AdLa s.r.o. Analyticko diagnostické laboratórium a ambulancie s.r.o.

Vajanského 1, Prešov

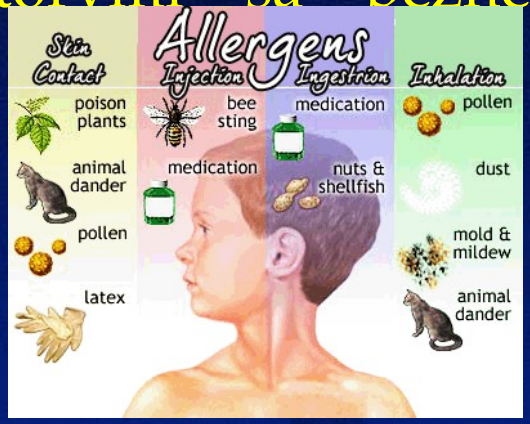
Bunkové testy v laboratórnej diagnostike alergií.

RNDr. Ľ. Müller, MUDr. E. Gerlašinská, RNDr. Leško Juraj

Velké Karlovice 2026

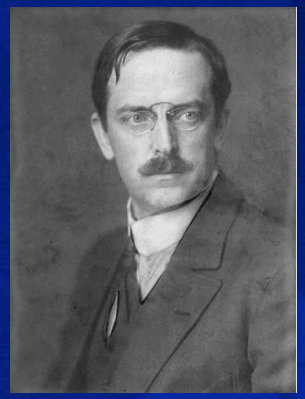
Alergická reakcia

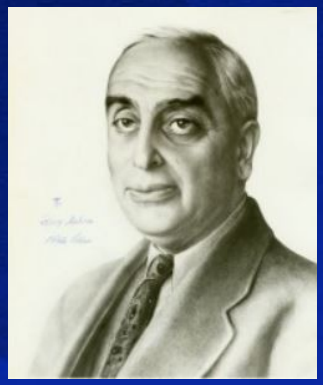
- **Alergia** je prehnaná, neprimeraná reakcia imunitného systému organizmu na látky, s ktorými sa bežne stretávame vo svojom prostredí.
- gr. *allos+ergon* (iný+reakcia)
- Pojem alergia zaviedli v r. **1906**



rakúsky vedec a pediater **Clemens Peter baron von Pirquet**

a maďarský pediater **Béla Schick**





Alergia = HYPERSENZITIVITA

Typy alergických reakcií

- I.typ: včasná – IgE sprostredkovaná (urtikária, astma, anafylaxia)
- II.typ: IgG a IgM indukovaná cytotoxická reakcia (anémia, neutropénia, trombocytopénia)
- III.typ: poškodenie tkanív prostredníctvom imuno-komplexov antigén-protilátka (nefritída, artritída, sérová choroba)
- IV.typ: oneskorený typ hypersensitivity indukovaný Th1 lymfocytmi (IVa), Th2 lymfocytmi (IVb), cytotoxickými lymfocytmi (IVc), Th17 lymfocytmi (IVd) (SJS, TEN, DRESS syndróm)
- V.typ: protilátky proti hormonálnemu receptoru (stimulačná hypersenzitivita) (TSH receptor – Gravesová choroba, Acetylcholínový receptor - Myastenia gravis)

Európska sieť pre liekovú alergiu
(European Network for Drug Allergy, ENDA)

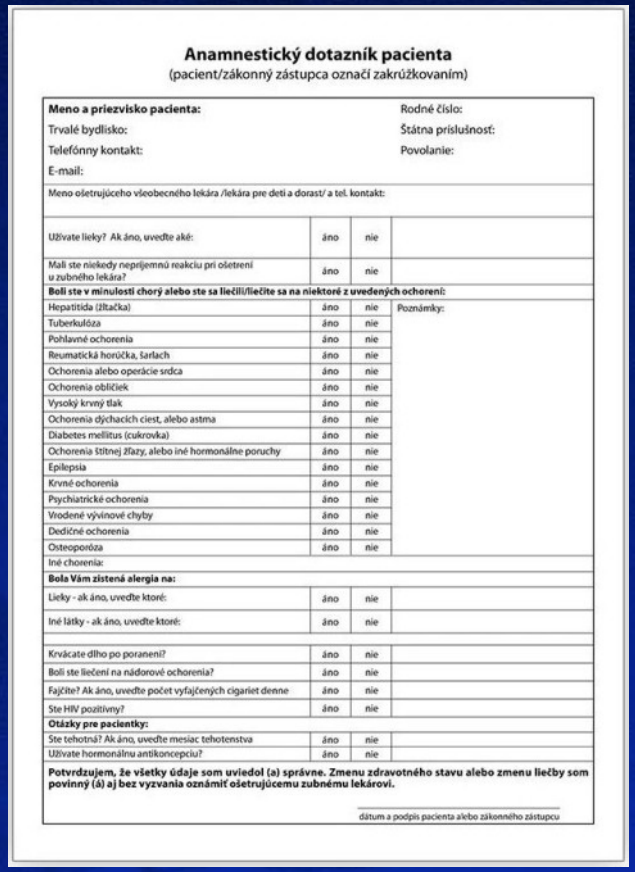
Navrhla všeobecné odporúčania pre diagnostiku takýchto reakcií:

1. klinická anamnéza

(špeciálny dotazník)

2. výber diagnostických vyšetrení

(podľa typu reakcie)



Anamnestický dotazník pacienta

(pacient/zákonný zástupca označí zakrúžkovaním)

