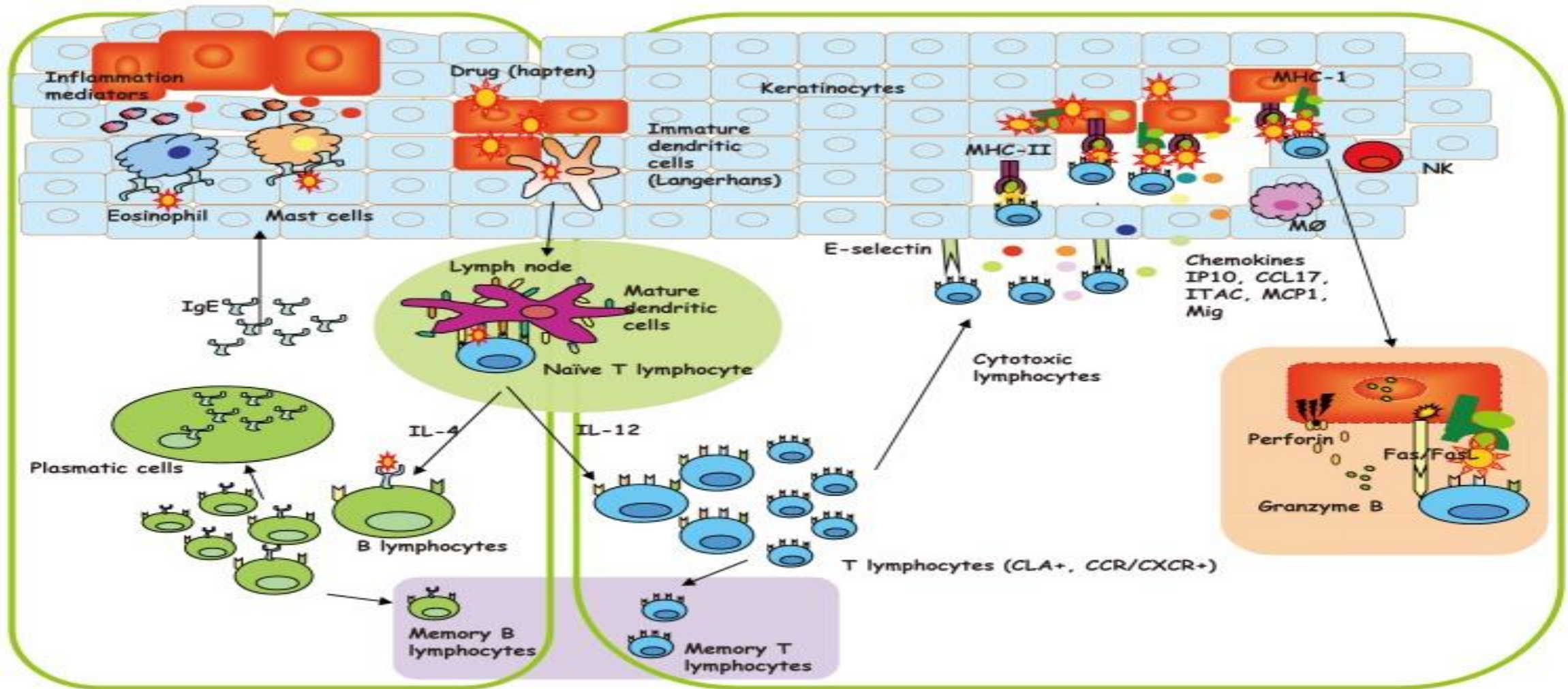


Proliferační test a jeho role v pozdní alergické reakci (přecitlivělost na léky) - doporučení

