

# Využití průtokové cytometrie v diagnostice alergických onemocnění

Jana Zsoldosová

# Alergie

- = hypersenzitivní reakce zprostředkovaná imunitními mechanismy (humorálními a buněčnými)
- = skupina chorob, u nichž dochází k opakované expozici škodlivými antigeny z vnějšího prostředí (alergenům)
  - navození zánětlivých změn → porucha struktury a funkce

# Léčba alergií

- profylaxe
- farmaka
  - **antihistaminika** – blokují receptory pro histamin
  - **kortikoidy** – inhibice syntézy histaminu, protizánětlivé
  - **kromoglykát** – inhibice degranulace ovlivněním vlastností membrány mastocytů
- tzv. alergenová imunoterapie – postupné zvyšování dávky alergenu

# Diagnostika alergických onemocnění

- **anamnéza** – možné příčiny vzniku alergie
- **kožní testy** – rychlost, spolehlivost, jednoduchost
  - prick testy, intradermální testy – k průkazu časně přecitlivělosti
  - epikutánní testy – k průkazu pozdní přecitlivělosti
- **provokační testy** – klinické projevy po kontaktu s alergenem
  - diagnostika alergických onemocnění z povolání
- **stanovení celkového množství IgE**
  - zvýšená koncentrace nemusí doprovázet IgE zprostředkovanou alergickou reakci
- **stanovení koncentrace specifických IgE (sIgE)**
  - RAST, FAST, Immulite, CAP – princip ELISA techniky

# Bazofily a žírné buňky

- primární efektorové buňky v IgE zprostředkované reakci I. Typu
- syntéza mediátorů alergické reakce – zejm. histamin
- exprimují vysokoafinitní receptor pro IgE (FceRI)
- IgE zprostředkovaná reakce – přemostění sousedních sIgE alergenem → splynutí granul → uvolnění granul vázajících histamin a heparin
  - = degranulace

# **Testy sledující aktivaci bazofilů**

- **Test uvolňování histaminu**

- závislé na povaze nemoci, příjem léků, hormonů, přítomnost cytokinů,..
- 5% jedinců nereaguje

- **CAST** - cellular allergen stimulation test

- test založený na uvolňování sulfidoleukotrienů

- Nevýhody

- Nutnost izolace → riziko nespecifické stimulace
- Plná krev – mediátory z monocytů, eosinofilů

- **BAT** – test aktivace bazofilů

- komerční kity – Bazotest, FAST
- s využitím průtokové cytometrie
- sledování membránových znaků

# **Test aktivace bazofilů (BAT)**



- průlom **1994** – objev CD63 znaku bazofilní aktivace
- **1999** – objevení znaku CD203c
  - jednoznačná identifikace bazofilů
  - znak aktivace – exprese se zvyšuje během aktivace bazofilů
- **CD63**
  - proteinová molekula (53 kDa) - glykoprotein
  - exprimovaná na cytoplazmatických granulích klidových bb
  - na aktivovaných bazofilech
  - monocyty, makrofágy, trombocyty
- **CD203c**
  - enzym
  - exprese se zvyšuje během aktivace
  - přítomen u klidových bazofilů

# Hlavní vlastnosti aktivačních markerů

	<b>CD63</b>	<b>CD203c</b>
<b>Synonyms</b>	Gp53, LAMP-3 (lysosome-associated membrane protein)	Neural cell surface differentiation antigen E-NPP3
<b>(Super) family</b>	Transmembrane-4 super family (tetraspanins)	Pyrophosphatase/phosphodiesterase
<b>Resting basophils</b>	Barely detectable	Constitutively present
<b>IgE –activated basophils</b>	Upregulation starts within 10 min Expressed with a high density (at least 1 log scale)	Upregulation starts within 5 min and peaks within 10 – 15 min Upregulation less prominent when compared with CD63

