

Alergie

Alergie - allos = jiný, ergon = reakce

Stav přecitlivělosti (hypersenzitivity) organismu na určitou látku - alergen.

Podstatou je porucha řízení imunitního systému vedoucí k nadměrným reakcím poškozujícím organismus či určité orgány.

Působení alergenů se musí kombinovat s dalšími faktory vnitřními (geny) a vnějšími (zevní prostředí).

V první fázi alergické reakce dochází k senzibilizaci, vytvoření paměťových B-lymfocytů pro tvorbu specifických IgE protilátek. Při druhém a dalším setkání s alergenem již tato reakce probíhá bouřlivě s typickým alergickým až anafylaktickým průběhem.

Typy hypersenzitivních reakcí

Samotné rozdělení je problematické, protože se různé typy překrývají (až 6 různých typů).

I. typ - stavy vyvolané anafylaktickou (časnou, protilátkovou) přecitlivělostí

II. typ - stavy vyvolané cytotoxickou protilátkovou přecitlivělostí

III. typ - stavy přecitlivělosti vyvolané imunitními komplexy

IV. typ - pozdní, oddálená přecitlivělost, DTH (delayed type hypersensitivity) - stav vyvolaný pozdní buněčnou přecitlivělostí



Hypersenzitivita I. typu - anafylaxe - atopie - reakce časného typu

Je to nejběžnější typ alergických reakcí, je především závislá na IgE a v jejím průběhu dochází k masivnímu uvolnění produktů degranulace bazofilů a mastocytů.

1. Senzibilizace (indukční fáze)

a) Prezentace Ag (alergenu) Th2 lymfocytům prostřednictvím antigen prezentujících buněk (APC).

b) Sekrece interleukinů, které aktivují B-lymfocyty k produkci IgE.

c) Vazba IgE (s navázaným Ag nebo bez něj) na membrány bazofilů a mastocytů. Navázáním IgE jsou mastocyty a bazofily senzibilizovány a připraveny k reakci, která nastane při dalším setkání s alergenem.

2. Vlastní reakce časného typu

a) Navázání alergenů na oblasti IgE, které jsou ukotveny na mastocytech a bazofilech (napojit se mohou přímo i protilátky s navázaným alergenem).

b) Přemostění sousedních na buňku navázaných molekul IgE alergenem (k aktivaci mastocytů může docházet i vznikem křížové vazby IgE s alergenem specifickým IgG).

c) Aktivace mastocytů a bazofilů, exocytóza granul, uvolnění histaminu, heparinu aj. Během aktivace mastocytů se syntetizují cytokiny, chemokiny a lipidové mediátory. IL-4 indukuje isotypový přesmyk a další tvorbu IgE, čímž dochází k amplifikaci reakce.

atopie = geneticky podmíněná hypersenzitivita I. typu na vdechnutý nebo polknutý alergen

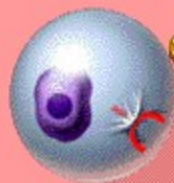
anafylaxe = akutní celková hypersenzitivní reakce I. typu

JAK SE ROZVÍJÍ ALERGICKÁ REAKCE?



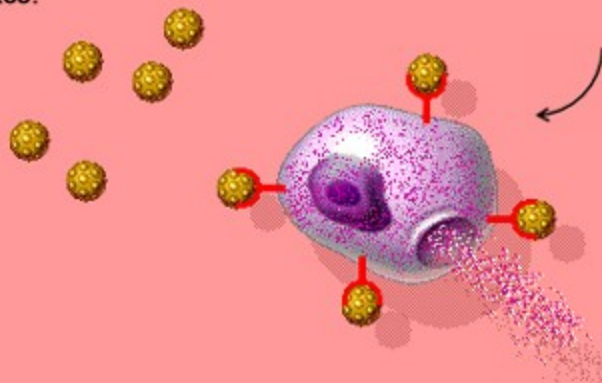
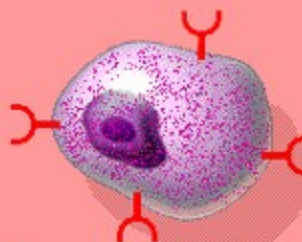
Alergen
(Pylové zrnko)

Alergen se setkává
s buňkou imunitního
systému, která je
schopná vytvářet
protilátky.



Protilátky jsou vytvořeny
a vážou se na buňku
imunitního systému,
obsahující histamin.

Při dalším setkání s alergenem
dojde k obsazení navázaných
protilátek a vyplavení histaminu
z buňky. Histamin má hlavní
podíl na rozvoji alergické
reakce.



Systemová reakce - anafylaktický šok

Reakce antigenů a protilátkami v oběhovém systému a ve všech tkáních.

Protilátky musí být přítomny ve velkém množství - projevy až po mnohokrát opakované imunizaci nebo u vysoce senzibilizovaných jedinců.

Antigeny musí být mnoho, nebo musí být vysoce účinný (vysoká afinita k protilátkám).

Během anafylaxe se uplatňují především IgE u člověka, psa, králíka, krysy a myši a IgG u morčete.

K anafylaxi může dojít i po náhodném proniknutí alergenu do krevního oběhu během hyposenzibilizace („imunizace“), nebo při testování přecitlivělosti.



Hypersenzitivita II. typu - cytotoxická hypersenzitivita

Typická reakce u autoimunitních chorob a imunitní eliminace krvinek a tkání při transfuzi a transplantaci.

Tvorba IgG a IgM, které mají schopnost aktivovat komplement, nebo způsobovat na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC). Fagocyty a NK-buňky vážou Fc-části IgG - rozpoznání buňky označené protilátkami a její likvidace svými cytotoxickými mechanismy.

Možnou příčinou jsou děje navazující u některých přecitlivělých jedinců na nákazy určitými viry, bakteriemi nebo parazity. popř. odpovědi na podávání určitých léků (neimunogenní složka infekčního agens nebo lékový metabolit se napojí na buněčnou membránu a vzniklý komplex projeví imunogenní vlastnosti, jindy se na membránu naváže komplex cizorodých složek s protilátkami).

Vlastní cytotoxická reakce může být vyvolána různými mechanismy.

a) Protilátky proti povrchovým strukturám buněk aktivují komplement, který způsobí lýzu buněk.

b) Destrukce cílových buněk může být zprostředkována ADCC, při níž efektorové buňky s navázanou protilátkou přes Fc fragment vyvolají cytotoxickou reakci s produkcí perforinu, TNF, případně reaktivních radikálů kyslíku při ox. vzplanutí.

c) Protilátka může působit jako opsonin a aktivovat fagocytózu, která je uskutečňována především neutrofilními granulocyty, v menší míře makrofágy a eozinofily, pokud mají receptory pro IgM, IgG, nebo C3 složku komplementu.