Vyšetření DHR v laboratoři
klinické imunologie

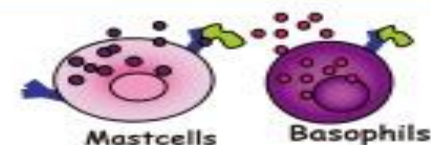
DHR – delayed hypersensitivity reaction



Mechanismus působení DHR

IMMEDIATE REACTIONS

Urticaria/angioedema
Anaphylactic Shock



NON-IMMEDIATE REACTIONS

Multiform erithema
Exanthema
Urticaria
Fixed drug eruption



Perforin
Granzyme

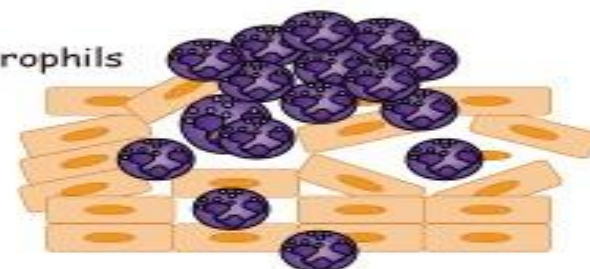


Acute generalised
exanthematic pustulosis



Neutrophils

IL-8

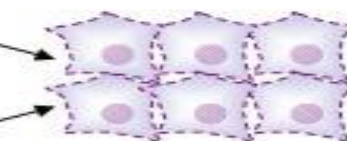


Stevens-Johnson syndrome
Toxic epidermal necrolysis

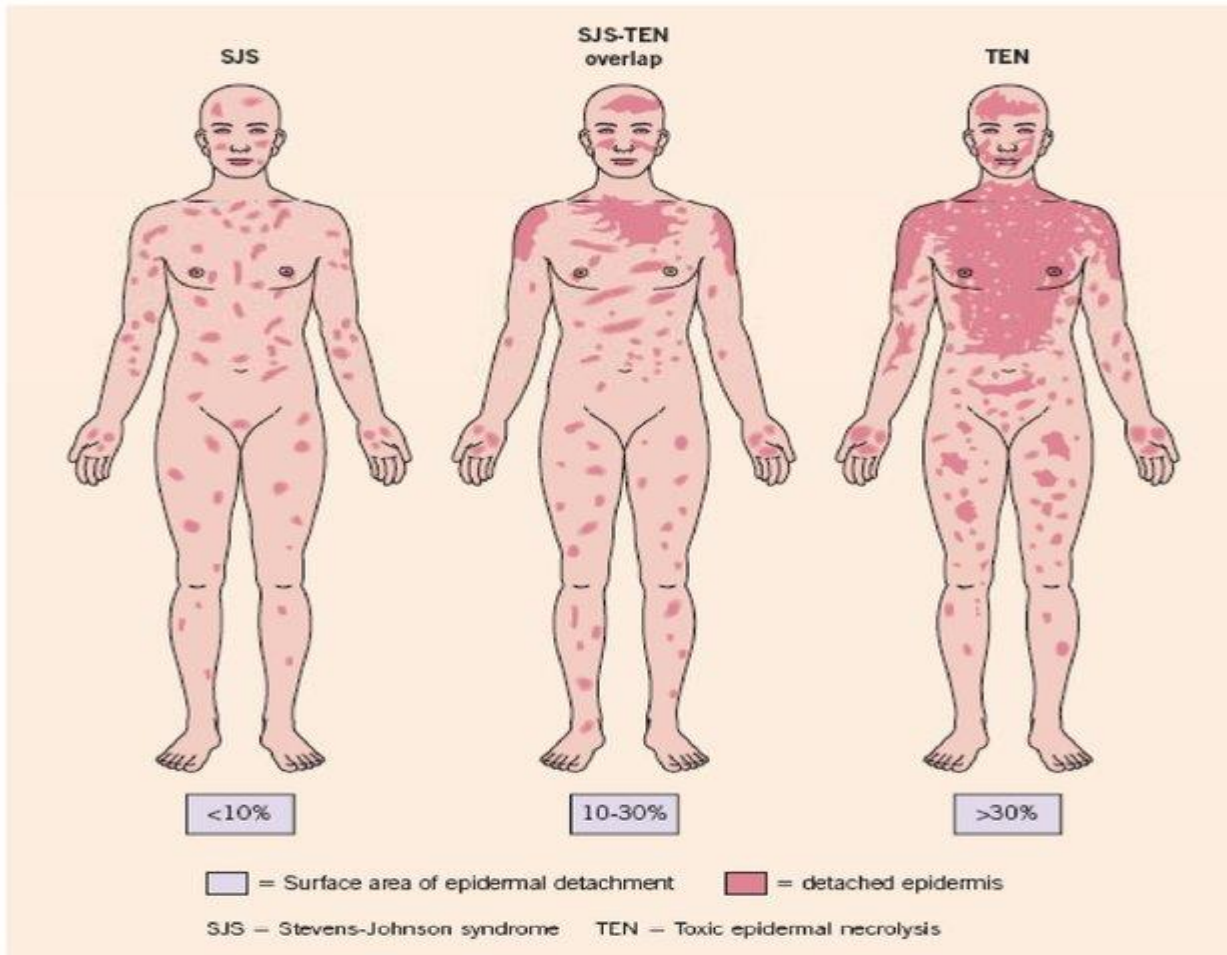


Perforin
Granzyme

Fas-FasL



Klinické důsledky DHR



- **Stevensův-Johnsonův syndrom**
imunopatologická reakce kůže
 - edém, nekróza epidermis a zánětlivá infiltrace cév
 - může postihnout i spojivky, dutinu ústní, genitálie, konečník...
- **TEN – toxická epidermální nekrolýza nebo též Lyellův syndrom**
 - zznik puchýřů a výrazným cárovitým olupováním velkých ploch kůže a sliznic
 - vysoká mortalita

Vyšetřování pacienti

- Pacienti vhodní pro test:
- S pozitivní reakcí na podávaný lék
- Vyšetření ideálně mezi 2- 5 týdnem od vzniku reakce
- Nejdéle však 6 měsíců po podání léku a vzniku DHR

Zpracovávaný materiál

- Ideálně plnou heparinizovanou krev
- Naředit médiem
- Izolovat PBMC – 200 000bb/ jamka+ 5% autologní sérum + médium
- Několik ředění léku v injekční podobě – ředit fyziologickým roztokem
- Inkubace 5-7 dní
- Vždy pozitivní kontrola – stimulace PHA, Con A, CD3+CD28+
- Vždy negativní kontrola
- + kontrolní „zdravý“ pacient

