

Strokovni prispevek/Professional article

TEST AKTIVACIJE BAZOFILCEV (BAT) V IN VITRO DIAGNOSTIKI PRI PREOBČUTLJIVOSTI ZA STRUP KOŽEKRIKILCEV

BASOPHIL ACTIVATION TEST (BAT) IN »IN VITRO« DIAGNOSIS OF
HYMENOPTERA VENOM HYPERSENSITIVITY

*Andreja Peternelj, Mira Šilar, Renato Eržen, Nisera Bajrovič, Ema Mušič, Mitja
Košnik, Peter Korošec*

Bolnišnica Golnik, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Golnik 36, 4204 Golnik

Izveček

Izhodišča *Test aktivacije bazofilcev je metoda, pri kateri s pretočnim citometrom v periferni krvi merimo izražanje označevalcev na površini bazofilcev. Vzorec krvi stimuliramo z določeno količino alergena, ki navzkrižno poveže protitelesa IgE na njihovi površini. V alergološki diagnostiki se označevalec CD63 uporablja pri diagnozi alergijskih bolezni takojšnjega tipa, ki jih pogojujejo protitelesa IgE za klasične vdihane alergene, lateks, hrano, zdravila in strupe kožekrilcev. Test je dobrodošel tudi pri boleznih brez IgE, kot sta preobčutljivost za nekatera zdravila in nekatere oblike urtikarije. Za potrditev diagnoze po piku kožekrilca se izvedejo kožni testi in merijo specifična protitelesa IgE v serumu. Včasih pride do neskladnosti med anamnezo in rezultati potrditvenih testov. V takih primerih nastane potreba po dodatnih testih, med katerimi se zadnja leta vse bolj uveljavlja merjenje aktivacije bazofilcev s pretočnim citometrom.*

Bolniki in metode *V Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Bolnišnice Golnik smo od leta 2004 do februarja 2007 izvedli BAT za 127 bolnikov z anamnezo anafilaktične reakcije po piku kožekrilca.*

Zaključki *Ugotovili smo, da je BAT visoko občutljiva in specifična metoda, ki omogoča dokaz senzibilizacije, napoveduje stranske učinke specifične imunoterapije in razmeji klinično pomembne in nepomembne epitope. S to tehniko smo dobili tudi nove podatke o mehanizmih in učinkih imunoterapije pri preobčutljivosti za kožekrilce.*

Ključne besede *test aktivacije bazofilcev; CD63; preobčutljivost za strup kožekrilcev*

Abstract

Background *The basophil activation test relies on flow cytometric quantitation of the expression of the markers on the surface of basophils, after stimulation with the amount of allergen that cross-link IgE antibodies bound on their surface. In allergy diagnosis, the technique has been applied in the investigation of IgE-mediated allergy caused by classical inhalant allergens, Hevea latex, food, drugs and hymenoptera venoms. The technique also proves valuable in the diagnosis of non-IgE-mediated reactions such as drug hypersensitivity and the detection of autoantibodies in certain forms of chronic urticaria. To strengthen the probability that the working diagnosis for hymenoptera venom hypersensitivity is correct, confirmatory testing for skin test and IgE antibody is often performed. But sometimes clinical*

Avtorica za dopisovanje / Corresponding author:

Andreja Peternelj, Bolnišnica Golnik, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Golnik 36, 4204 Golnik, tel.: +386 4/2569432; fax: +386 4/2569143, e-mail: andreja.mr_peternelj@klinik-golnik.si

history and the results of confirmatory tests are contradictory. In such cases additional tests are necessary, among which flow cytometric quantification of in vitro basophil activation is becoming a valuable tool during the last few years.