Klinické příznaky se projevují, jakmile cytotoxická reakce poškodí kritické množství tkáně a vyvolá dysfunkci atakovaných buněk či tkání. První reakce se mohou objevit po 5 až 8 hodinách.



Hypersenzitivita III. typu

Reakce spojené s tvorbou imunokomplexů

Podobná reakci typu I, ale způsobena protilátkami IgG a IgM. Protilátka s antigenem tvoří imunokomplexy. V závislosti na jejich množství, velikosti, struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech může dojít místo eliminace fagocytujícími buňkami k jejich ukládání do tkání. Imunokomplexy se pak vážou na Fc receptor fagocytů nebo aktivují komplement, který spouští kaskádu poškozujících reakcí, v níž hlavní roli hrají přilákané neutrofily a pomocnou úlohu mají aktivované mastocyty. Dochází k zánětu, který může při přetrvávání velkých nefagocytovatelných komplexů přecházet do chronického stavu.

2. Imunokomplexy během vaskulitidy (zánětu cévy)

Zvláštním typem reakce je sérová choroba. Může se objevit po aplikaci velkých dávek antigenu (léčebné použití heterologních antisér). **Příčinou vzniku je zvýšená tvorba imunokomplexů perzistujícího antigenu a nově vytvořených protilátek.** Obvykle se objevuje 5 až 15 dní po aplikaci a způsobuje vaskulitidy, glomerulonefritidy a artritidy, tím může maskovat perzistentní infekci, proti níž bylo léčebné sérum použito. **Morfologicky lze v cévách postižených oblastí prokázat poškození imunokomplexové povahy. Masívní ukládání komplexů je provázeno granulocytopenií a poklesem komplementu.** U části případů se účastní i anafylaktické mechanismy podmíněné faktory krevních destiček, mastocytů a granulocytů. Při značném nadbytku antigenu v komplexech probíhá onemocnění mírněji, při mírném nadbytku antigenu a při rovnovážném stavu mezi antigeny a protilátkami hrozí prudký průběh.



Hypersenzitivita IV. typu - pozdní, zprostředkovaná buňkami

Tento typ lokální reakce je způsoben zánětlivou reakcí závislou na Th1 buňkách a makrofázích. Po intradermální, nebo kontaktní aplikaci antigenu nastává maximální reakce po 24 až 72 hodinách proto, že do místa vpichu musí nejprve migrovat Th1 buňky a makrofágy a vzájemně se stimulovat.

Senzibilizace spočívá v prezentaci antigenu Th lymfocytům a jejich přeměně v lymfocyty typu Th1. Senzibilizované lymfocyty po další aktivaci antigenem zahájí vlastní reakci produkcí cytokinů, které vtahují do místa reakce makrofágy a aktivují je ke zvýšené fagocytární aktivitě a lytických enzymů. Vzniká tvrdý otok způsobený buněčnou infiltrací. Tato reakce je normálně namířena proti intracelulárním parazitům, které aktivované makrofágy dokáží usmrtit. Pokud se tak z různých důvodů nestane, dochází později k lokálnímu poškození tkáně až k nekrotám.

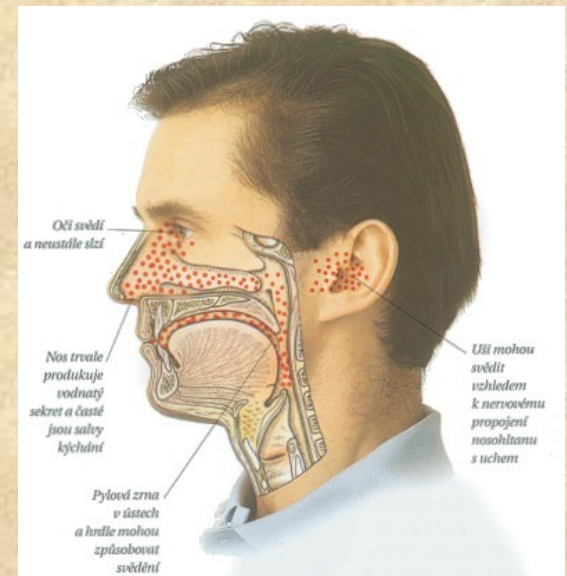


Hypersensitivity 4

Diagnostika alergií

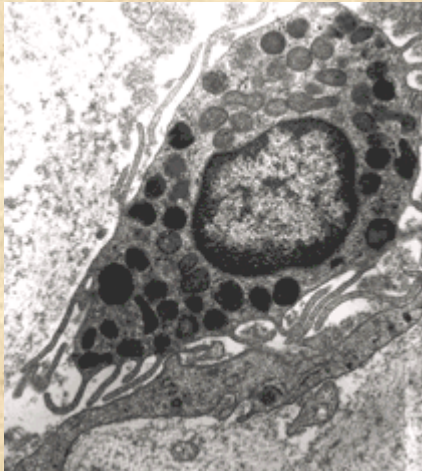
Diagnostické postupy použitelné v praxi při vyšetřování alergických onemocnění a při zvažování indikace alergenové imunoterapie musí splňovat jisté předpoklady. Musí to být testy:

- **detekující časný typ alergie (IgE)**
- **relativně spolehlivé (co nejvyšší senzitivita a specifita)**
- **vhodné pro rutinní práci (cena, rychlost)**
- **dostupné (nároky na vybavení)**
- **bezpečné pro pacienta.**



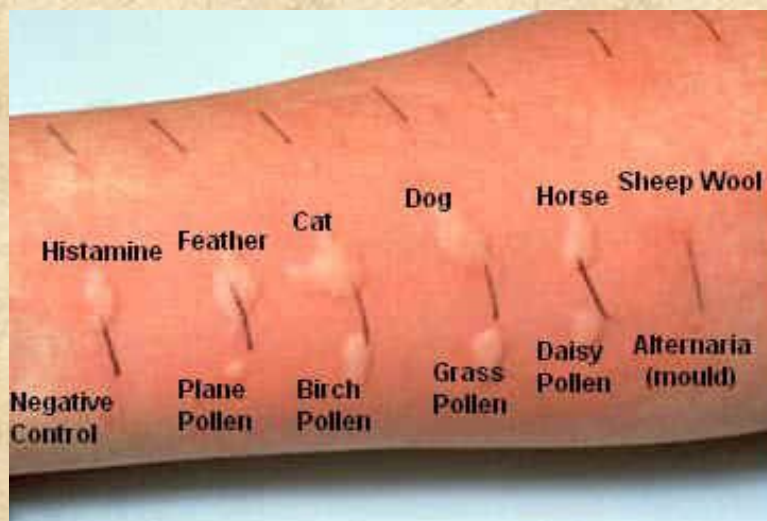
Kožní testy

Kožní testy prováděné s určitým alergenem zjišťují přítomnost specifických IgE protilátek vůči tomuto alergenu, navázaných na kožních mastocytech. Pokud se příslušný alergen váže na specifické IgE protilátky fixované na povrchu mastocytů, dojde k aktivaci a uvolnění mediátorů. Vazoaktivní mediátory vyvolávají lokální edém (kožní pupen), erytém (zarudnutí) a pruritus (svědění). Tyto příznaky se zpravidla začínají projevovat 5 minut po testu a maximální reakce je zjišťována mezi 10 - 20 minutami po provedení testu.