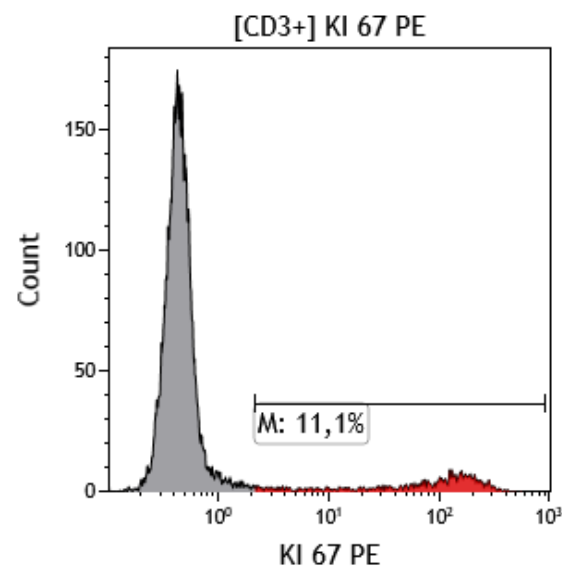
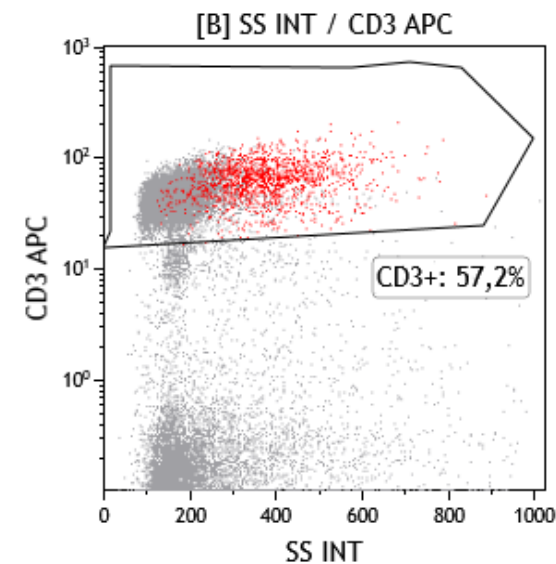
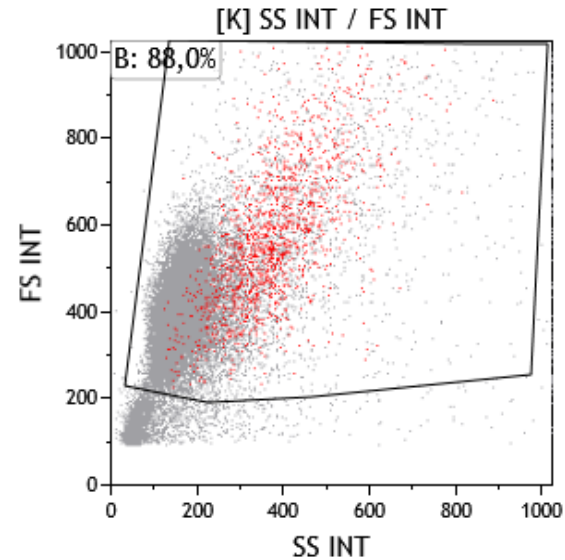
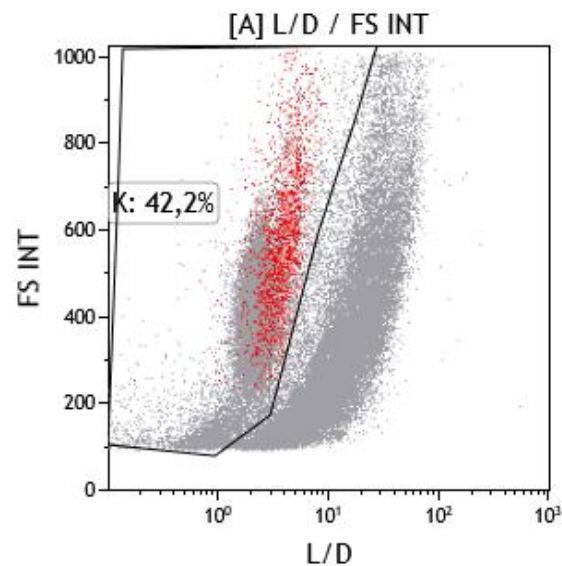
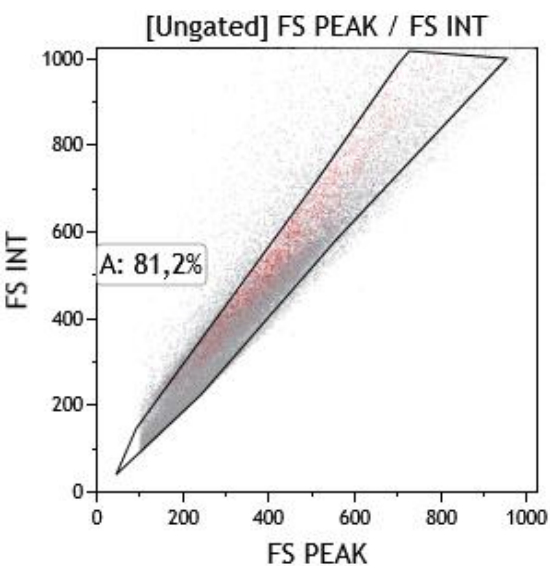
Laboratorní testy vhodné pro vyšetření DHR

- Proliferace
 - Inkorporace thymidinu
 - BrDU
 - Ki-67
- ELISPOT
 - Měření produkce cytokinů
 - nejčastěji IFN- γ , TNF- α
 - IFN- γ může být ovlivněno CMV, EBV a influenza viry
- Cytometrické měření produkce cytokinů
 - IFN- γ , TNF- α
- Stanovení granulolysinu
 - Cytometrické nebo mikroskopické stanovení počtu apoptotických buněk
 - Imunochromatografické stanovení sérové hladiny granulolysinu v časném stádiu SJS/TEN (2-4 dny)

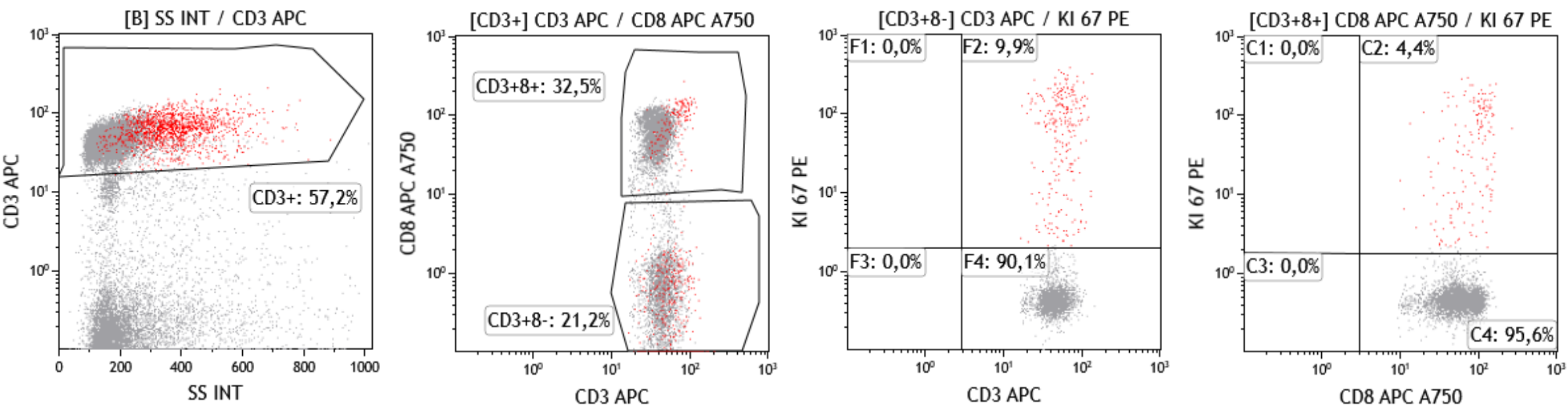
Vyhodnocení proliferačních testů pro DHR

