, Potential Treatments, and Role of Allergen Bioinformatics. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. Basel: Molecular Diversity Preservation International, **18**(22), 1-29 [cit. 2023-02-22]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph182212105

ALLIANCE, c2023. Cross-reactivities of cat and dog allergens. In: *Alliance: Advancing together in Allergy Care* [online]. London: Alliance [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: <https://allianceallergy.com/component-resolved-diagnostics-for-allergic-disease/cat-and-dog-allergies/>

ALPCO, c2023. Multiplex Allergy. In: *Alpco* [online]. United States: Alpco [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: <https://www.alpco.com/platforms/multiplex-allergy-instrumentation>

ANSOTEGUI, Ignacio J., Giovanni MELIOLI, Giorgio Walter CANONICA et al., 2020. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organization Journal* [online]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **13**(2), 1-50 [cit. 2023-03-01]. ISSN 19394551. Dostupné z: doi:10.1016/j.waojou.2019.100080

BOJCUKOVA, Jana, Tomas VLAS, Peter FORSTENLECHNER et al., 2019. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clinical and Translational Allergy* [online]. London: BioMed Central, **9**(1), 1-6 [cit. 2023-04-05]. ISSN 2045-7022. Dostupné z: doi:10.1186/s13601-019-0270-y

BUZZULINI, Francesca, Mirella DA RE, Enrico SCALA et al., 2019. Evaluation of a new multiplex assay for allergy diagnosis. *Clinica Chimica Acta* [online]. New York: Elsevier, **493**, 73-78 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2019.02.025

COLLEYVILLE DERMATOLOGY, c2023. Eczema. In: *Colleyville Dermatology* [online]. Texas: Colleyville Dermatology [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: <https://www.colleyvilledermatology.com/dermatology-services/medical-dermatology/eczema-atopic-dermatitis/>

DAI, Y.-S., 2007. Allergens in Atopic Dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* [online]. New Jersey: Springer Nature, **33**(3), 157-166 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1080-0549. Dostupné z: doi:10.1007/s12016-007-0042-7

FISCHER, Christian, c2023a. Fel d 1. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2020 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/allergen-component.html?key=e94>

FISCHER, Christian, c2023b. House dust mite. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2020 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=d1>

GOIKOETXEA, M.J., M.L. SANZ a B.E. GARCÍA et al., 2013. Recommendations for the use of in vitro methods to detect specific immunoglobulin E: are they comparable?. *Journal of Investigational Allergology and*

Clinical Immunology [online]. Barcelona: Esmon Publicidad, **23**(7), 448-454 [cit. 2023-02-28]. ISSN 1698-0808. PMID:24654308. Dostupné z: <https://www.jiaci.org/issues/vol23issue7/1.pdf>

HAMILTON, Robert G. a John OPPENHEIMER, 2015. Serological IgE Analyses in the Diagnostic Algorithm for Allergic Disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* [online]. United States: Elsevier, **3**(6), 833-840 [cit. 2023-03-06]. ISSN 2213-2198. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaip.2015.08.016

HANIFIN, Jon M. a Georg RAJKA, 1980. Diagnostic Features of Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovener* [online]. Stockholm, **92**, 44-47 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: https://www.medicaljournals.se/acta/content_files/files/pdf/60/92/924447.pdf

HAWARDEN, D., 2014. Guideline for Diagnostic Testing in Allergy - Update 2014. *Current Allergy & Clinical Immunology* [online]. Cape Town: Allergy Society of South Africa, 2014, **27**(3), 1-6 [cit. 2023-02-028]. Dostupné z: <https://journals.co.za/doi/pdf/10.10520/EJC157476>

HEFFLER, Enrico, Francesca PUGGIONI a Silvia PEVERI et al., 2018. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organization Journal* [online]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **11**(7), 1-8 [cit. 2023-04-22]. ISSN 19394551. Dostupné z: doi:10.1186/s40413-018-0186-3

HONZOVÁ, Stanislava, 2009. Možnosti laboratorní diagnostiky alergie. *Interní medicína pro praxi* [online]. Praha: Solen, **11**(4), 168-170 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimediceina.cz/pdfs/int/2009/04/05.pdf>

CHAN, Sanny K. a Donald Y. M. LEUNG, 2018. Dog and Cat Allergies: Current State of Diagnostic Approaches and Challenges. *Allergy, asthma & immunology research* [online]. Seoul: Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology, **10**(2), 97-105 [cit. 2023-03-02]. ISSN 2092-7355. Dostupné z: doi:10.4168/aaair.2018.10.2.97

CHANG, MAN-LI, CAN CUI, YAN-HONG LIU, LI-CHUN PEI et al., 2015. Analysis of total immunoglobulin E and specific immunoglobulin E of 3,721 patients with allergic disease. *Biomedical Reports* [online]. London: Spandidos Publications, **3**(4), 573-577 [cit. 2023-02-28]. ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2015.455

IMD LABOR BERLIN, c2023. ImmunoCAP® ISAC IgE Allergy Profile. In: *IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR* [online]. Berlin: IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: https://www.imd-berlin.de/fileadmin/user_upload/Diag_Info_Englisch/311_ImmunoCAP_ISAC_IgE_Allergiprofil.pdf

JEONG, Kyoung Yong, Chein-Soo HONG a Tai-Soon YONG, 2006. Allergenic tropomyosins and their cross-reactivities. *Protein & Peptide Letters* [online]. United Arab Emirates: Bentham Science Publishers, **13**(8), 835-845 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1875-5305. Dostupné z: doi:10.2174/092986606777841244

