



# **VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V DIAGNOSTICE ALERGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ**

**Tereza Pechová**

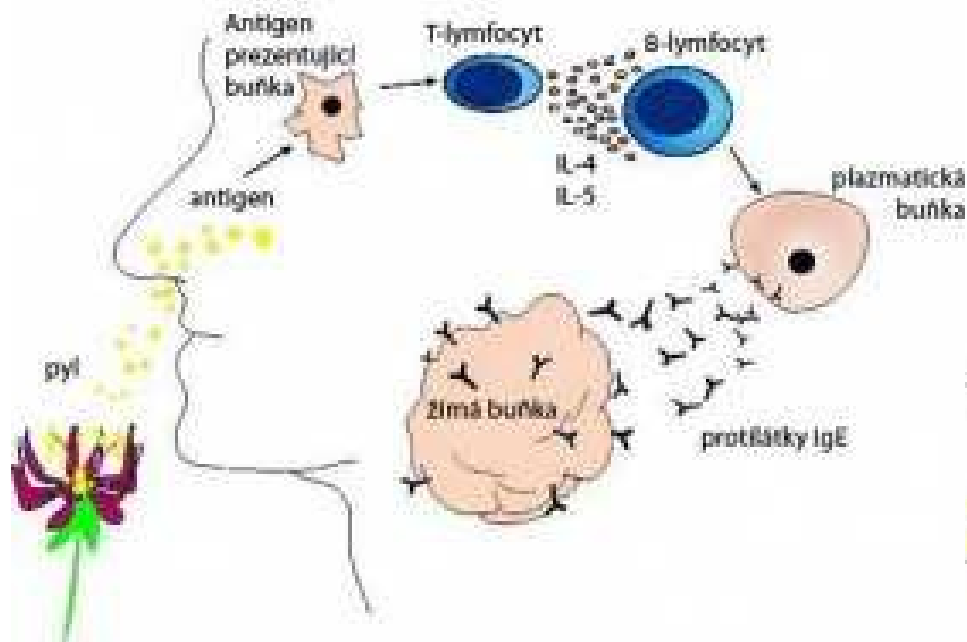
# ALERGIE

- Stav přecitlivělosti (hypersenzitivity) organismu na alergen (antigen, který je schopný vyvolat alergickou reakci)
- Porucha řízení IS vedoucí k nadměrným, nepřiměřeným reakcím poškozujícím organismus
- Typy hypersenzitivních reakcí:
  - I. typ - s účastí IgE protilátek (časná přecitlivělost)
  - II. typ - s účastí IgG a IgM protilátek (přecitlivělost cytotoxického typu)
  - III. typ - s tvorbou imunokomplexů
  - IV. typ - oddáleného typu (pozdní/buněčná přecitlivělost)

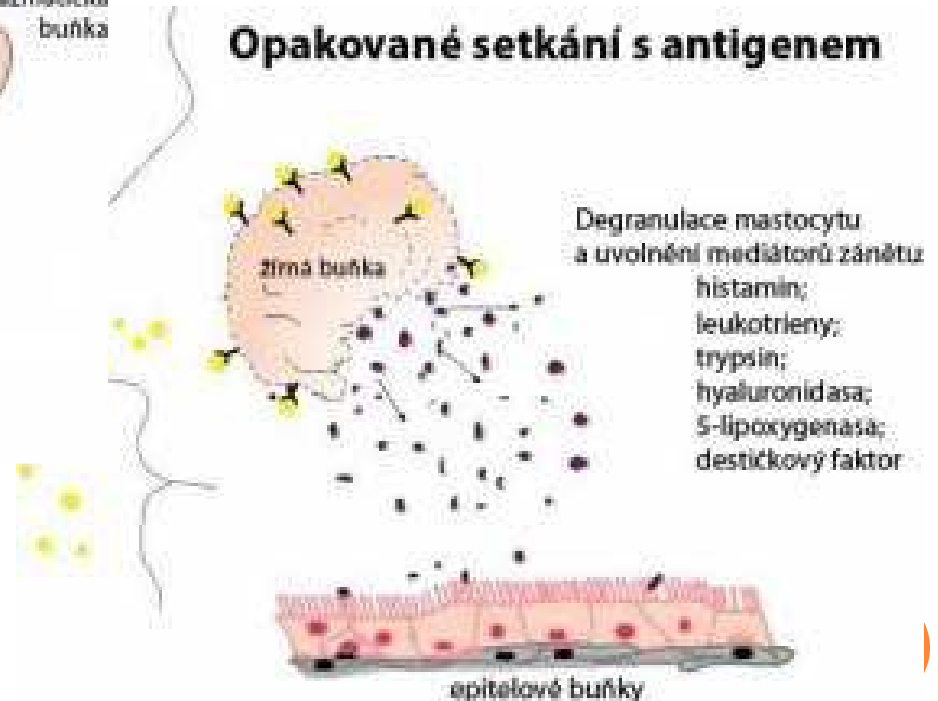


# HYPERSENZITIVITA I. TYPU

## Senzibilizace



## Opakované setkání s antigenem



Fáze senzibilizace (<http://www.doktorzdravi.cz/lekarna/cache/thumbs/database=galerie&uid=5738&x=280&y=min.jpg>)