- Nejčastěji jako **stimulační index (SI)** – poměr naměřených hodnot mezi nestimulovaným a stimulovaným vzorkem, přičemž hodnota nad hodnotu 2 se bere jako pozitivní
- Omezení testu:
 - Senzitivita testu se liší v jednotlivých studiích v závislosti na lécích a typu klinické rekace
 - Nejsou testovány případné metabolity léku – některé účinné látky jsou oxidovány v játrech enzymatickým systémem cytochromu P450
 - Některé léky samy o sobě působí jako stimulancia či inhibitory proliferace lymfocytů – Prostaglandin E2 – supresivní efekt na IL-2 – je produkován makrofágy v buněčných kulturách – možnost využití PGE2 inhibitorů
 - Možnost přítomnosti falešně pozitivních výsledků, tj. pozitivní výsledek proliferačního testu bez klinických příznaků u pacienta
 - Výsledek vždy dávat do souvislosti s klinickým nálezem

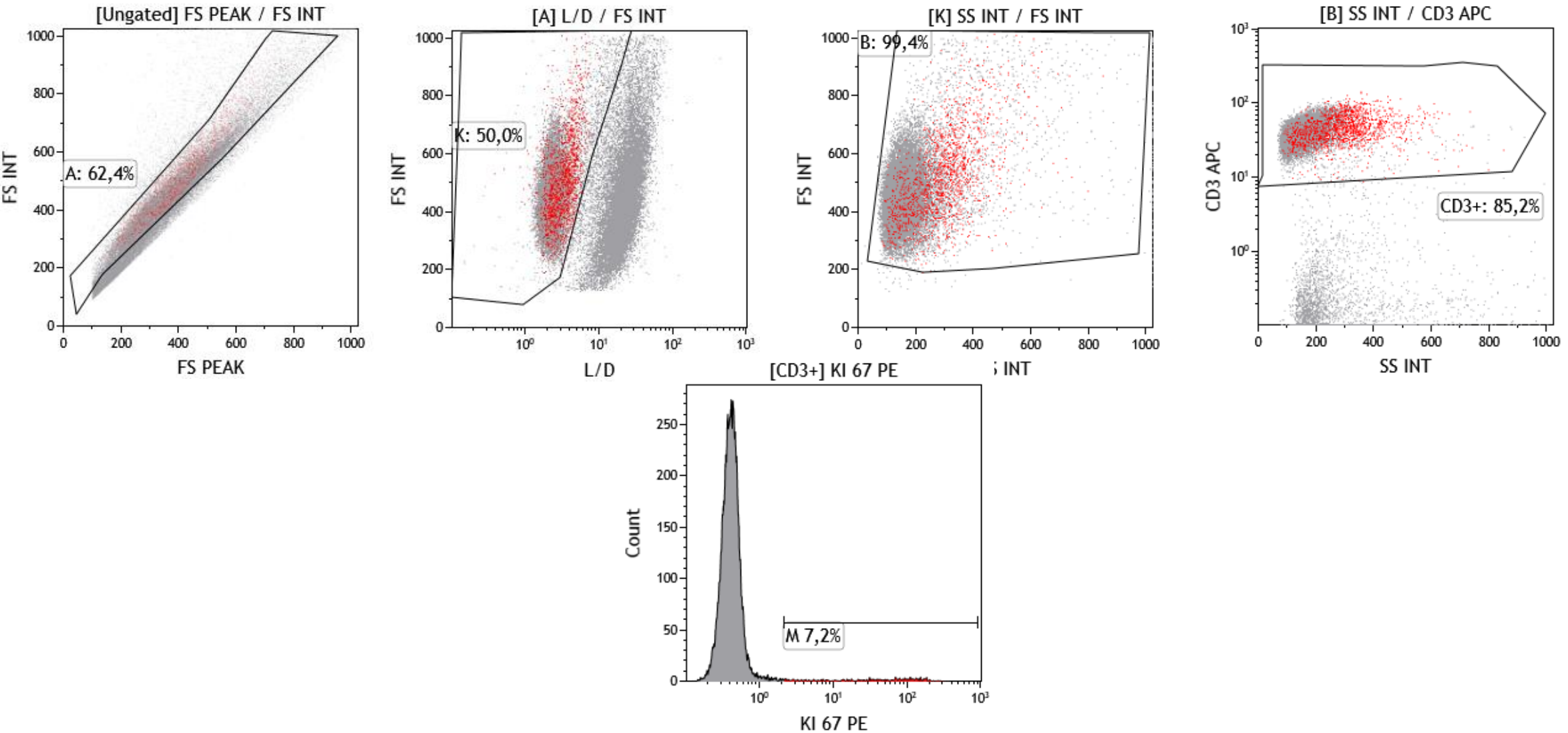
Kontrola nestimulovaný vzorek



Kontrola nestimulovaný vzorek

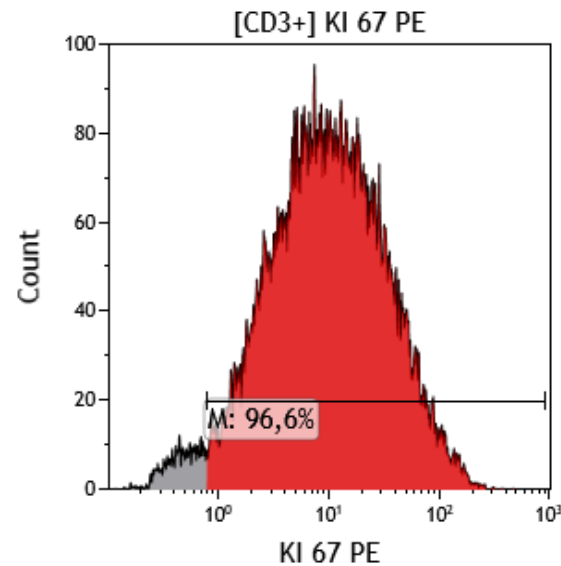
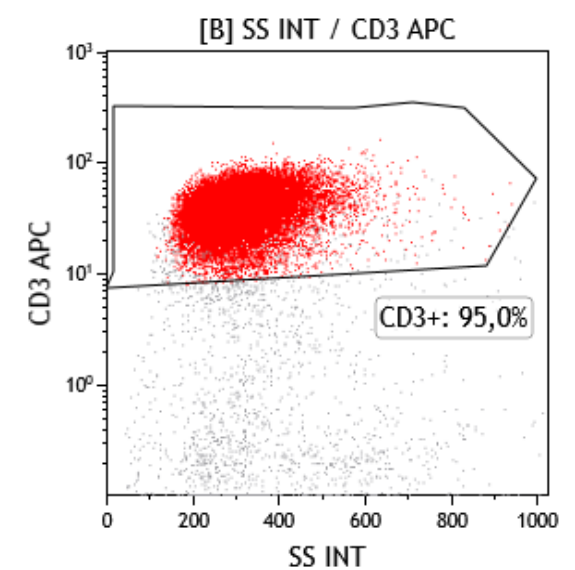
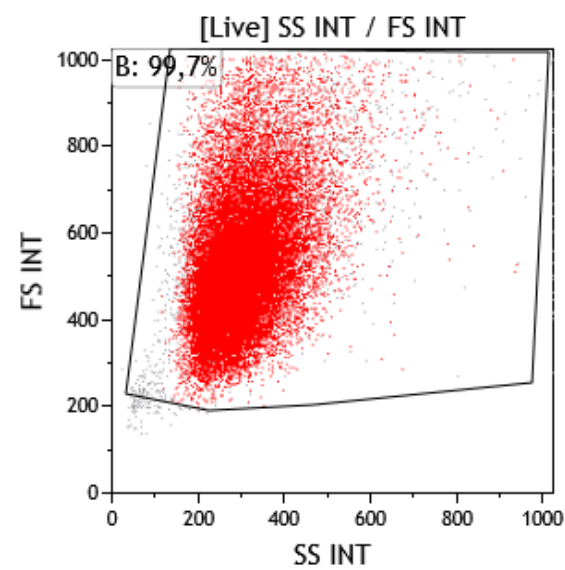
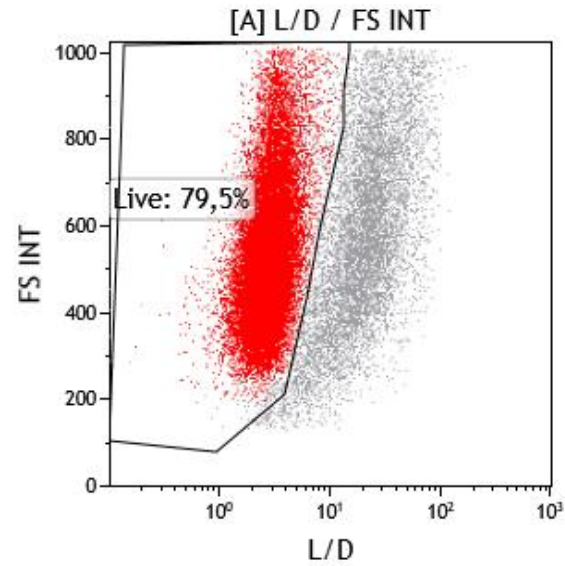
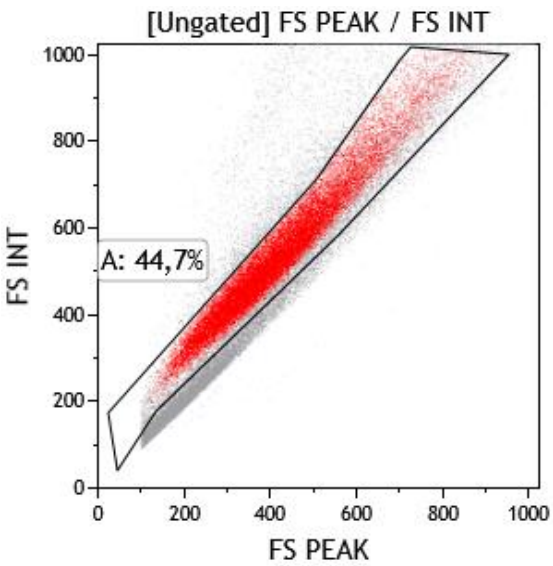


