



Alergologické vyšetření část II.

Mgr. Julie Štíchová
MUDr. Zita Chovancová, Ph.D

ÚKIA - FNUSA

Obor: Bioanalytik, jaro 2021

Serologické testy - pokračování

ALEX (allergy explorer)

- Čipová technologie – multiplex metoda
- Stanovení až 280 alergenů v jediném kroku (čip obsahuje jak alergenové extrakty, tak vybrané rekombinantní alergeny)
- Klinik v ordinaci indikuje pacienty pro vyšetření ALEX pouze na základě klinických projevů – pacienti, kteří udávají mnohočetné alergie (inhalační, potravinové)
- Hodí se pro pacienty kde je podezření na **zkřížené alergie**
- Hladina celkového IgE nehraje při indikaci roli
- Hodnocení výsledků probíhá pomocí počítače – speciální čtečka čipů, software
- Výsledky – kUA/l, 4 semikvantitativní třídy
- Video – pracovní postup:
https://www.youtube.com/watch?v=k1ET1jLVmp4&ab_channel=DasitGroupS.p.A.



ALEX (allergy explorer)



ALEX – čipy obsahují až 280 alergenů, v průběhu inkubace pacientova séra se přidává také speciální diluent, který obsahuje **blokátor, který eliminuje vazbu anti-CCD IgE**