Meno a priezvisko pacienta:			Rodné číslo:
Trvalé bydlisko:			Štátna príslušnosť:
Telefónny kontakt:			Povolanie:
E-mail:			
Meno ošetrujúceho všeobecného lekára /lekára pre deti a dorast/ a tel. kontakt:			
Užívate lieky? Ak áno, uveďte aké:	áno	nie	
Mali ste niekedy nepríjemnú reakciu pri ošetrení u zubného lekára?	áno	nie	
Boli ste v minulosti chorý alebo ste sa liečili/liečite sa na niektoré z uvedených ochorení:			
Hepatitida (žltačka)	áno	nie	Poznámky:
Tuberkulóza	áno	nie	
Pohlavné ochorenia	áno	nie	
Reumatická horúčka, šarlach	áno	nie	
Ochorenia alebo operácie srdca	áno	nie	
Ochorenia obličiek	áno	nie	
Vysoký krvný tlak	áno	nie	
Ochorenia dýchacích ciest, alebo astma	áno	nie	
Diabetes mellitus (cukrovka)	áno	nie	
Ochorenia štítnej žľazy, alebo iné hormonálne poruchy	áno	nie	
Epilepsia	áno	nie	
Krvné ochorenia	áno	nie	
Psychiatrické ochorenia	áno	nie	
Vrodené vývinové chyby	áno	nie	
Dedičné ochorenia	áno	nie	
Osteoporóza	áno	nie	
Iné chorenia:			
Bola Vám zistená alergia na:			
Lieky - ak áno, uveďte ktoré:	áno	nie	
Iné látky - ak áno, uveďte ktoré:	áno	nie	
Krvácate dlho po poranení?	áno	nie	
Boli ste liečení na nádorové ochorenia?	áno	nie	
Fajčíte? Ak áno, uveďte počet vyfajčených cigariet denne	áno	nie	
Ste HIV pozitívny?	áno	nie	
Otázky pre pacientky:			
Ste tehotná? Ak áno, uveďte mesiac tehotenstva	áno	nie	
Užívate hormonálnu antikoncepciu?	áno	nie	

Potvrdzujem, že všetky údaje som uviedol (a) správne. Zmenu zdravotného stavu alebo zmenu liečby som povinný (á) aj bez vyzvania oznámiť ošetrujúcemu zubnému lekárovi.

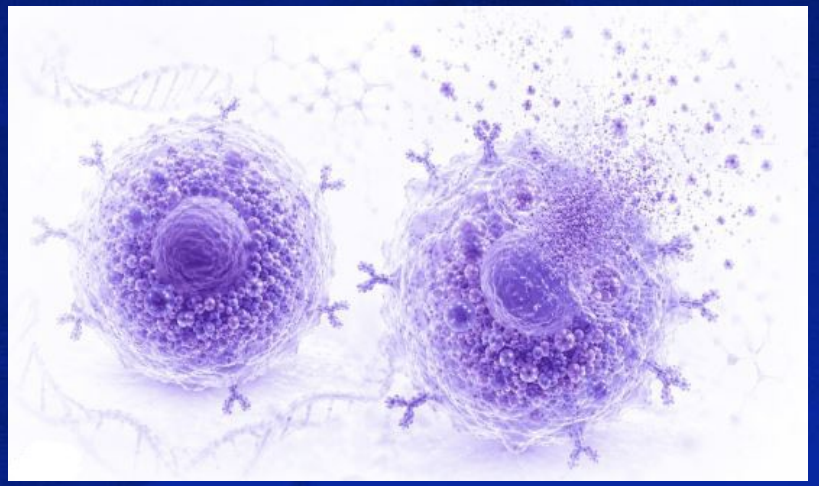
_____

dátum a podpis pacienta alebo zákonného zástupcu

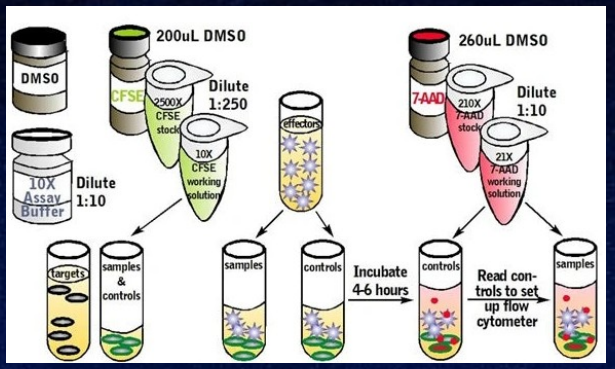
Laboratórne testy používané pri diagnostike alergie



- 1. Humorálne: majú v praxi prevahu
  - stanovenie špecifického IgE
  - tryptáza a histamín
- 2. Bunkové testy
- - BAT
- - LTT, LAT
- - MAT



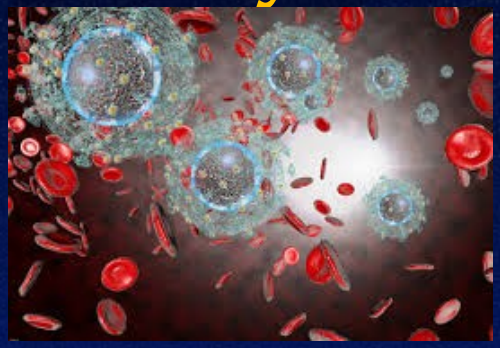
Prečo bunkové testy?