Pacientka nestimulovaný vzorek

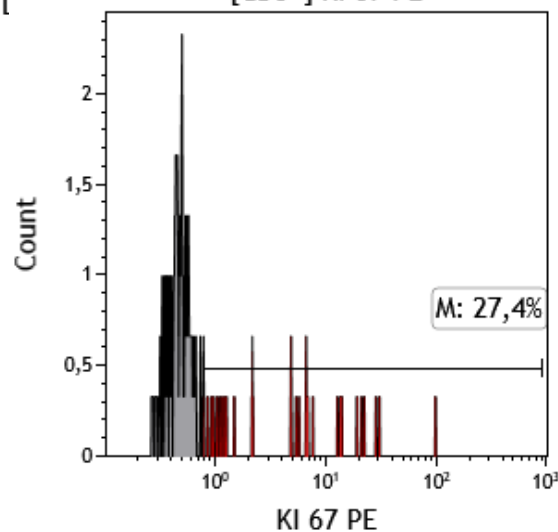
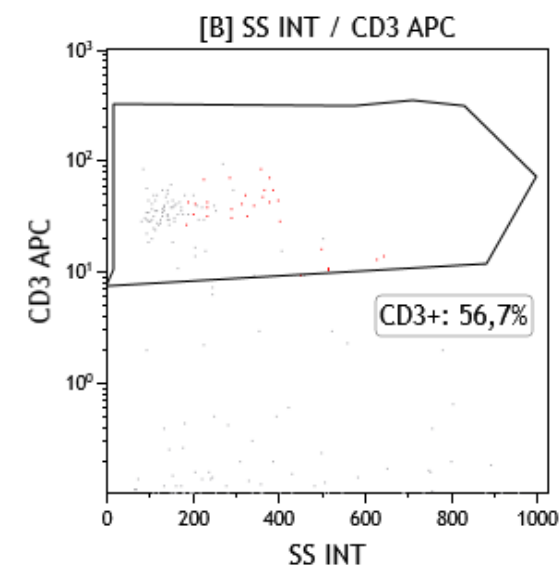
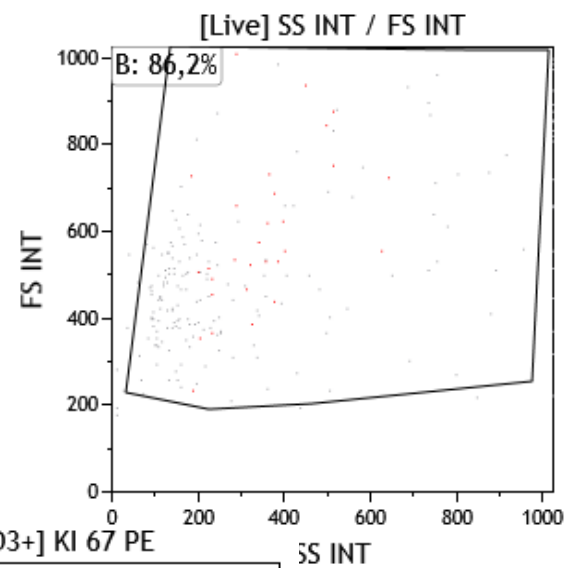
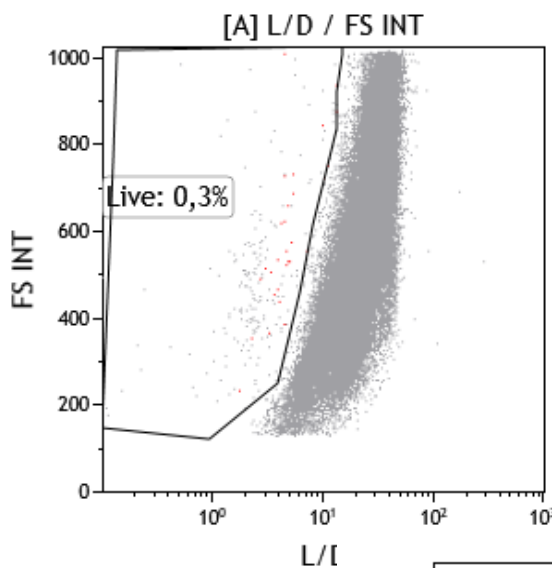
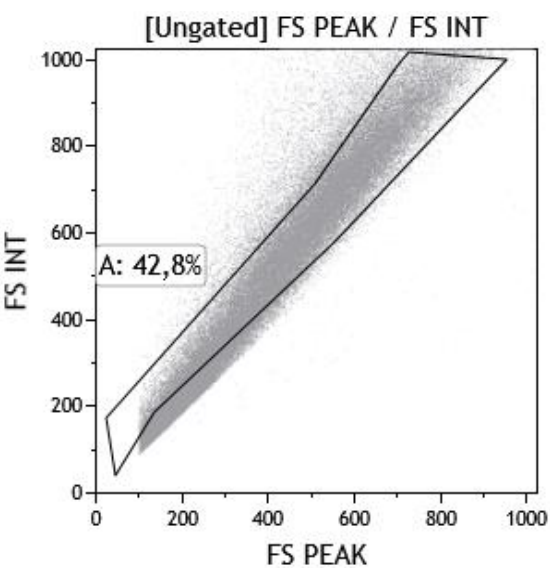