2. Přídavek diluentu
a 100ul pacientova séra

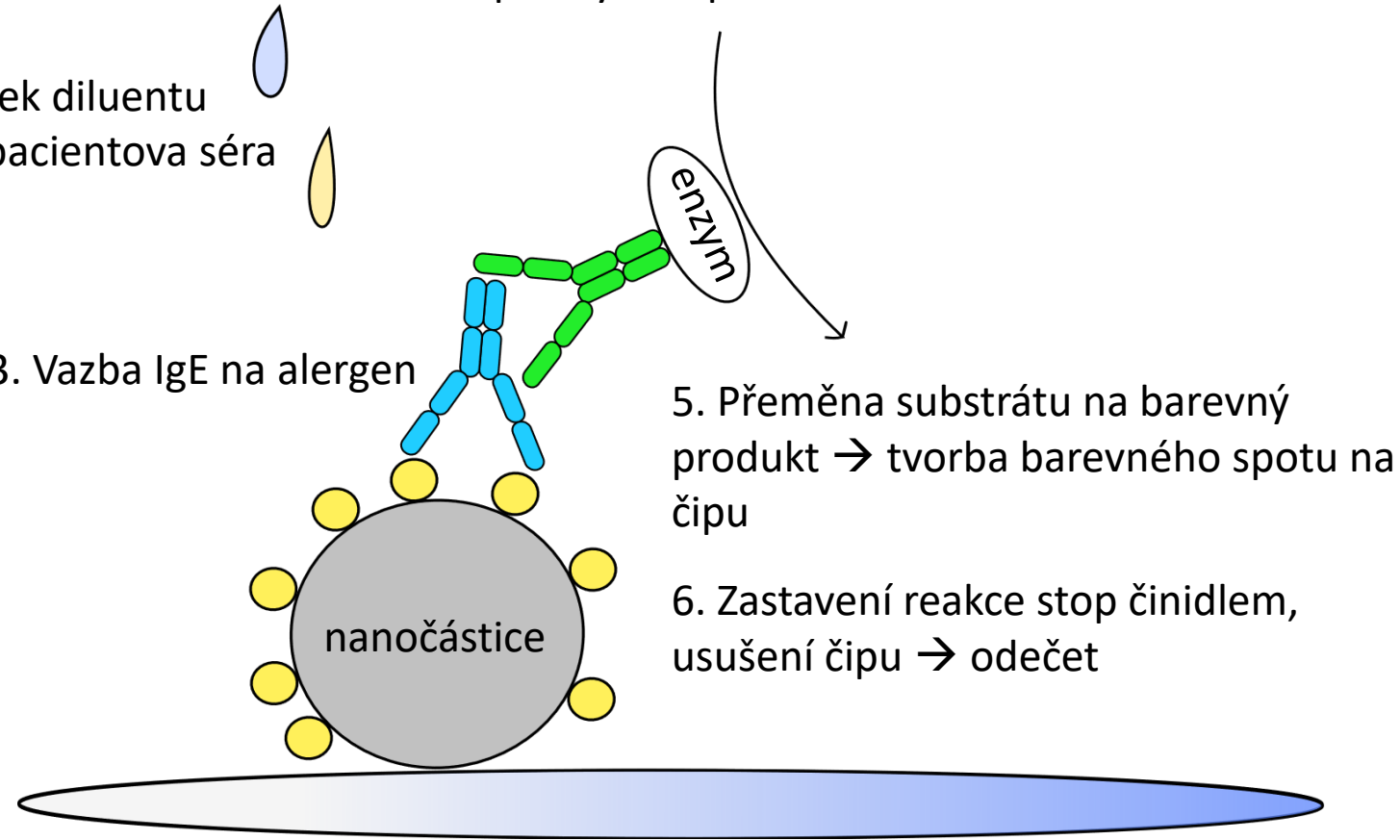
3. Vazba IgE na alergen

4. Přídavek anti-IgE značené enzymem
→ promytí → přídavek substrátu

5. Přeměna substrátu na barevný produkt → tvorba barevného spotu na čipu

6. Zastavení reakce stop činidlem, usušení čipu → odečet

1. Na čipu jsou ve formě spotu imobilizovány nanočástice potažené alergenem - je dána přesná poloha spotu na čipu pro konkrétní alergen







ALEX (allergy explorer)

○ Využití:



- Indikace pro specifickou imunoterapii
- Vyhodnocení rizik pro pacienta s cílem zabránit závažným alergickým reakcím
- Získáváme molekulární informace o zkřížené reaktivitě

Například zásobní proteiny jako jsou Ara h 1,2,3 nebo 6 mohou vyvolat alergické symptomy vedoucí až k anafylaktickému šoku. Naopak, Ara h 8, protein PR-10 obvykle nevyvolává závažnější problém, přitom ale vede k tomu, že výsledky testu extraktu jsou pozitivní, což vede k určité nejistotě na straně lékaře i pacienta. Podobné konstelace se objevují i u dalších potravinových alergenů, např. sóji, lískových ořechů či vlašských ořechů.

	CCD	PROFILIN	PR-10	LTP	STORAGE PROTEINS
 Peanut	MUXF3*	Bet v 2**	Ara h 8	Ara h 9	Ara h 1 Ara h 2 Ara h 3 Ara h 6
 Hazelnut			Cora 1	Cora 8	Cora 9 Cora 14
 Walnut				Jugr 3	Jugr 1
 Brazil Nut					Ber e 1
 Cashew					Ana o 3

ImmunoCap ISAC

- Taktéž biočipová technologie
- Na rozdíl od ALEXe se zde používá k detekci **anti-IgE značená fluorochromem**
- Výsledkem tedy není barevná reakce, ale odečítá se fluorescence pomocí speciálního laserového snímače

