

Received: 19.03.2020
Accepted: 12.05.2020
Published: 11.12.2020

Test aktywacji bazofilów w diagnostyce alergii*

Basophil activation test in allergy diagnostics

Karolina Nowakowska¹, Emilia Królewicz², Andrzej Gamian², Wojciech Barg¹

¹Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

²Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

*Publikacja powstała w ramach projektu finansowanego w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego pod nazwą „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” w latach 2019–2022, nr projektu 016/RID/2018/19.

Streszczenie:

Występowanie chorób alergicznych w Polsce i na świecie rośnie w ostatnich latach. W alergiach IgE-zależnych najczęściej stosowanymi metodami diagnostycznymi są testy skórne punktowe (SPT, Skin Prick Test) oraz oznaczenie stężenia swoistego IgE (sIgE), skierowanego przeciwko konkretnemu alergenowi. Obie metody mają jednak pewne wady, a uzyskiwane wyniki mogą być niejednoznaczne. Rutynowe testy diagnostyczne nie zawsze są wiarygodne, szczególnie w przypadku niektórych leków i pokarmów. W związku z tym należy posługiwać się dodatkowymi narzędziami laboratoryjnymi. Obiecującą metodą diagnostyczną jest test aktywacji bazofilów (BAT, Basophil Activation Test), wykorzystujący technikę cytometrii przepływową. W artykule omówiono przydatność i skuteczność BAT w rozpoznawaniu alergii do celów naukowych. W porównaniu z powszechnie stosowanymi metodami diagnostycznymi BAT jest kosztownym i skomplikowanym narzędziem laboratoryjnym, ale umożliwia sprawne i skuteczne rozpoznawanie alergii. Podstawowym problemem związanym z wprowadzeniem BAT do rutynowej diagnostyki alergologicznej jest brak standaryzacji i walidacji tej metody. Dlatego istnieje uzasadniona potrzeba kontynuowania badań w tej dziedzinie. BAT może w przyszłości zapewnić poprawną diagnostykę alergii, jeśli zostanie zwalidowany i wystandaryzowany.

Słowa kluczowe:

diagnostyka alergii, test aktywacji bazofilów (BAT), cytometria przepływowa

Summary:

The prevalence of allergic diseases in Poland and in the world continues to rise in recent years. The most commonly used methods for diagnosing IgE – dependent allergies are skin prick testing (SPT) and assessment of specific IgE (sIgE) directed against specific allergens. However, both methods have some disadvantages and the obtained results may be inconsistent. In particular, routine diagnostic tests are not always effective for some drugs and foods. Consequently, additional laboratory tools should be used. Basophil activation test (BAT) based on flow cytometry is a promising diagnostic method. The present paper demonstrates the usefulness and effectiveness of BAT protocols in allergy diagnosis in scientific research. In comparison to routinely used diagnostic methods, BAT is an expensive and complicated laboratory tool. However, it offers the possibility to efficiently and effectively recognize allergies. Introducing BAT into routine diagnostics in allergology is problematic because this method has not yet been standardized and validated. Therefore, there is a justified need to continue research in this field. If standardized and validated, BAT may offer a reasonable improvement in allergy diagnostics in the future.

Keywords:

allergy diagnostics, basophil activation test (BAT), flow cytometry

GICID 01.3001.0014.5766
DOI: 10.5604/01.3001.0014.5766
Word count: 4 860

Tables:	6
Figures:	–
References:	60

Adres autorki: mgr inż. Karolina Nowakowska, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 66, 50-369 Wrocław;
e-mail: karolina.nowakowska@student.umed.wroc.pl

WSTĘP

W ostatnich latach w Polsce i na całym świecie obserwuje się szybki wzrost występowania alergii, zwłaszcza alergicznego nieżyty nosa i astmy alergicznej. Program ECAP (Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce) zrealizowany w latach 2006–2008 miał na celu ocenę częstości występowania chorób alergicznych w Polsce oraz ukazanie skali problemu. Spośród 4783 zbadanych osób ponad 40% miało dodatnie testy na powszechnie występujące alergeny, a u prawie 50% wystąpiła co najmniej jedna cecha alergii. Najczęściej rozpoznawanymi chorobami alergicznymi były: astma, alergiczne zapalenie śluzówki nosa, alergie na leki, pokarmy, lateks, jad owadów, atopowe zapalenie skóry, pokrzywka oraz obrzęk naczynioruchowy [48]. W tabeli 1 zamieszczono informacje dotyczące odsetka poszczególnych rozpoznań w programie ECAP.

