

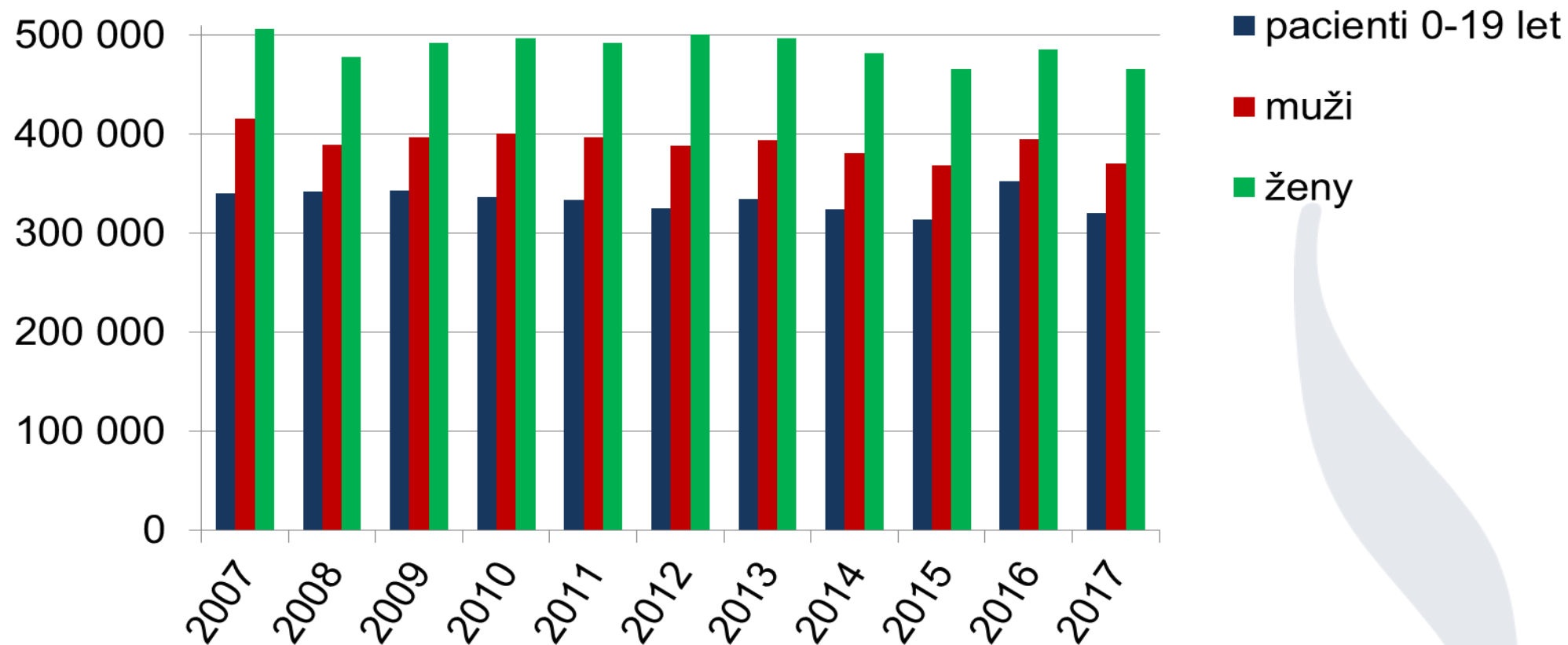
TEST AKTIVACE BAZOFILŮ A JEHO ROLE PŘI SLEDOVÁNÍ DESENZIBILIZACE PACIENTA

Analytická cytometrie X
21.-24.9.2019

**Monika Knoppová
&
Pavla Plačková**

- nepřiměřená odpověď imunitního systému na neškodné cizorodé látky
 - venkovní alergenů: pyl
 - vnitřní alergenů: roztoči, domácí zvířata
 - další alergenů: potraviny, léky, hmyzí jed
- I. Typ – časná přecitlivělost
 - založen na tvorbě IgE
 - lokální/systematický projev

REPORT NZIS - ALERGOLOGIE A KLIN. IMUNOLOGIE, POČET LÉČENÝCH PACIENTŮ



NZIS REPORT č. K/5 (08/2018)

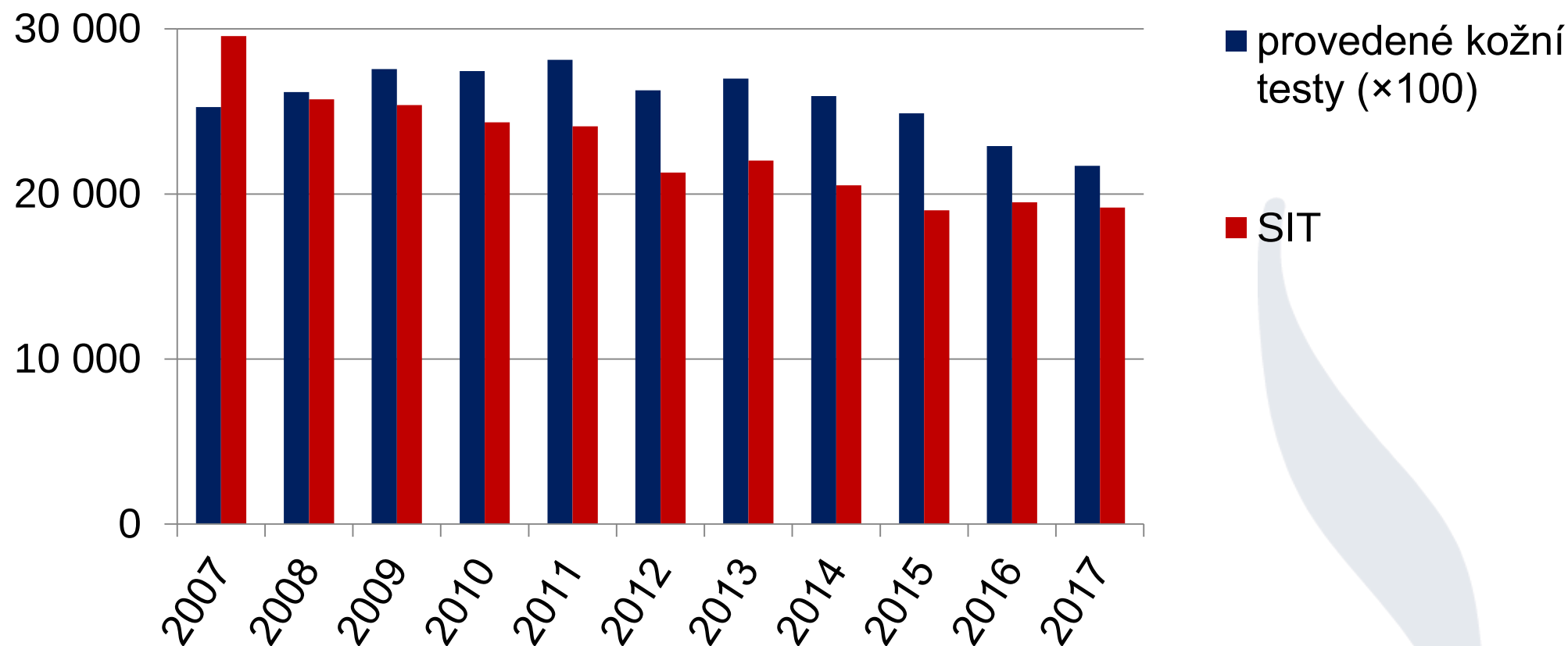
SPECIFICKÁ ALERGENOVÁ IMUNOTERAPIE (SIT)