# Použití

- **citlivá** a specifická metoda
- v diagnostice **IgE-zprostředkované alergické reakce** (i non-IgE reakce)
  - inhalační alergeny, přírodní alergie na latex, alergie na jídlo, léky, autoprotilátky u chronické kopřivky, alergie na vosí, včelí jed,..
- monitoring imunoterapie
- **indikace** – kožní testy a vyšetření specifických IgE protilátek – NELZE
  - výsledky neodpovídající klinické anamnéze
  - problematické alergeny – jed blanokřídlého hmyzu, lékové alergie

# Provedení:

- heparinizovaná krev + IL-3
- stimulace vodnými roztoky alergenů - inkubace 10 min při 37°C na vodní lázni
- do zkumavky:
  - pozitivní kontrola
  - negativní kontrola
- inkubace 20 min při 37°C
- zastavení reakce na ledu
- přidavek dvou druhů fluorescenčně značených protilátek
  - protilátka k identifikaci bazofilů – anti-CD203c, anti-IgE
    - (anti IgE-PE-Cy5, 203cPE)
  - protilátka, která se váže na aktivační znaky – anti-CD63
    - CD63 FITC
- inkubace 30 min ve tmě při 2 - 8°C
- lýza erytrocytů → centrifugace
- slití supernatantu
- FACS

# Zpracování vzorku I

- **preanalytická fáze**

- odběr do antikoagulačního činidla – heparin, EDTA
- skladování s EDTA – 24 hodin při 4°C

- **interference**

- léky (vynechat před odběrem)

- **alergická reakce před odběrem – falešně negativní výsledky**

- **test s plnou krví**

**x**

- **s izolovanými bazofily**

- jednodušší
- rychlejší
- aktivace v přirozeném prostředí
- interference se složkami krevní plazmy?

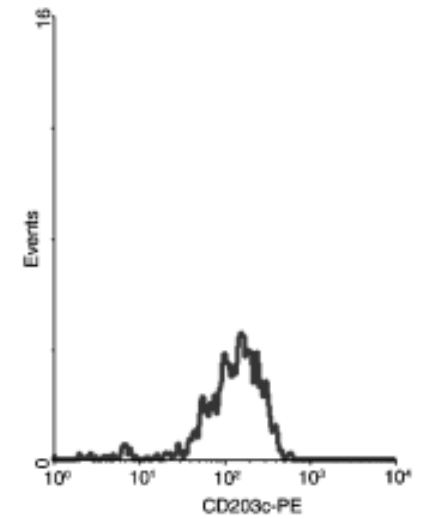
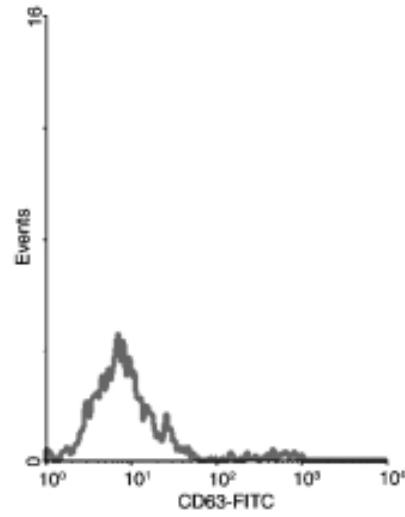
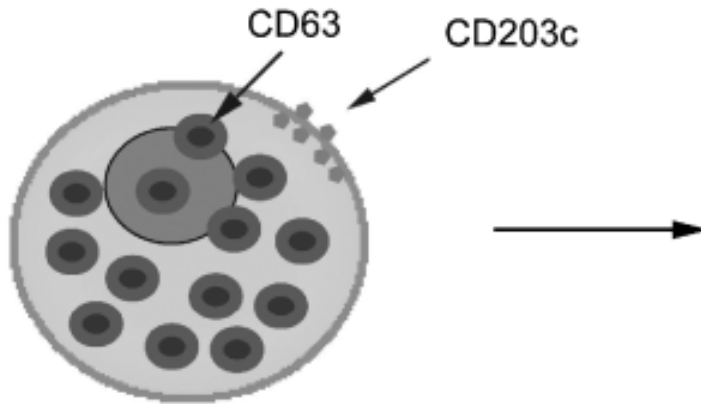
- časově náročnější
- větší množství krve
- nespecifická aktivace buněk