KAPUR, Sandeep, Wade WATSON a Stuart CARR, 2018. Atopic dermatitis. *Allergy, asthma, and clinical immunology:: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* [online]. Ontario: BC Decker, **14**(2), 52 [cit. 2022-12-14]. ISSN 1710-1492. Dostupné z: doi:10.1186/s13223-018-0281-6

KLEINE-TEBBE, Jörg a Thilo JAKOB, 2015. Molecular allergy diagnostics using IgE singleplex determinations: methodological and practical considerations for use in clinical routine. *Allergo Journal International* [online]. Berlin: Springer Medizin, **24**(6), 185-197 [cit. 2023-02-28]. ISSN 2197-0378. Dostupné z: doi:10.1007/s40629-015-0067-z

KONIECZNY, A., J. P. MORGENSTERN, C. B. BIZINKAUSKAS et al., 2003. The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms. *Immunology* [online]. Oxford: Blackwell Science, **92**(4), 577-586 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1365-2567. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00386.x

KUEHN, Annette a Christiane HILGER, 2015. Animal allergens: Common protein characteristics featuring their allergenicity. *Frontiers in Immunology* [online]. Luxembourg: Frontiers Media, **6**(40), 1-2 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00040

LITZMAN, Jiří, 2007. Základy alergologického vyšetření. In: LITZMAN, Jiří, Vlastimil KRÁL, Tomáš FREIBERGER et al. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. 1. Brno: Masarykova univerzita, s. 45-49. ISBN 978-80-210-4227-8.

LOCHMAN, Ivo, Alena KLOUDOVÁ a Vítěslav NOVÁK, 2003. Stanovení specifického IgE - volba metody. *Alergie* [online]. Praha: Tigis, (1), 1-9 [cit. 2023-05-05]. ISSN 1212-3536. Dostupné z: <https://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2003/01/02lochm.pdf>

LOCHMAN, Ivo, František KOPŘIVA, Evžen WEIGL et al., 2005. Laboratorní diagnostika alergií. *Alergie* [online]. Praha: Tigis, (1), 51-56 [cit. 2023-03-06]. ISSN 1212-3536. Dostupné z: https://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2005/01/08_lochman_alergie_1-05.pdf

LONDON ALLERGY AND IMMUNOLOGY CENTRE, c2023. ISAC Allergy Test. In: *London Allergy and Immunology Centre* [online]. London: London Allergy and Immunology Centre [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://www.ukallergy.com/isac/>

MATRICARDI, P. M., J. KLEINE-TEBBE, H. J. HOFFMANN et al., 2016. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology* [online]. Copenhagen: John Wiley, **27**(23), 1-38 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0905-6157. Dostupné z: doi:10.1111/pai.12563

MÚNERA, Marlon, Andres SANCHEZ, Jorge SÁNCHEZ et al., 2019. Allergy to Mus m 1: Allergy to Mus m 1: A review of structural, and immunological features. *Immunology Letters* [online]. Amsterdam: Elsevier Science, **209**, 1-3 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0165-2478. Dostupné z: doi:10.1016/j.imlet.2019.03.012

NERELIUS, Charlotte, Mats ANDERSSON a L. SØGAARD et al., 2020. Comparative study of Allergy Explorer (ALEX) versus ImmunoCAP platforms. *Russian Journal of Allergy* [online]. Russia: Russian Journal of Allergy, **17**(1), 66-84 [cit. 2023-04-22]. ISSN 2686-682X. Dostupné z: doi:10.36691/RAJ.2.020.17.1.007

NKURUNUNGI, Gyaviira, Harriet MPAIRWE, Serge A. VERSTEEG et al., 2021. Cross-reactive carbohydrate determinant-specific IgE obscures true atopy and exhibits α -1,3-fucose epitope-specific inverse associations with asthma. *Allergy* [online]. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, John Wiley, **76**(1), 233-246 [cit. 2023-02-25]. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.14469

NOWICKI, Roman, Magdalena TRZECIAK, Katarzyna WOŹNIAK et al., 2020. Atopic dermatitis: Interdisciplinary diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society, Polish Society of Allergology, Polish Pediatric Society and Polish Society of Family Medicine. Part I. Prophylaxis, topical treatment and phototherapy. *Advances in Dermatology and Allergology* [online]. Poznań: Termedia Publishing House, **37**(1), 1-10 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1642-395X. Dostupné z: doi:10.5114/ada.2020.93423

ORANJE, A.P., E.J. GLAZENBURG, A. WOLKERSTORFER et al., 2007. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *British Journal of Dermatology* [online]. Oxford: Blackwell, **157**(4), 645-648 [cit. 2023-02-25]. ISSN 0007-0963. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08112.x

PALLIANCE, c2023. Image Xplorer – ALEX² Allergy Desktop Analyzer. In: *Palliance* [online]. Norway: Palliance [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://palliance.eu/product/image-xplorer-alex2-allergy-desktop-analyzer/>

PEVERI, S., S. PATTINI, M.T. COSTANTINO et al., 2019. Molecular diagnostics improves diagnosis and treatment of respiratory allergy and food allergy with economic optimization and cost saving. *Allergologia et Immunopathologia* [online]. Madrid: Gráficas Orbe, **47**(1), 64-72 [cit. 2023-03-01]. ISSN 0301-0546. Dostupné z: doi:10.1016/j.aller.2018.05.008

PHADIA, 2019. *Directions for Use: ImmunoCAP ISAC® Assay Kit IgE, ImmunoCAP ISAC® Starter Kit IgE*. Uppsala, Sweden: Phadia, 14 s.