Časná fáze alergické reakce (<http://www.doktorzdravi.cz/lekarna/cache/thumbs/database=galerie&uid=5737&x=280&y=min.jpg>)

# DIAGNOSTIKA ALERGIÍ



## ○ In vivo testy:

- kožní testy (prick testy, intradermální a epikutánní)
- provokační (spojivkový, intranasální, bronchoprovokační)

## ○ In vitro testy

- Stanovení celkového množství IgE protilátek (EIA, FEIA)
- Stanovení koncentrace specifických IgE protilátek (CAP systém, FAST, RAST)
- Funkční/buněčné testy
  - testy detekující uvolněné mediátory (ELISA, CAST test)
  - test aktivace bazofilů /BAT/ (průtoková cytometrie)



# TEST AKTIVACE BAZOFILŮ

- Založen na sledování membránových znaků charakterizující aktivované bazofily alerginem
- Tyto znaky jsou značeny monoklonálními protilátkami a jsou detekovány pomocí průtokového cytometru
- Nejčastěji sledovanými znaky na bazofilech jsou CD63 (marker aktivace bazofilů) a CD203c (marker bazofilů)
- Výsledkem vyšetření je procento aktivovaných bazofilů nebo stimulační index
- Test aktivace bazofilů se může provádět s plnou krví (Basotest) nebo s izolovanými bazofily (Flow-CAST)



## TEST AKTIVACE BAZOFILŮ - BASOTEST

- Plná krev (heparin) inkubována s alergenem
- Současná inkubace negativní kontroly (místo alergenu ředící roztok) a pozitivní kontroly (anti-IgE protilátka nebo fMLP)
- Smíchání s protilátkou označující bazofily (anti-IgE nebo anti-CD203c) a protilátkou navazující se na aktivované bazofily (anti-CD63)
- Lýza erytrocytů, promytí
- Měření pomocí průtokového cytometru do 2 hodin po lýze erytrocytů ve vzorcích



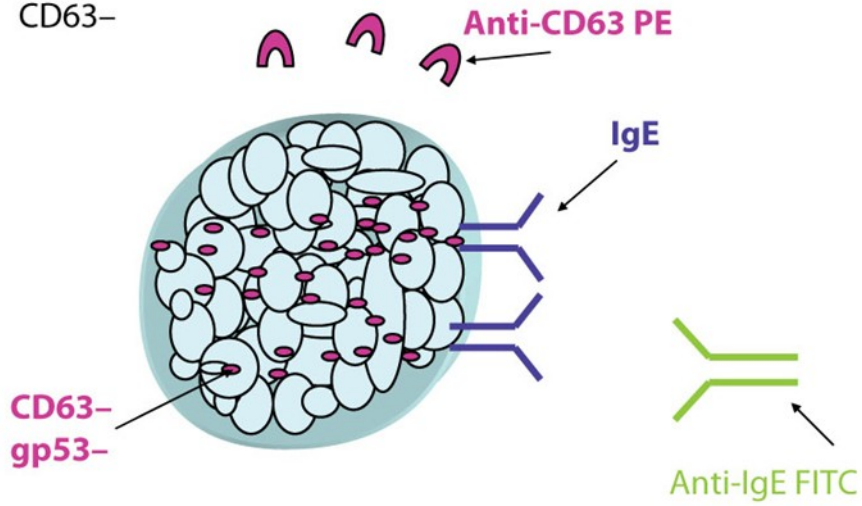
# MĚŘENÍ

- Bazofily gatovány na základě bočního rozptylu (side scatter) a specifického značení bazofilů (SS/anti-IgE nebo SS/CD203c)
- Na takto vybraných bazofilech měřena exprese aktivačního znaku CD63
- Výsledek procento aktivovaných bazofilů – anti-IgE+/CD63+ nebo CD203c+/CD63+



Basophil phenotype at rest:

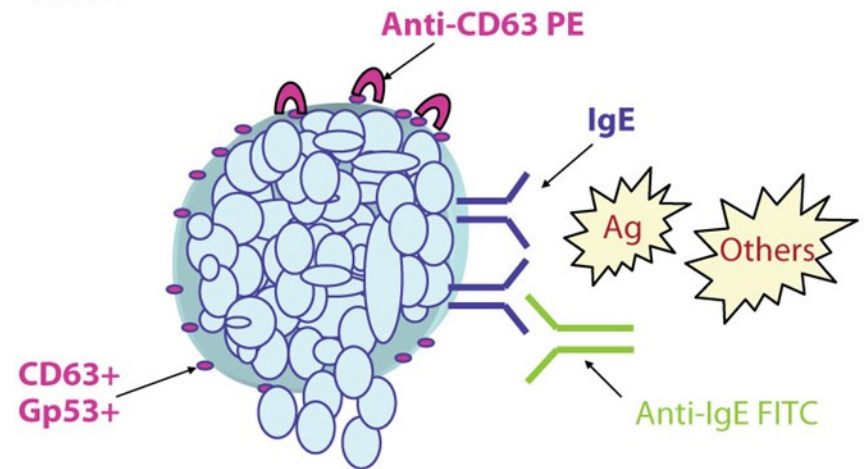
IgE+  
CD63-



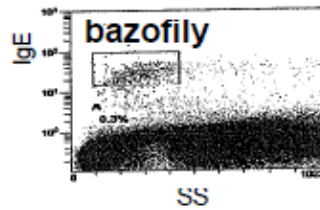
aktivace

Basophil phenotype after activation:

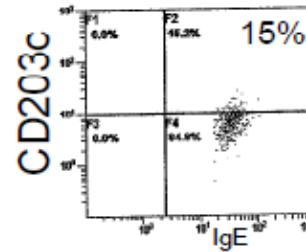
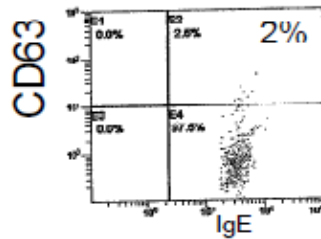
IgE+  
CD63+



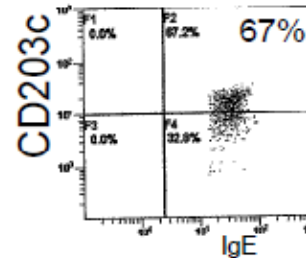
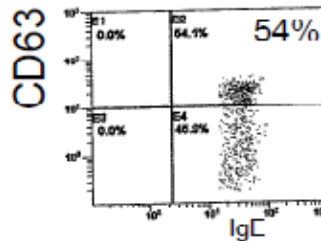




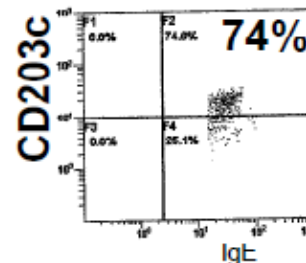
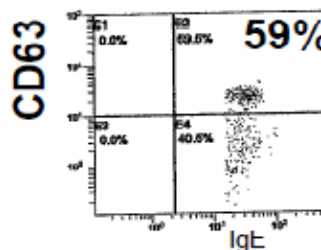
negativní kontrola