Ważnym aspektem poruszonym w badaniach ECAP jest wiarygodność diagnostyki alergii i nadwrażliwości. Spośród wszystkich chorych na astmę, tylko 30% było zdiagnozowanych przed włączeniem ich do programu [48]. W takiej sytuacji duże znaczenie ma rozwój i wprowadzanie do praktyki klinicznej skutecznych metod diagnozowania chorób alergicznych. W diagnostyce alergologicznej dostępne są zarówno metody *in vitro*, jak i *in vivo*. Cechą korzystną *in vitro* jest brak ryzyka dla pacjenta. Metody *in vivo* polegają na podaniu alergenu w celu wywołania reakcji układu immunologicznego.

Reakcje wywołane przez testy *in vivo* powodują u pacjenta np. świąd i obrzęk skóry po testach skórnych punktowych (SPT). Testy punktowe nie zawsze są możliwe do wykonania u pacjentów cierpiących na: atopowe zapalenie skóry (AZS), dermatografizm lub stale przyjmujących niektóre leki, np. antyhistaminowe, ale również glikokortykosteroidy, benzodiazepiny, anksjolityki, a także trójpierścieniowe antydepresanty [7, 25, 30]. W przypadku testów skórnych pacjent musi odstawić leki przeciwalergiczne, co często jest niemożliwe. Testy skórne punktowe są obciążone ryzykiem wystąpienia miejscowej niepożądanego reakcji, uogólnionej reakcji systemowej, a nawet wstrząsem anafilaktycznym. Na wynik testu skórniego mogą mieć również wpływ choroby niezwiązane z alergią, np. choroby zakaźne lub zaburzenia neurologiczne [7]. Leki zażywane w chorobach psychicznych mogą dawać fałszywie ujemne testy skórne. Niemniej jednak SPT są często używane ze względu na: dużą skuteczność diagnostyczną, łatwość i szybkość wykonania oraz stosunkowo niewielkie koszty. W Polsce diagnostyka alergii wziewnych opiera się głównie na testach skórnych. SPT wykazują natychmiastową

reakcję alergiczną IgE-zależną i są pierwszą sugerowaną metodą diagnostyczną u pacjentów z alergicznym nieżytem nosa i/lub astmą w każdym wieku [7]. Należy podkreślić, że SPT mogą być wykonywane tylko na zdrowej skórze. Na wiarygodność testów duży wpływ ma jakość ekstraktów alergenowych – testy mogą być natywne, tzn. otrzymane z naturalnych alergenów i rekombinowane, czyli uzyskane z zastosowaniem metod inżynierii genetycznej. Ważnym czynnikiem, mającym wpływ na wiarygodność testów punktowych, jest odpowiedni dobór alergenów, charakterystycznych dla danego regionu [7].

Testy śródskórne (IDST, Intradermal Skin Test) nie są stosowane w rutynowej diagnostyce alergii wziewnych i pokarmowych, ale są bardzo wartościowe w sytuacjach, gdy potrzebna jest wysoka czułość testu, jak np. w diagnostyce alergii na leki lub jady owadów [8].

Pomiar stężenia swoistej alergenowo immunoglobuliny klasy E w surowicy krwi jest najczęściej mierzony testem *in vitro* w diagnostyce alergii IgE-zależnych. Jest prostym i bezpiecznym dla pacjenta badaniem, polecanym małym dzieciom oraz osobom, które z różnych względów nie mogą odstawić np. leków przeciwhistaminowych. Według Goswami i wsp. [25] pomiar stężenia sIgE skierowanych przeciwko alergenom wziewnym jest lepszym narzędziem do wykrywania swoistości alergenów, ale SPT wydają się bardziej czułe.