# Zpracování vzorku II

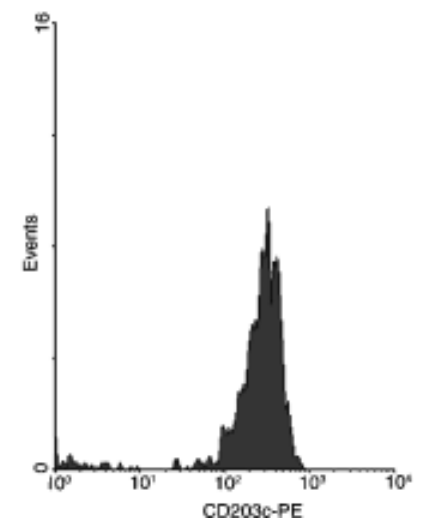
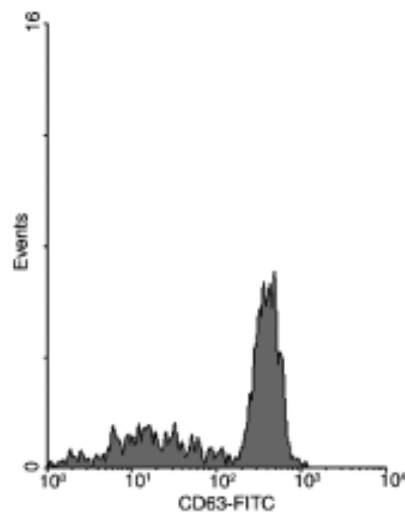
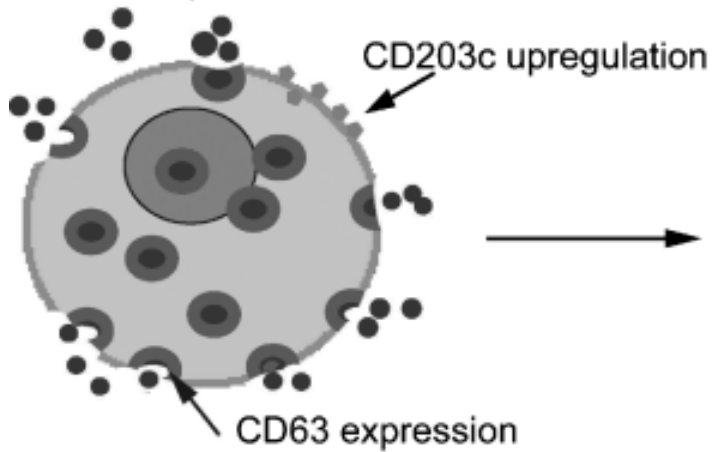
- **preinkubace** – krev s IL-3 (stimulace bazofilů)
- **aktivace alergenem**
  - přírodní alergenové extrakty – heterogenní
  - rekombinantní
- **se vzorkem – pozitivní i negativní kontrola**
  - pozitivní kontrola – anti-IgE protilátka, fMLP
  - negativní kontrola – ředící roztok
- **identifikační znaky**
  - protilátka proti IgE
    - IgE i na jiných buňkách (př. na monocytech) – odlišení anti-HLA-DR protilátka
    - různé množství IgE a receptorů
  - CD203c – specifitější
    - i zhodnocení stavu aktivace
  - CCR2 (eotaxin CC chemokin receptor-3) – nespecifický
  - CRTH2 (DP2)

