

Alergološka dijagnostika u Klinici za kožne i spolne bolesti KBC-a Zagreb

prof. dr. sc. Višnja Milavec-Puretić, prof. dr. sc. Jasna Lipozenčić

Klinika za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Budući da s porastom životnog standarda sve više raste upotreba konzervansa i aditiva, kako u tehnološkoj, tako i u prehrambenoj industriji, te potrošnja lijekova, sve češće se javlja potreba za alergološkim testiranjima. U radu su prikazani alergološki testovi *in vivo* i *in vitro* koji se provode u Klinici za kožne i spolne bolesti KBC Zagreb. Prikazane su metode rada, indikacije za alergološka testiranja alergenima iz prehrane, inhalacijskim alergenima kao i iz svakodnevnog života

U alergologiji se primjenjuju brojni testovi zbog utvrđivanja preosjetljivosti na pojedine alergene. Ponekad je potrebno primijeniti i kombinacije testova. U Polikliničkom odjelu za imunologiju, alergologiju i profesionalne bolesti Klinike za kožne i spolne bolesti KBC Zagreb izvode se brojni alergološki testovi *in vivo* i *in vitro* u dijagnostici alergijskih i imunoloških uzrokovanih kožnih bolesti. Od testova *in vivo* koriste se sljedeći:

1. Epikutano (*patch*) testiranje standardnom serijom alergena (alergeni Imunološkog zavoda u Zagrebu) – zatvoreni, otvoreni:

- epikutano testiranje s profesionalnim alergenima uz izradu alergena iz donesenih uzoraka prema propisanim testnim koncentracijama i u adekvatnim otapalima, s frizerskim setom, sa stomatološkim setom alergena i pojedinačnim alergenima iz smjese mirisa (izrađeni u Imunološkom zavodu u Zagrebu)

2. Kombinirano skarifikacijski s epikutanim testom
3. Fototestiranje i *photopatch* test uz UV obasjavanje
4. Ubodni (*prick*) test na:

- inhalacijske alergene
- nutritivne alergene
- alergene otrova insekata (osa, pčela i stršljen)
- profesionalne alergene (priređuje Imunološki zavod Zagreb na zahtjev liječnika iz donesenog materijala s radnoga mjesta)

5. Skarifikacijski test (test zarezom) na konzervanse i aditive te lijekove:

- intrakutano testiranje purificiranim tuberkulinskim antigenom (PPD), ekstraktom trihofitina, kandidina i dr.
- 6. Testovi opterećenjem na hladnoću, led, toplinu, umor, pritisak
- 7. Konjunktivalni test
- 8. Mjerenje pH kože
- 9. Mjerenje evaporacije kože (TEWL)

Nakon alergološke obrade izdaju se mišljenja o profesionalnim bolestima kože, ocjene radne sposobnosti, ekspertize i vještačenja o profesionalnim i drugim kožnim bolestima.

Od *in vitro* testova provode se test-blastične transformacije limfocita (TBTL), indirektni test degranulacije bazofilnih granulocita (ITDBG) te CAST-ELISA (*cellular antigen stimulation test – enzyme linked immunosorbent assay*).

Alergološki testovi *in vivo*

Epikutani ili (*patch*) test izvodi se metodom krpice uz primjenu alergena standardne serije (Imunološki zavod Zagreb) ili ciljanim profesionalnim alergenima. Alergeni se primjenjuju na koži leđa u interskapularnoj regiji ili na volarnoj strani podlaktice. Alergen se u netoksičnoj i propisanoj (prema europskim standardima odre-

đenoj) koncentraciji aplicira na zdravu, prethodno očišćenu kožu (benzinom, eterom ili alkoholom). Na filter-papir dimenzija 1/1cm stavi se 0,02-0,03 g alergena u vazelinu ili drugoj podlozi – vehiklu – u slučaju profesionalnih alergena. Krpica se prekrije celofanskom oblogom 2x2 cm te sve prekrije leukoplastom 5x5 cm. Budući da se radi o IV. tipu reakcije po Coombsu i Gellu, reakcije preosjetljivosti kasnog tipa, alergen dolazi u kontakt s kožom bolesnika te se reakcija očitava nakon 24, 48 i 72 sata. Mogu se koristiti i gotove, komercijalne testne vrpce različitih proizvođača, npr. Beiersdorf, FinnChambre te Lohmann. Ovaj test je zlatni standard u dijagnostici kontaktnog alergijskog dermatitisa (SLIKE 1 i 2) te se izvodi i za sve vrste dermatitisa kao kasnog odgovora.