- publikováno v roce 1911, Leonard Noon
- dlouhodobá aplikace alergenových extraktů za účelem nastavení imunologické tolerance u jedinců s neúměrnou odpovědí imunitního systému na daný alergen
- účinná v léčbě alergií na hmyzí bodnutí, u alergické rýmy a bronchiálního astmatu
- aplikace: subkutánní (depotní alergeny ve vazbě na adjuvans)
sublinguální (kapková vs. tabletová forma)

Reakce na bodnutí	Kožní testy/specif. IgE	Indikace léčby SIT
těžká anafylaktická reakce	pozitivní negat	ano ne
středně těžká anafylaktická reakce (hypotenze, kopřivka, dyspnoe...)	pozitivní	ano
lehká anafylakt. reakce	pozitivní	ne
velká reakce v místě vpichu	pozitivní	ne

Med. praxe 2011; 8(10): 407–409

REPORT NZIS - ALERGOLOGIE A KLIN. IMUNOLOGIE



NZIS REPORT č. K/5 (08/2018)

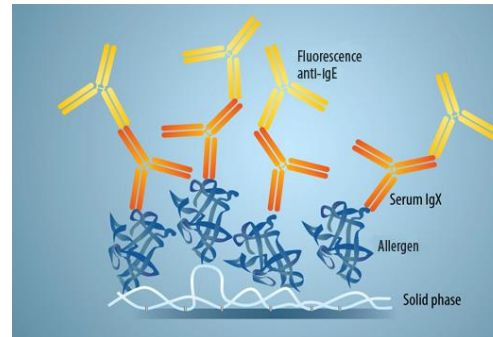
Diagnostika alergických reakcí

Skin prick test (SPT)



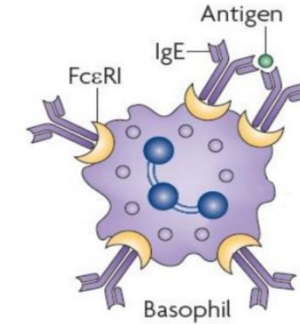
Zdroj: London Allergy and Immunology Centre

Testování sIgE



Zdroj: ThermoScientific

BAT – test aktivace bazofilů



Karasuyama H. et. al. Nature Reviews Immunology 2009;9:9-13
Schroeder JT. Middleton's Allergy Principle and Practice. 8th edition, 2014

- *in vivo* funkční test
- nejčastěji používaný způsob testování
- nejlevnější
- rychlý
- komerčně dostupné alergenů
- možnost testovat řadu alergenů najednou
- náročný na čerstvost stimulačních reagií
- u některých pacientů riziko anafylaktického šoku
- nevhodné pro pacienty s kožním onemocněním

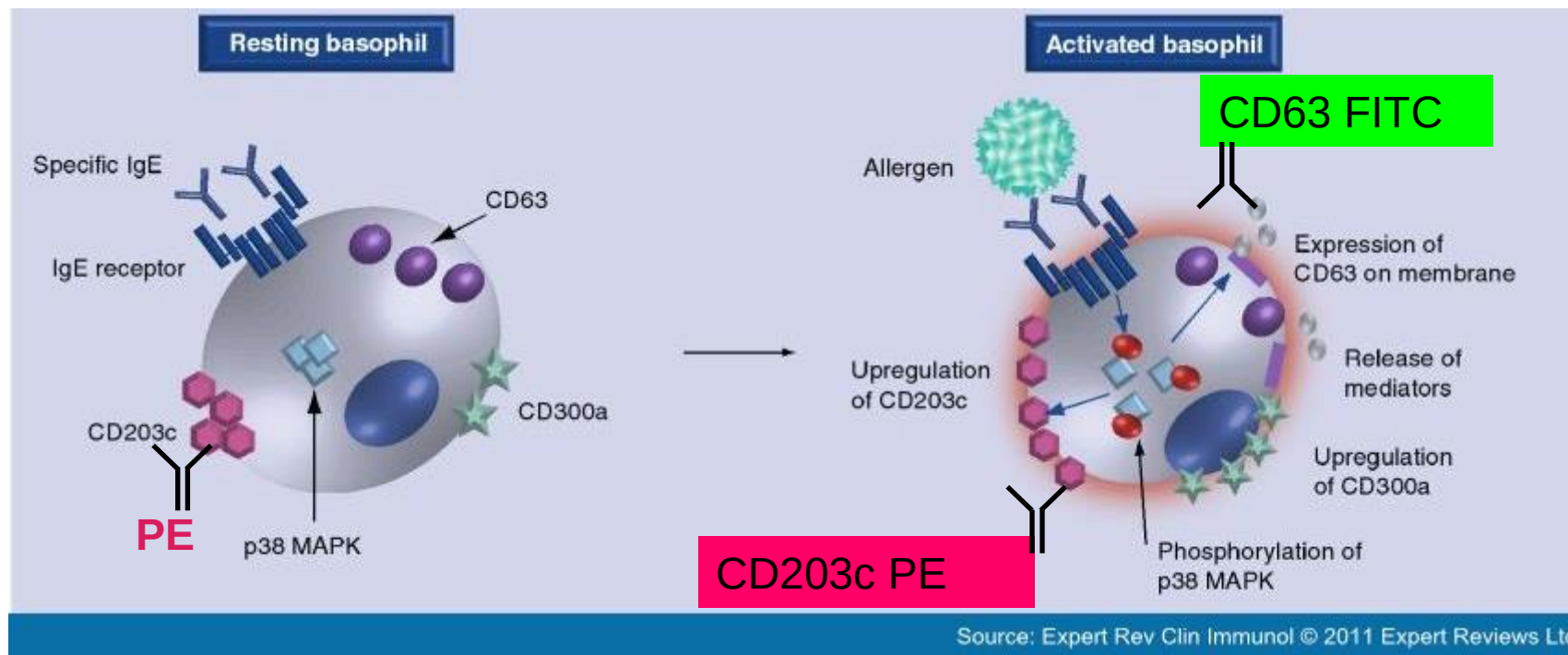
- *in vitro* test
- často používaný způsob testování
- oproti STP jsou náklady výrazně vyšší
- nejširší škála komerčně dostupných alergenů
- středně náročné na vybavení
- značně automatizované
- nutnost zkušených pracovníků při vyhodnocování
- kvantitativní

- *in vitro* funkční test (živé bazofily)
- vysoká specifita (75 - 100%) a citlivost (80 – 95%)
- nehrozí riziko anafylaktického šoku
- může suplovat provokační test bez rizika obtíží pro pacienta
- možnost testovat řadu alergenů najednou
- monitoring imunoléčby
- náročný na vybavení (průtokový cytometr)
- nutnost proškolených pracovníků
- nutnost pracovat s čerstvým krevním vzorkem
- omezená nabídka komerčně dostupných alergenů kompatibilních s detekční sadou
- semi-kvantitativní pro 1-testové stimulační reagentie
- kvantitativní pro produkty s titrační řadou alergenu