TEST AKTYWACJI BAZOFILÓW (BAT)

W 1994 r. Sainte-Laudy i wsp. jako pierwsi przeprowadzili test aktywacji bazofilów (Basophil Activation Test, BAT) [46]. Technika pomiarowa, wykorzystywaną w BAT, jest cytometria przepływową, która umożliwia nie tylko zliczanie komórek krwi, ale również ich immunofenotypowanie. Test wykorzystuje cząsteczki występujące na powierzchni komórek (antygeny różnicowania; CD, Cluster of Differentiation). Markerem aktywacji jest wykazanie na powierzchni bazofila albo zwiększenia ekspresji oznaczanej cząsteczki, która występuje już w spoczynku, albo pojawienia się cząsteczki niewystępującej na powierzchni nieaktywowanej komórki.

Do degranulacji bazofilów dochodzi w wyniku dwóch rodzajów reakcji – IgE-zależnej oraz IgE-niezależnej. Pierwsza z nich jest skutkiem aktywacji i agregacji FcεR1; receptora o wysokim powinowactwie do cząsteczek IgE. W wyniku pobudzenia FcεR1 uruchomiona zostaje kaskada reakcji, prowadzących do uwolnienia uformowanych wcześniej *de novo* mediatorów reakcji. Degranulacja

Tabela 1. Odsetek poszczególnych rozpoznań wg wieku w badaniach lekarskich programu ECAP (n = 4783) [48]

Wiek w latach	ROZPOZNANIE								
	Odsetek osób z rozpoznanymi schorzeniami alergicznymi [%]	Odsetek osób z dodatnimi testami skórnymi [%]	Alergiczny nieżyt nosa [%]	Astma [%]	Atopowe zapalenie skóry (AZS) [%]	Alergia na pokarmy [%]	Uczulenie na owady [%]	Pokrzywka [%]	Obrzęk z pokrzywką [%]
6–7	40	39	24	11	9	13	2	5	0
13–14	43	49	30	11	9	11	2	5	0
20–44	39	48	30	9	4	5	3	8	1

Tabela 2. Zestawienie wyników BAT w wybranych badaniach w diagnostyce alergii wziewnej

Autor	Kraj	Alergen sprawczy	Marker aktywacji	Liczba badanych	Próg odcięcia [%]	Czułość [%]	Swoistość [%]	Literatura
Ogular i wsp. (2017)	Turcja	Ekstrakt alergenów roztocza kurzu domowego	CD63	62	12,5	90,0	73,0	[42]
Ogular i wsp. (2017)	Turcja	Ekstrakt alergenów pyłków traw	CD63	62	11,0	96,0	93,0	[42]
Wolańczyk-Mędrala i wsp. (2011)	Polska	Ekstrakt alergenów pyłków traw	CD164	49	4,0	100	100	[58]
Gómez E. i wsp. (2013)	Hiszpania	Roztocze kurzu domowego (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>)	CD63	24	N/A	85,0	93,0	[24]
Özdemir i wsp. (2011)	Turcja	Tymotka łąkowa (<i>Phleum pratense</i>)	CD203c	40	14,05	100	100	[44]

N/A – niedostępne

zachodzi szybko, a łączenie się struktur wewnątrzkomórkowych prowadzi do śmierci komórki. Bazofile mogą być aktywowane również bez wykorzystania FcεRI, przez cząsteczki IgG, IgD, IL-3, substancje endogenne, np. składniki układu dopełniacza lub egzogenne, jak niektóre peptydy. Ten typ degranulacji powoduje niewielkie zmiany morfologiczne, ale ziarnistości pozostają w komórce [5]. Przedstawione dwa sposoby aktywacji bazoofilów pozwalają na szerokie zastosowanie BAT nie tylko w alergii IgE-zależnej, ale również w nadwrażliwości na NLPZ, czy na zastosowanie środków kontrastowych.

W BAT stosowane są różne markery identyfikacji i aktywacji bazofila. Jako pierwszą zastosowano cząsteczkę anty-IgE, ale badania z jej wykorzystaniem nie okazały się wystarczająco skuteczne i wiarygodne [17]. Najczęściej stosowanym markerem do identyfikacji bazofila jest CD203c. Ponieważ w stanie spoczynku CD203c wykazuje jedynie słabą ekspresję, istnieje ryzyko kontaminacji innymi komórkami [34]. Obecnie stosowanymi markerami identyfikacji bazofila są: CRTH2, CD123 i CCR3 (znany pod wcześniejszą nazwą jako CD193) [11, 17, 28].