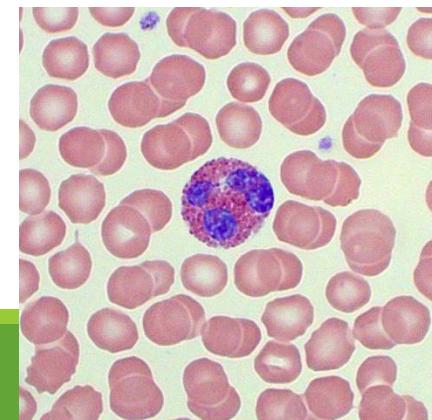
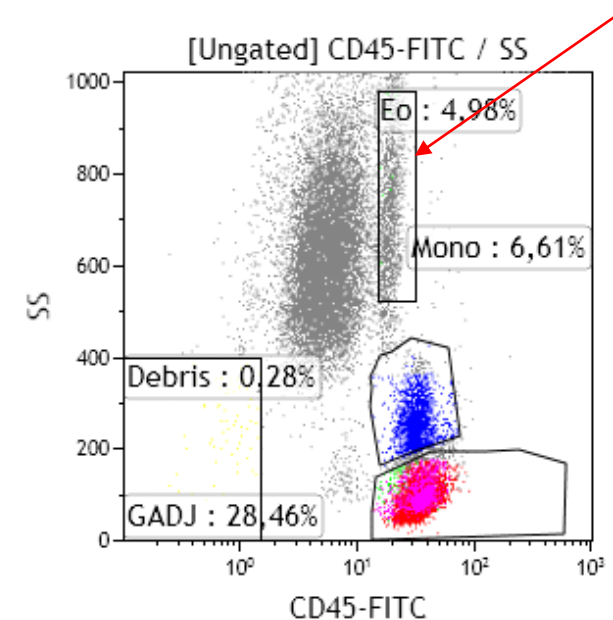
	 ISAC (Thermofisher)	 ALEX Allergy Explorer (MADx)
Složení	112 komponent 51 alergenových zdrojů	125 komponent + 157 extraktů 160 alergenových zdrojů
Biologický materiál množství	plasma, sérum 30 µl	plasma, sérum 100 µl
Doba trvání testu	cca 4 hodiny	cca 4 hodiny
Doba odezvy	delší doba odezvy 3-4 pacienti/test	krátká doba odezvy 1 pacient/test
		stanovení celkového IgE Inhibice CCD

Buněčné testy v alergologii

1. Stanovení počtu eozinofilů (I.typ přecitlivělosti)
2. Test aktivace bazofilů (BAT) (I.typ přecitlivělosti)
3. Test proliferace lymfocytů na pozdní alergickou reakci (IV. typ přecitlivělosti)