- Vyšetrenie špecifických IgE : len cirkulujúce IgE protilátky
- Väčšina IgE protilátok je naviazaná: tkanivá, žírne bunky, bazofily

- Vznik techník, ktorých cieľom je priblížiť sa viac situáciám, ktoré sa odohrávajú v tele v priebehu alergického ochorenia

Princíp laboratórnych bunkových testov



Špecifická stimulácia krvných buniek alergénom a následné hodnotenie pochodov spojených s ich aktiváciou, ev. degranuláciou.

- Test aktivácie bazofilov (Flow2CAST , BasoFlowEx Kit, BasoStep, BAT 3.0, Allergy flow cytometry kit)
- Eseje s T-lymfocytmi (LTT, LAT)

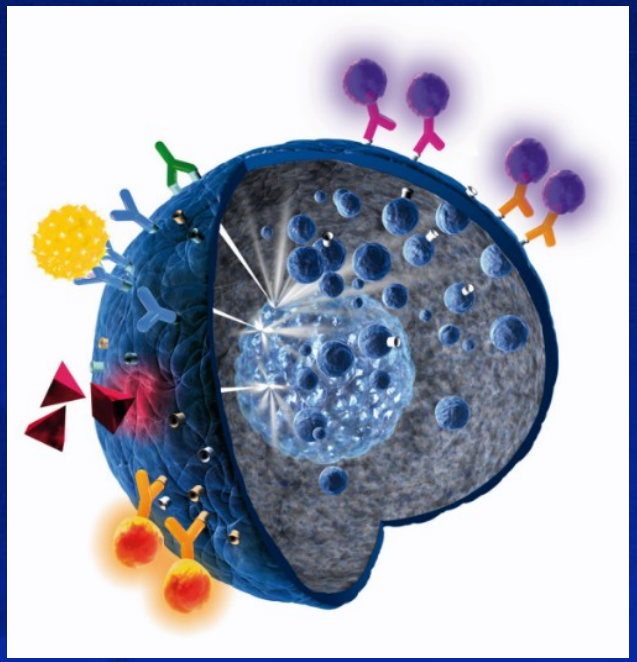
Prietoková cytometria

- štandartná metóda pre analýzu buniek v suspenzii
- 50 000 – 100 000 leukocytov pre 1 vzorku
- 500 - 600 bazofilov v gate

- monoklonové protilátky s fluorochromom (mAb)

- použitie rôznych mAb umožňuje
- súčasne vyšetriť niekoľko
- antigénov na jednej bunke

- Parametre vyjadrujúce fluorescenciu:
- FL1, FL2, FL3...



Správne načasovanie testu

- 3-4 týždne po akútnej príhode je šanca na potvrdenie najvyššia, potom klesá (po 1-3 rokoch je prínos reakcie sporný)
- načasovanie zhodné s kožnými testami i špec. IgE
- falošne negatívny výsledok:

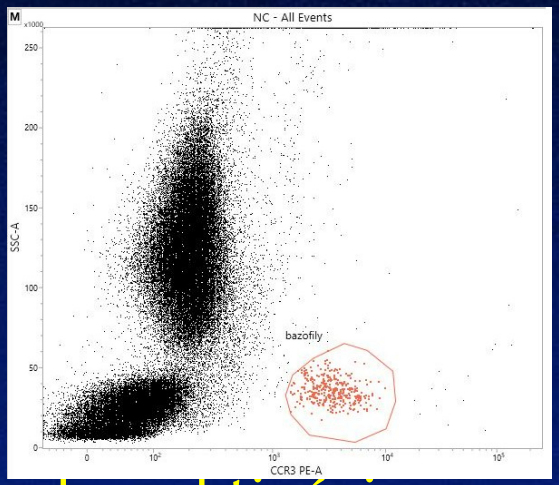
  - prvý kontakt s alergénom
  - znížená refrakternosť buniek po nedávnej alergickej reakcii
  - znížený počet IgE



(Lenka Sedláčková, Hypersenzitívní reakce na léky,2024)

BAT (Bazofil Aktivačný Test)

- patrí medzi funkčné testy
- Cieľ: - priblížiť sa čo najviac podmienkam in vivo
  - sledovať priamo efekt reakcie alergénu na cieľové bunky
- Expresia špecifického znaku bazofilov
- Expresia aktivačného znaku – špecifický marker aktivácie bazofilov



Stanovenie pomocou prietokovej cytometrie

- na základe emitovanej fluorescencie sa kvantitatívne vyjadrí percento aktivovaných bazofilov z celkového počtu bazofilov

Allergy flow cytometry kit (RUO) Astra Biotech GmbH Germany

- Vzorka krvi s Li-heparínom
- Trojfarebný panel:
- CD294 (CRTH2)
- CD3
- CD203c
- NC, PC
- Aktivačný pufor (Ca^{2+}, Mg^{2+})
- Stop pufor, Lyzačný roztok, Fixačný roztok

BAT 3.0 – Beckman Coulter USA

- Vzorka krvi s heparínom (EDTA + Ca aktivačný pufor)
- CD45, CD3 + HLA-DR
- CD203c - povrchový Ag
- CD123 - po degranulácii
- CD63 - po degranulácii

Duraclone tube

- NC
- PC (Anti-IgE, fMLP)
- Aktivačný pufor (alikvotovať, mraziť)
- Lyzačný roztok

BasoFlowEx® Kit – Exbio CZ

- Vzorka krvi s heparínom (EDTA, citrát)
- CD203c - povrchový Ag
- CD63 - po degranulácii
- NC
- PC (Anti-IgE, fMLP)
- Aktivačný pufor (alikvotovať, mraziť)
- Lyzačný roztok