BAT pozwala monitorować reakcję bazofila na kontakt z alergenem w różnych stężeniach. Najczęściej stosowanym markerem aktywacji bazofila, o udowodnionej czułości i swoistości, jest obecnie CD63 uznawany za „złoty

standard BAT” [35]. Do oznaczenia aktywacji bazoofilów może być również użyty CD203c; za miarę aktywacji przyjmuje się wzrost ekspresji cząsteczki na powierzchni bazofila w porównaniu do ekspresji w stanie spoczynku [35]. Ponadto za pomocnicze lub opisane w nielicznych badaniach antygeny aktywacji bazofila uznaje się: CD11b, CD11c, CD13, CD45, CD69, CD107a i CD164 [38, 58]. Obecnie badanych jest jednak coraz więcej różnych markerów, wykazujących nowe właściwości.

Dużą niedogodnością BAT jest konieczność przeprowadzenia testu w krótkim czasie po pobraniu krwi; zazwyczaj 4–24 h [34]. Przedłużenie procedury o kolejne godziny zwiększa ryzyko spadku żywotności bazoofilów w warunkach *in vitro*.

Odczyt cytometryczny próbek konieczny jest zaraz po ich przygotowaniu, ze względu na krótki czas fluorescencji znaczników używanych do detekcji aktywacji bazoofilów. Analiza i interpretacja wyników BAT, w porównaniu z testami skórnymi, jest o wiele bardziej czasochłonna i wymaga specjalistycznej wiedzy i doświadczenia.

Warto również zwrócić uwagę na tzw. anergię bazofila – prawie 10% pacjentów posiada bazofile nieodpowiadające na stymulację. Istnieje jednak możliwość wykluczenia tych osób z badania dzięki zastosowaniu kontroli pozytywnej, np. anty-IgE [1].

Tabela 3. Zestawienie wyników BAT w wybranych badaniach w diagnostyce alergii pokarmowej

Autor	Kraj	Alergen sprawczy	Marker aktywacji	Liczba badanych	Próg odcięcia [%]	Czułość [%]	Swoistość [%]	Literatura
Deng i Yin (2019)	Chiny	Brzoskwinie	CD63	38	19,4	100	86,3	[15]
Ruinemans-Koerts i wsp. (2019)	Holandia	Mleko krowie	CD63	86	N/A	100	100	[45]
Santos i wsp. (2014)	Wielka Brytania	Orzeszki ziemne	CD203c	65	1,88	95,2	96,0	[49]
Tokuda i wsp. (2009)	Japonia	Pszenica	CD203c	58	14,4	85,0	77,0	[55]
Ebo i wsp. (2008)	Belgia	Krewetki	CD63	20	6,0	100	100	[20]

N/A – niedostępne

Tabela 4. Zestawienie wyników BAT w wybranych badaniach w diagnostyce alergii na jad owadów błonkoskrzydłych

Autor	Kraj	Alergen sprawczy	Marker aktywacji	Liczba badanych	Próg odcięcia [%]	Czułość [%]	Swoistość [%]	Literatura
Balzer i wsp. (2014)	Niemcy	Ekstrakt alergenów jadu osy: Ves v1, Ves v2, Ves v3, Ves v5	CD63	60	15,7	53,3–82,6	100	[4]
Bidad i wsp. (2013)	Holandia	Ekstrakt alergenów jadu osy	CD63	17	N/A	87	100	[6]
Korošec i wsp. (2013)	Słowenia	Ekstrakt alergenów jadu osy: Ves v1, Ves v5 i jadu pszczoły: Api m1	CD63	21	15,0	81	85	[36]
Žitnik i wsp. (2012)	Słowenia	Ekstrakt alergenów jadu pszczoły i osy	CD63	31	15,0	100	74	[60]
Scherer i wsp. (2008)	Szwajcaria	Ekstrakt alergenów jadu pszczoły	CD63	37	10,0	89,5	94,9	[51]
		Ekstrakt alergenów jadu osy	CD63	37	10,0	86,7	97,2	