Material and methods	<i>In Laboratory for Clinical Immunology and Molecular Genetic, Golnik, we performed BAT for 127 patients with history of anaphylactic reactions after Hymenoptera sting.</i>
Conclusions	<i>According to our findings BAT is a highly sensitive and specific technique and as an in vitro provocation assay enables sensibilisation detection, prediction of side effects from specific immunotherapy and differentiates between clinically relevant and irrelevant epitops. This technique also gave us a new information on mechanisms and effects of venom immunotherapy.</i>
Key words	<i>basophil activation test; CD63; Hymenoptera venom hypersensitivity</i>

Uvod

Test aktivacije bazofilcev (angl. Basophil Activation Test - BAT) je metoda, pri kateri s pretočnim citometrom merimo izražanje označevalcev, ki se pojavijo na površini bazofilcev po aktivaciji z alergenom.¹ Bazofilci zavzemajo le od 0,5 do 1 % deleža levkocitov. Na svoji površini izražajo visokoafinitetne receptorje za protitelesa IgE (FcεRI). V svojih citoplazemskih granulah vsebujejo histamin. Po vezavi na membrano vezanih protiteles IgE s specifičnim antigenom lahko bazofilci sproščajo že predhodno nastale mediatorje (histamin) in tvorijo nove mediatorje (metabolite arahidonske kisline, citokine).^{2,3} V 90. letih se je izkazalo, da bazofilci po aktivaciji z alergenom preurejajo izražanje številnih površinskih proteinov (npr.: CD45, CD63, CD69 in CD203c).^{1,4} Prvič je bila zamisel analize izražanja CD63 s pretočno citometrijo kot označevalca aktivacije bazofilcev predstavljena leta 1991.⁵ Površinski označevalec CD63 je 53 kDa velik glikoprotein, ki pripada družini tetraspanov. Izraža se tudi na makrofagih in krvnih ploščicah.^{1,5,6} Pri neaktiviranih bazofilcih je CD63 izražen znotrajcelično na membrani granul, ki vsebujejo histamin. Navzkrižna povezava protiteles IgE z alergenom na površini bazofilcev sproži zlitje granul s plazemsko membrano in izražanje CD63 na zunajcelični membrani bazofilcev.^{1,7}

BAT v alergološki diagnostiki

V alergološki diagnostiki se merjenje CD63 na bazofilcih uporablja pri diagnozi od IgE odvisnih preobčutljivostih za vdihane alergene, lateks, hrano, zdravila in strupe kožekrilcev.⁸ V Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Bolnišnice Golnik ugotavljamo uporabnost BAT za napoved stranskih učinkov med imunoterapijo pri bolnikih, preobčutljivih za strup čebele in ose.⁹ Njegova uporaba je dobrodošla tudi pri diagnozi od IgE neodvisnih reakcij, kot sta preobčutljivost za zdravila in določanje avtoproteles pri nekaterih oblikah urtikarije.⁸

BAT pri preobčutljivosti za strupe kožekrilcev

Preobčutljivost za strupe kožekrilcev je pogosta in smrtno nevarna bolezen, ki jo lahko z imunoterapijo zelo učinkovito zdravimo.¹⁰ Prav zato je pomembno, da alergologi odkrijejo vse bolnike z velikim tveganjem

za hude sistemske reakcije. Za potrditev alergijske senzibilizacije se izvedejo kožni testi alergije ali določijo specifična protitelesa razreda E (sIgE) v serumu.^{1,11} Vendar pa včasih pride do neujemanja med anamnezo in rezultati testov alergijske senzibilizacije. V takih primerih so potrebni dodatni testi, ki vključujejo različne *in vitro* teste in v skrajnih primerih celo precej tvegane provokacijske teste s pikom žuželke. Od metod *in vitro* se izvaja z alergenom izzvano sproščanje mediatorjev (histamin, levkotrien C₄) iz bazofilcev, zadnja leta pa se vse bolj uveljavlja merjenje aktivacije bazofilcev s pretočnim citometrom.^{1,5,7,8,11-14} Namen naše študije je pokazati uporabnost testa BAT pri ugotavljanju senzibilizacije za strup kožekrilcev.