Flow2CAST (Bühlmann)

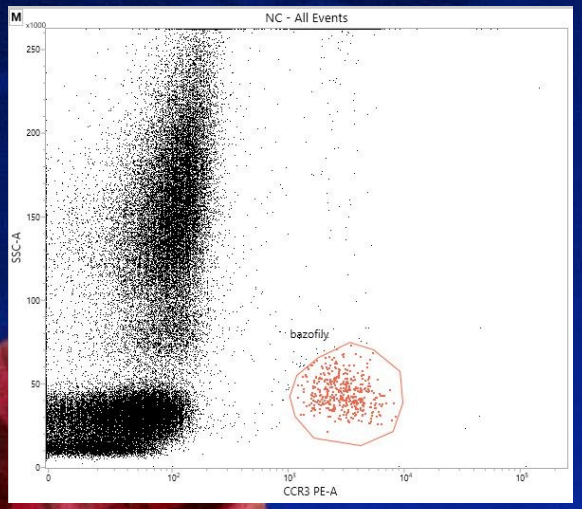
- Negatívna kontrola
- Anti-CD63 Ab
- Anti-CCR3 Ab
- Pozitívna kontrola
- Stimulačný pufor (IL-3)
- Lyzačný roztok

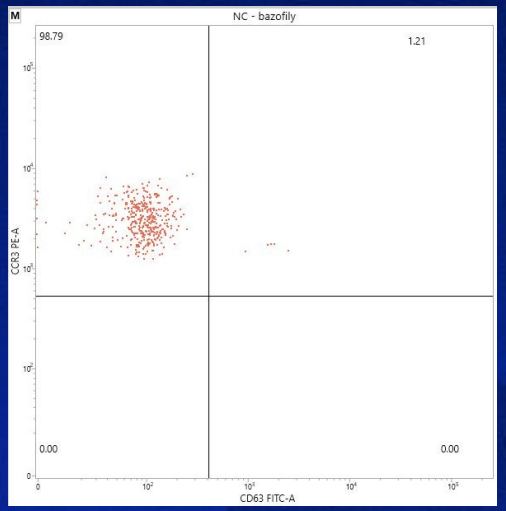


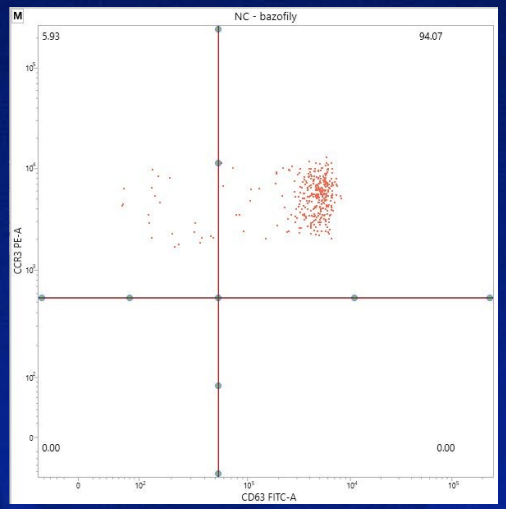
Hodnota negatívnej kontroly

- inkubácia bez alergénu (pufer)
- nemala by prekročiť 5% pre všetky typy alergénov

(čo najbližšie 0%, 2,5% EAACI 2023)