CD63

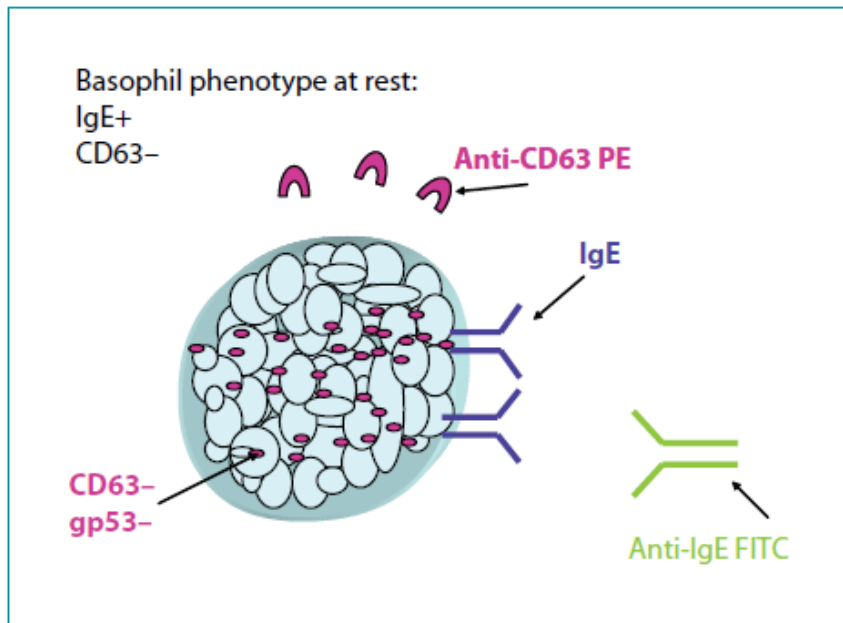
CD203c



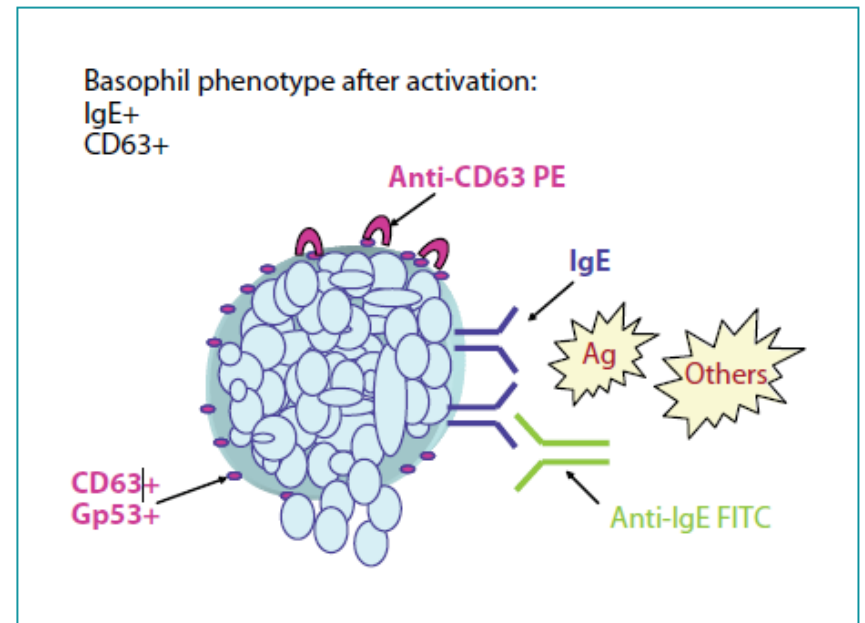
Allergen stimulation



Degranulation



**Fig. 1.** Basophil phenotype at rest.



**Fig. 2.** Basophil phenotype after activation.



# Interpretace

- **výsledek**

- % aktivovaných bazofilů
- u některých alergenů – tzv. stimulační index
- absolutní počet hodnocených bazofilů (>150)

$$SI = \frac{\% \text{ bazofilů po stimulaci alergenem}}{\% \text{ bazofilů bez stimulace nebo negativní kontrola}}$$