Stejně jako u dalších popisovaných diagnostických postupů je nutno zdůraznit, že **neplatí rovnice: pozitivní kožní test = průkaz alergie**. **Senzitivita a specifita kožních testů** je však velmi dobrá - pohybuje se obvykle mezi **80-90 %**.

Kožní testy jsou zejména vhodné pro diagnostiku alergie na inhalační alergeny nebo alergie na hmyzí bodnutí. U potravinových alergií bývá senzitivita a specifita kožních testů nižší. U alergií lékových je situace komplikovanější vzhledem k tomu, že se často nejedná o reakci zprostředkovanou IgE.



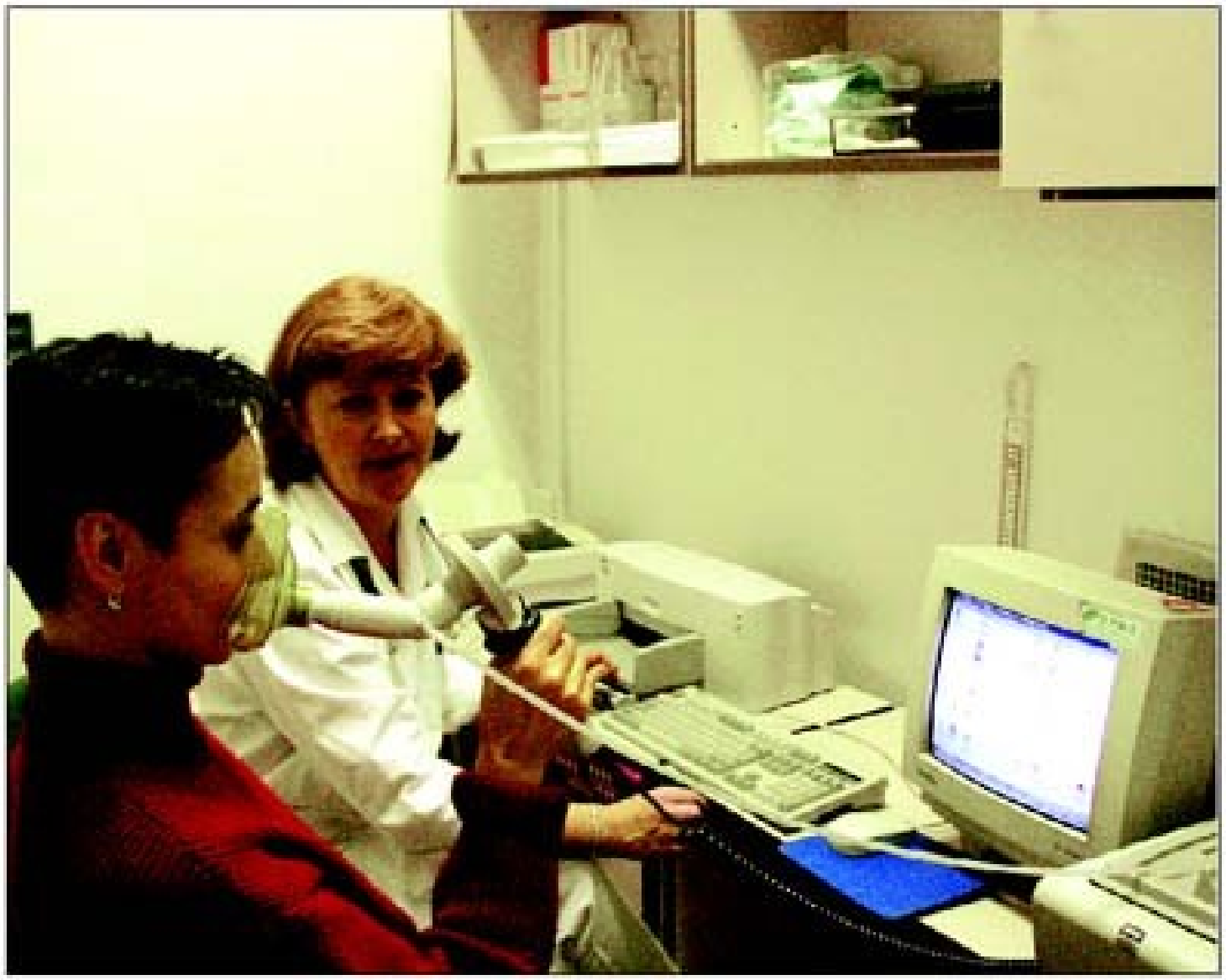
Expoziční (provokační) testy

Podstatou tohoto testu je vyvolat příznaky alergie tím, že vystavíme pacienta kontaktu s podezřelým alergenem. **Jestliže reakce vznikne, je to potvrzení toho, že zkoušený alergen je příčinou pacientových obtíží.**

Při expozičním testu s potravinovým nebo s poléťavým alergenem se provede rovněž slepý test s neškodnou látkou. Ani pacient ani člověk, který reakci hodnotí, neví, která látka je která (dvojitě slepá kontrolovaná studie s placebem). **Expoziční test se využívá při potravinové alergii jako následné vyšetření po kožních testech.** Test by se nikdy neměl provádět bez pečlivých předběžných zkoušek na tváři a rtech, a při vlastním expozičním testu je třeba začínat pouze s nepatrným množstvím potravy. **V oblasti lékových alergií je expoziční test mnohdy jediným možným způsobem objektivizace diagnózy.**

K expozičním testům patří dále **spojivkový test**, kdy se roztok alergenu vkapává do spojivkového vaku jednoho oka, **intranasální test**, který se provede vkápnutím roztoku alergenu do jednoho nosního průduchu a **bronchoprovokační test**, kdy pacient vdechuje prostřednictvím inhalátoru testovaný alergen. Tyto testy jsou používány méně často. Důvodem pro to jsou otázky na nezbytnost takovýchto postupů při poměrně vysoké spolehlivosti kožních testů a laboratorních diagnostických postupů pro inhalační alergeny. Zejména u průduškových specifických provokací nastupují pochybnosti o bezpečnosti (astmatický záchvat) a míře senzitivity a specifity tohoto testu. Přesto mají tyto testy své opodstatněné indikace, například v oblasti profesních alergóz.