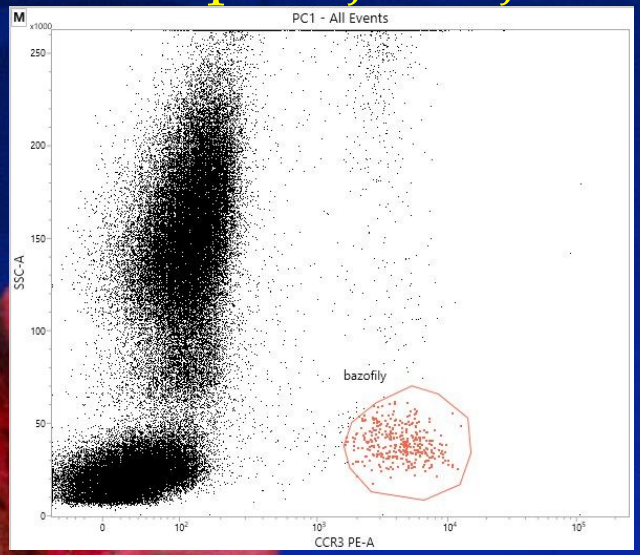


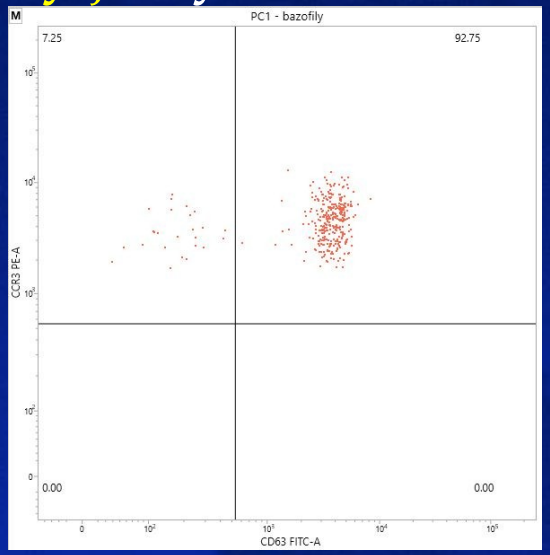
NC=1,21% NC=94,07%

Pozitívna kontrola

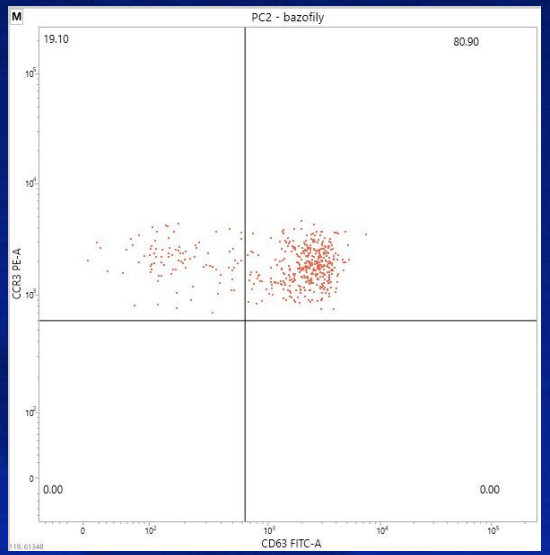
- stimulácia bazofilov dvomi nešpecifickými stimulmi:
  1. protilátka anti - IgE
  2. peptid N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)

 vyšetrenie je možné hodnotiť len vtedy, ak hodnota aspoň jednej kontroly je vyššia ako 10%





PC1= 92,75%



PC2=80,90%

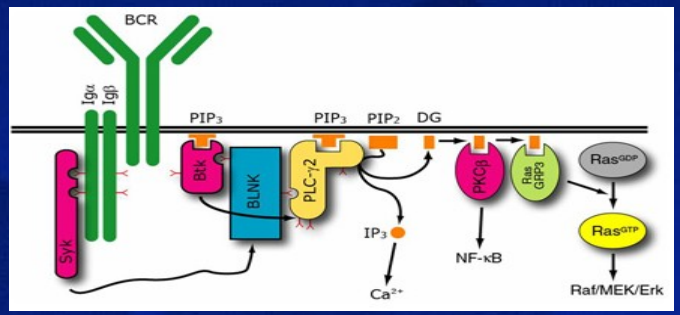
Non – responderi

- Pacienti, ktorí nereagujú na pozitívnu stimuláciu

  anti-IgE (6,1%), fMLP (4,9%)

  10-15% (EAACI 2022)
- Nie sú vhodní na stanovenie alergie metódou BAT
- U pacientov zistená neprítomnosť tyrozín kinázy syk a znížené množstvo tyrozín kinázy lyn

- asociované s neodpovedavosťou (Ebo ai. 2006)



BAT: pacient nedostatočne odpovedal na stimuláciu (non-responder). Prosíme opakujte odber o 4-6 týždňov.

BAT: pacient opakovane nedostatočne odpovedal na stimuláciu (non-responder). Vyšetrenie BAT nie je u tohto pacienta vhodné na testovanie liekovej hypersenzitivity.

Hodnotenie BAT

- % aktivovaných bazofilov
- lieky, aditíva vykazujú nižšie % aktivácie bazofilov než ostatné alergény
- senzitivita je nižšia a hodnotenie náročnejšie a preto je doporučené stanoviť stimulačný index SI
- (pomer stimulovanej/nestimulovanej vzorky)
- výsledok je POZITÍVNY pri hodnote SI = 2,0 a viac

Lieky	Aditíva	Potraviny	Hmyz
SI= 0,0 – 2,0	SI= 0,0 – 2,0	< 15%	< 10%

Alergény

- Nesmú byť cytotoxické (bez aditív a k h látok - fenol, glycerol, azid sod
- Len lieky v tekutej be
- Nesmú endotoxí
- Používame

Aké sú použité alergény?

Aké sú koncentrácie alergénov?

Aké médium je použité?