# Alternativy

- **modifikace**
  - *kombinace protilátek CRTH2/CD203c/CD3/CCR3*
    - anti-CD203c – pouze k měření aktivace
    - anti-CRTH2 a anti-CD3 – detekce bazofilů
    - nepřínosné
- **znaky nové generace – CD13, CD164, CD107a a CD107b**
  - spojené s degranulací
  - využití jako aktivační znaky pomocí průtokové cytometrie?
  - odlišné doby aktivace

# Senzitivita a specifita BAT

<b>alergie</b>	<b>senzitivita (%)</b>	<b>specifita (%)</b>
<b>na inhalační alergen</b>	91 - 93	98 - 100
<b>potravinové alergie</b>	80 - 90	80 - 90
<b>alergie na latex</b>	80 - 90	téměř 100
<b>alergie na hmyzí jedy</b>	téměř 100	100
<b>lékové alergie</b>	50 - 64	100

# Shrnutí

- spolehlivá metoda k diagnostice různých alergií
  - inhalační alergen
  - potravinové alergen
  - alergie na latex
  - alergie na hmyzí jed
  - lékové alergie
- doplňkové vyšetření ke kožním testům a stanovení specifických IgE protilátek
- při stanovení problematických alergenů
- aktivační znaky CD63 a CD203c
  - CD63 – na aktivovaných bazofilech
  - CD203c – přítomen u klidových bazofilů, zvýšení exprese během aktivace

# Zdroje:

- BIDAD, K., M. C. NAWIJN, A. J. M. VAN OOSTERHOUT, S. VAN DER HEIDE a Joanne N. G. OUDE ELBERINK. 2014. Basophil activation test in the diagnosis and monitoring of mastocytosis patients with wasp venom allergy on immunotherapy. *Cytometry part B (Clinical cytometry)*. : 183-190. DOI: 10.1002/cyto.b.21148. ISBN 10.1002/cyto.b.21148. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.b.21148>
- BOUMIZA, R., A.-L. DEBARD a G. MONNERET. 2005. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clinical and Molecular Allergy*. **3**(9): 1-8. DOI: 10.1186/1476-7961-3-9. ISSN 14767961. Dostupné také z: <http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/3/1/9>
- BOVENZI, D., A. GIORDANO, D. GRAZIANO, E. ASSENTATO, G. DE SIMONE, G. SPADARO a C. LO PARDO. 2011. CD63 expression as marker of basophil activation test. In: ASSENTATO, E. a G. SPADARO. *Abstracts from the XXIX Conferenza Nazionale di Citometria*. 79A. *Cytometry part A*, s. 1025-1077. DOI: 10.1002/cyto.a.21155. ISBN 10.1002/cyto.a.21155. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.21155>
- DE WECK, A. L., M. L. SANZ, P. M. GAMBOA, W. ABERER, J. BIENVENU, M. BLANCA, P. DEMOLY, D. G. EBO, L. MAYORGA, et al. 2008. Diagnostic Tests Based on Human Basophils: More Potentials and Perspectives than Pitfalls. *International archives of Allergy and Immunology*. **18**(3): 177-189. DOI: 10.1159/000115885. ISBN 10.1159/000115885. Dostupné také z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000115885>
- EBERLEIN-KÖNIG, B., C. SCHMIDT-LEIDESCHER, J. RAKOSKI, H. BEHRENDT a J. RING. 2006. In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *The Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. **16**(1): 5-10.
- EBO, D. G., C. H. BRIDTS, M. M. HAGENDORENS, N. E. AERTS, L. S. DE CLERCK a W. J. STEVENS. 2008. Basophil activation test by flow cytometry: Present and future applications in allergology. *Cytometry part B (Clinical Cytometry)*. (4): 201-210. DOI: 10.1002/cyto.b.20419. ISBN 10.1002/cyto.b.20419. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.b.20419>