pozitivní kontrola

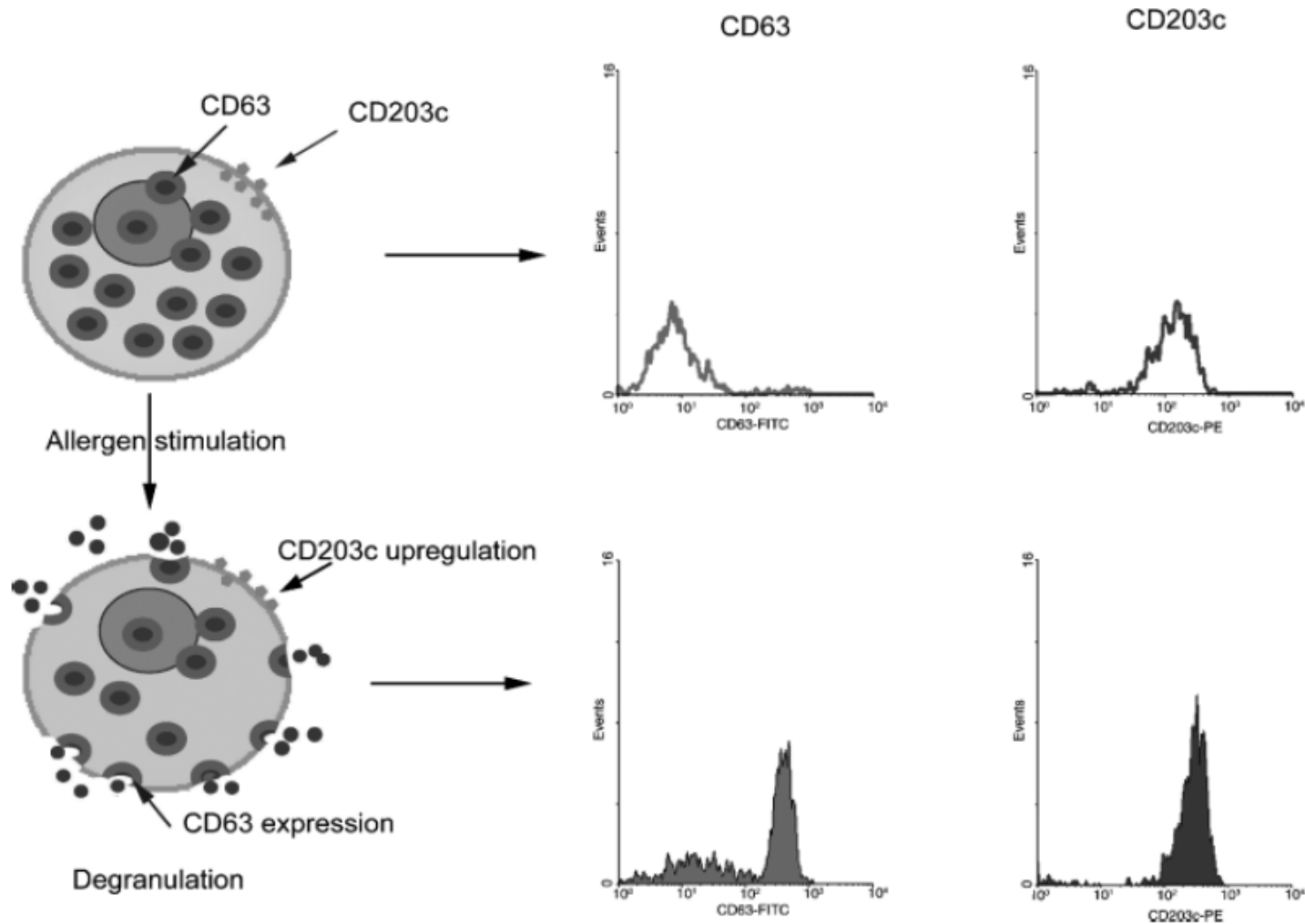


Vosa



*Ukázka jasně pozitivního výsledku. Výsledek funkční aktivity aktivace bazofilů u pacienta se specifickými IgE protilátkami proti vose obecné*





Rozdílná exprese CD63 a CD203c na klidových bazofilech a po aktivaci alergenem.  
 Změna intenzity fluorescence po aktivaci bazofilů je zřetelnější u znaku CD63



# ZÁVĚR

- BAT je spolehlivá a citlivá metoda v diagnostice IgE-zprostředkované alergie
- Méně používaná metoda (při stanovení problematických alergenů)
- Jeví se (prozatím jako jediný) jako citlivý nástroj pro měření změn odpovědi na alergen během specifické imunoterapie



# LITERATURA

- Bašná, L.: *Funkční laboratorní vyšetření v alergologii – test aktivace bazofilů: bakalářská práce*. Brno: Masarykova univerzita, Fakulta lékařská, 2011. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Vojtěch Thon.
- Thon, V.: *Jak na bodnutí hmyzem a reakcí na alergen?* Interní medicína pro praxi, 2010, vol. 12, no.6, s. 330-332.
- Havranová M., Šetinová, I., Honzová, S.: *Měření aktivace bazofilů – CD63 nebo CD203c?* Alergie, 2006, no. 1.
- Honzová, S.: *Možnosti laboratorní diagnostiky alergie*. Interní medicína pro praxi, 2009, vol. 11, no. 4., s. 168-170.
- <http://www.imalab.cz/clanek/266-test-aktivace-bazofilu.aspx>
- Přednášky Specializované imunologické metody
- <http://www.doktorzdravi.cz/lekarna/cache/thumbs/databaze=galerie&uid=5738&x=280&y=min.jpg>)
- <http://www.doktorzdravi.cz/lekarna/cache/thumbs/databaze=galerie&uid=5737&x=280&y=min.jpg>)





**DĚKUJI ZA POZORNOST**