POMÉS, Anna, Janet M. DAVIES, Gabriele GADERMAIER et al., 2018. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Molecular Immunology* [online]. Oxford: Elsevier, **100**, 3-13 [cit. 2023-02-23]. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2018.03.003

QUIRCE, S. a G. SALCEDO, 2010. The role of cross-reactive carbohydrate determinants in the diagnosis of occupational allergy. *Clinical & Experimental Allergy* [online]. Oxford: Blackwell, **40**(7), 962-964 [cit. 2023-03-01]. ISSN 0954-7894. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03537.x

RIABOVA, Ksenja, Antonina V. KARSONOVA, Marianne VAN HAGE et al., 2022. Molecular Allergen-Specific IgE Recognition Profiles and Cumulative Specific IgE Levels Associated with Phenotypes of Cat Allergy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. Switzerland: Molecular Diversity Preservation International, **23**(13), 1-13 [cit. 2023-03-03]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23136984

RUBYDUKE COMMUNICATIONS, c2023a. D71 Lepidoglyphus destructor. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2022 [cit. 2023-03-04]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=d71>

RUBYDUKE COMMUNICATIONS, c2023b. E5 Dog dander. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2020 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=e5>

RUBYDUKE COMMUNICATIONS, c2023c. E88 Mouse epithelium, serum proteins and urine proteins. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2021 [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=e88>

RUBYDUKE COMMUNICATIONS, c2023d. I6 Cockroach, German. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2021 [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=i6>

SANTOS, Alexandra F., Oral ALPAN a Hans-Jürgen HOFFMANN, 2021. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy* [online]. Malden: Blackwell Pub on behalf of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, **76**(8), 2420-2432 [cit. 2023-03-06]. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.14747

SCALA, Enrico, Elisabetta CAPRINI a Damiano ABENI et al., 2021. A qualitative and quantitative comparison of IgE antibody profiles with two multiplex platforms for component-resolved diagnostics in allergic patients. *Clinical & experimental allergy* [online]. Oxford: Blackwell Science, **51**(12), 1603-1612 [cit. 2023-04-22]. ISSN 0954-7894. Dostupné z: doi:10.1111/cea.14016

SEBEROVÁ, Ester, Claus BACHERT, Wytke J. FOKKENS et al., 2020. ARIA 2019: Doporučení péče o pacienty s alergickou rýmou v České republice. *ALERGIE Supplementum* [online]. Praha: Tigris, **2020**(1), 5-18 [cit. 2023-02-25]. ISSN 1212-8740. Dostupné z: <https://www.csaki.cz/dokumenty/ARIA2019.pdf>

SHELDON, Joanna, Rachel D. WHEELER a Pamela G. RICHES, 2014. Immunology for clinical biochemists. In: MARSHALL, William J., Marta LAPSLEY a Adrew P. DAY. *Clinical Biochemistry Metabolic and Clinical Aspects* [online]. 3. New York: Churchill Livingstone/Elsevier, s. 560-603 [cit. 2023-02-23]. ISBN 978-0-7020-5478-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-5140-1.00030-4

STALDER, J. F., A. TAÏEB, D. J. ATHERTON et al., c1993. Severity scoring of atopic dermatitis: The SCORAD index (Consensus report of the european task force on atopic dermatitis). *Dermatology* [online]. Basel: Karger Publishers, **186**(1), 23-31 [cit. 2023-02-25]. ISSN 1421-9832. Dostupné z: doi:10.1159/000247298

TEŘL, Milan, Petr ČÁP, Renata DVOŘÁKOVÁ et. al., 2015. *Doporučený postup diagnostiky a léčby bronchiálního astmatu*. 1. Semily: GEUM, 60 s. ISBN 978-80-87969-08-3.

THE DOCTORS LABORATORY, c2023. ALEX² Allergy Test. In: *The Doctors Laboratory* [online]. London: The Doctors Laboratory [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://www.tdlpathology.com/media/17457/example-of-alex-allergy-test-result.pdf>

THOMSEN, Simon F, 2015. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *European Clinical Respiratory Journal* [online]. Copenhagen: Co-Action Publishing, **2**(1), 1-6 [cit. 2023-04-22]. ISSN 2001-8525. Dostupné z: doi:10.3402/ecrj.v2.24642

TURACCOZ HEALTHCARE SOLUTIONS, c2023a. D2 American house dust mite. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2021 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=d2>

TURACCOZ HEALTHCARE SOLUTIONS, c2023b. D201 Blomia tropicalis. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2021 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=d201>

TURACCOZ HEALTHCARE SOLUTIONS, c2023c. D202 Der p 1. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2020 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/allergen-component.html?key=d202>

TURACCOZ HEALTHCARE SOLUTIONS, c2023d. D203 Der p 2. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2020 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/allergen-component.html?key=d203>

TURACCOZ HEALTHCARE SOLUTIONS, c2023e. D205 Der p 10. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2020 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/allergen-component.html?key=d205>

TURACCOZ HEALTHCARE SOLUTIONS, c2023f. E227 Equ c1, Horse dander. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2021 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/allergen-component.html?key=e227>

TURACCOZ HEALTHCARE SOLUTIONS, c2023g. M6 Alternaria alternata. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2021 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=m6>

VAŇKOVÁ, Radka, 2021. *Analýza senzibilizace na molekulární komponenty stanovené multiplexním systémem ImmunoCAP ISAC u pacientů s atopickou dermatitidou* [online]. Hradec Králové [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/152328>. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové.