Laboratorní metody

V rámci screeningu může první informaci vedoucí k diagnóze alergózy přinést stupeň eozinofilie v krevním obraze nebo hladina celkových IgE protilátek.

Eozinofilie

Vyšetření diferenciálního počtu eozinofilů (větší výskyt při alergiích). **Za zvýšené hodnoty se považuje počet eozinofilů nad $0,35 \times 10^9/l$.**

Celková hladina IgE

Kvantifikace celkové hladiny IgE protilátek je prováděna řadou laboratorních metodik. Pouze nejkvalitnější techniky (EIA, FEIA-enzymová imunoanalýza s fluorescenční detekcí, chemiluminiscence) dosahují prahové citlivosti kolem 0,5 U/ml (kU/l) (=1,2 ng/ml) a optimální přesnosti v rozsahu asi 7,5 - 50 U/ml (18 - 120 ng/ml). To je třeba mít na mysli zejména u vyšetřování novorozenců a malých dětí. U dospělých je naopak nutno sérum příslušně naředit.

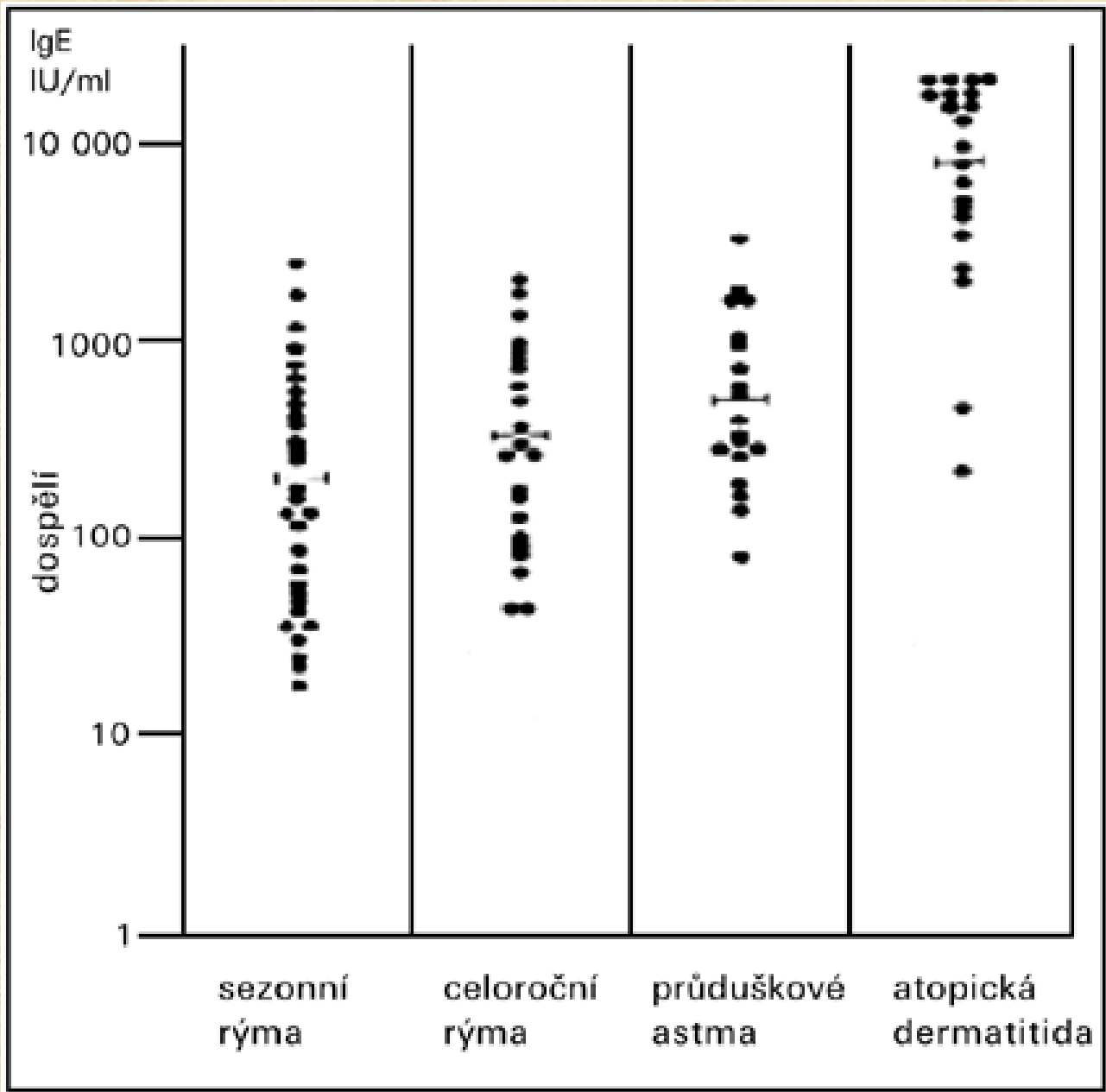
Výpovědní hodnotu hladiny celkových IgE protilátek snižuje vysoká horní hranice normálu, která bývá obvykle definována v rozmezí 2SD. Distribuce hodnot v populaci je velmi šikmá. Hladiny závisejí na věku (vzestup do 5. - 7. roku věku).

Za normální u novorozenců se považují hladiny do 0,7 U/ml. U dětí signalizuje již hladina +1SD výrazně zvýšené riziko vývoje alergózy. **Normální hladina IgE nevylučuje přítomnost alergózy. Při již stanovené diagnóze alergózy nepřinášejí vyšší hladiny IgE žádnou další informaci.**

	Průměr	+ 1SD	+ 2SD
Novorozenec	< 12	< 12	< 12
1 - 11 měs.	< 12	12	56
1 rok	< 12	15	83
2 - 4 roky	< 12	33	130
5 - 80 let	20	85	367

Hladiny zvýšené nad +2SD bývají často u osob s polyvalentní alergií na více alergenů a s výskytem různých alergických symptomů. U osob alergických na 1 alergen a s postižením pouze 1 orgánu jsou často hladiny v normě. **Výskyt alergických projevů na kůži (atopická dermatitida) a gastrointestinálních projevů zvyšuje pravděpodobnost zvýšené sérové hladiny IgE.** U atopické dermatitidy nejsou vzácné extrémní hladiny. **Frekvence zvýšené hladiny celkového IgE je vyšší u alergie pylové než u alergie na roztoče a plísň.** Při vyloučení parazitárního postižení je specifická zvýšená hladina IgE pro alergózu velmi vysoká (asymptomatický pacient - prealergický stav).