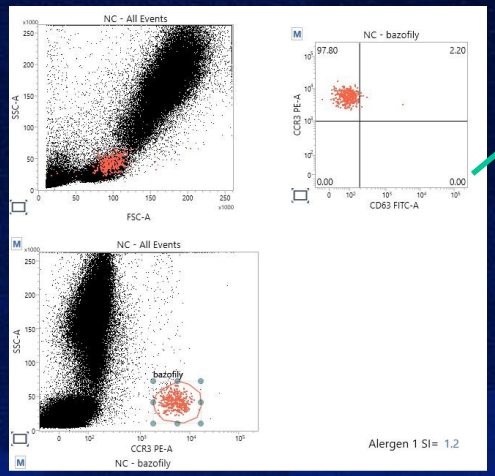




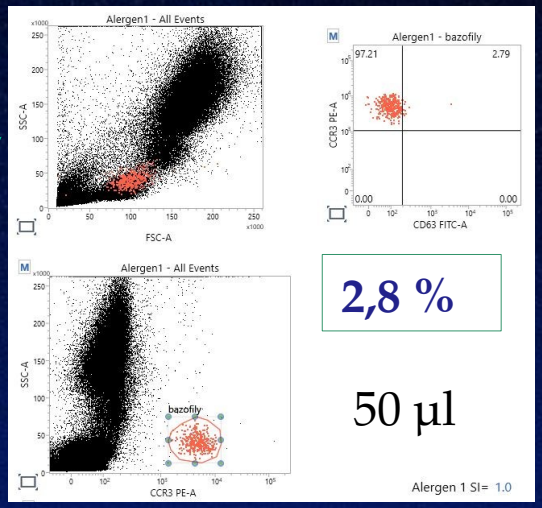




Pacient 0532 (m. 35r. z 18.6.2026) - Osa

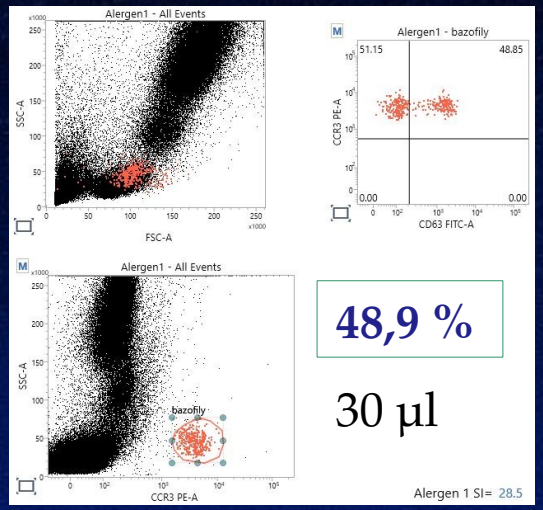


Alergén DrFooke



2,8 %

50 µl



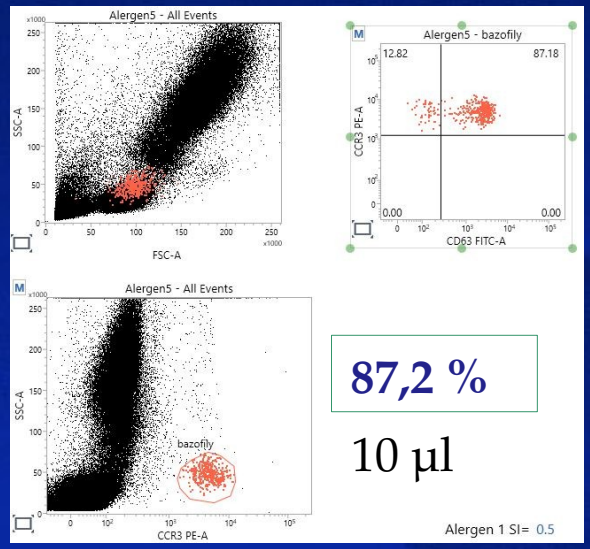
48,9 %

30 µl

Alergén Bühlmann

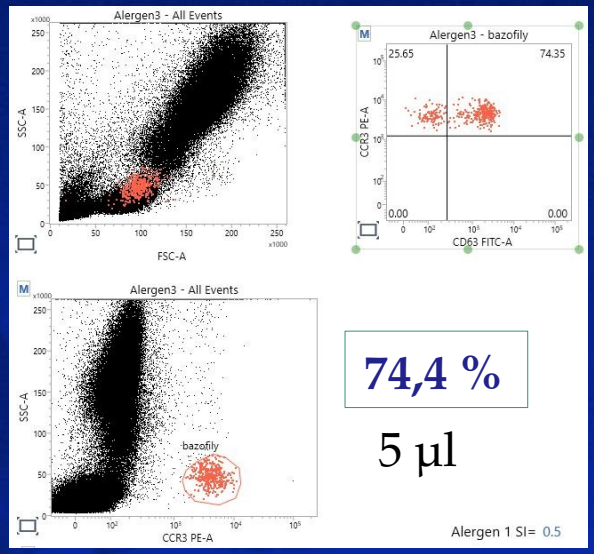
Alergén Astra Biotech

sIgE I3 - Osa
0,95 kU/I
(2026)
5,35 kU/I
(2025)