VERNEROVÁ, Eva, 2012. Alergie a astma, současný stav poznání a léčby. *Interní medicína pro praxi* [online]. Solen, **14**(2), 55-58 [cit. 2023-02-23]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedcina.cz/pdfs/int/2012/02/03.pdf>

VICTOR, Susanne, Erik LAMPA, Anna RASK ANDERSEN et al., c2022. Measurement of Horse Allergens Equ c 1 and Equ c 2: A Comparison among Breeds. *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. Basel: Karger Publishers, **183**(11), 1166-1177 [cit. 2023-03-03]. ISSN 1018-2438. Dostupné z: doi:10.1159/000525960

VIRTANEN, Tuomas, 2001. Lipocalin allergens. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. Wiley, **56**(67), 48-51 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1398-9995. Dostupné z: doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00915.x

VITTE, Joana, c2023a. M229 Alt a 1. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2022 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/allergen-component.html?key=m229>

VITTE, Joana, c2023b. M3 Aspergillus fumigatus. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2021 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/hcp/cz/en/resource-center/allergen-encyclopedia/whole-allergens.html?key=m3>

VYDLÁKOVÁ, Jana, 2010. Inhalační alergeny a spouštěče alergických onemocnění. *Interní medicína pro praxi* [online]. Praha: Solen, **12**(2), 101-103 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1212-7299. Dostupné z: [https://www.solen.cz/artkey/int-201002-0010>Inhalacni alergeny a spoustece alergickykh onemocneni.php](https://www.solen.cz/artkey/int-201002-0010>Inhalacni%20alergeny%20a%20spoustece%20alergickykh%20onemocneni.php)

WEIDINGER, Stephan, Lisa A. BECK, Thomas BIEBER et al., 2018. Atopic dermatitis. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. London: Nature Publishing Group, **4**(1), 1-20 [cit. 2023-02-23]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/s41572-018-0001-z

WOODFOLK, Judith A., Scott P. COMMINS, Alexander J. SCHUYLER et al., 2015. Allergens, sources, particles, and molecules: Why do we make IgE responses?. *Allergology International* [online]. Oxford: Blackwell Pub, **64**(4), 295-303 [cit. 2023-02-04]. ISSN 13238930. Dostupné z: doi:10.1016/j.alit.2015.06.001

WONG, Lydia, Chiung Hui HUANG a Bee Wah LEE, 2016. Shellfish and House Dust Mite Allergies: Is the Link Tropomyosin?. *Allergy, asthma & immunology research* [online]. Seoul: Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology, **8**(2), 101-106 [cit. 2023-05-05]. ISSN 2092-7355. Dostupné z: doi:10.4168/aair.2016.8.2.101

YU, Wong, Deborah M. Hussey FREELAND a Kari C. NADEAU, 2016. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* [online]. England: Nature Pub Group, **16**(12), 751-765 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri.2016.111

16 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Seznam druhově specifických a zkřížených alergenových komponent na biočipu ISAC

Příloha 2: Seznam alergenových komponent na biočipu ALEX

**Příloha 1: Seznam druhově specifických a zkřížených alergenních komponent na biočipu ISAC
(Upraveno dle IMD Labor Berlin, c2023)**

Molekulární komponenta	Zdroj alergenu	Latinský název	Proteinová skupina
Potravinové alergeny – druhově specifické			
nGal d 1	Vaječný bílek	<i>Gallus domesticus</i>	Ovomukoid
nGal d 2		<i>Gallus domesticus</i>	Ovalbumin
nGal d 3		<i>Gallus domesticus</i>	Konalbumin/Ovotransferin
nGal d 5	Vaječný žloutek/ kuřecí maso	<i>Gallus domesticus</i>	Livetin/sérový albumin
nBos d 4	Kravské mléko	<i>Bos domesticus</i>	Alfa-laktalbumin
nBos d 5		<i>Bos domesticus</i>	Beta-laktoglobulin
nBos d 8		<i>Bos domesticus</i>	Kasein
nBos d lactoferin		<i>Bos domesticus</i>	Transferrin
rGad c 1	Treska	<i>Gadus callarias</i>	Parvalbumin
nPen m 2		<i>Penaeus monodon</i>	Arginin kináza
nPen m 4		<i>Penaeus monodon</i>	Vazebný protein na sarkoplazmatický vápník
rAna o 2	Kešu	<i>Anacardium occidentale</i>	Zásobní protein, 11S globulin
rBer e 1	Para ořech	<i>Bertholletia excelsa</i>	Zásobní protein, 2S albumin
nCor a 9	Lískový ořech	<i>Corylus avellana</i>	Zásobní protein, 11S globulin
rJug r 1	Vlašský ořech	<i>Juglans regia</i>	Zásobní protein, 2S albumin
nJug r 2		<i>Juglans regia</i>	Zásobní protein, 7S globulin
rSes i 1	Sezamové semínko	<i>Sesamum indicum</i>	Zásobní protein, 2S albumin
rAra h 1	Arašíd	<i>Arachis hypogaea</i>	Zásobní protein ,7S globulin
rAra h 2		<i>Arachis hypogaea</i>	Zásobní protein, konglutin
rAra h 3		<i>Arachis hypogaea</i>	Zásobní protein, 11S globulin
nAra h 6		<i>Arachis hypogaea</i>	Zásobní protein, konglutin
nGly m 5	Sója	<i>Glycine max</i>	Zásobní protein, beta-konglycinin
nGly m 6		<i>Glycine max</i>	Zásobní protein, glycinin
nFag e 2	Pohanka	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Zásobní protein, 2S albumin
rTri a 14	Pšenice	<i>Triticum aestivum</i>	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)
rTri a 19.0101		<i>Triticum aestivum</i>	Omega-5-gliadin
nTri a aA_TI		<i>Triticum aestivum</i>	Inhibitor alfa-amylázy/trypsinu
nAct d 1	Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	Cysteinová proteáza
nAct d 5		<i>Actinidia deliciosa</i>	Kiwelin
Potravinové alergeny – zkříženě reagující			
nPem m1	Kreveta	<i>Penaeus monodon</i>	Tropomyosin
rApi g 1	Celer	<i>Apium graveolens</i>	PR-10 protein
rMal d 1	Jablko	<i>Malus domestica</i>	PR-10 protein
rPru p 1	Broskev	<i>Prunus persica</i>	PR-10 protein
rPru p 3		<i>Prunus persica</i>	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)
nBos d 6	Kravské mléko/maso	<i>Bos domesticus</i>	Sérový albumin
rGly m 4	Sója	<i>Glycine max</i>	PR-10 protein