Princip testu aktivovaných bazofilů v BasoFlowEx Kitu

BasoFlowEx Kit je určený pro **testování alergické reakce zprostředkované protilátkami IgE** analýzou expozice proteinu CD63 na povrchu bazofilů po jejich stimulaci alergenem v lidské periferní krvi antikoagulované heparinem pomocí průtokové cytometrie.

detekce znaků CD63 a CD203c



exbio

A Brighter Future in Flow

Postup testu BasoFlowEx Kitu (CE-IVD)

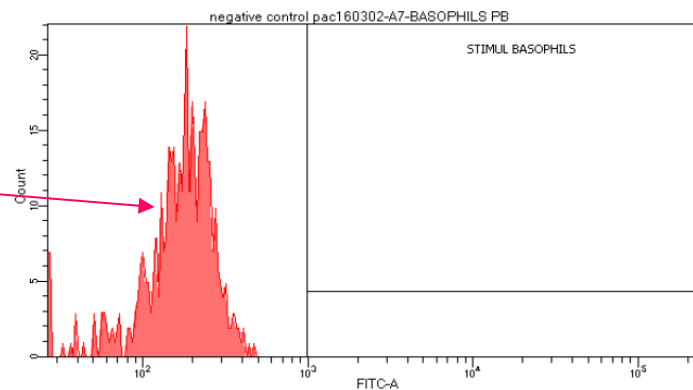
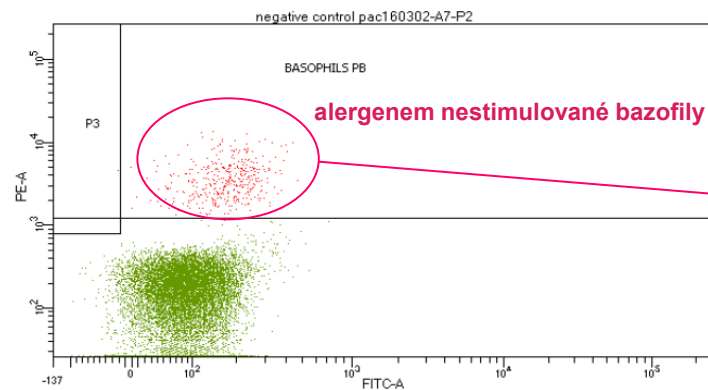
- Alergen inkubujte s heparinovou krví při 37 °C 15 min ve vodní lázni
- Přidejte koktejl protilátek anti-CD63/FITC a anti-CD203c/PE 20 min v lednici
- Lyzujte přidáním 300 µl lyzačního roztoku 5 min, při laboratorní teplotě a 3 ml dH₂O 5 min při LT
- Centrifugujte 5 min, při 300 g
- Odstraňte supernatant a resuspendujte pomocí 0,3 ml PBS
- Vzorky změřte průtokovým cytometrem: - min. 200 bazofilů a 50.000-100.000 událostí,
 - kompenzace fluorescenčních signálů (FITC a PE kanál)



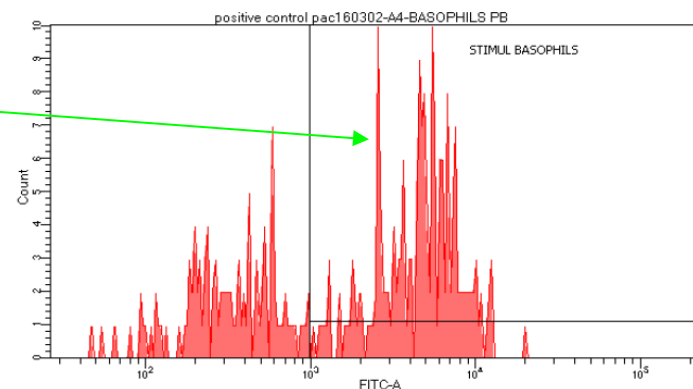
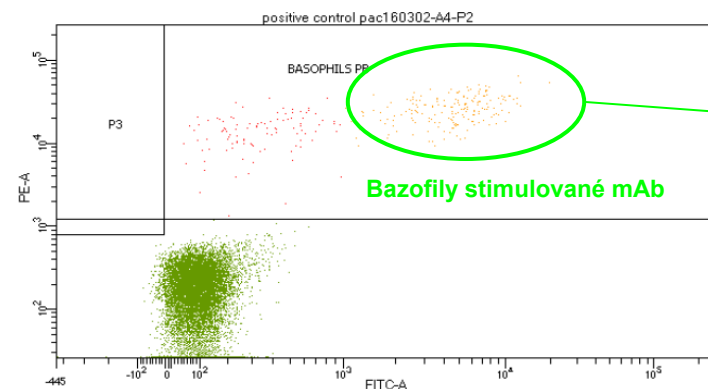
exbio
A Brighter Future in Flow

Analýza testu průtokovým cytometrem

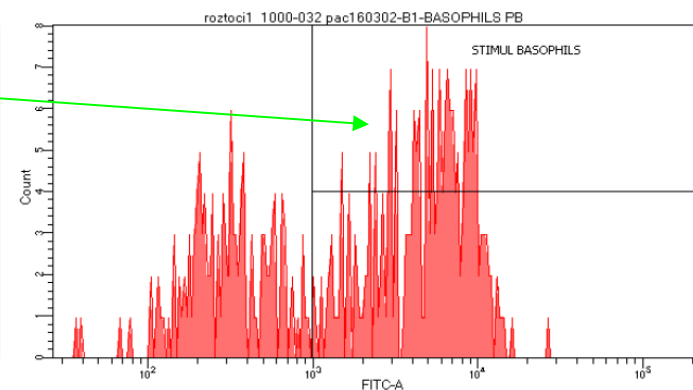
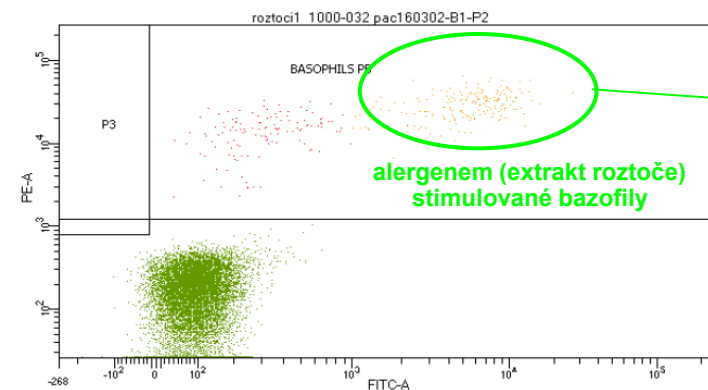
CD203c PE