# Zdroje:

- EBO, D. G., J. SAINTE-LAUDY, C. H. BRIDTS, C. H. MERTENS, M. M. HAGENDORENS, A. J. SCHUERWEGH, L. S. DE CLERCK a W. J. STEVENS. 2006. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy*. **61**(9): 1028-1039. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01039.x. ISSN 0105-4538. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2006.01039.x>
- HAVRANOVÁ, M., I. ŠTĚTINOVÁ a S. HONZOVÁ. 2006. Měření aktivace bazofilů - CD63 nebo CD203c? *Alergie*. **8**(1): 11-15.
- HENNERSDORF, F., S. FLORIAN, A. JAKOB, K. BAUMGÄRTNER, K. SONNECK, A. NORDHEIM, T. BIEDERMANN, P. VALENT a H.-J. BÜHRING. 2005. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. *Cell Research*. **15**(5): 325-335.
- HONZOVÁ, S. 2009. Možnosti laboratorní diagnostiky. *Interní medicína*. **11**(1): 168-170.
- HONZOVÁ, S. a M. HAVRANOVÁ. 2003. Test aktivace bazofilů, jeho přínos pro klinickou praxi. *Alergie*. **5**: 292-297.
- HOŘEJŠÍ, V. a J. BARTŮŇKOVÁ. 2009. *Základy imunologie*. 4. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.
- KREJSEK, J. a O. KREJSEK. 2004. *Klinická imunologie*. 1. Hradec Králové: Nucleus. ISBN 808622550X.
- LITZMAN, J., T. FREIBERGER, V. KRÁL a V. THON. 2009. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. 1. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 9788021042278.
- MANDY, F. F., M. BERGERON a T. MINKUS. 1995. Principles of flow cytometry. *Transfusion Science*. Elsevier Science, **16**(4): 303-314.
- PICHLER, W. J. 2007. Drug Hypersensitivity: In vitro Tests: Basophil Activation Tests. *Basel: Karger*. : 391-402.

# Zdroje:

- SABATINI, F., A. USAI, L. PETECCHIA, A. DI STEFANO a F.L.M RICCIARDOLO. 2009. Allergen-induced bradykinin B2R expression in mild atopic asthma. In: PETECCHIA, L. a F.L.M RICCIARDOLO. *Abstracts from the Proceedings of the XXVII National Conference of Cytometry*. 77A. Cytometry Part A, s. 144-202. DOI: 10.1002/cyto.a.20826. ISBN 10.1002/cyto.a.20826. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20826>
- SAINTE-LAUDY, J., A. BOUMEDIENE, F. TOURAINÉ, I. ORSEL, C. BRIANCHON, F. BONNAUD a M. COGNÉ. 2007. Use of both CD63 up regulation and IgE down regulation for the flow cytometric analysis of allergen induced basophil activation. Definition of an activation index. *Inflammation Research*. **56(7)**: 291-296. DOI: 10.1007/s00011-007-7014-5. ISBN 10.1007/s00011-007-7014-5. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-007-7014-5>
- ŠPIČÁK, V. a P. PANZNER. 2004. *Alergologie*. 1. vyd. Praha: Galén, xxii, 348 s. ISBN 80-726-2265-X.
- VALENT, P., A. W. HAUSWIRTH, S. NATTER, W. R. SPERR, H. J. BÜHRING a R. VALENTA. 2004. Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. *Methods*. **32(3)**: 265-270. DOI: 10.1016/j.ymeth.2003.08.006. ISBN 10.1016/j.ymeth.2003.08.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202303002408>
- WOLANCZYK-MEDRALA, A., G. GOGOLEWSKI, J. LIEBHART, K. GOMULKA, M. LITWA, P. PANASZEK, K. LINDNER a W. MEDRALA. 2009. A new variant of the basophil activation test for allergen-induced basophil CD63 upregulation. The effect of cetirizine. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. **19(6)**: 465-473.
- WOLANCZYK-MEDRALA, A., G. GOGOLEWSKI, J. LIEBHART, K. GOMULKA, M. LITWA, B. PANASZEK, K. LINDNER a W. MEDRALA. 2009. A New Variant of the Basophil Activation Test for Allergen-Induced Basophil CD63 Upregulation. The Effect of Cetirizine. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. **19(6)**: 465-473.

**Děkuji za pozornost!**