Molekulární komponenta	Zdroj alergenu	Latinský název	Proteinová skupina
nAct d 2	Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	Thaumatococin-like protein
rAct d 8	Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	PR-10 protein
Inhalační komponenty pylu trav, pylu stromů a pylu plevele – převážně druhově specifické			
nCyn d 1	Troskut prtnatý	<i>Cynodon dactylon</i>	Beta-expansin,
rPhl p 1	Bojínek luční	<i>Phleum pratense</i>	Beta-expansin
rPhl p 2		<i>Phleum pratense</i>	Expansin
nPhl p 4		<i>Phleum pratense</i>	Berberine-bridge enzym,
rPhl p 5		<i>Phleum pratense</i>	Trávy třídy 5
rPhl p 6		<i>Phleum pratense</i>	Trávy třídy 6
rPhl p 11		<i>Phleum pratense</i>	Ole e 1-příbuzný protein
nCry j 1	Cedr japonský	<i>Cryptomeria japonica</i>	Pektát lyáza
nCup a 1	Cypřiš	<i>Cupressus arizonica</i>	Pektát lyáza, CCD
rOle e 1	Bojínek luční	<i>Olea europaea</i>	Olivovník evropský, skupina 1
rOle e 9	Olivovník	<i>Olea europaea</i>	Beta-1,3-glukanáza
rPla a 1	Platan	<i>Platanus acerifolia</i>	Putative invertase inhibitor
nPla a 2		<i>Platanus acerifolia</i>	Polygalakturonáza, CCD
nAmb a 1	Ambrozie	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Pektát lyáza
nArt v 1	Pelyněk černobýl	<i>Artemisia vulgaris</i>	Defensin
rChe a 1	Merlík bílý	<i>Chenopodium album</i>	Ole e 1-příbuzný protein
rPar j 2	Drnavec palestinský	<i>Parietaria judaica</i>	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)
rPla l 1	Jitrocel kopinatý	<i>Plantago lanceolata</i>	Ole e 1-příbuzný protein
nSal k 1	Slanobýl draselný	<i>Salsola kali</i>	Pektin methylesteráza
Inhalační komponenty pylu trav, pylu stromů a pylu plevele – zkřížené reagující			
rPhl p 7	Bojínek luční	<i>Phleum pratense</i>	Polkalcin
rPhl p 12		<i>Phleum pratense</i>	Profilin
rAln g 1	Olše	<i>Alnus glutinosa</i>	PR-10 protein
rBet v 1	Břiza	<i>Betula verrucosa</i>	PR-10 protein
rBet v 2		<i>Betula verrucosa</i>	Profilin
rBet v 4		<i>Betula verrucosa</i>	Polkalcin
rCor a 1.0101	Pyl lísky	<i>Corylus avellana</i>	PR-10 protein
rCor a 1.0401		<i>Corylus avellana</i>	PR-10 protein
nOle e 7	Olivovník	<i>Olea europaea</i>	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)
rPla a 3	Platan	<i>Platanus acerifolia</i>	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)
nArt v 3	Pelyněk černobýl	<i>Artemisia vulgaris</i>	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)
rMer a 1	Bažanka roční	<i>Mercurialis annua</i>	Profilin
Inhalační komponenty zvířat – převážně druhově specifické			
rCan f 1	Pes	<i>Canis familiaris</i>	Lipokalin
rCan f 2		<i>Canis familiaris</i>	Lipokalin
rCan f 5		<i>Canis familiaris</i>	Arginine esteráza, prostatický kalikrein
rEqu c 1	Kůň	<i>Equus caballus</i>	Lipokalin
rFel d 1	Kočka	<i>Felis domesticus</i>	Uteroglobin
rFel d 4		<i>Felis domesticus</i>	Lipokalin