Stanovení specifických IgE

Provádí se u pacientů, u kterých nelze provést kožní test. Stanovují se specifické IgE protilátky proti širokému spektru alergenů. Vyšetření metodami vysokoafinitní FEIA (CAP systém), chemiluminiscenční analýza (IMMULITE), ELISA.

Stanovení specifických IgG

Pozitivita specifických IgG je dnes považována pouze za průkaz předchozí expozice alergenu či alergenů u pacientů, u kterých kožní testy i specifické IgE tzv. nevycházejí. U alergií na jed blanokřídlého hmyzu se někdy setkáváme s negativitou jak kožních testů tak specifických IgE, navzdory těžkým alergickým reakcím. Totéž platí také pro alergie na plísně a potraviny, méně potom na některé další inhalační alergeny - upřesnění stanovením IgG (EIA).

Hladina alergen-specifických IgE protilátek

Prototypem těchto testů je **RAST** (radioalergosorbent test). **Alergen je navázán kovalentní vazbou na nitrocelulóзовou pevnou fází, kterou bývá papírový disk.** Tento disk je inkubován s vyšetřovaným sérem, přičemž dochází k vazbě specifického IgE ze séra na disk. Po promytí disku je provedena druhá inkubace s protilátkou proti IgE, která je značena izotopem jodu 125. Intenzita navázané radioaktivity je pak přímo úměrná množství specifického IgE ve vyšetřovaném vzorku.



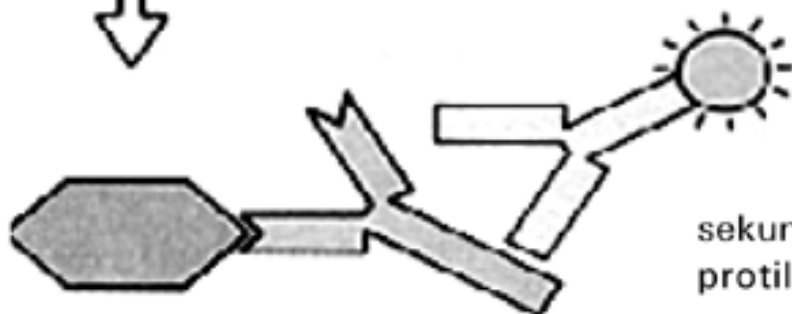
"You should have told me you have a cat allergy - I cannot sleep without them"



alergen navázaný na pevné fázi



IgE z vyšetřovaného séra



sekundární značená
protilátka

U těchto technik jsou používány různé pevné fáze k navázání alergenů, různé alergeny, různé enzymy k označení protilátek proti IgE, různé substráty a z toho vyplývající různé systémy detekce výsledného signálu. Rovněž jsou používány různé systémy standardů pro kalibraci. Z toho vyplývá, že **každá technika má svá vlastní kritéria pro hodnocení.**

První používanou pevnou fází byla nitrocelulóza. Vazba na antigen je stabilní, ale má i své nevýhody. Jednak může dojít k zamaskování některých epitopů antigenu a jednak dochází k nespecifické vazbě IgE na nitrocelulózu v případě, že hladiny celkového IgE jsou vysoké.

Navázání antigenu na pevnou fázi v trojrozměrné podobě je významným zlepšením techniky. Alergen je v tomto případě navázán na hydrofilní derivát celulózy. Tento systém má schopnost vázat třikrát více bílkoviny alergenu než papírový disk. Tato technika je uváděna pod označením **CAP System.**

Jiným zlepšením původní metody je navázání antigenu v kapalně fázi. Toho je využito při technice **AlaSTAT**.

Jsou také používány různé enzymy ke značení anti-IgE protilátek. Například beta-galaktosidáza získaná z *E. coli* při RAST Phadezym technice, alkalická fosfatáza z *E. coli* (FAST), křenová peroxidáza (AlaSTAT) atd. Bylo prokázáno, že **charakter enzymu hraje důležitou úlohu pro detekci zejména protilátek proti potravinovým alergenům**. Použití alkalické fosfatázy (např. FAST) snižuje citlivost techniky zejména pro potravinové alergeny rostlinného původu (ovoce, zelenina). Naopak galaktozidáza (např. RAST Phadezym) snižuje senzitivitu pro potravinové alergeny živočišného původu (zejména mléko). Je velmi pravděpodobné, že **charakter použitého substrátu hraje rovněž nezanedbatelnou roli**. Například substrát použitý při FAST technice je nevhodný pro stanovení protilátek proti celeru a jiné kořenové zelenině.

CAP

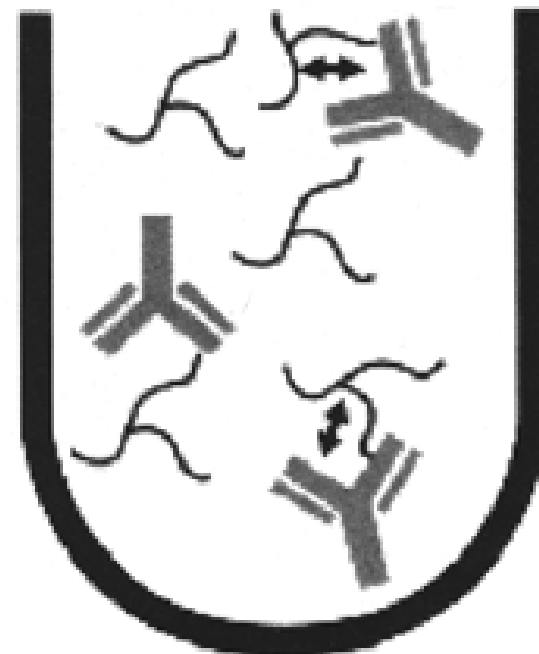
AlaSTAT

Vazba IgE na alergen
v pevné fázi



- vazba je omezena na
povrch pevné fáze

Vazba IgE na alergen
v kapalně fázi



- reaktanty jsou mobilní a
všude v dobrém vzájemném
kontaktu

Různé techniky používají různé protilátky anti-IgE - monoklonálních i polyklonálních. Liší se i v systému detekce: radioimunoassay, fluorescenční alergosorbent test (FAST) atd. Důležité hledisko moderních technik je trend k vysoké automatizaci.