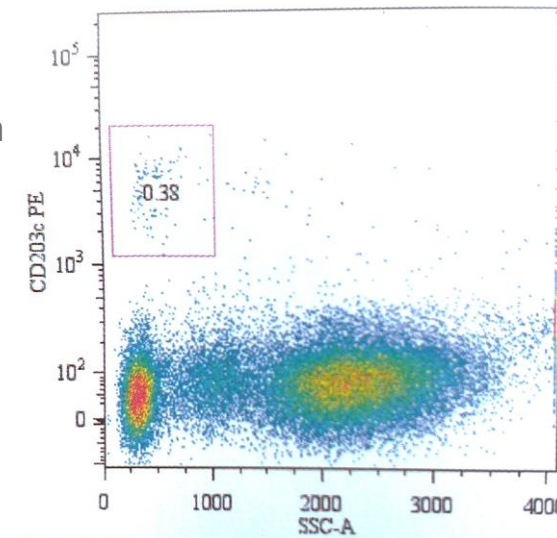
Negativní kontrola



Pozitivní kontrola
(mAb anti-IgE)



Vzorek stimulovaný
alergenovým
extraktem
D. Pteronyssinus
(ED7440)



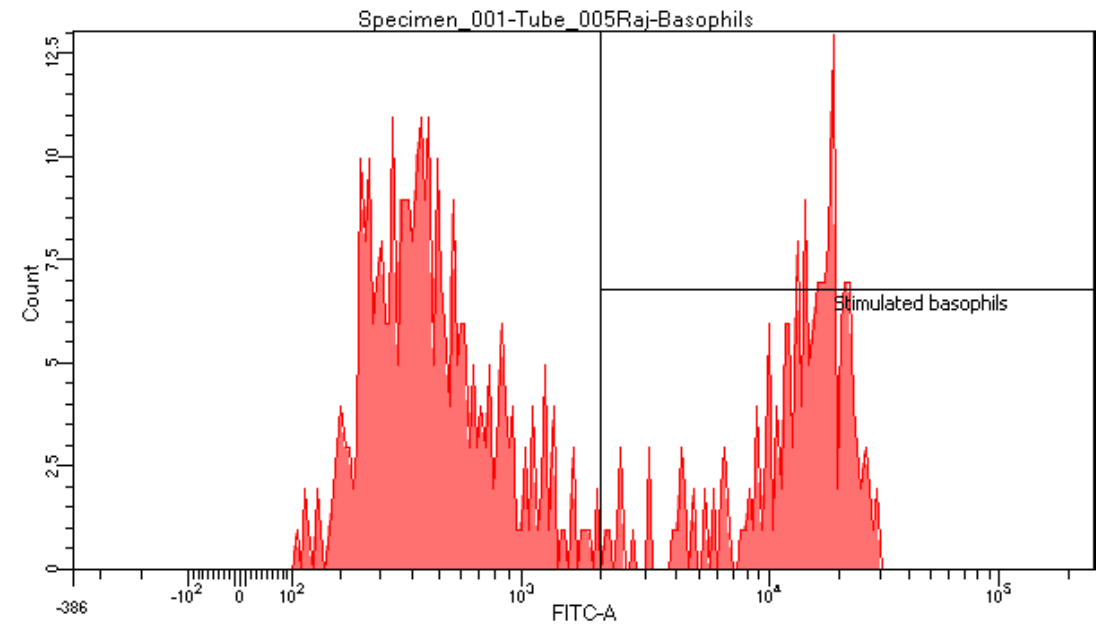
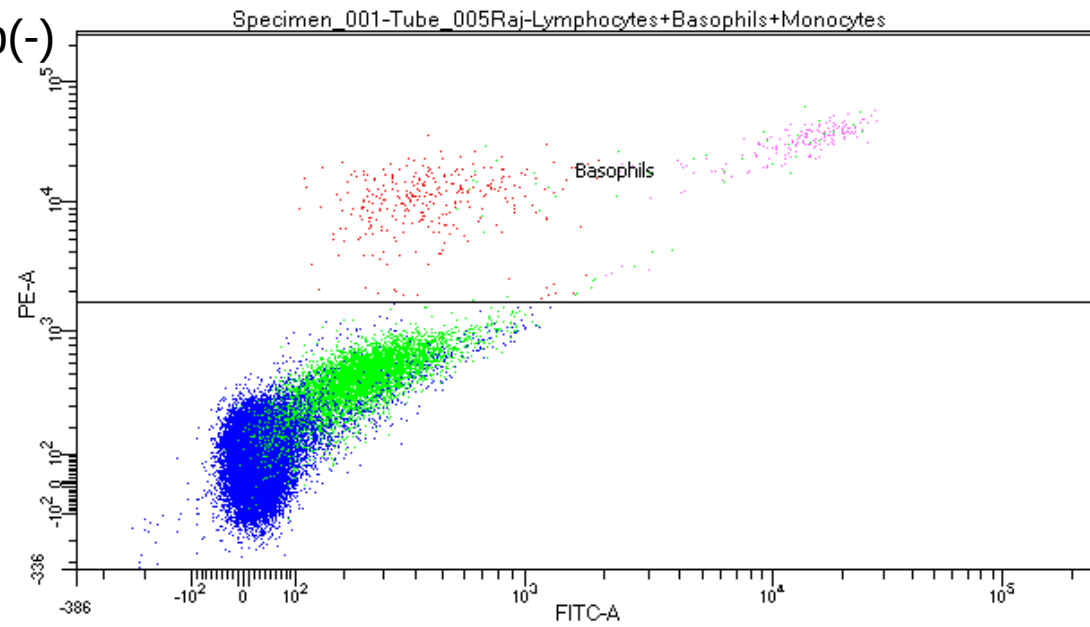
CD63 FITC