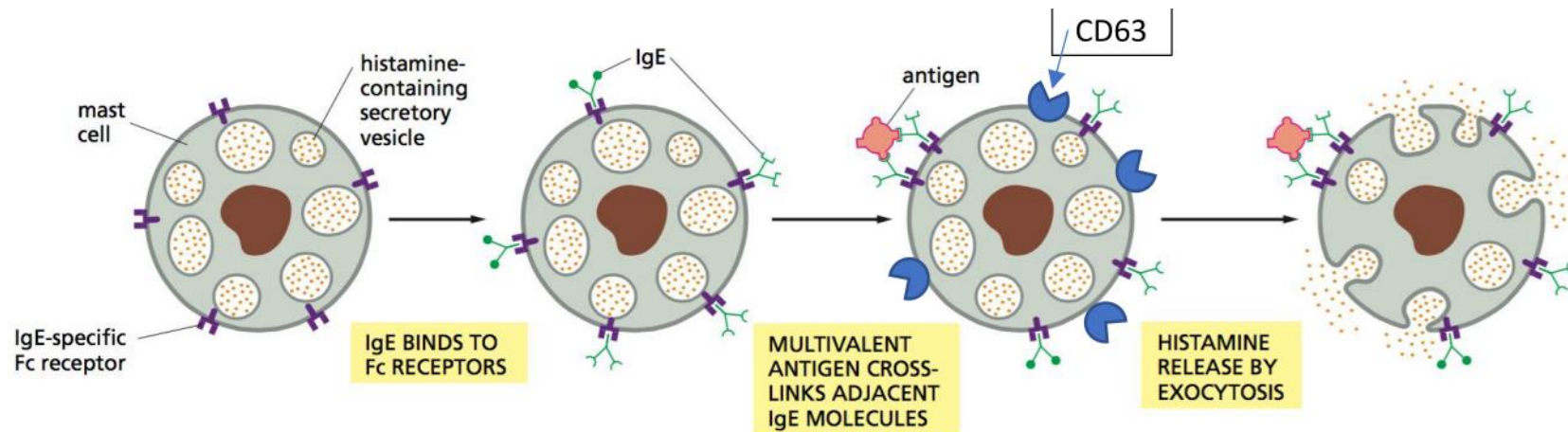
Stanovení počtu eozinofilů

- Princip – hematologický analyzátor
 - Hydrodynamická fokusace vzorku
 - Impedanční vlastnosti buněk - počet
 - Průchod světelným paprskem – vlastnosti o velikosti a granularitě
- Krevní diferenciál dospělého člověka:
 - Lymfocyty: 20-45 %
 - Monocyty 2-12 %
 - Neutrofily 50-70 %
 - **Eozinofily 1-3 %**
 - Bazofily < 1 %
- Zvýšení eozinofilů – alergická, parazitární onemocnění...
- Použití – monitoring eozinofilního astmatu
- Při znalosti absolutního počtu leukocytů lze absolutní počty buněk dopočítat
 - Leukocyty $4-10 \cdot 10^9/l$




Test aktivace bazofilů (BAT)

- Bazofily v neaktivovaném stavu exprimují v nízké míře znak CD203c, jsou CD63 negativní
- Při aktivaci a degranulaci se zvyšují znaky **CD63** a CD203c → měření pomocí průtokové cytometrie
- Provedení testu – prestimulace plné krve s IL-3 → následuje přidavek alergenu → inkubace → promytí → značení protilátkami (anti-CD63, anti-CD203c, anti-IgE) → promytí → lýza erytrocytů



BAT – alergen

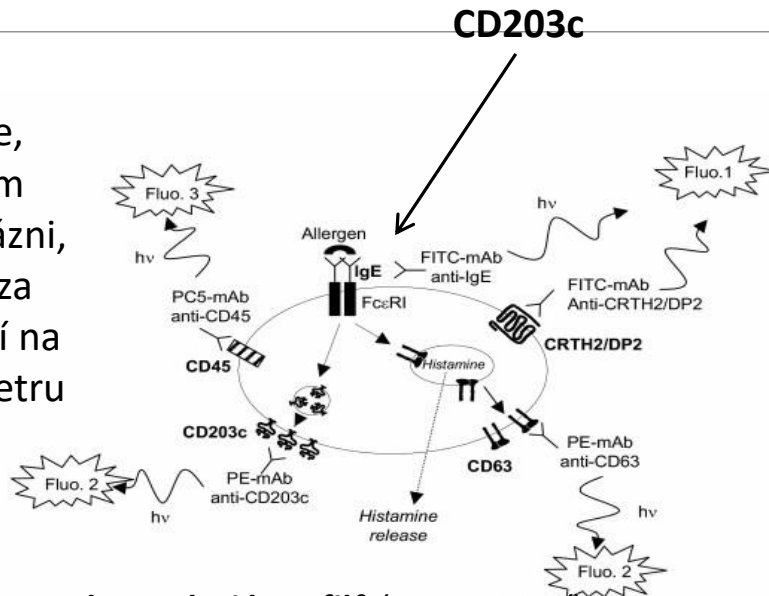
- Většinou se používají alergen z prick testů
- U podezření na lékové alergie doktor spolu s krví zasílá do laboratoře podezřelý lék → v laboratoři rozdrcen, přefiltrován a naředěn
 - Pozn. v minulosti se používaly k provedení BAT i potraviny → v laboratoři se potravina rozdrtila, naředila a výsledný roztok se přefiltroval
- U každého BAT testu se používá ředění alergenu v pořadí 10krát, 100krát a 1000krát → proč?