Významným problémem je výběr standardů pro kalibraci. Mohou to být séra obsahující specifické protilátky proti pylu břízy (RAST), jílku (FAST) apod. CAP používá jako standard celkový IgE.

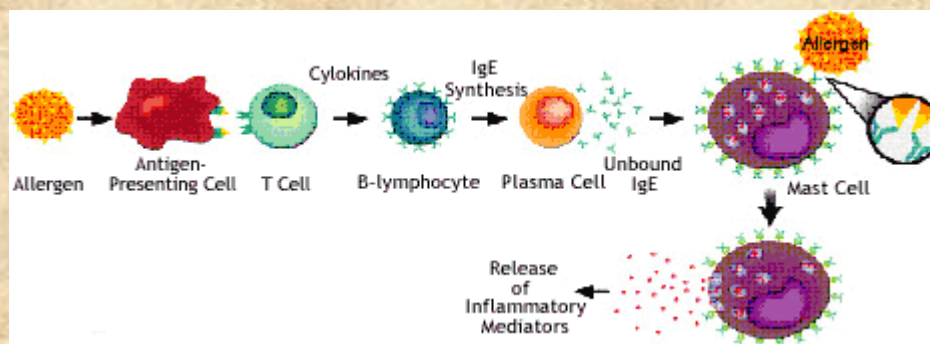
Vzhledem k těmto výše uvedeným odlišnostem **jsou i rozdíly ve výsledcích u různých technik velmi časté.**

Specifita testu, tedy vlastnost testu, že není falešně pozitivní, nesmí být zaměňována s pozitivitou na zkříženě reagující alergeny (nejčastěji pyly, ovoce, zelenina), která se nemusí projevovat klinicky. Specifita RAST testu je výborná - kolem 95 %. Specifita FAST testu je o něco nižší. Přítomnost specifických IgE protilátek proti určitému alergenu však není vyloučena ani u asymptomatické osoby.

Senzitivita (citlivost) testů se pohybuje u nejkvalitnějších technik **kolem 75 %**. Některé antigenní složky mohou z komerčně dostupných preparátů vymizet, a tím způsobit falešně negativní výsledek.

Výsledkem testů nejsou skutečné koncentrace:

- obsah specifických protilátek v séru je často vyšší než vazebná kapacita alergenu.
- nemusí být vždy zcela zajištěno, že po vazbě alergenu na pevnou fázi jsou dostupné všechny antigenní determinanty daného alergenu.
- během inkubace nemusí dojít k navázání všech specifických IgE protilátek (různá afinita protilátek proti různým epitopům) a nelze ani vyloučit interferenci specifických IgG protilátek (např. po imunoterapii).



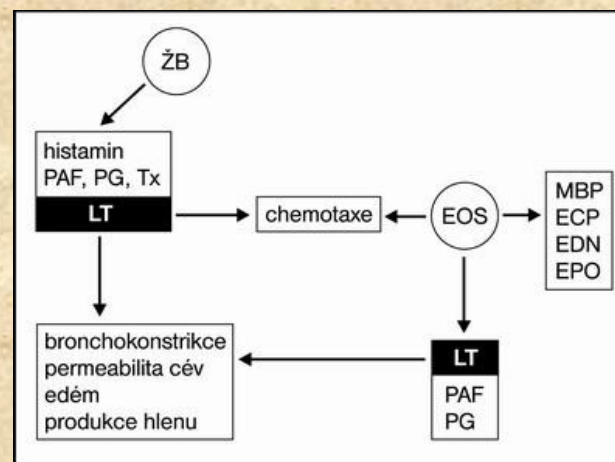
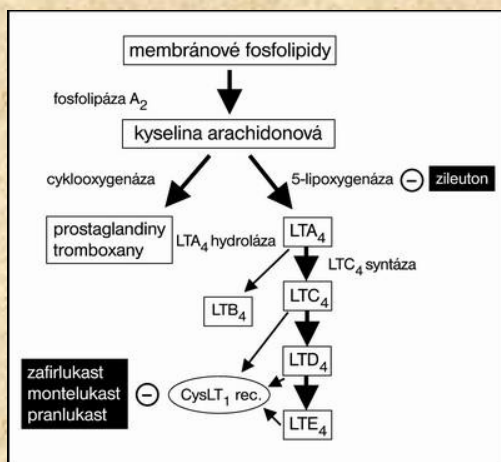
Přesto lze pokládat množství navázané sekundární značené protilátky za úměrné (v určitém rozsahu) množství specifického IgE ve vyšetřovaném séru. **Křivky vyjadřující závislost vazby na množství specifických protilátek bývají paralelní pro různé alergeny i pro celkové IgE. Proto lze takovou křivku použít jako kalibrační i pro jiné alergeny. Konečným výsledkem je tedy spíše relativní než absolutní číslo.**

Testy detekující uvolnění mediátorů po expozici alergenu

Test uvolnění histaminu - kvantifikace histaminu uvolněného z bazofilů po inkubaci s alergenem. Kvantifikace histaminu se dnes provádí prakticky pouze ELISA nebo RIA technikou s využitím monoklonální protilátky proti histaminu. **Tento test má však jistá omezení vzhledem k poměrně vysokému spontánnímu uvolňování histaminu z leukocytů.**

CAST test (Cellular Allergen Stimulation Test) - měření hladiny leukotrienů po stimulaci leukocytů IL-3 a alergenem in vitro. Principem kvantifikace leukotrienů je opět ELISA technika s monoklonální protilátkou proti společné determinantě leukotrienů.

Tyto testy jsou v současné době určeny především pro výzkumné účely. Jejich rutinnímu využití brání poměrně vysoká cena a nároky na vybavení laboratoře. Rovněž senzitivita a specifita těchto testů může být v určitých situacích problematická. **Perspektivně by testy detekující uvolnění mediátorů mohly najít uplatnění i v oblastech, kde reakce nejsou zprostředkovány IgE mechanismem (některé léky, potraviny).**



Stanovení ECP (eosinofilní kationický protein)

Aktivované eozinofily degranulují a uvolňují do okolních tkání silně bazické granulární proteiny, které jsou schopny ničit parazity. Mohou však způsobit destrukci tkání spojenou s astmatem a jinými zánětlivými onemocněními. Mezi granulární proteiny patří i ECP. **ECP narušuje buněčnou membránu a umožňuje průnik enzymů do buněk a jejich následné poškození a poškození tkání podslizničního vaziva, bazální membrány respirační sliznice i hladkého svalstva bronchu.**

Existuje vysoká korelace mezi koncentrací ECP a klinickými astmatickými symptomy.