Metode

V Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Bolnišnice Golnik - KOPA smo s testom aktivacije bazofilcev pričeli leta 2004. Uporabljamo tribarvno tehniko anti-CD123/anti-HLA DR/anti-CD63, kjer so bazofilci označeni kot CD123+/HLA DR-. Prednost te tehnike je, da se lahko uporablja vzorec celotne krvi in ni potrebno izolirati levkocitov.^{8,9,13} Vzorce heparinizirane krvi smo inkubirali 15 min na 37 °C s stimulacijskim pufrom, ki vsebuje IL-3,¹⁵ in končnimi koncentracijami strupa 0,1 ali 1 µg/ml (Hall Allergie), 0,55 µg/ml anti-FcεRI monoklonskimi protitelesi (mAb; Buehlmann Laboratories, Basel, Švica), 2 µM fMLP (L-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine; Sigma, St. Louis, MO, ZDA) ali samo s stimulacijskim pufrom. Celice smo potem 20 min inkubirali s FITC-označenimi anti-CD63 mAb, s PE-označenimi anti-CD123 mAb in PerCP-označenimi anti-HLA-DR mAb (BD Biosciences, San Jose, CA, ZDA) v ledeno mrzli vodi, da se je degranulacija ustavila. V vzorcih smo nato lizirali eritrocite (BD FACS Lysing Solution, BD), jih sprali in resuspendirali v fiksacijskem pufu ter analizirali vsaj 600 CD123 pozitivnih celic (Sl. 1) s pretočnim citometrom FACSCalibur (BD Biosciences). Določili smo delež aktiviranih oz. degranuliranih bazofilcev (CD63+). Pozitiven rezultat predstavljajo aktivirani bazofilci nad vrednostjo 15 %.^{9,13} Bolnikom so bili narejeni še kožni vbodni testi in izmerjena protitelesa sIgE v serumu s sistemom CAP-FEIA (Phadia, Uppsala, Švedska).

Sl. 1. Primer analize bazofilcev pri pretočni citometriji pri bolniku, preobčutljivem za strup čebele. Zgoraj: bazofilce se identificira kot CD123+/HLA DR-. Spodaj: določi se delež aktiviranih oz. degranuliranih bazofilcev (CD123+/HLA DR-/CD63+) pri koncentracijah strupa 0,1 in 1 µg/ml.