Molekulární komponenta	Zdroj alergenu	Latinský název	Proteinová skupina	
nMus m 1	Myš	<i>Mus musculus</i>	Lipokalin	
Inhalační komponenty zvířat – zkříženě reagující				
nEqu c 3	Kůň	<i>Equus caballus</i>	Sérový albumin	
nCan f 3	Pes	<i>Canis familiaris</i>	Sérový albumin	
nFel d 2	Kočka	<i>Felis domesticus</i>	Sérový albumin	
Inhalační alergeny spor plísní – převážně druhově specifické				
rAlt a 1	Alternaria	<i>Alternaria alternata</i>	Nznámý	
rAlt a 6		<i>Alternaria alternata</i>	Enoláza	
rAsp f 1	Aspergillus	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mitogilin	
rAsp f 3		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Peroxisomální protein	
rAsp f 6		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Manganová superoxid dismutáza	
rCla h 8	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	Manitol dehydrogenáza	
Inhalační komponenty roztočů a švábů – převážně druhově specifické				
rBlo t 5	Roztoči domácího prachu	<i>Blomia tropicalis</i>	Neznámý	
nDer f 1		<i>Dermatophagoides farinae</i>	Cysteinová proteáza	
rDer f 2		<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		NPC2 rodina
nDer p 1			Cysteinová proteáza	
rDer p 2			NPC2 rodina	
rLep d 2	Roztoč skladištní	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	NPC2 rodina	
rBla g 1	Šváb (Rus domácí)	<i>Blattella germanica</i>	Neznámý	
rBla g 2		<i>Blattella germanica</i>	Aspartátová proteáza	
rBla g 5		<i>Blattella germanica</i>	Glutation S-transferáza	
Inhalační komponenty roztočů a švábů – zkříženě reagující				
rDer p 10	Roztoč domácího prachu	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Tropomyosin	
nBla g 7	Šváb (Rus domácí)	<i>Blattella germanica</i>	Tropomyosin	
Další komponenty (hmyzí jed, paraziti, latex) – převážně druhově specifické				
rApi m 1	Včela medonosná (jed)	<i>Apis mellifera</i>	Fosfoliáza A2	
nApi m 4		<i>Apis mellifera</i>	Melitin	
rPol d 5	Vosík skvrnitý (jed)	<i>Polistes dominulus</i>	Antigen 5	
rVes v 5	Vosa obecná (jed)	<i>Vespula vulgaris</i>	Antigen 5	
rAni s 1	Škravka	<i>Anisakis simplex</i>	Inhibitor serinových proteáz	
rHev b 1	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	Elongační faktor	
rHev b 3	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	Small rubber particle protein	
rHev b 5	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	Acidický protein	
rHev b 6.01	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	Prohevein	
Další komponenty (hmyzí jed, paraziti, latex) – zkříženě reagující				
rAni s 3	Škravka	<i>Anisakis simplex</i>	Tropomyosin	
rHev b 8	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	Profilin	
nMUXF3	Sacharidový epitop bromelainu		CCD-marker	

Vysvětlivky: n (nativní), r (rekombinantní), CCD (zkříženě reagující cukerné determinanty)

**Příloha 2: Seznam alergenních komponent na biočipu ALEX
(Upraveno dle The doctors laboratory, c2023)**

Název	Alergen	E/M	Proteinová skupina
Pyly trav			
Troskut	Cyn d	E	
Troskut	Cyn d 1	M	Beta-Expanzin
Jílek	Lol p 1	M	Beta-Expanzin
Paspal	Pas n	E	
Bojínek	Phl p 1	M	Beta-Expanzin
	Phl p 2	M	Expanzin
	Phl p 5.0101	M	Třída trav 5/6
	Phl p 6	M	Třída trav 5/6
	Phl p 7	M	Polkalcin
Phl p 12	M	Profilin	
Rákos	Phr c	E	
Žito	Sec c_pollen	E	
Pyly stromů			
Akácie	Aca m	E	
Pajasan	Ail a	E	
Olše	Aln g 1	M	PR-10 protein
	Aln g 4	M	Polkalcin
Bříza	Bet v 1	M	PR-10 protein
	Bet v 2	M	Profilin
	Bet v 6	M	Izoflavon Reduktáza
Papírovník	Bro pa	E	
Líska	Cor a_pollen	E	
	Cor a 1.0103	M	PR-10 protein
Kryptomerie japonská	Cry j 1	M	Pektát lyáza
Cypřiš	Cup a 1	M	Pektát lyáza
	Cup s	E	
Buk	Fag s 1	M	PR-10 protein
Jasan	Fra e	E	
	Fra e 1	M	Ole e 1 příbuzný protein
Ořešák	Jug r_pollen	E	
Jalovec	Jun a	E	
Morušovník	Mor r	E	
Olivovník	Ole e 1	M	Ole e 1 příbuzný protein
	Ole e 9	M	1,3-beta- Glukanáza
Datlovník	Pho d 2	M	Profilin
Platan	Pla a 1	M	Invertáza
	Pla a 2	M	Polygalakturonáza
	Pla a 3	M	nsLTP
Topol	Pop n	E	
Jilm	Ulm c	E	
Akácie	Ama r	E	
Pyly bylin			
Ambrozie	Amb a	E	
	Amb a 1	M	Pektát lyáza
Ambrozie	Amb a 4	M	Defezin
Pelyněk	Art v	E	
	Art v 1	M	Defenzin
	Art v 3	M	nsLTP
Konopí	Can s	E	
	Can s 3	M	nsLTP
Merlík	Che a	E	
	Che a 1	M	Ole e 1 příbuzný protein
Bažanka	Mer a 1	M	Profilin
Drnavec	Par j	E	
	Par j 2	M	nsLTP
Jitrocel	Pla l	E	