ECP odráží sezónní změny aktivity atopického onemocnění, nezávisle na koncentraci IgE.

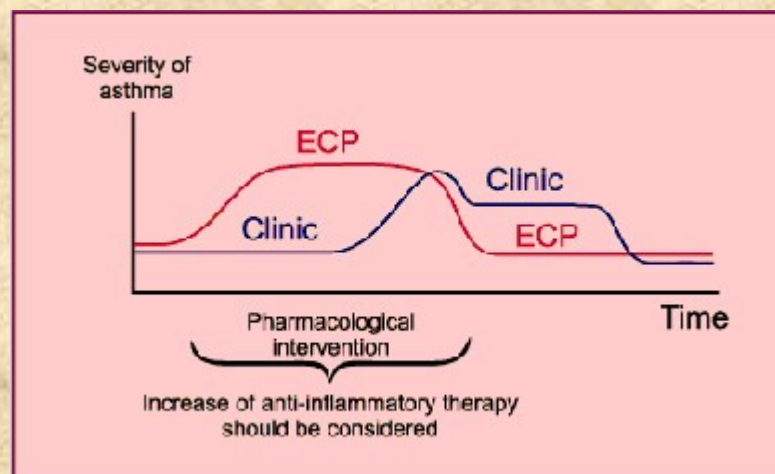
Koncentrace ECP koreluje s aktivitou atopické dermatitidy.

Stanovení hladiny ECP se nabízí jako vhodný diagnostický ukazatel tíže zánětu u astmatu, ale v praxi se ukazují určité limitace využití tohoto ukazatele.

Metodika stanovení je velmi citlivá, je možno ji provádět pouze na určitých typech laboratorních analyzátorů ve specializovaných imunologických laboratořích. Doporučený čas na zpracování vzorku je 1-2 hodiny při uchování krve v pokojové teplotě, nebo okamžité oddělení séra a hluboké zamražení před vlastním zpracováním. Ne ve všech ordinacích alergologů a pneumologů lze tyto podmínky zajistit.

Vyšetřovací metoda: vysokoafinitní FEIA (CAP systém), chemiluminiscenční analýza (IMMULITE)

Referenční hodnoty: < 20 ug/l

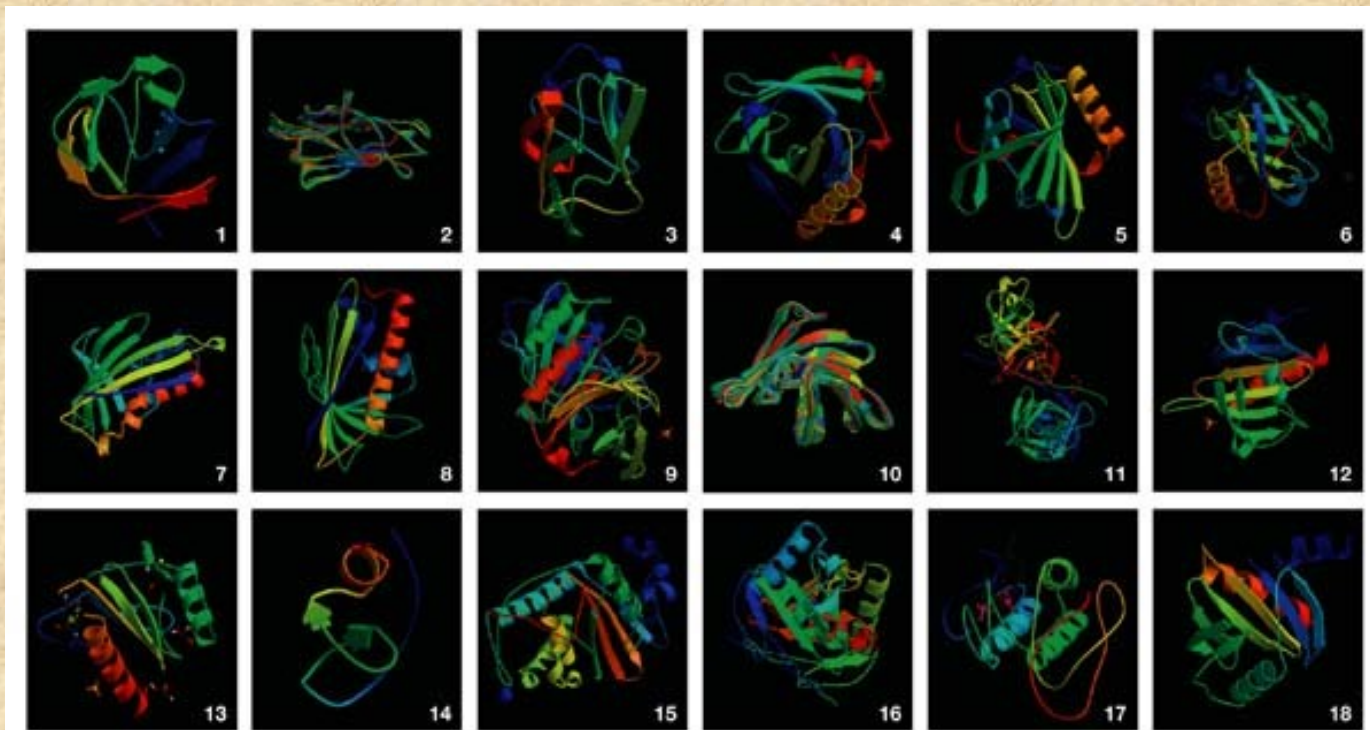


Test aktivace bazofilů (BAT)