U nas standardna serija sadrži 26 alergena (SLIKE 3 i 4). To su alergeni iz svakodnevnog života i rada, kao npr. metali kroma, nikla, kobalta, žive te ursol, formaldehid, epoksidne smole, katrani drvenog ugljena, peruvijanski balzam, merkaptospojevi, tiuram spojevi, smjesa parabena, timerosal, primin i drugo.

Za ciljano testiranje primjenjuju se alergeni prema profesiji. Ukoliko je bolesnik na bolovanju dulje vrijeme, test nije potrebno provoditi. Najčešći alergeni su terpentini ulje, nafta, katrani kamenog ugljena, građevni materijali – cement, vapno, pijesak i željezo – te pesticidi. Alergeni se izrađuju iz uzoraka s radnog mjesta za koje se sumnja da su izvor alergije. Komercijalna proizvodnja alergena u Hrvatskoj postoji za stomatološku seriju, frizere i smjese mirisa. U europskoj ponudi postoji serija alergena za razna zanimanja. Kriteriji za očitavanje epikutnog testa prikazani su u TABlici 1, a pozitivan nalaz na SLICI 5.



Slika 1. Kontaktni alergijski dermatitis od boje za kosu (paraphenylenediamine)

Kombinirani skarifikacijski s epikutanim testom izvodi se na koži nadlaktica ili leđa u interskapularnoj regiji. Na filter-papir dimenzija 1/1cm stavi se 0,02-0,03 g alergena u vazelinu ili drugoj podlozi (profesionalni alergeni ili neki lijek) koji se aplicira na kožu ogrebnu lancetom (skarificiranu). Reakcija se očitava nakon 20-30 minuta. Potom se preko te krpice nanese celofanska obloga 2x2 cm (ili vrpca komercijalne proizvodnje) koja se prekrije leukoplastom 5x5 cm. Reakcija se očitava nakon 48 i 72 sata.

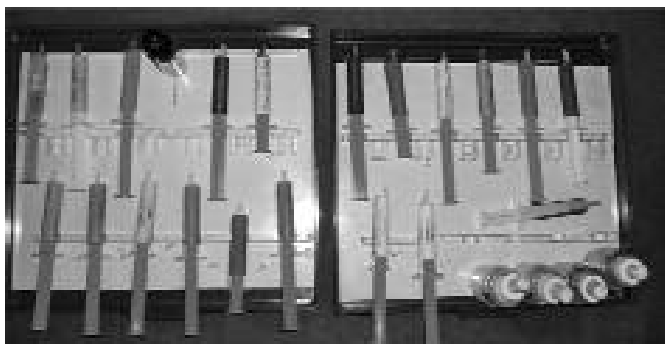
Test se izvodi u bolesnika koji imaju atopijski dermatitis, alergiju na lijek tipa različitih dermatitisa, psorijaze, kao i neke metaboličke dermatoze s pruritusom.

Photopatch test primjenjuje se za testiranje fototoksične i fotoalergijske reakcije. Testne vrpce s alergenima apliciraju se na leđa u dvije serije; nakon 24 sata se odstrane krpice s jedne serije alergena i obasjaju UVA 10 J/cm² (5-10 J/cm²). Odmah se očitava reakcija, pa nakon iduća 24 sata te 48 i 72 sata od aplikacije alergena. Druga serija alergena se na neobasjanoj strani očitava nakon 48 i 72 sata.

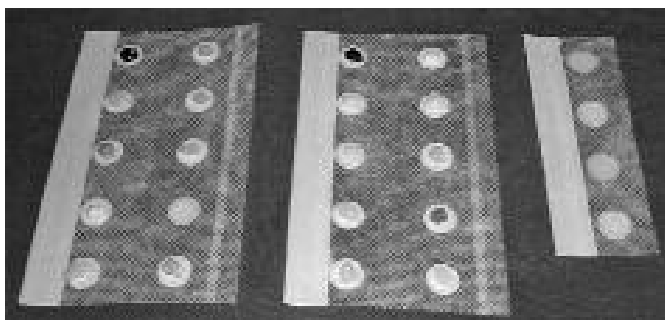
Test se izvodi u bolesnika koji su imali alergiju na otvorenim dijelovima tijela nakon izlaganja suncu, a bili su u kontaktu s nekom biljkom, odnosno kemikalijom koja reagira na UV svjetlo.