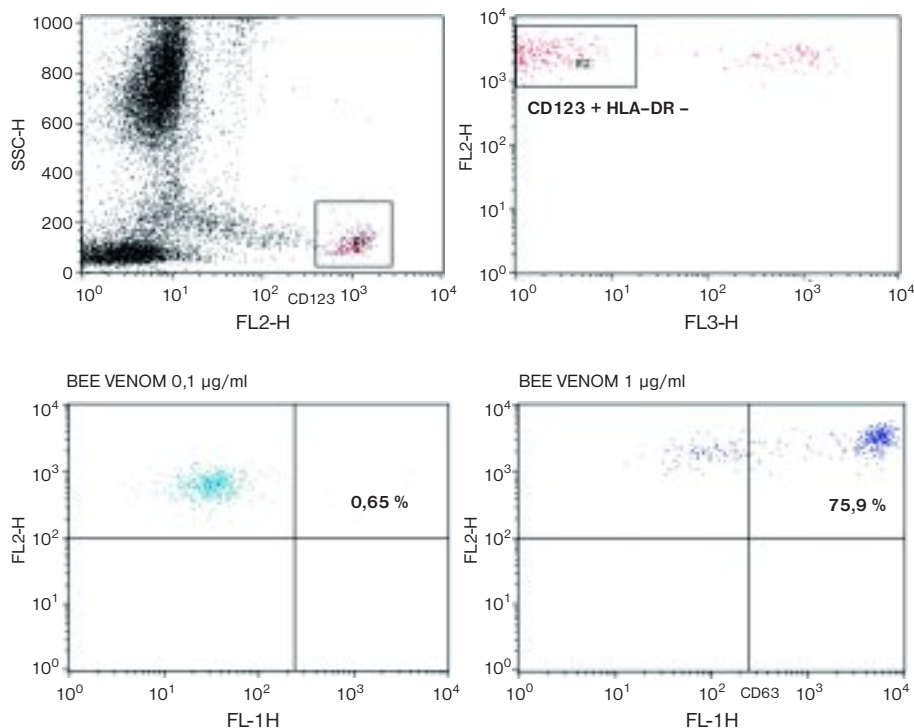


Figure 1. Example of basophil analysis with flow cytometer in patient hypersensitive to bee venom. Above: basophils are identified as CD123+/HLA DR-. Below: the percentage of activated i.e. degranulated basophils is determined (CD123+/HLA DR-/CD63+) at venom concentration of 0.1 and 1 µg/ml.

Razpr. 1. Primerjava rezultatov BAT-a, sIgE in kožnih vbodnih testov s kožekrilcem, ki je povzročil alergijsko reakcijo (II.–IV. stopnje po Müllerju). č: čebela, o: osa, sIgE: specifična protitelesa razreda E, BAT: test aktivacije bazofilcev, vbodni KT: kožni vbodni testi, P: pozitivno, N: negativno, ND: ni določeno.

Table 1. Comparison of BAT-a, sIgE and skin prick test results with cultprit insekt (patient's observation) which caused allergic reaction (II–IV Müller grades). b: bee, w: wasp, sIgE: specific antibody class E, BAT: basophil activation test, SPT: skin prick test, P: positive, N: negative, ND: not done.

Kožekrilce, ki naj bi povzročil reakcijo	Število bolnikov	BAT (č/o: število bolnikov)	sIgE (č/o: število bolnikov)	Vbodni KT (č/o: število bolnikov)
Culprit insekt (patient's observation)	Patient number	BAT (b/w: patient number)	sIgE (b/w: patient number)	SPT (b/w: patient number)
Čebela Bee	38	P/P: 13 P/N: 13 N/P: 5 N/N: 7	P/P: 10, P/N: 2, N/N: 1 P/P: 1, P/N: 8, N/N: 4 P/P: 1, N/P: 2, N/N: 2 P/P: 2, N/P: 1, N/N: 4	P/P: 1, P/N: 3*, N/P: 1, N/N: 4, P/ND: 2, ND: 2 P/P: 1, P/N: 6, N/N: 5§, ND: 1 N/P: 3, N/N: 1‡, ND: 1 P/N: 2, N/N: 2†, P/ND: 2, ND: 1†
Osa/sršen Wasp/hornet	50	P/P: 22 P/N: 3 N/P: 20 N/N: 5	P/P: 15, P/N: 4, N/N: 3 P/N: 2, N/N: 1 P/P: 6, N/P: 10, N/N: 4 P/P: 1, P/N: 1, N/N: 3	P/P: 10, P/N: 6, N/P: 1, N/N: 4, ND/N: 1 P/P: 1, P/N: 1#, N/N: 1 P/P: 3, P/N: 1, N/P: 5, N/N: 7, ND/N: 1, ND: 3 P/N: 1, N/P: 1, N/N: 2§, ND/P: 1
Čebela in osa/sršen Bee and wasp/hornet	8	P/P: 6 N/P: 1 N/N: 1	P/P: 6 N/P: 1 N/N: 1	P/N: 2, neocenljivi (dermografizem): 1, ND: 3 assessable (dermographism) N/P: 1 P/N: 1
Neprepoznan Unrecognized	31	P/P: 14 P/N: 3 N/P: 10 N/N: 4	P/P: 10, N/P: 1, N/N: 3 P/N: 2, N/N: 1 P/P: 2, N/P: 7, N/N: 1 P/P: 1, N/P: 1, N/N: 2	P/P: 2, P/N: 2, N/P: 2, N/N: 8± N/N: 3‡ P/N: 4+, N/P: 2A, N/N: 4 P/P: 1, N/N: 3+†