exbio

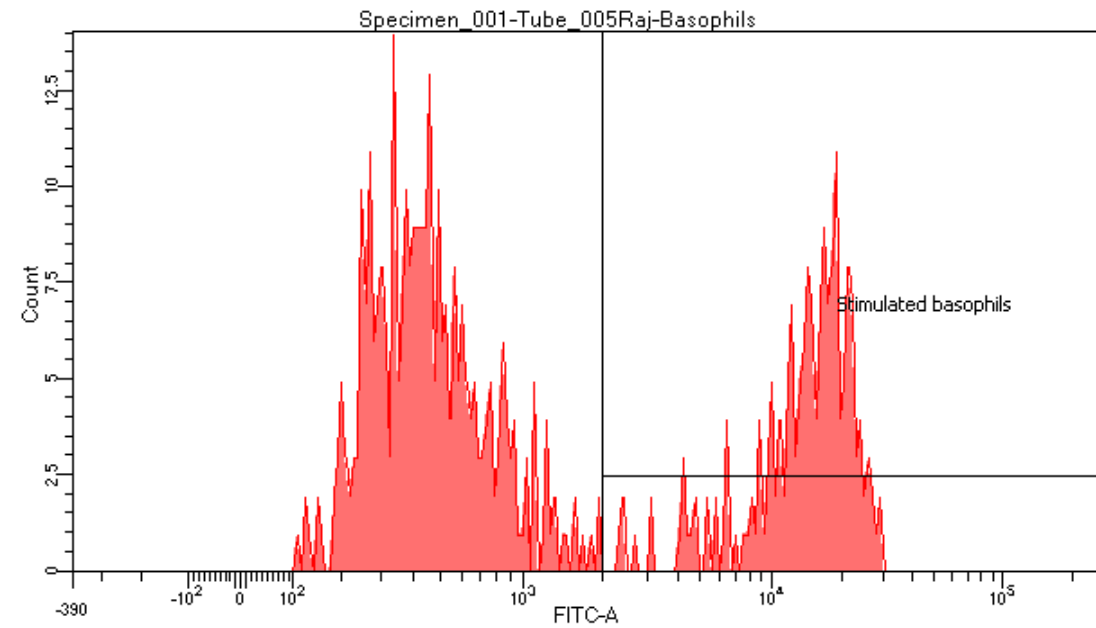
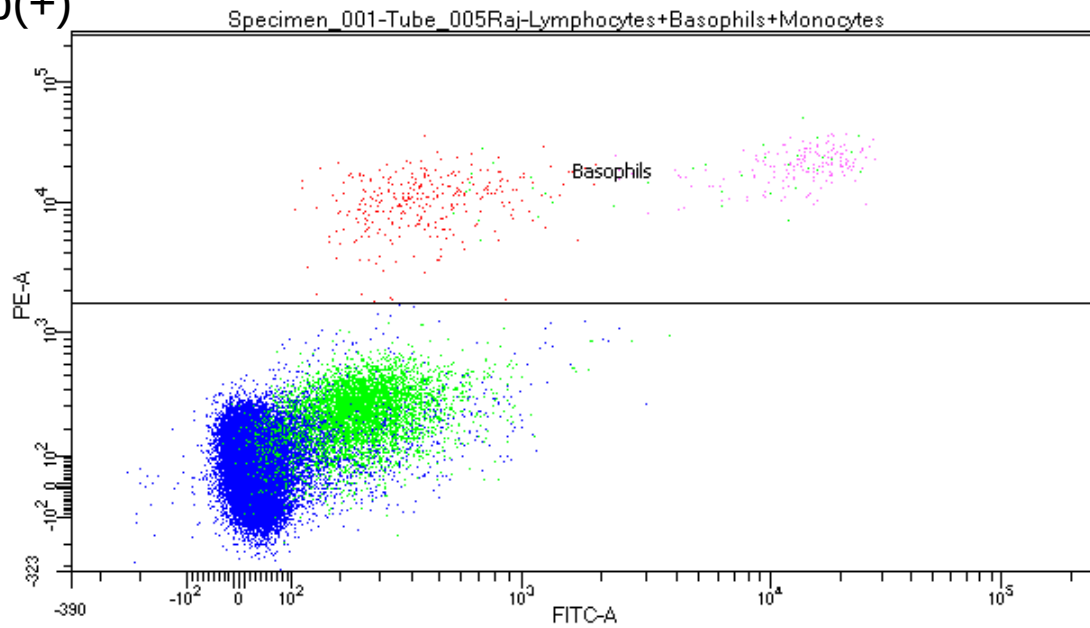
A Brighter Future in Flow

Správné kompenzace:

Comp(-)



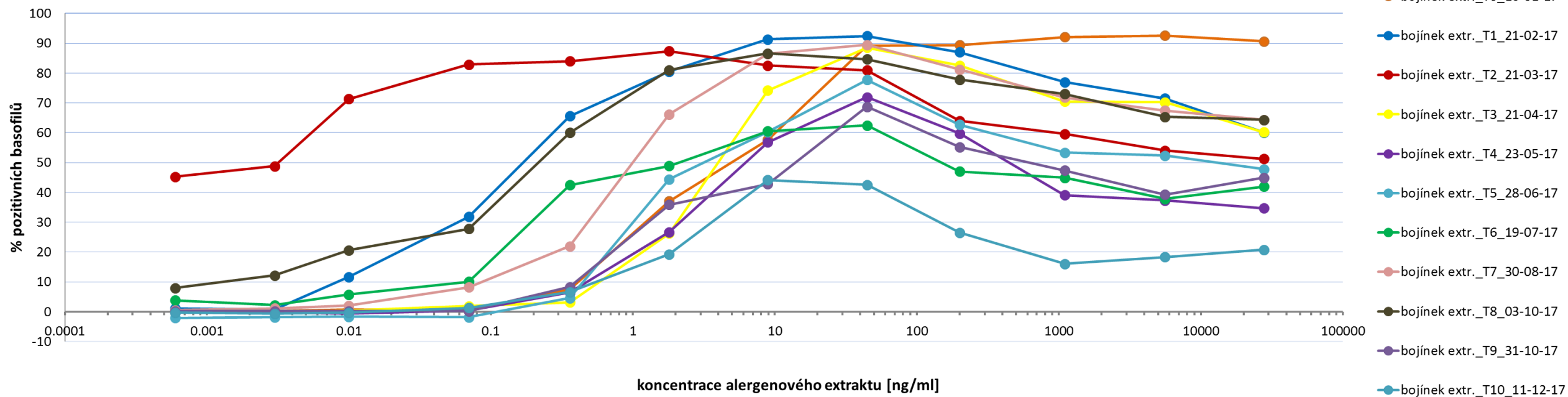
Comp(+)



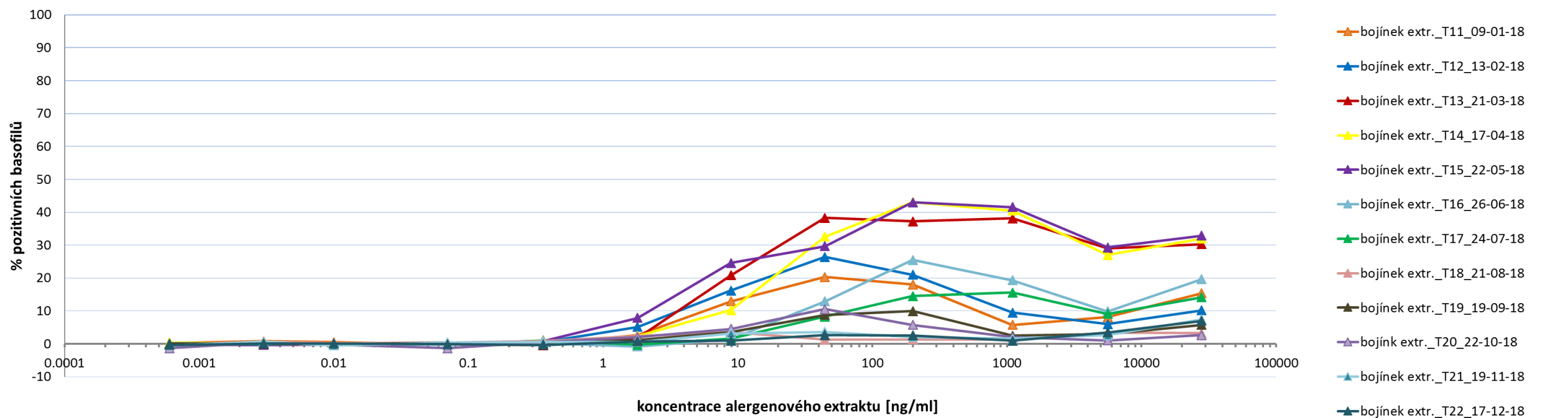
Pacient podstupující imunoléčbu alergie na pyl bojínku lučního