- Někdy může být koncentrace alergenu natolik velká, že bazofily se výrazně naaktivují a během inkubace podlehnou nekróze → výsledkem měření je falešná negativita
- Proto se může stát, že např. při ředění 10krát je reakce negativní, ale pozitivní v ředění 100krát!!

BAT

funkční test umožňující vyšetření aktivace bazofilů po setkání se s určitým alergenem *in vitro*

Na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)

Vyšetření periferní heparinizované krve, stimulace alergenem při 37 °C ve vodní lázni, zastavení reakce, lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru

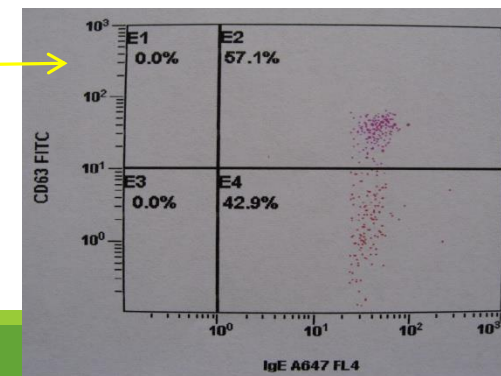
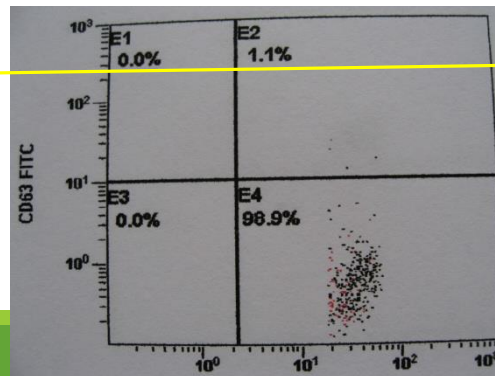
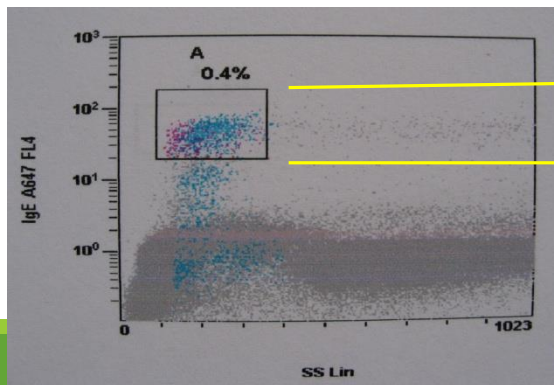


Založen na expresi aktivačního znaku (**CD63**) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem *in vitro*

Reakce přecitlivělosti jsou podstatou alergických onemocnění. Reakce přecitlivělosti I. typu neboli **IgE** **mediovaná alergie** - je zprostředkována protilátkami IgE. IgE se naváže na bazofily ve fázi senzibilizace. Při dalším setkání s alergenem – alergen přemostí IgE, to vede k aktivaci bazofilů - masivnímu uvolnění produktů degranulace bazofilů a mastocytů → **zvýšená exprese CD63 a CD203c** na aktivovaných bazofilech.

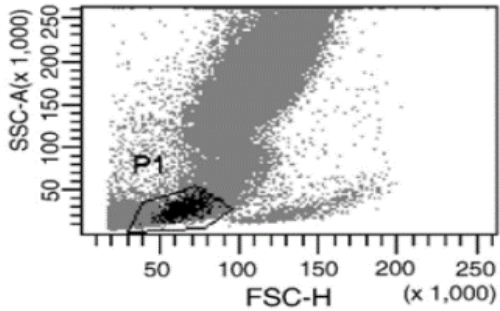
ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)

Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů

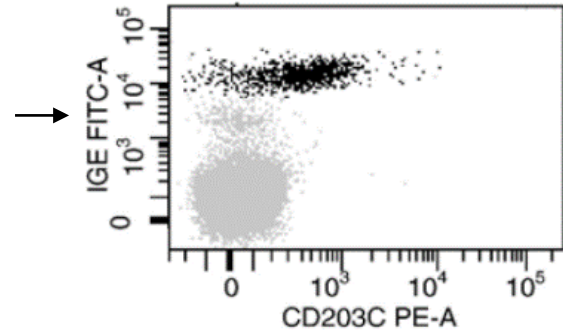


BAT – gatovací strategie

(Pacient alergický na kočku – alergen *Fel d*)



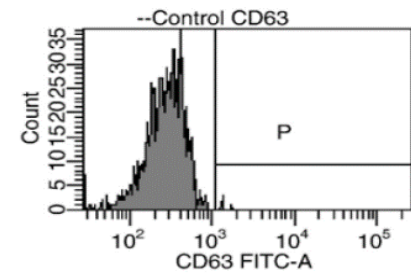
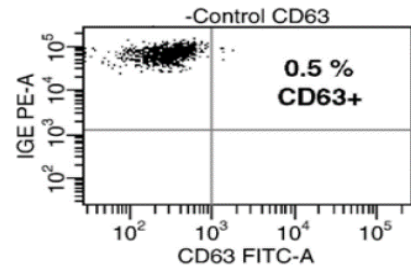
1. Na Forward scatteru a Side scatteru gatovány lymfocyty



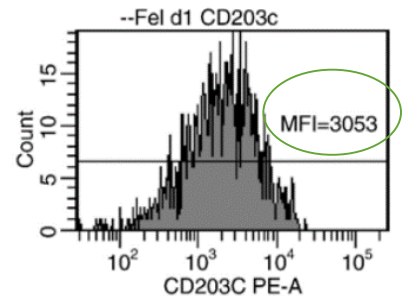
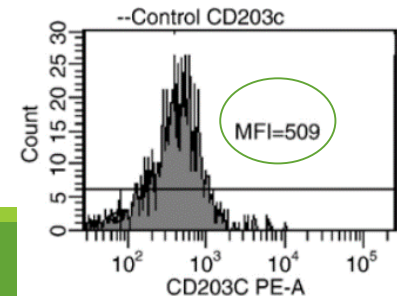
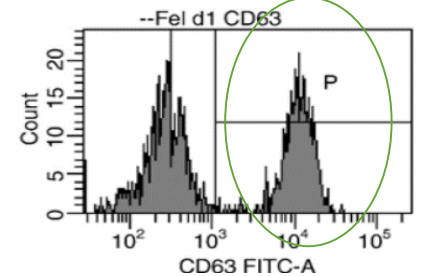
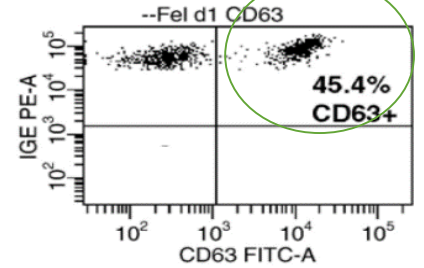
2. Z lymfocytů gatovány pouze IgE pozitivní buňky - bazofily

3. Bazofily – sledujeme CD63 a CD203c

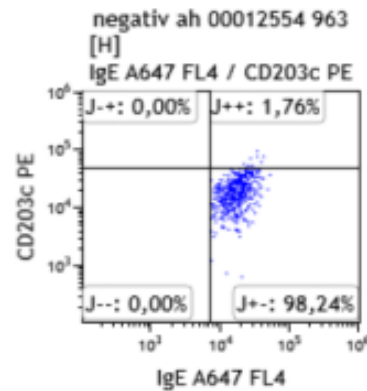
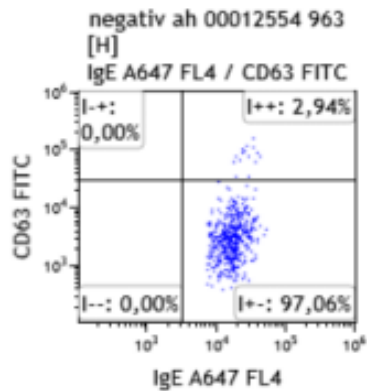
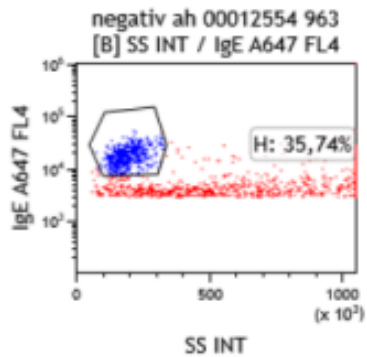
Negativní kontrola
Bazofily jsou CD63 neg.