Gate	Number
All	19 637
M 7,2%	827

Pacientka stimulance PHA

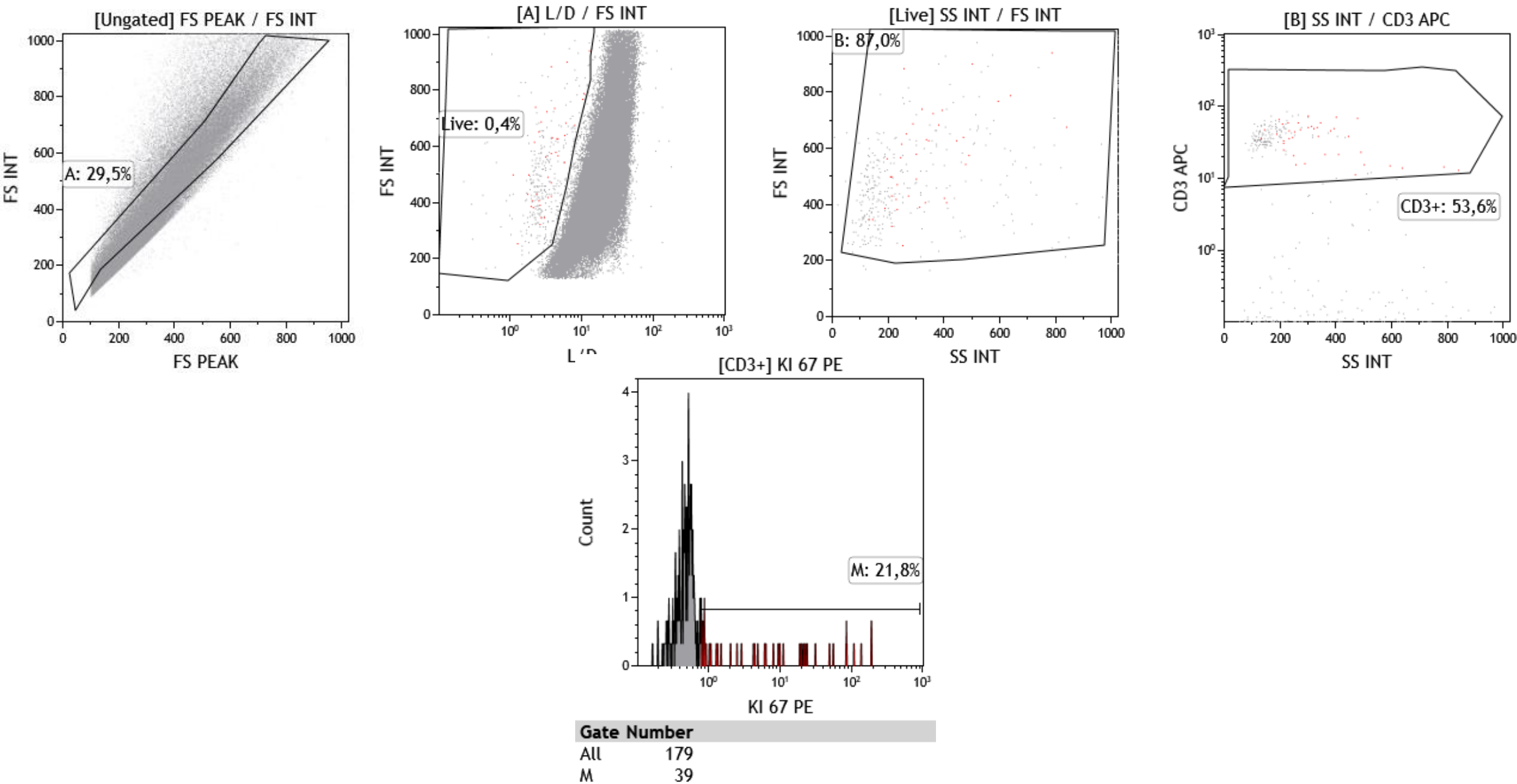


Pacientka penicilin 5000



Gate Number	
All	106
M	29

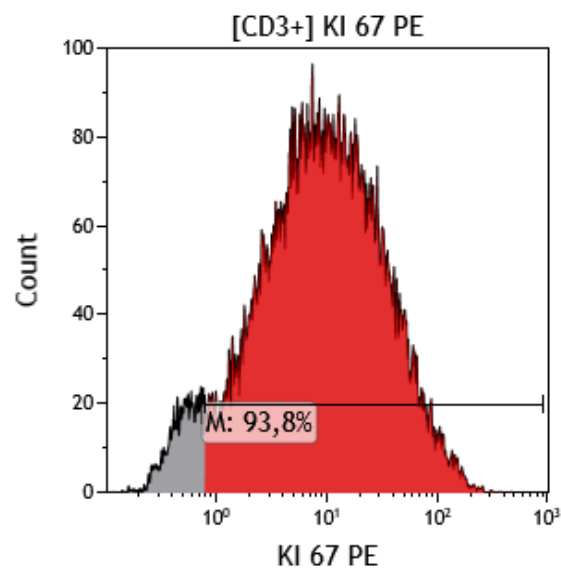
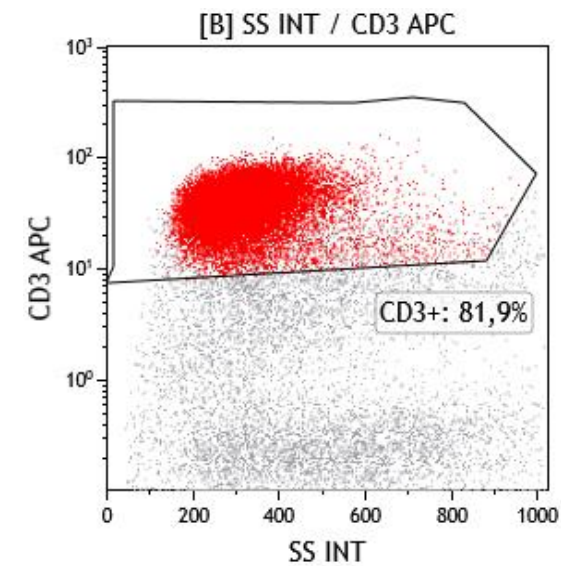
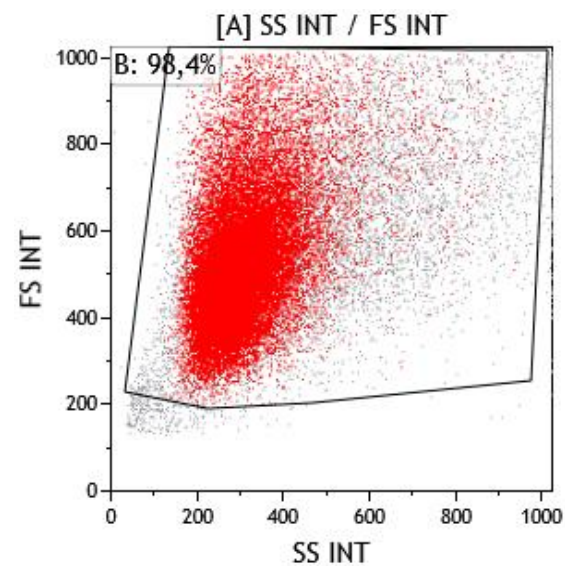
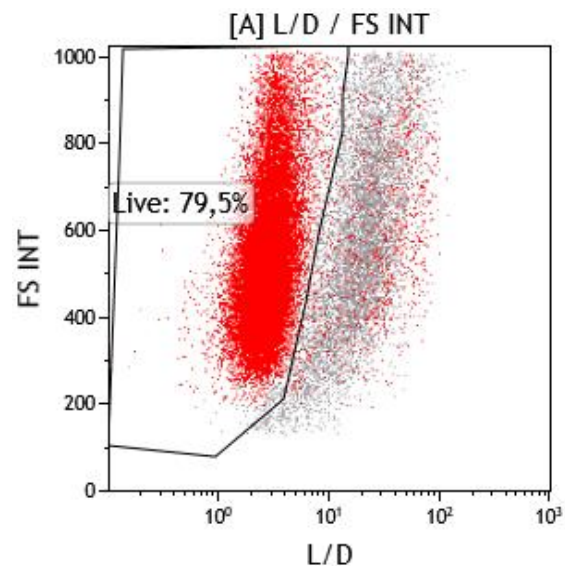
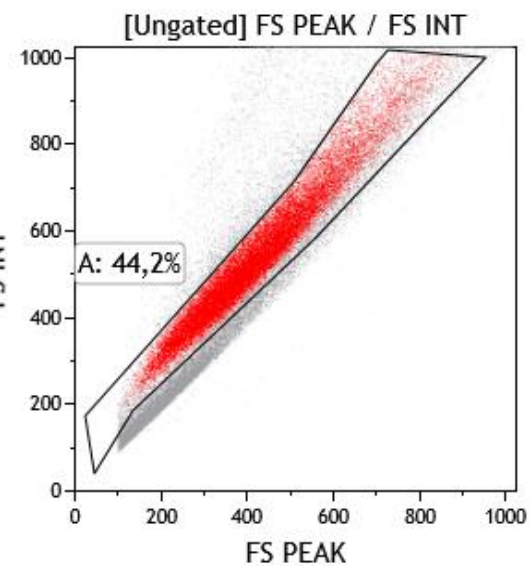
Kontrola penicilin 5000j