* pri 1 bolniku so bili intradermalni kožni testi negativni za čebelo / 1 patient had negative intradermal skin test for bee venom
 § pri 1 bolniku so bili intradermalni kožni testi pozitivni za čebelo / 1 patient had positive intradermal skin test for bee venom
 ‡ pri 1 bolniku so bili intradermalni kožni testi pozitivni za čebelo in negativni za oso / 1 patient had positive intradermal skin test for bee venom and negative for wasp venom
 † pri 1 bolniku so bili intradermalni kožni testi negativni za čebelo in oso / 1 patient had negative intradermal skin test for bee and wasp venom
 # pri 1 bolniku so bili ponovljeni kožni vbodni testi negativni za čebelo in oso / 1 patient had negative repeated skin prick test for bee and wasp venom
 ± pri 1 bolniku so bili intradermalni kožni testi pozitivni za čebelo in oso / 1 patient had positive intradermal skin test for bee and wasp venom
 ¥ pri 1 bolniku so bili ponovljeni kožni vbodni testi pozitivni za čebelo in negativni za oso / 1 patient had positive repeated skin prick test for bee venom and negative for wasp venom
 + pri 1 bolniku so bili intradermalni kožni testi negativni za čebelo in pozitivni za oso / 1 patient had negative intradermal skin test for bee venom and positive for wasp venom

Rezultati

Od leta 2004 do februarja 2007 smo izvedli BAT za 127 bolnikov z anamnezo anafilaktične reakcije II.–IV. stopnje po Müllerju po piku kožekrilca.¹⁶ Delež oseb z neodzivnimi bazofilci je približno 5 %, kar je zelo odvisno od metode; za take bolnike pa je BAT kot diagnostično orodje neuporaben.^{7,8}

Primerjali smo rezultate BAT, sIgE in kožnih vbodnih testov (vbodni KT) s strupom kožekrilca, ki naj bi po opažanju bolnika povzročil reakcijo (Razpr. 1). Izmed 38 bolnikov s sistemsko alergijsko reakcijo po piku čebele je pri 26 (68 %) BAT pozitiven za strup čebele. V skupini teh 26 bolnikov je 13 dvojno senzibiliziranih. Prisotna protitelesa za strup čebele ima 21 (55 %) bolnikov (11 dvojno senzibiliziranih). 19 (50 %) bolnikov ima pozitivne vbodne KT za strup čebele (2 dvojno senzibilizirana), od tega so pri 1 bolniku intradermalni kožni testi za strup čebele negativni, 2 bolnika pa imata pozitivne intradermalne kožne teste in negativne vbodne KT za strup čebele. Od 50 bolnikov s sistemsko alergijsko reakcijo po piku ose je pri 42 (84 %) BAT pozitiven za strup ose. Od teh 42 je 22 bolnikov dvojno senzibiliziranih. Pozitivne sIgE za strup ose ima 31 (62 %) bolnikov (21 dvojno senzibiliziranih) in le 22 (44 %) bolnikov ima pozitivne vbodne KT za strup ose (14 dvojno senzibiliziranih). Pri 8 bolnikih, ki naj bi po njihovem opažanju imeli reakcijo po piku čebele in ose ali sršena, so rezultati za BAT in sIgE skladni (6 bolnikov ima [75 %] pozitiven BAT in sIgE za oba strupa). Noben bolnik nima pozitivnih vbodnih KT za oba strupa, s tem da so pri 1 bolniku zaradi dermatografizma rezultati neocenljivi, pri 3 pa vbodni KT niso določeni.

Razpravljanje

Naši rezultati kažejo, da je BAT občutljiv in visoko specifičen test za določanje preobčutljivosti za strup kožekrilcev. Izkazal se je za učinkovitejšega od določanja protiteles sIgE in kožnih vbodnih testov. Naše ugotovitve so potrdile tudi študije drugih skupin. Erdmann s sod. je ugotovil, da je BAT primerljiv z intradermalnimi kožnimi testi in sIgE pri bolnikih, preobčutljivih za strup ose, in je tako koristen pri dopolnitvi rutinskih diagnostičnih testov, kot so sIgE, ker poveča občutljivost za detekcijo senzibilizacije.¹⁴ Podobno sta ugotovila Sturm s sod.¹³ in Eberlein-König s sod.¹² pri bolnikih, preobčutljivih za strup čebele in ose.