Slika 2. Akutni kontaktni alergijski dermatitis (šampon)



Slika 3. Alergeni za epikutano testiranje



Slika 4. Primjena alergena za epikutano testiranje

Metoda fototestiranja (fotoprovokacijskog testa) dokazuje alergijski odgovor na određeni lijek. Bolesnik mora popiti lijek. Nakon obasjavanja UV zrakama izaziva se fototoksična ili fotoalergijska reakcija. Budući da se osoba izloži lijeku, očitava se reakcija 1, 3 i 6 sati od uzimanja lijeka. Zatim se testno mjesto obasjava UVA 10 J/cm² (5-10 J/cm²), a očitavanje je nakon 24, 48 i 72 sata.

Testiranje je potrebno provesti nakon što bolesnik popije lijek, pa dobije reakciju i na UV svjetlo.

Ubodni (*prick*) test izvodi se alergenskim pripravcima koji su dijalizirani ekstrakti otopljeni u otapalu, a koje je mješavina 50% otopine glicerola u fosfatnom puferu uz dodatak stabilizatora. Test počinje primjenom histamina kao pozitivne kontrole, a kao negativna kontrola primjenjuje se pufer. Alergenski pripravci (npr. alergen grinje, peludi i drugo) primjenjuju se na očišćenoj koži volarne strane podlaktice u razmacima od najmanje 3-5 cm. Kroz kap alergenskog pripravka probode se koža standardiziranom lancetom vrha dužine 1 mm pod 90°. Kod ispitivanja većeg broja alergena testiranje se može izvoditi i na koži leđa. Rana reakcija se očitava nakon 20-30 minuta. U slučaju pozitivne kontrole histaminom, ona iznosi 17 minuta. Kao pozitivan rezultat kožnog testa je karakteristična urtika veća od promjera 3x3 mm uz eritem, a puferska otopina je negativna. Ukoliko se pojave urtike na pufer istog promjera kao i alergen, rezultat se interpretira kao negativan. Test se izvodi za sve rane ili promptne reakcije kao urtikarija i angioedem, te osjećaj gušenja, alergije na niz lijekova s istom kliničkom slikom, alergijskog rinitisa i konjunktivitisa, pruriga, strofulusa u djece, atopijskog dermatitisa, alergijskog vaskulitisa. Također se izvodi za pruriginozne reakcije tipa pruriga, odnosno strofulusa u djece.

Skarifikacijski (test zarezom) izvodi se na volarnoj strani podlaktice koja je prethodno očišćena alkoholom ili benzinom. Lancetom

Tablica 1. Kriteriji za očitavanje epikutanog testa

Tip kožne reakcije	Očitavanje testa
Iritativna	IR (crvenilo unutar 30 minuta)
Negativna	0 (nema reakcije na mjestu primjene alergena)
Pozitivna	+ (nezatni eritem i edem uz crvenilo) ++ (eritem, edem, pojedinačne papule i po koja vezikula) +++ (jača infiltracija, brojne papule i vezikule, vlaženje te reakcija izvan mjesta testiranja) ++++ (brojne papule i vezikule, po koja bula, erodirana površina i jako vlaženje)



Slika 5. Pozitivni alergeni – epikutani test

se površinski zagrebe linearna brazda (ne smije krvariti) dužine 1-3 cm, na koju se nanese histamin (pozitivna kontrola) i puferska otopina (negativna kontrola), a zatim pojedinačno alergeni u testnim koncentracijama.

Testom se dokazuje preosjetljivost na konzervanse, aditive, lijekove i svježe nutritivne alergene. Reakcija se očitava nakon 25-30 minuta. Pozitivnom alergijskom reakcijom smatra se urtika kod koje je poprečni dijametar veći od 3 mm (+), veći od 5mm (++) , veći od 9 mm (+++), veći od 14 mm (++++). Testiraju se svi bolesnici kojima je potreban rani alergijski odgovor, tipa urtikarije, naročito na konzervanse i aditive te lijekove.

Fizikalnim testovima najprije se ispituje dermografizam, koji može biti crven (ruber) ili bijeli (albus) pozitiviteta od + do +++. Test opterećenja na hladno (hladna voda, led), toplo (topla voda), umor („sklekovi“) i pritisak (utezima) izvodi se kod dokazivanja fizičke urtikarije. Pri testiranju opterećenja na hladno preko volarne strane podlaktice polijeva se mjesto 10 minuta (može 5 min u djece) hladnom vodom ili ledom. Kao pozitivna reakcija procjenjuje se tipična urtika na mjestu izloženom hladnoći.