Název	Alergen	E/M	Proteinová skupina
Jitrocel	Pla l 1	M	Ole e 1 příbuzný protein
Slanobýl	Sal k	E	
	Sal k 1	M	Pektin-metylesteráza
Kopřiva	Urt d	E	
Roztoči domácího prachu			
<i>Dermatophagoides farinae</i>	Der f 1	M	Cysteinová proteáza
	Der f 2	M	NPC2 rodina
<i>Dermatophagoides pteronyssus</i>	Der p 1	M	Cysteinová proteáza
	Der p 2	M	NPC2 rodina
	Der p 5	M	neznámá
	Der p 7	M	Roztoči, skupina 7
	Der p 10	M	Tropomyosin
	Der p 11	M	Myosin, těžký řetězec
	Der p 20	M	Arginin kináza
	Der p 21	M	neznámý
	Der p 23	M	Peritropin příbuzný protein
Roztoči skladů			
<i>Acarus siro</i>	Aca s	E	
<i>Blomia tropicalis</i>	Blo t 5	M	Roztoči, skupina 5
<i>Blomia tropicalis</i>	Blo t 10	M	Tropomyosin
<i>Blomia tropicalis</i>	Blo t 21	M	Neznámý
<i>Glycyphagus domesticus</i>	Gly d 2	M	NPC2 rodina
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	Lep d 2	M	NPC2 rodina
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	Tyr p	E	
Kvasinky			
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	Tyr p 2	M	NPC2 rodina
<i>Malassezia sympodialis</i>	Mala s 5	M	Neznámý
<i>Malassezia sympodialis</i>	Mala s 6	M	Cyklopilin
<i>Malassezia sympodialis</i>	Mala s 11	M	Manganová superoxid dismutáza
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sac c	E	
Plísně			
<i>Alternaria alternata</i>	Alt a 1	M	Alt a rodina
<i>Alternaria alternata</i>	Alt a 6	M	Enoláza
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asp f 1	M	Mitogilin rodina
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asp f 3	M	Peroxisomální protein
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asp f 4	M	Neznámý
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asp f 6	M	Manganová superoxid dismutáza
<i>Cladosporium herbarum</i>	Cla h	E	
<i>Cladosporium herbarum</i>	Cla h 8	M	Dehydrogenáza s krátkým řetězcem
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pen ch	E	
Luštěniny			
Arašíd	Ara h 1	M	7/8S globulin
	Ara h 2	M	2S albumin
	Ara h 3	M	11S globulin
	Ara h 6	M	2S albumin
	Ara h 8	M	PR-10 protein
	Ara h 9	M	nsLTP
	Ara h 15	M	Oleosin
Cizrna	Cic a	E	
Sója	Gly m 4	M	PR-10 protein
	Gly m 5	M	7/8S globulin
	Gly m 6	M	11S globulin
	Gly m 8	M	2S albumin
Čočka	Len c	E	
Fazole	Pha v	E	
Hrách	Pis s	E	
Oves	Ave s	E	
Merlík	Che q	E	
Pohanka	Fag e	E	
	Fag e 2	M	2S albumin
Ječmen	Hor v	E	
Lupina	Lup a	E	

Název	Alergen	E/M	Proteinová skupina
Rýže	Ory s	E	
Proso	Pan m	E	
Žito	Sec c_fLOUR	E	
Pšenice	Tri a aA_Tl	M	Inhibitor alfa-amylázy/trypsinu
	Tri a 14	M	nsLTP
	Tri a 19	M	Omega-5-gliadin
Pšenice špalda	Tri s	E	
Kukuřice	Zea m	E	
	Zea m 14	M	nsLTP
Paprika	Cap a	E	
Koření			
Kmín	Car c	E	
Oregano	Ori v	E	
Petržel	Pet c	E	
Anýz	Pim a	E	
Hořčice	Sin	E	
	Sin a 1	M	2S albumin
Ovoce			
Kiwi	Act d 1	M	Cysteinová proteáza
Kiwi	Act d 2	M	TLP
Kiwi	Act d 5	M	Kiwelin
Kiwi	Act d 10	M	nsLTP
Papája	Car p	E	
Pomeranč	Cit s	E	
Meloun	Cuc m 2	M	Profilin
Fík	Fic c	E	
Jahoda	Fra a 1+3	M	PR-10 protein+LTP
Jablko	Mal d 1	M	PR-10 protein
	Mal d 2	M	TLP
	Mal d 3	M	nsLTP
Mango	Man i	E	
Banán	Mus a	E	
Avokádo	Pers a	E	
Třešeň	Pru av	E	
	Pru p 3	M	nsLTP
Hruška	Pyr c	E	
Borůvka	Vac m	E	
Hroznové víno	Vit v 1	M	nsLTP
Zelenina			
Cibule	All c	E	
Česnek	All s	E	
Celer	Api g 1	M	PR-10 protein
	Api g 2	M	nsLTP
	Api g 6	M	nsLTP
Mrkev	Dau c	E	
	Dau c 1	M	PR-10 protein
Brambory	Sol t	E	
Rajče	Sola l	E	
	Sola l 6	M	nsLTP
Kešu	Ana o	E	
	Ana o 2	M	11S globulin
	Ana o 3	M	2S albumin
Ořechy			
Para ořech	Ber e	E	
	Ber e 1	M	2S albumin
Pekanový ořech	Car i	E	