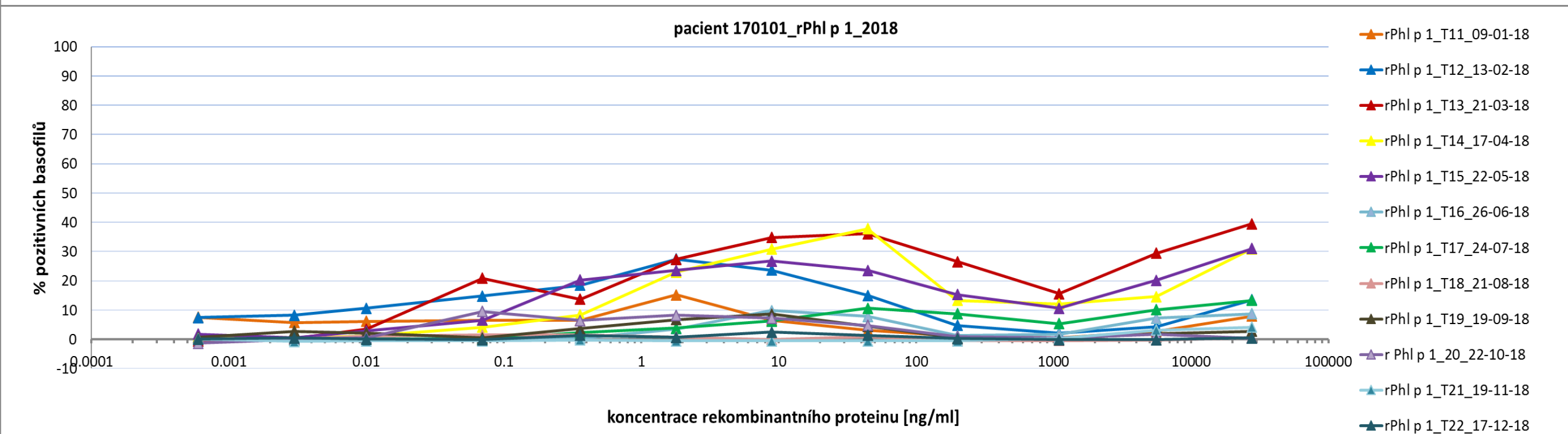
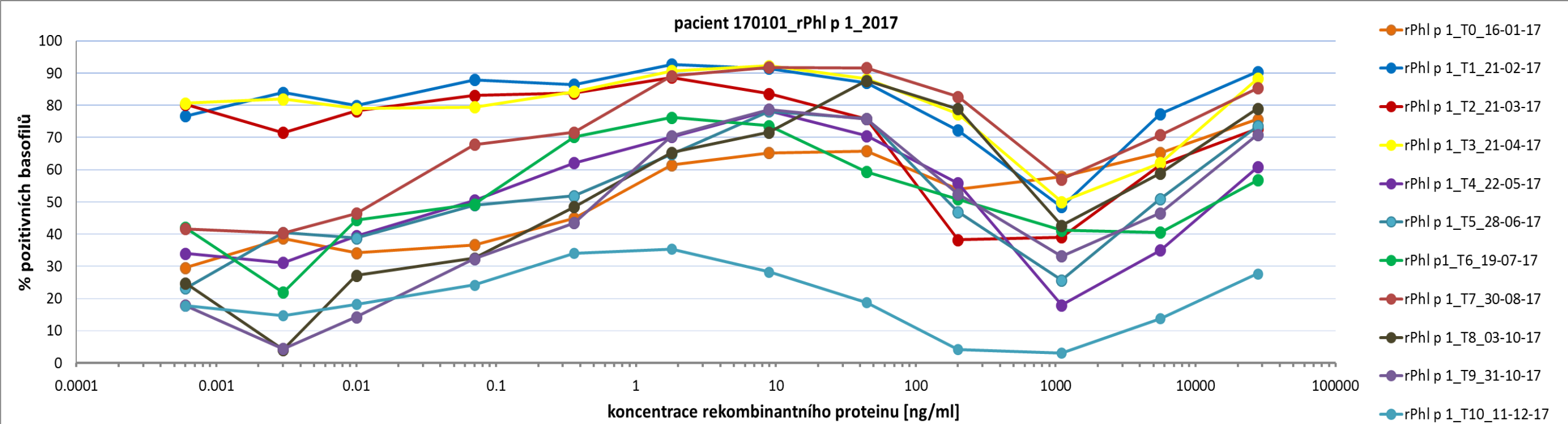
Pacient:	muž
Diagnostikované alergie I. typu:	Bojínek luční, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , další pylové alergie
Metoda stanovení alergie:	sIgE (Imulite)
Zahájení a délka imunoléčby:	16.01.2017, 3 roky (cykly 180 dnů administrace léku/180 klid)
Léčivo:	GRAZAX® (standardizovaný alergenový extrakt z travního pylu bojínku lučního)
Monitoring pomocí BAT:	1 x měsíčně - pomocí extraktu bojínku lučního a tří rekombinantních molekul rPhl p 1, rPhl p 5 a rPhl p 7, - 12-ti bodová titrační řada. Pro každý bod titrační řady jsou prováděna 3 nezávislá měření, ze kterých se následně počítá průměrná hodnota (CD63+ buňky). - realizace BATu v 96-jamkové desce, jímáno 160 bazofilních granulocytů (CD203c+)
Pomocné léky:	2017 Xyzal – 1 x denně (dlouhodobě) Avamys spray – glukokortikoid (příležitostně podle potřeby od 03/2017) Olynth® HA 0,1% (příležitostně podle potřeby) 2018 Aerius – antihistaminikum (příležitostně podle potřeby) 2019 žádné léky