Test opterećenja na toplinu izvodi se tako da se preko volarne strane podlaktice polijeva koža 10 minuta toplom vodom (42°C). Kao pozitivna reakcija očitava se tipična urtika na mjestu izloženom toplini.

Kod testa opterećenja umorom bolesniku se izaziva pojačano znojenje (sklekovi, trčanje). Pozitivna reakcija su sitne crvene urtike diseminirane po oznojenoj koži trupa i udova. Test opterećenja pritiskom izvodi se tako da se bolesniku izazove linearna urtika nakon pritiska od utega težine 5-7 kg tijekom 10 minuta (većoj djeci 3,5 kg/10 min). Na tome mjestu, u slučaju pozitivne reakcije, nastaje linearna urtika i očitava se nakon 20 minuta. Testovi se izvode u slučaju osoba koje reagiraju na hladnoću, toplinu, pritisak i umor, odnosno znoj.

Konjunktivalni test koristi se u dijagnostici medikamentne preosjetljivosti. Alergen lijeka (10%-tno razrijeđen u fiziološkoj otopini) aplicira se na konjunktivu (očnu spojnicu) jednog oka. U drugo oko ukapa se 1 kap fiziološke otopine kao negativna kontrola. Test se očitava nakon 10 minuta. Negativna reakcija je 0, pozitivna od + do +++, ovisno o jačini reakcije akutnog konjunktivitisa. Napomena: u slučaju jako pozitivne reakcije potrebno je odmah isprati oko (aqua redestilata). Test se izvodi u bolesnika koji koriste kapi za oči i na njih reagiraju s alergijskim odgovorom te u slučaju anafilaktičkih stanja na lokalne anestetike.

Mjerenje kiselosti (pH) kože provodi se pH uređajem 597 i „pH-combined“ elektrodom za aplikaciju. pH-metiranje kože provodi se za utvrđivanje kisele ili lužnate reakcije kože. Mjerenje pH kože izvodi se na dva mjesta (zdravo i oboljelo). U prostoriji mora biti konstantna temperatura. Bolesniku se ne čisti koža. Elektroda se prisloni na površinu kože i nakon što se uređaj stabilizira, očita se rezultat s displeja.

Metoda se provodi u bolesnika koji imaju dermatitis na koži ili suhu kroničnu kožu.

Mjerenje evaporacije i vlažnosti kože – TEWL (engl. *trans epidermal water loss*) – neinvazivna je pretraga kojom se utvrđuje učinkovitost zaštitne funkcije kože. Metoda ima široku primjenu kako u medicini tako i u dermatovenerologiji te kozmetologiji. Zdrava koža predstavlja svojevrsnu barijeru, tj. štiti tijelo od isušivanja i različitih mehaničkih utjecaja (fizičkih, kemijskih i bioloških podražaja). TEWL pokazatelj je količina vode koja se oslobađa kroz kožu, ali ne znojenjem. Koristi se posebice u dijagnostici atopijskog dermatitisa i drugih kožnih bolesti koje se pojavljuju ljuštenjem i suhoćom.

Postupak mjerenja TEWL-a: uređaj se uključi i čeka se 15 minuta, nakon toga može početi postupak. Slijede kompjutorsko izvođenje Tewametar „*measure*“ i start (prethodno se odabere područje na kojem će se mjeriti oslobađanje vode kroz kožu, a obično se mjere zdrava i oboljela koža radi usporedbe). Trajanje jednog mjerenja je 20 minuta.

Alergološki testovi in vitro

TBTL (Test blastične transformacije limfocita) dokazuje kasnu preosjetljivost na medikamente te kontaktne alergene. Izvodi se umjesto ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ili radioizotopne metode (RAST). Mjeri se broj specifično transformiranih limfocita (limfoblasta) tako da se u razmazima izbroje mlade stanice (morfološko vrednovanje). Pri primjeni TBTL-a optičke metode test je pozitivan ako se u razmazima iz krvi bolesnika pronađe 3% blastnih stanica više od onih iz kontrole.

ITDBG (indirektni test degranulacije bazofilnih granulocita, Shelleyev test) dokaz je rane preosjetljivosti, a izvodi se na bazofilima kunića, uz dodatak seruma bolesnika i odgovarajuće koncentracije inkriminiranog lijeka kao antigena. Test je pozitivan ako je postotak degranuliranih bazofila veći od 24% u ispitivanom serumu u odnosu na kontrolu bez antigena.