Název	Alergen	E/M	Proteinová skupina
Lískový ořech	Cor a 1.0401	M	PR-10 protein
	Cor a 8	M	nsLTP
	Cor a 9	M	11S globulin
	Cor a 11	M	7/8S globulin
	Cor a 14	M	2S albumin
Vlašský ořech	Jug r 1	M	2S albumin
	Jug r 2	M	7/8S globulin
	Jug r 3	M	nsLTP
	Jug r 4	M	11S globulin
	Jug r 6	M	7/8S globulin
Makadamový ořech	Mac i 2S Albumin	M	2S albumin
	Mac inte	E	
Pistácie	Pis v 1	M	2S albumin
	Pis v 2	M	11S globulin subjednotka
	Pis v 3	M	7/8S Globulin
Mandle	Pru du	E	
Semena			
Dýňové semínko	Cuc p	E	
Slunečnicové semínko	Hel a	E	
Mák	Pap s	E	
	Pap s 2S Albumin	M	2S abumin
Sezam	Ses i	E	
	Ses i 1	M	2S albumin
Semena Pískavice	Tri fo	E	
Mléko			
Kravské mléko	Bos d_milk	E	
	Bos d 4	M	Alfa-laktalbumin
	Bos d 5	M	Beta-laktoglobulin
	Bos d 8	M	Kasein
Velbloudí mléko	Cam d	E	
Kozí mléko	Cap h_milk	E	
Kobylí mléko	Equ c_milk	E	
Ovčí mléko	Ovi a_milk	E	
Vajíčka			
Vaječný bílek	Gal d_white	E	
Vaječný žloutek	Gal d_yolk	E	
Vaječný bílek	Gal d 1	M	Ovomukoid
	Gal d 2	M	Ovalbumin
	Gal d 3	M	Ovotransferin
	Gal d 4	M	Lysozym C
Vaječný žloutek	Gal d 5	M	Sérový albumin
Mořské plody			
Anisakis	Ani s 1	M	Inhibitor Kunitz serinové proteázy
	Ani s 3	M	Tropomyosin
Krab	Chi spp.	E	
Sleď	Clu h	E	
	Clu h 1	M	Beta-parvalbumin
Garnát obecný	Cra c 6	M	Troponin C
Kapr	Cyp c 1	M	Beta-parvalbumin
Treska	Gad m	E	
	Gad m 2+3	M	Beta-enoláza & Aldoláza
	Gad m 1	M	Beta-parvalbumin
Humr	Hom g	E	
Krevety	Lit s	E	

Název	Alergen	E/M	Proteinová skupina
Oliheň	Lol spp.	E	
Slávka	Myt e	E	
Ústřice	Ost e	E	
Kreveta severní	Pan b	E	
Hřebenatka	Pec spp.	E	
Kreveta tygří	Pen m 1	M	Tropomyosin
	Pen m 2	M	Arginin kináza
	Pen m 3	M	Myosin, lehký řetězec
	Pen m 4	M	Vazebný protein na sarkoplazmatický vápník
Rejnok ostnatý	Raj c	E	
	Raj c Parvalbumin	M	Alfa-parvalbumin
Škeble	Rud spp.	E	
Losos	Sal s	E	
	Sal s 1	M	Beta-parvalbumin
Makrela obecná	Sco s	E	
	Sco s 1	M	Beta-parvalbumin
Tuňák	Thu a	E	
	Thu a 1	M	Beta-parvalbumin
Mečoun obecný	Xip g 1	M	Beta-parvalbumin
Maso			
Cvrček domácí	Ach d	E	
Hovězí maso	Bos d_meat	E	
	Bos d 6	M	Sérový albumin
Koňské maso	Equ c_meat	E	
Kuřecí maso	Gal d_meat	E	
Saranče stěhovavá	Loc m	E	
Krutí maso	Mel g	E	
Králičí maso	Ory_meat	E	
Jehněčí maso	Ovi a_meat	E	
Vepřové maso	Sus d_meat	E	
	Sus d 1	M	Sérový albumin
Jed blankokřídleho hmyzu a hmyz			
Moučný červ	Ten m	E	
Ohnivý mravenec (jed)	Sol spp.	E	
Včela	Api m	E	
	Api m 1	M	Fosfolipáza A2
	Api m 10	M	Ikarapin varianta 2
Vosa (Dolichovespula)	DoI spp	E	
Vosík	Pol d	E	
	Pol d 5	M	Antigen 5
Vosa	Ves v	E	
	Ves v 1	M	Fosfolipáza A1
	Ves v 5	M	Antigen 5
Rus	Bla g 1	M	Šváb, skupina 1
	Bla g 2	M	Aspartyl proteáza
	Bla g 4	M	Lipokalin
	Bla g 5	M	Glutathion S-transferáza
	Bla g 9	M	Arginine kináza
Šváb	Per a	E	
	Per a 7	M	Tropomyosin
Zvířecí alergeny			
Pes	Can f_Fd1	M	Uteroglobin
Psí moč	Can f_male urine	E	
Pes	Can f 1	M	Lipokalin

Název	Alergen	E/M	Proteinová skupina
Pes	Can f 2	M	Lipokalin
	Can f 3	M	Sérový albumin
	Can f 4	M	Lipokalin
	Can f 6	M	Lipokalin
Morče	Cav p 1	M	Lipokalin
Kočka	Fel d 1	M	Uteroglobulin
	Fel d 2	M	Sérový albumin
	Fel d 4	M	Lipokalin
	Fel d 7	M	Lipokalin
Myš domácí	Mus m 1	M	Lipokalin
Králík	Ory c 1	M	Lipokalin
	Ory c 2	M	Lipofilin
	Ory c 3	M	Uteroglobulin
Křečík džungarský	Phod s 1	M	Lipokalin
Potkan	Rat n	E	
Hovězí dobytek	Bos d 2	M	Lipokalin
Koza	Cap h epithelia	E	
Kůň	Equ c 1	M	Lipokalin
	Equ c 3	M	Sérový albumin
	Equ c 4	M	Laterin
Ovce	Ovi a epithelia	E	
Prase	Sus d epithelia	E	
Ostatní			
Latex	Hev b 1	M	Rubber elongation factor
	Hev b 3	M	Small rubber particle protein
	Hev b 5	M	Neznámý
	Hev b 6.02	M	Pro-Hevein
	Hev b 8	M	Profilin
	Hev b 11	M	třída 1 Chitináza
Fíkus	Fic b	E	
Laktoferin	Hom s LF	M	CCD
Klíšťák holubí	Arg r 1	M	Lipokalin

Vysvětlivky: E (alergenový extrakt), M (molekulární alergen), nsLTP (protein pro přenos lipidů), CCD (zkříženě reagující cukerné determinanty sacharidů)