pacient 170101_bojínek extrakt_2017

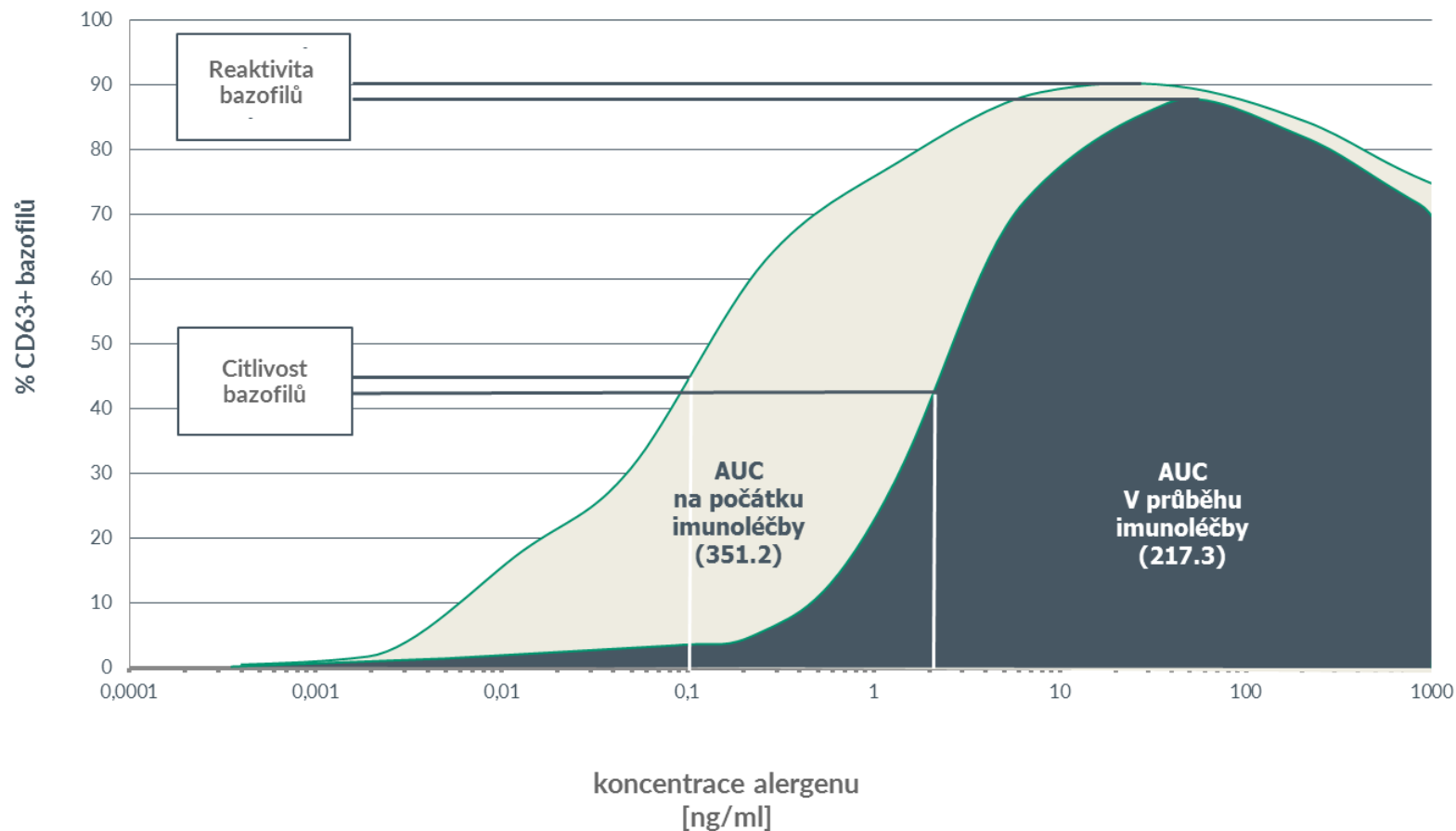


pacient 170101_bojínek extrakt_2018





Hodnocení odpovědi aktivovaných bazofilů v BAT



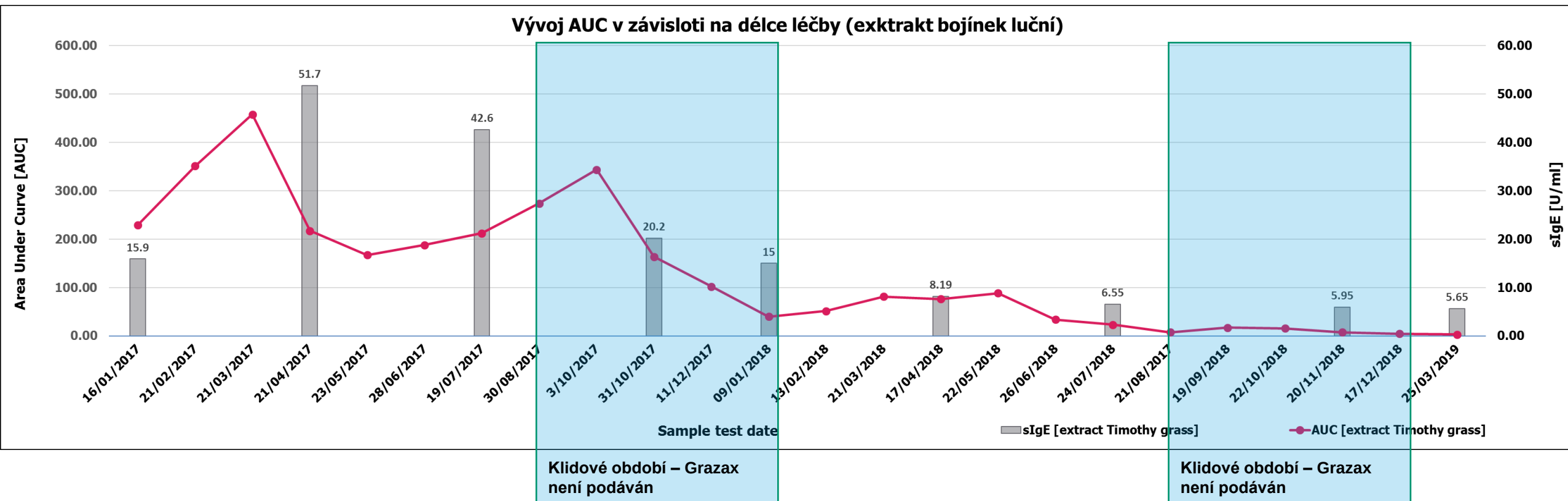
AUC – Area Under Curve
(plocha pod křivkou)

Zdroj: Patil SU. Clin Exp Immunol 2012;167:59
Hoffmann HJ. et. al. Allergy 2015; 70: 1393

Citlivost bazofilů je určena koncentrací alergenu, při které odpověď bazofilů na stimul je poloviční (EC50) v porovnání s maximální odpovědí.

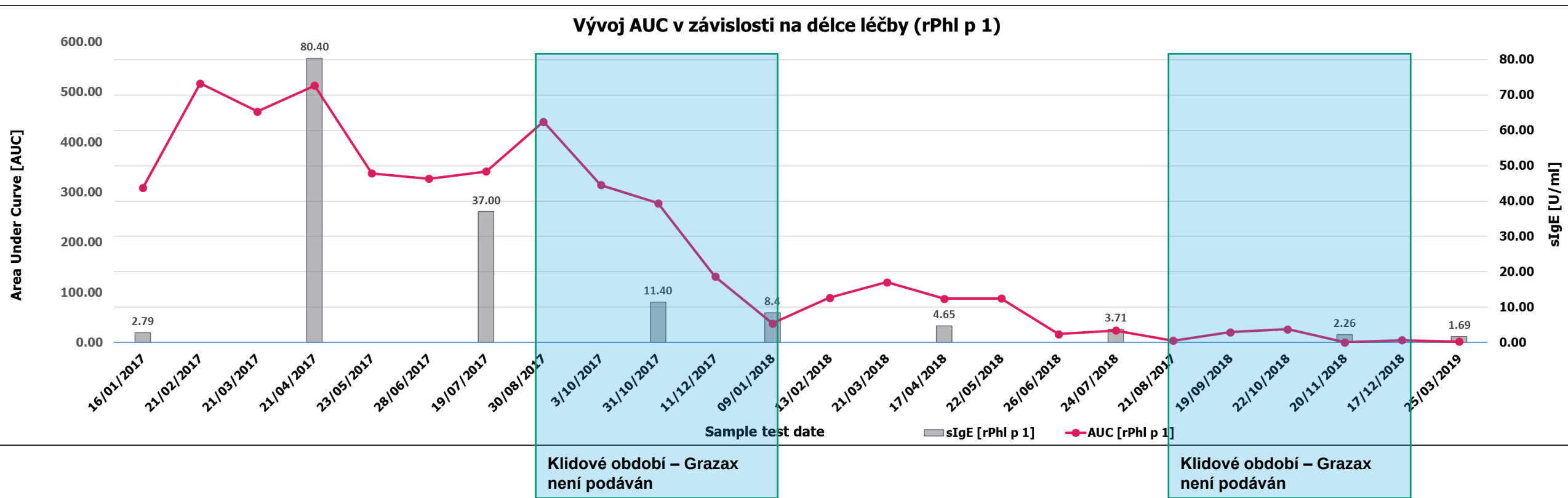
Reaktivita bazofilů je určena koncentrací alergenu, při které dochází k maximální odpovědi bazofilů (CD63+) na daný stimul.