Testovi *in vitro* (TBTL i ITDBG) prema pozitivnim rezultatima godišnje (24-28%) sukladni su u bolesnika s pozitivnim anamnestičkim podacima o lijekovima.

CAST-ELISA (*cellular antigen stimulation test – enzyme linked immunosorbent assay*) metoda u KBC-u Zagreb primjenjuje se za otkrivanje alergijske reakcije ranog tipa i preko sulfidnih leukotrijena (sLT) (LTC4, LTD4, LTE4). Koriste se pročišćeni alergeni i definirani puferski sustavi.

Zaključak

Kako bi se u bolesnika potvrdile alergijske reakcije ranog ili kasnog tipa, potrebno je provoditi alergološko testiranje *in vivo* i *in vitro*. U slučaju alergijskog testa na određeni lijek potrebno je provesti barem četiri testa. U slučaju pozitivnog nalaza bolesnika se hospitalizira te se provodi ekspozicijski test na lijek, koji za sada daje najtočniji odgovor o uzročniku alergijske reakcije. U provedbi alergološkog testiranja nužna je suradnja bolesnika i liječnika te adekvatna anamneza prema kojoj se izabire odgovarajući alergološki test. **M**

LITERATURA

- Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Winkelmann RK, Burgdorf WHC, Landthaler M: *Dermatologie und Venerologie*, 5. ed. Heilderberg: Springer, 2005.
- Brnobić A, Karličić Đ. Odnos između testa blastičke transformacije limfocita u dijagnostici medikamentozne alergije. *Acta Derm lug* 1974;1:131-5.
- Catalogue 2005/2. Patch Test Products, Chemotechnique Diagnostics, 2005.
- Čvorišćec B, Turkalj M. Hitna stanja u alergologiji. Poslijediplomski tečaj I. kategorije. Zagreb, 2006;33-9.
- Fisher AA. *Contact Dermatitis*, 3rd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986.
- Freedberg TM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 6. ed. New York: McGraw Hill, 2003.
- Isaksson M, Brandao FM, Bruze M, Goossens A. Recommendation to include budesonide and tixocortol pivalate in the European standard series. *Contact Dermatitis* 2000;43:41-2.
- Lindemann M, Bohmer J, Zabel M, Grosse-Wilde H. ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(7):992-8.
- Lipozenčić J i sur. *Dermatovenerologija*. Zagreb: Naklada Zadro, 2004.
- Lipozenčić J i sur. Hitna stanja u alergologiji i kliničkoj imunologiji u dermatologiji. U: Poslijediplomski tečaj I. kategorije. Zagreb: Medicinska naklada, 2002.
- Litt JZ. *Drug Eruption Reference Manual*, millenium ed. New York: Derm, The Parthenon Publishing Group, 2006.
- Luque I, Leyva L, José Torres M, Rosal M, Mayorga C, Segura JM, Blanca M, Juárez C. *In vitro* T-cell responses to β -lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy* 2001;56:611-8.
- Milavec D, Husedžinović I. Anafilaktička reakcija kao nuspojava primjene općih anestetika i mišićnih relaksansa. *Liječ Vjesn* 2006;128:317-21.
- Milavec-Puretić V, Lipozenčić J, Muršić I, Rudolf M, Malenica B. Role of some diagnostic methods in confirming drug allergy diagnosis type I. *Allergy* 1997;52 Suppl 137:134.
- Milavec-Puretić V, Lipozenčić J, Vukšić D, Zrnić T, Bubalović D. Kožni simptomi i dijagnostika preosjetljivosti na lijekove. *Liječ Vjesn* 1994;116:83-7.
- Nyfelner B, Pichler WJ. The lymphocyte transformation test for diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 1997;27:175-81.
- Pichler W. Diagnostische Möglichkeiten bei Medikamentenallergien. *Schweiz Med Wschr* 1993;123:1182-3.
- Rietschel RL, Fowler JF, Jr. *Fisher's Contact Dermatitis*, 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995.
- Rycroft RJG, Menne T, Frosch PJ, ed. *Textbook of Contact Dermatitis*, 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1995.
- Shelley WB. New serological test for allergy in men. *Nature* 1962;195:1181-3.
- Wahlberg JE. Patch testing. U: Rycroft RJG, Menne T, Frosch PJ, Lepoittevin J-P, ur. *Textbook of Contact Dermatitis*. Berlin: Springer-Verlag, 2001;435-68.
- Warrington RJ, Tse KS. Lymphocyte transformation studies in drug hypersensitivity. *Can Med Assoc J* 1979;120:1089-94.