Težavo pri izbiri strupa za imunoterapijo velikokrat predstavljajo bolniki, ki imajo pozitivne kožne vbodne teste in/ali sIgE za čebelo in oso. Iz naših podatkov lahko sklepamo, da BAT ne zazna protiteles sIgE proti ogljikohidratnim epitopom, ki so velikokrat vzrok dvojno pozitivnih rezultatov in so verjetno klinično nepomembni.¹⁷ Izmed 51 bolnikov, ki imajo pozitivne sIgE za strup čebele in ose, je BAT pri 10 (20 %) pozitiven samo za en strup. V tej skupini je BAT pri 9 (90 %) bolnikih pozitiven za strup ose in pri 1 za strup čebele. Pri vseh ostalih je BAT pozitiven za oba strupa.

BAT je uporabna metoda posebno v primerih, kadar je z ostalimi diagnostičnimi postopki težko ali nemožno določiti, s katerim strupom se bo izvajala imunoterapija.¹⁸ To so potrdili tudi naši rezultati, saj je BAT pozitiven pri 16 (67 %) od 24 bolnikov, ki so po piku insekta doživeli sistemsko alergijsko reakcijo in imajo negativne sIgE in negativne kožne vbodne teste. 10 bolnikov ima BAT pozitiven za en strup (5 za strup čebele, 5 za strup ose) in 6 za oba strupa.

Zaključki

Naši rezultati kažejo, da je odgovor na celični ravni osnova za klinično manifestacijo alergoloških bolezni. V Bolnišnici Golnik izvajamo BAT v nejasnih primerih, z negativnimi ali nasprotujočimi si rezultati ostalih testov, pri ugotavljanju senzibilizacije, napovedi stranskih učinkov med specifično imunoterapijo⁹ in pri ločevanju med klinično pomembno in nepomembno senzibilizacijo.

Literatura

- Hamilton GR, Adkinson NF Jr. Reviews and feature articles. Current reviews of allergy and clinical immunology. In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 213–25.
- Schwartz LB, Kepley C. Development of markers for human basophils and mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 1231–40.
- Schroeder JT, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. The role of the basophil in allergic inflammation. *Allergy* 1995; 50: 463–72.
- Bochner SB. Systemic activation of basophils and eosinophils: Markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 292–302.
- Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 328–38.
- Metzelaar MJ, Wiingaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. CD63 antigen: a novel lysosomal membrane glycoprotein cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 3239–45.
- Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 332–9.
- Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; 61: 1028–39.
- Kosnik M, Silar M, Bajrovic N, Music E, Korosec P. High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. *Allergy* 2005; 60: 1401–6.
- Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Reviews and feature articles. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1025–34.
- Hamilton RG, Adkinson NF Jr. Assessment and modulation of the immune response. 23. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 697–701.
- Eberlein-König B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2006; 16: 5–10.
- Sturm GJ, Böhm E, Trummer M, Wieglerhofer I, Heinemann A, Aberer W. The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy* 2004; 59: 1110–7.
- Erdmann SM, Sachs B, Kwicien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 2004; 59: 1102–9.

15. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin JC. Diagnosis of latex allergy: comparison of histamine release and flow cytometric analysis of basophil activation. *Inflamm Res* 1996; 45: S35-6.
16. Zdravljenje anafilaksije – strokovna izhodišča. *Zdrav Vestn* 2002; 71: 479-81.
17. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson IB, Altmann F, Wohrl S, et al. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 1045-52.
18. Eberlein-König B, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004; 14: 10-6.

Prispelo 2007-06-15, sprejeto 2007-12-11