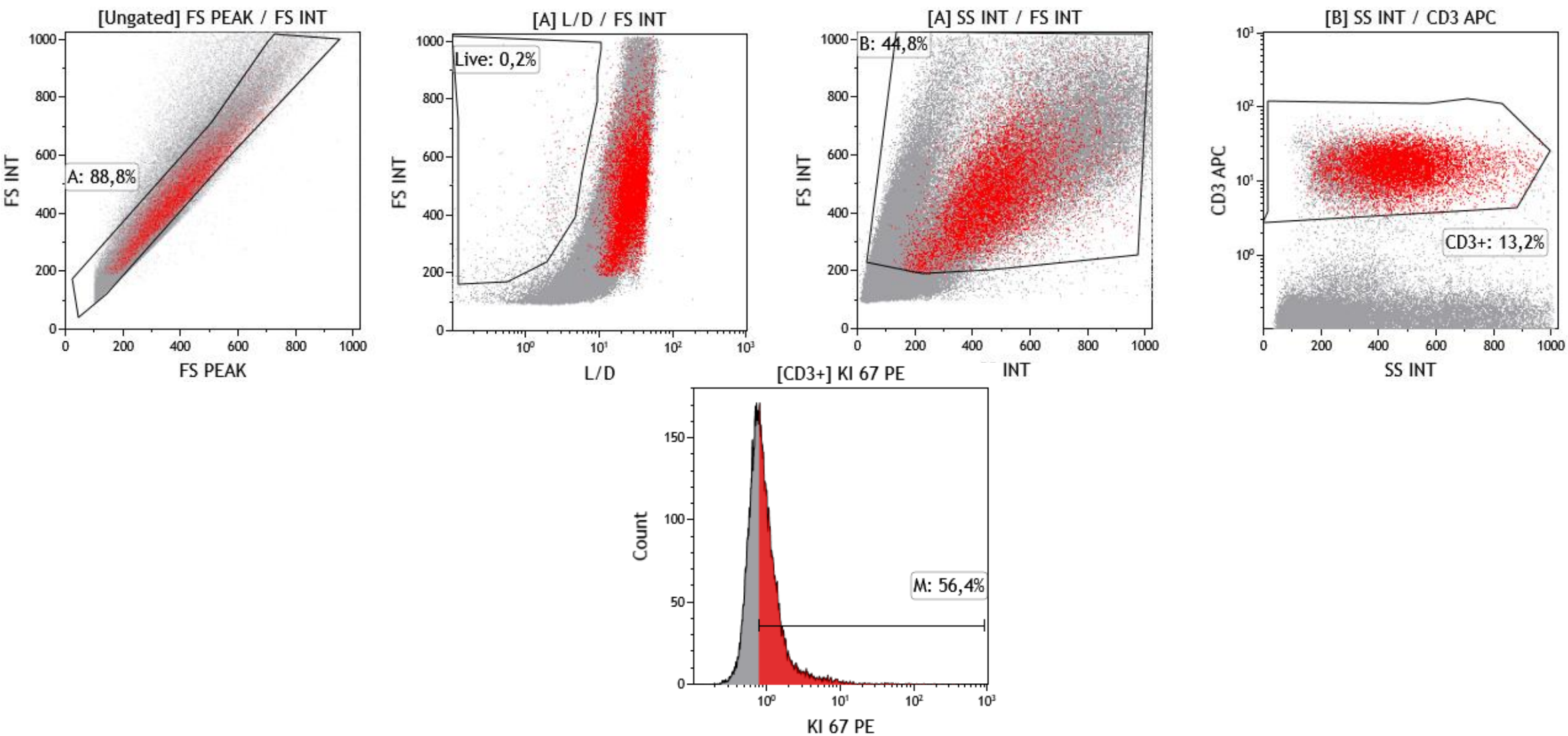
Vyhodnocení

	Kontrola	Pacient	Pacient	Kontrola
	% Ki67z CD3+	% Ki67z CD3+	SI	SI
Nestimulované	18,4	7,2	x	x
Concanavalin 1ug/ml	22,8	3,2	0,4	1,2
Concanavalin 2,5ug/ml	44,8	10,5	1,5	2,4
Phytohemaglutinin 2ug/ml	95,6	89,2	12,4	5,2
Phytohemaglutinin 5ug/ml	95,5	95	13,2	5,2
Penicilin 5000 jednotek	mb	mb	nelze hodnotit	nelze hodnotit
Penicilin 500 jednotek	5,1	2,1	0,3	0,3
Penicilin 50 jednotek	8,5	2,6	0,4	0,5
Ampicilin 10mg	5,2	2,8	0,4	0,3
Ampicilin 1mg	2,4	3,2	0,4	0,1
Ampicilin 0,1mg	15,8	4,6	0,6	0,9
Amoksiklav 10mg	mb	mb	nelze hodnotit	nelze hodnotit
Amoksiklav 1mg	mb	mb	nelze hodnotit	nelze hodnotit
Amoksiklav 0,1mg	11,5	6,3	0,9	0,6

Pacientka stimulace PHA bez Live gatu



Kontrola penicilin 5000j bez Live gatu



Gate Number

All 16 584

M 9 353

Doporučení

- Použít plnou krev nebo PBMC a sérum
- Použít více koncentrací daného léku
- Používat označení živých a mrtvých buněk
- Vždy mít pozitivní a negativní kontrolu
- Vždy srovnávat se zdravou kontrolou

Děkuji za pozornost

- Poděkování :
 - MUDr. Lenka Sedláčková
 - Mgr. Peter Slanina