87,2 %

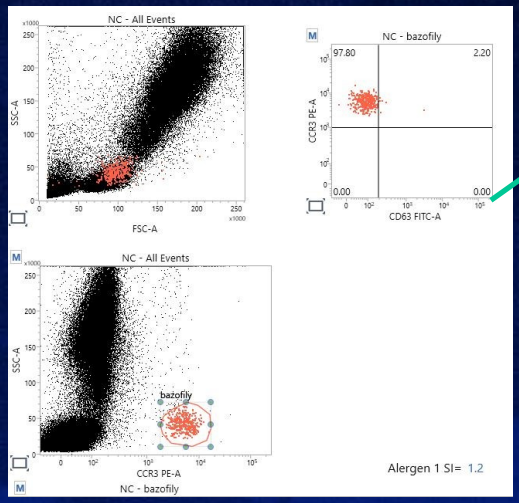
10 µl



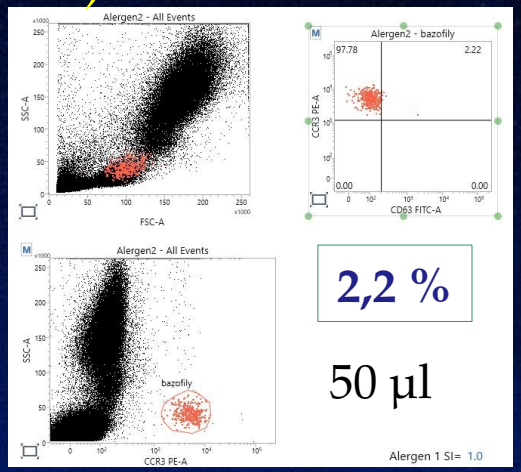
74,4 %

5 µl

Pacient 0532 (m. 35r. z 18.6.2026) - Včela

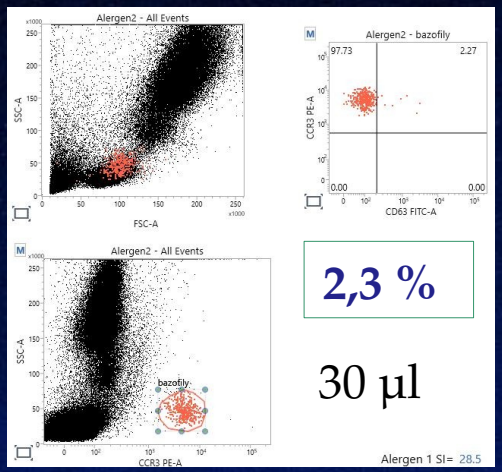


Alergén DrFooke



2,2 %

50 µl



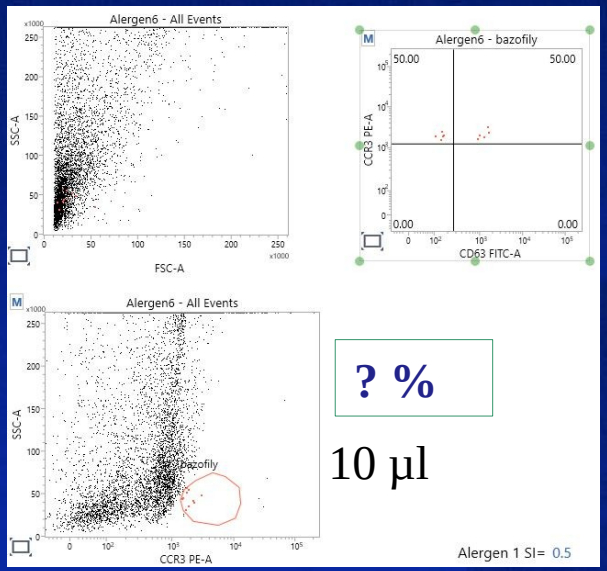
2,3 %

30 µl

Alergén Bühlmann

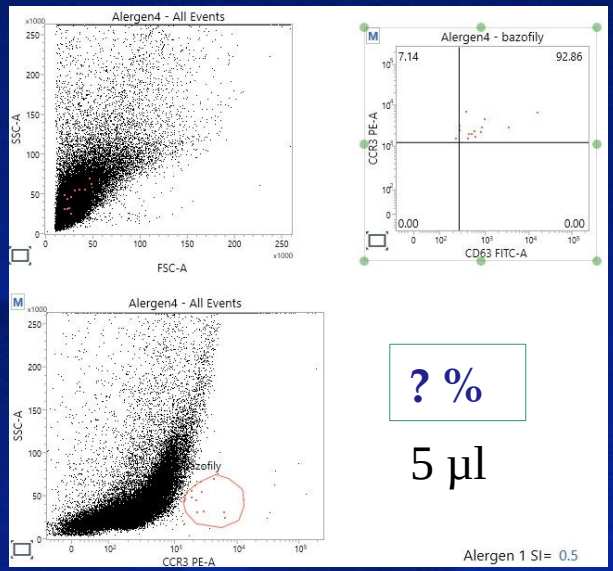
Alergén Astra Biotech

sIgE I1 - Včela
<0,35 kU/I (2026)
<0,35 kU/I (2025)



? %

10 µl



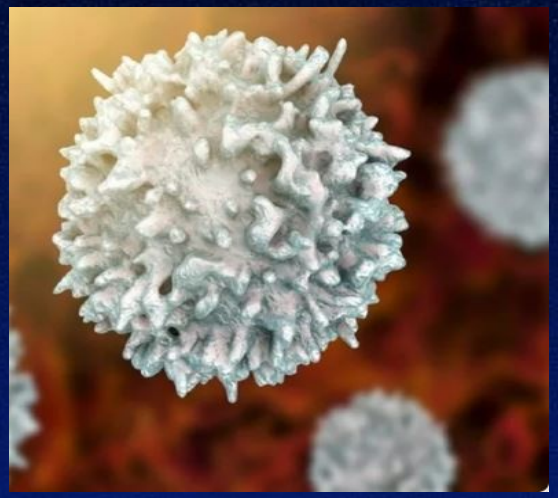
? %

5 µl

Prehľad vyšetrovaných potravinových alergénov

- Aditíva (SI=0,0-2,0)
- Farbivá (SI=0,0-2,0)
- Potraviny (0-15%)
- Obilniny (0-15%)
- Hmyz (0-10%)
- Inhalačné alergény (0-15%)
- Zvierací epitel (0-15%)
- Plesne (0-15%)
- Iné (0-15%)
- - latex

Oneskorené HR



- sprostredkované T- lymfocytmi

LTT - Lymfocytotransformačný test

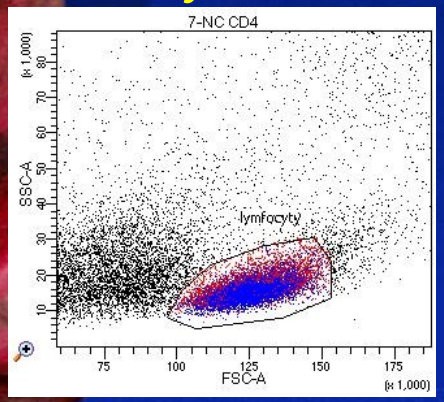
Sledovanie syntézy DNA na označenie mitoticky aktívnych buniek rádioaktívnym ^{3}H thymidinom