Sledování imunoterapie alergie na bojínek pomocí BAT



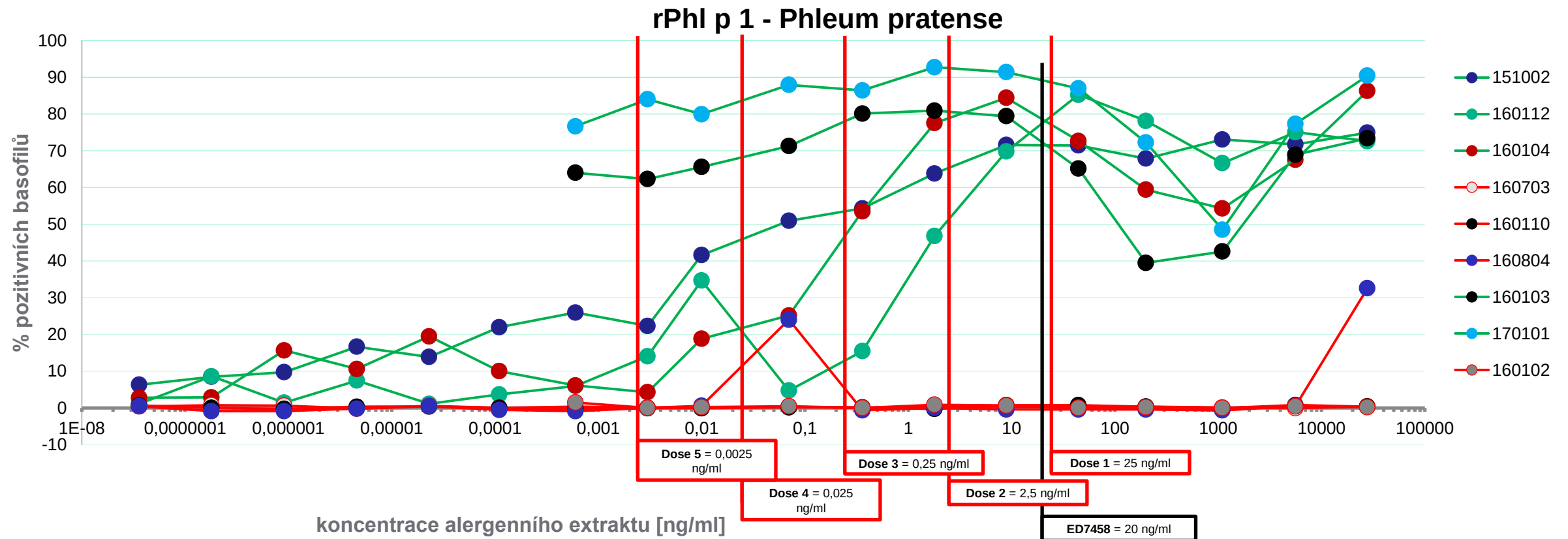
- Plochy pod titračními křivkami (AUC) jsou počítány pomocí softwaru SigmaPlot, verze 13 (Systat Software, USA).
- Specifické IgEs proti pylu bojínku lučního jsou stanovovány každé 3 měsíce za použití ImmunoCAP LAB testování (synlab czech s.r.o.)

Sledování imunoterapie alergie na bojínky pomocí BAT



- Plochy pod titračními křivkami (AUC) jsou počítány pomocí softwaru SigmaPlot, verze 13 (Systat Software, USA).
- Specifické IgEs proti rPhl p 1 jsou stanovovány každé 3 měsíce za použití ImmunoCAP LAB testování (synlab czech s.r.o.)

Sledování imunoterapie alergie na bojínek pomocí BAT



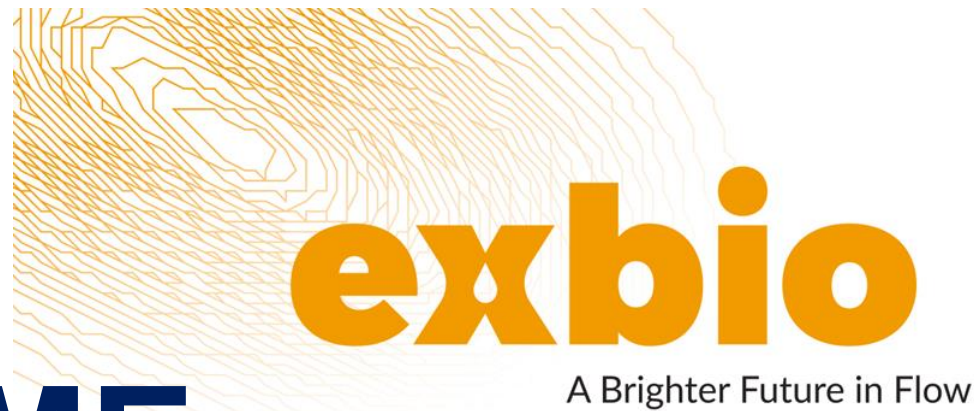
ED7631 rPhl p 1 (g205) Sensitivity Test

ED7632 rPhl p 5 (g215) Sensitivity Test

exbio
A Brighter Future in Flow

- opakovaně po bodnutí včelou, vosou
 - bezvědomí bez otoků a dušnosti a nutnosti hospitalizace
 - dezorientace, pálení sliznic, kůže, samovolná inkontinence moči a stolice
- negace jiných imunologických potíží (subjektivně/laboratorně)
- adrenalinový autoinjektor, pohotovostní balíček (Dithiaden, Medrol, Efedrin)
- plně indikovaná AIT Alutard SQ (2012 – 2017)
 - 801 Apis mellifera (včela medonosná)
 - 802 Vespula spp. (vosa)

		VČELA				VOSA	
	IgE (U/ml)	BAT (%)	IgG4 (mg/l)		IgE (U/ml)	BAT (%)	IgG4 (mg/l)
	< 0,35	< 10	0,2 - 50		< 0,35	< 10	0,2 - 50
14. 09. 2012	1,28 !!	96 !!!			1,46 !!	98 !!!	
23. 11. 2017	0,6 !	35 !	> 50		1,06 !!	22 !	5,1
29. 01. 2019	0,47 !	81 !!!	10,2		0,58 !	48 !!	0,6



DĚKUJEME ZA POZORNOST

Analytická cytometrie X
21.-24.9.2019

