

Burst test (test oxidačního vzplanutí)

Teorie

Test je využíván ke kvantitativnímu vyhodnocení oxidačního (respiračního) vzplanutí fagocytů (především granulocytů). Pro vyšetření se používá plná nesrážlivá krev odebraná do zkumavek s heparinem.

Fagocytující buňky se stimulují pomocí bakterií *E. coli*, fMLP (N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) a PMA (phorbol-myristát-acetát). Dochází k oxidačnímu vzplanutí, při kterém se tvoří reaktivní kyslíkové sloučeniny a radikály, které oxidují dihydrorhodamin (DHR) na rhodamin. Fluorogenní substrát DHR, který se na začátku přidá k buňkám, prochází membránou a sám o sobě není fluorescenčně aktivní. Fluoreskuje až produkt (rhodamin), který vzniká z DHR při oxidačním vzplanutí. Procento granulocytů, ve kterých došlo k oxidačnímu vzplanutí měříme na průtokovém cytometru. Máme celkem 4 zkumavky: neg. kontrola - bez stimulatoru, zjistí se podle ní fluorescence pozadí u daného pacienta, 3 zkumavky se stimulatory (*E. coli*, fMLP, PMA).

Materiál a pomůcky

Plná krev v heparinu, PBS, dihydrorhodamin 123 (DHR123), *E. coli*, fMLP, PMA, zkumavky 5 ml, mikrozkušavky 1,5 ml ("eppendorfy"), vortex, pipety, špičky, ledová lázeň, vodní lázeň 37°C, lyzátor, cytometr.

Postup

1. Plnou krev v heparinu rozpipetovat po **100 µl** do **4 zkumavek**.
2. Všechny zkumavky dát na **5 min** do **ledové lázně**.
3. Naředit roztok PMA: k **16 µl** rozmraženého PMA přidat **270 µl PBS**.
Naředit roztok fMLP: k **15 µl** rozmraženého fMLP přidat **30 µl PBS**.
4. K vychlazené krvi ve čtyřech zkumavkách pipetovat:
 - a. zk.č.1 – **20 µl PBS**
 - b. zk.č.2 – **20 µl** rozmraženého alikvotu *E. Coli*
 - c. zk.č.3 – **20 µl fMLP**
 - d. zk.č.4 – **20 µl PMA**
5. Promíchat.
6. Všechny zkumavky inkubovat **10min** ve vodní lázni při **37°C**.
7. Naředit **DHR** – Nechat rozmraznout zkumavku s **45µl DHR**, přidat **450µl PBS** pro BT, důkladně promíchat na Vortexu.
8. Dát **vychladit PBS** tak, aby byl ledový, ale ne zmrzlý.
9. Po ukončení inkubace přidat ke všem zkumavkám **30µl** naředěného **DHR**. Důkladně promíchat na Vortexu. Nechat inkubovat **10min** ve vodní lázni **při 37°C**.
10. Přidat ke každé zkumavce **2ml ledového PBS** pro BT. Centrifugovat **2000ot/5min**.
11. Slít supernatant, sediment rozmíchat na Vortexu a lyzovat na lyzátoru.
12. Do odečtení uchovávat v ledničce.
13. Odečíst na průtokovém cytometru.

Vyhodnocení

Normální hodnoty při stimulaci - *E. Coli* >70%
- PMA >90%