Pozitivní pacient – vidíme populaci CD63 pozitivních bazofilů



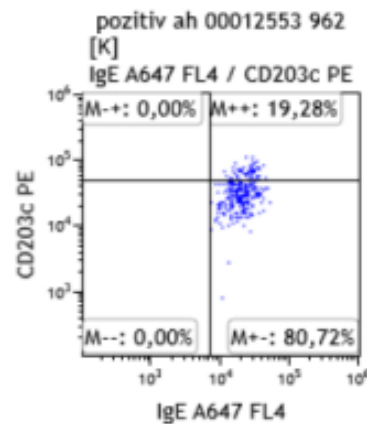
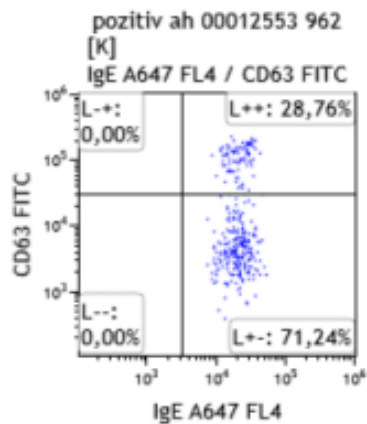
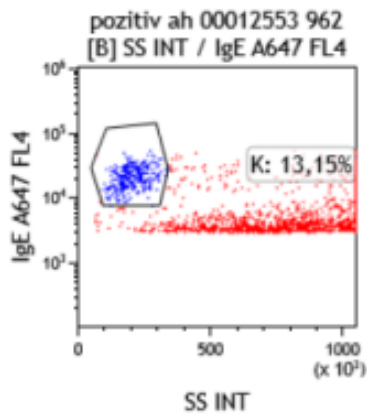
Negativní kontrola



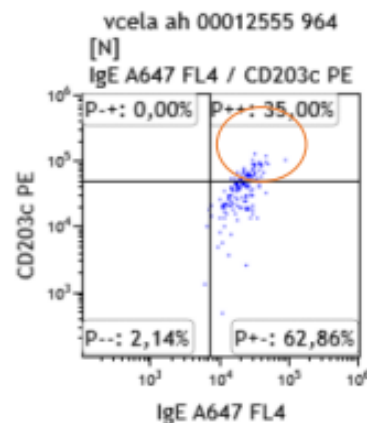
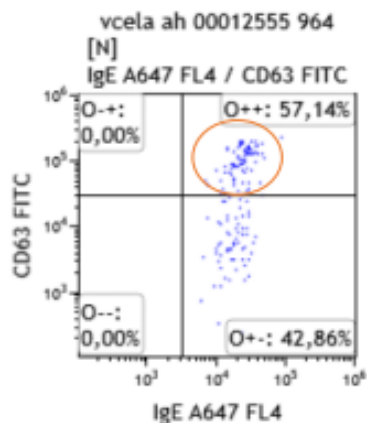
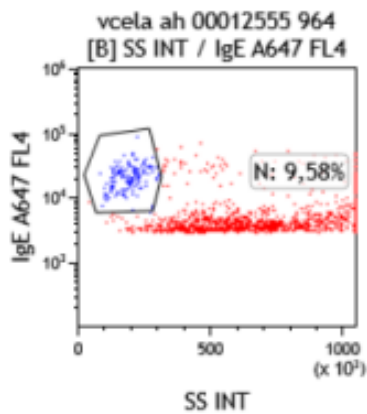
- Při vyšetření BAT u pacienta je součástí testu vždy:

- Negativní kontrola (PBS)
- Pozitivní kontrola (stimulace fMLP)

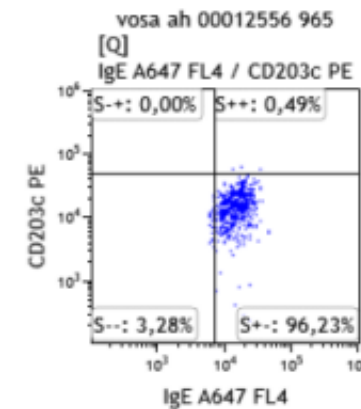
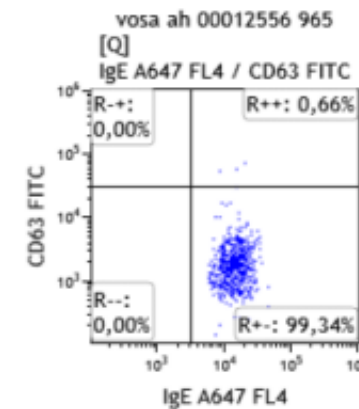
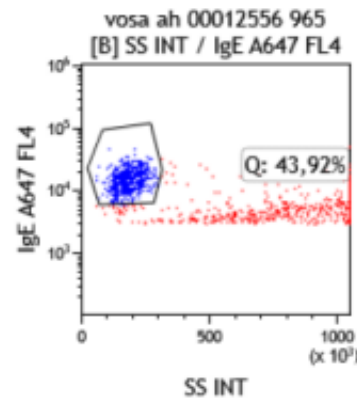
Pozitivní kontrola



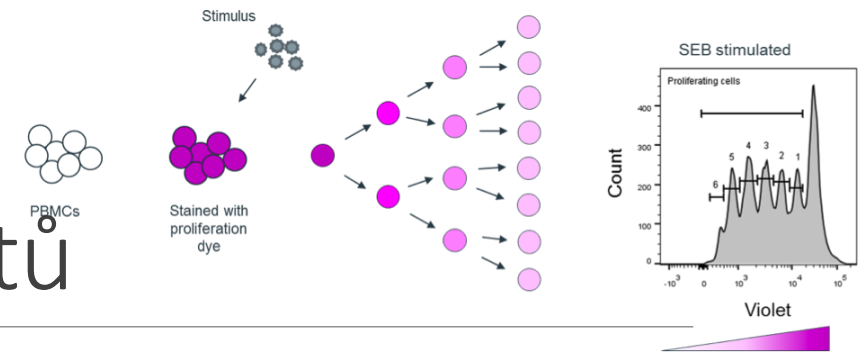
Včela



Vosa



Proliferace lymfocytů



- Pacienti se závažnými reakcemi na léky → IV. Typ přecitlivělosti dle Coombse a Gella
- Princip: inkubace lymfocytů pacienta s podezřelým lékem 7 dní v médiu → poté měření proliferace
 - Součástí testu též negativní kontrola (PBS), pozitivní kontrola (PHA, ConA) a zdravá kontrolní osoba!
- Pokud lymfocyty proliferují, je daný lék považován za spouštěč pozdní alergické reakce
- Úskalí:
 - Testován je přímo lék, ale ne jeho metabolity (některé léky se biotransformují na metabolity které mají daný účinek)
 - Některé léky přímo působí jako inhibitory proliferace (např. prostaglandin E2 → útlum produkce IL-2)
 - Možnost falešné positivity bez klinických příznaků pacienta → nutno vždy hodnotit výsledky spolu s klinickými daty