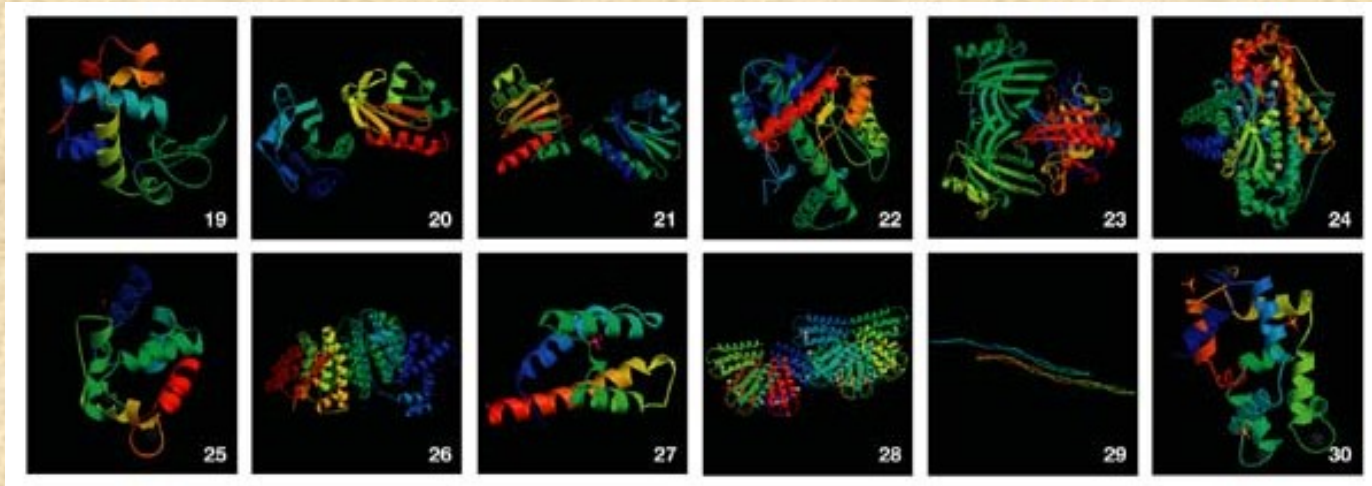
Test aktivace bazofilů s využitím průtokové cytometrie byl vyvinut jako alternativní metoda pro *in vitro* diagnostiku IgE zprostředkované alergické reakce pro různé alergeny. Po expozici alergenu dochází k aktivaci bazofilů s navázanými molekulami alergen-specifického IgE na povrchu buňky. Tento proces je charakterizován mj. i změnou exprese některých povrchových struktur těchto buněk. Prakticky je pro tento účel využito sledování změny exprese antigenu CD63 na buňkách nesoucích IgE (bazofilech) pomocí průtokové cytometrie. **CD63 je proteinová molekula o hmotnosti 53kDa exprimovaná na cytoplazmatických granulích různých klidových buněk. Bylo prokázáno, že lidské bazofily aktivované in vitro (alergenem nebo anti-IgE protilátkami) prostřednictvím jejich vysokoafinitního receptoru pro IgE nově exprimují CD63 také na své membráně.** Exprese CD63 na povrchu bazofilů tak velmi dobře koreluje s jejich degranulací.

Plná krev (event. suspenze leukocytů) je inkubována s alergenem. Současně je inkubována tzv. negativní kontrola, kde místo alergenu je přidán pouze ředící roztok a pozitivní kontrola, kde je přidána látka způsobující aktivaci co největšího počtu bazofilů (kultivace s anti-IgE protilátkou nebo N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalaninem tzv. FMLP). Po inkubaci s alergenem jsou vzorek, negativní i pozitivní kontrola smíchány se dvěma protilátkami, protilátkou označující bazofily (anti-IgE nebo anti-CD203) a protilátkou vázající se na aktivované bazofily (anti-CD63). Po inkubaci je provedena lýza erytrocytů.

Měření je prováděno pomocí průtokového cytometru. Bazofily jsou tzv. gatovány na základě bočního rozptylu (side scatter) a specifického značení bazofilů (SS/anti-IgE nebo SS/CD203c). Na takto vybraných bazofilech je měřena exprese aktivačního znaku CD63. Výsledkem je procento aktivovaných bazofilů tj. anti-IgE+/CD63+ nebo CD203c+/CD63+ v závislosti na typu použitých protilátek.



Structures of known allergens. All structures are available in the Protein Data Bank and the code for each is given. (1) **Timothy grass pollen allergen Phl p 2** (crystal, 1.9 Å resolution, 1WHO). (2) **Mite allergen Der p 2** (NMR structure, 1A9V). (3) **Mite allergen Der f 2** (NMR structure, 1AHK). (4) **Bovine lipocalin dander allergen Bos d 2** (crystal, 1.8 Å resolution, 1BJ7). (5) **Horse allergen Equ c 1** (crystal, 2.3 Å resolution, 1EW3). (6) **Mouse urinary protein Mus m 1** (crystal, 2.4 Å resolution, 1MUP). (7) **Protein L1pr10.1A from yellow lupine** (crystal, 1.95 Å resolution, 1ICX). (8) **Birch pollen allergen Bet v 1** (crystal, 2.0 Å resolution 1BV1). (9) **Bovine lactoglobulin** (crystal, 1.8 Å resolution, 1BEB). (10) **Cherry allergen Pru av 1** (NMR structure, 1E09). (11) **Timothy grass pollen allergen Phl p 1** (crystal, 2.9 Å resolution, 1N10). (12) **Human profilin** (crystal, 2.0 Å resolution, 1FIL). (13) ***Arabidopsis thaliana* profilin** (crystal, 1.6 Å resolution, 3NUL). (14) **Ragweed pollen allergen Amb T 5** (NMR structure, 1BBG). (15) **Wasp venom allergen 5** (crystal, 1.9 Å resolution, 1QNX). (16) **Hevea latex allergen Hev b 8** (crystal, 3.1 Å resolution, 1G5U). (17) **Bee venom phospholipase A2** (crystal, 2.0 Å resolution, 1POC). (18) **Birch pollen profilin** (crystal, 2.4 Å resolution 1CQA).



(19) Hen egg-white lysozyme (crystal, 1.8 Å resolution, 1BWH). **(20) *Acanthamoeba castellanii* profilin** (crystal, 2.3 Å resolution, 1F2K). **(21) Yeast profilin** (crystal, 2.3 Å resolution, 1YPR). **(22) Bee venom hyaluronidase** (crystal, 1.6 Å resolution, 1FCQ). **(23) Rat urinary protein and its complex with a Hyaline Droplet Inducer** (crystal, 2.9 Å resolution, 2A2G). **(24) *Aspergillus fumigatus* manganese superoxide dismutase** (crystal, 2.0 Å resolution, 1KKC). **(25) Carp parvalbumin** (crystal, 1.5 Å resolution, 4CPV). **(26) Human serum albumin** (crystal, 2.5 Å resolution, 1BJ5). **(27) Functional domain of timothy grass pollen allergen Phl p 5b** (crystal, 1.98 Å resolution 1L3P). **(28) Timothy grass pollen allergen Phl p 6** (crystal, 2.8 Å resolution, 1NLX). **(29) Tropomyosin** (crystal, 7.0 Å resolution, 1C1G). **(30) Timothy grass pollen allergen, Phl p 7** (crystal, 1.75 Å resolution, 1K9U). Figure kindly provided by R. Valenta.

http://www.nature.com/embor/journal/v5/n8/fig_tab/7400204_f1.html