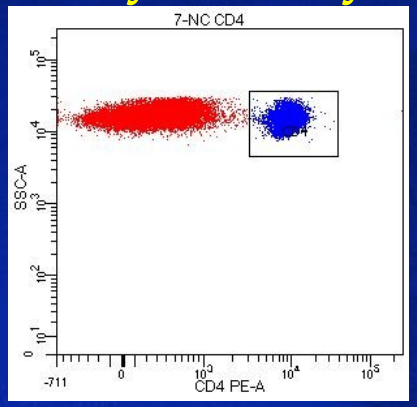
Dôkaz prítomnosti určitých liekovo-špecifických klonov T- lymfocytov

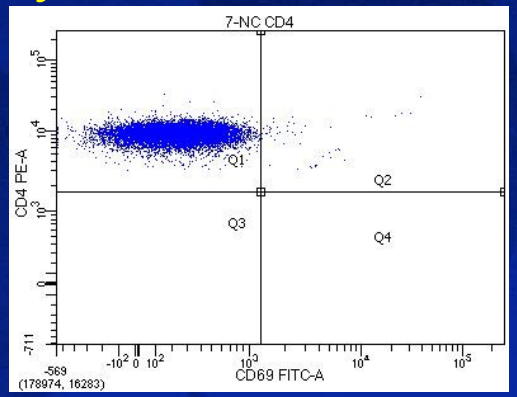
LAT - Lymfocytoaktivačný test

LAT - Lymfocyto Aktivačný Test

- Lymfocytoaktivačný test (LAT) –vyvinutý ako **alternatíva LTT.**
- Stanovujeme percentuálne zastúpenie **aktivovaných T- lymfocytov** meraním antigénu **CD69** na prietokovom cytometri po ich 48 hodinovej inkubácii s liekom pri 37˚C s 5% CO_2 .
- **Stimulačný index 2,0 ako cut-off** umožňuje odlíšiť medzi reaktívnymi a nereaktívnymi T- lymfocytmi.





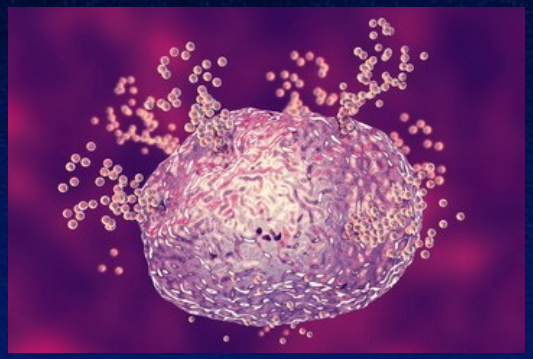




Načasovanie LAT

- stanovuje odpoveď **pamäťových T- lymfocytov**
- môže byť pozitívny po dobu mnohých rokov (10-20 rokov), ale aj strata reaktivity po 3-4 rokoch
- **nie je možné predpovedať**, či bude u pacienta reaktivita na liek pretrvávať alebo nie
- test vykonávať po **4 - 8 týždňoch od reakcie**
- vzorku **heparinizovanej krvi** doručiť čo najskôr (pracujeme so živými bunkami)

MAT – Mast cell Activation Test



- Mastocyt – koža, tráviaca sústava
- Funkcia ako bazofil, ale v tkanive

- Princíp testu:
- Prekurzory MC generované z periférnej krvi
- Senzitizácia pacientským sérom
- Inkubácia s alergénom
- Expresia povrchových markerov CD63, CD107a
- Detekcia prietokovou cytometriou

Laboratórne testy - výhody

- vysoká špecificita
- sú výhodné - bezpečné pre pacienta
- široký výber alergénov
- reprodukovateľnosť (vyššia ako u provokačných testov)
- jednoduché vybavenie (akýkoľvek prietokový cytometer)

Laboratórne testy - nevýhody

- potreba čerstvej krvi (24-48 hod.)
- pri indikácii a interpretácii laboratórnych testov je potrebné zohľadniť typ reakcie a časový odstup medzi reakciou a vyšetrením
- Non-responderi (10-15%)
- manuálna náročnosť – časová náročnosť
- subjektivita pri analýze dát (chýba štandardizácia) !
- niektoré reakcie vyvoláva metabolit lieku, nie originálna molekula

Budúcnosť bunkových testov

- BAT sa využíva ako ex vivo test v stále sa zvyšujúcej miere
- Koreluje s klinickou relevanciou
- Stanovenie alergenicity nových rekombinantných imunoterapeutík, vakcín
- Testovanie rekombinantných alergénov

Multiplexové BAT

- Fluorescenčne značené alergény (vs. neznačené) proteínovej povahy
- Šité pre všetky proteínové alergény (potraviny, jed hmyzu, inhalačné, biologiká)
- Lieky? – prevažne malé molekuly (proteínový nosič)
- Efektívne pre analýzu krížových reakcií
- Negatívny vplyv prítomných IgG4 alergén špecifických protilátok
- Porovnateľná senzitivita a špecificita so singleplexom

- Ana Koren and Peter Korosec: Multiplex basophil activation tests for allergy diagnosis: present and future aplications, Frontiers in Allergy, 2025

Záver

- Univerzálny diagnostický test zatiaľ neexistuje.

(snaha o štandardizáciu BAT testu – Flow2CAST® Bühlmann*)

- Kombinácia niekoľkých vyšetrovacích metód zvyšuje senzitivitu a špecificitu diagnostického procesu.

- Potreba kombinácie klinického vyšetrenia
  in vivo testov
  in vitro testov

** EAACI: Molecular Allergology User's Guide 2.0, 2022*


Ďakujem za pozornosť.