N/A – niedostępne

Skuteczność BAT w diagnostyce alergii wziewnej

Obecnie BAT w alergii inhalacyjnej wykorzystywany jest tylko w badaniach naukowych. Jednak potwierdzono jego bardzo dużą skuteczność w diagnozowaniu alergicznego nieżytu nosa, np. przy alergii na roztocze kurzu domowego (*Dermatophagoides pteronyssinus*) [16]. Skuteczność BAT została udowodniona również w uczuleniu na pyłek tymotki łąkowej (*Phleum pratense*). Wykazano, że BAT dobrze koreluje z testem prowokacji donosowej ($r = 0,54$, $p < 0,05$) [40]. BAT użyto także w diagnostyce innych chorób alergicznych, np. przewlekłej pokrzywki [13]. W tabeli 2 przedstawiono wyniki BAT uzyskane w wybranych badaniach z alergenami inhalacyjnymi.

Skuteczność BAT w diagnostyce alergii pokarmowej

Test aktywacji bazofilów jest przydatny w diagnozowaniu alergii pokarmowej, np. w alergii na mleko krowie [59] lub nawet mleko ośle [23]. Wykorzystano go również w badaniach alergii na: orzeszki ziemne [9, 29] i laskowe, pszenicę i białko jaja kurzego [50], a także brzoskwinie [56] lub

sezam, chociaż w przypadku sezamu największą wartość diagnostyczną miało połączenie BAT oraz SPT [2]. W tabeli 3 zebrano wyniki BAT z wybranymi alergenami pokarmowymi.

Zastosowanie BAT w diagnostyce alergii na jad owadów błonkoskrzydłych

Obraz kliniczny w połączeniu z pomiarami stężenia sIgE oraz testami skórnymi może wystarczyć do zdiagnozowania alergii na jad owadów błonkoskrzydłych, ale do 60% pacjentów uczulonych na jad owadów może reagować w testach z więcej niż jednym jadem owadów należących do rzędu *Hymenoptera* [54]. To komplikuje podjęcie decyzji o rozpoczęciu immunoterapii swoistej właściwym alergenem. Wprowadzenie na rynek rekombinowanych alergenów molekularnych, zwłaszcza jadu osy, umożliwiło rozwiązanie wielu wątpliwych przypadków. W sytuacji, gdy BAT jest pozytywny zarówno z alergenami jadu osy, jak i pszczoły, najczęściej możliwe jest zidentyfikowanie alergenu dominującego [18, 31, 54]. Czułość i swoistość BAT z wyciągami jadów owadów błonkoskrzydłych

Tabela 5. Zestawienie wyników BAT w wybranych badaniach w diagnostyce alergii na leki

Autor	Kraj	Alergen sprawczy	Marker aktywacji	Liczba badanych	Próg odcięcia [%]	Czułość [%]	Swoistość [%]	Literatura
Uyttebroek i wsp. (2016)	Belgia	β-laktamy	CD63	33	>5,0	33	94	[57]
			CD203c			67	94	
Fernández i wsp. (2016)	Hiszpania	Chinolony	CD63	11	>5,0	9,1	77,8	[22]
			CD203c			36,4	94,4	
Hagau i wsp. (2013)	Rumunia	Środki zwiotczające (NMBA)	CD63	56	5,1	68,18	100	[27]
Ariza i wsp. (2014)	Hiszpania	Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)	CD63	91	*SI>3	100	31,1	[3]
Salas i wsp. (2013)	Hiszpania	Jodowe środki kontrastowe (JSK)	CD63	28	N/A	63	100	[47]

*SI – wartość graniczna wskaźnika stymulacji; N/A – niedostępne

Tabela 6. Zestawienie wyników BAT z An-V i alergenami wziewnymi

Autor	Ekstrakt alergenowy, stężenie	Czułość i swoistość [%]	Ekstrakt alergenowy, stężenie	Czułość i swoistość [%]	Ekstrakt alergenowy, Stężenie	Czułość i swoistość [%]
Barg (2015) [5]	<i>D.pteronyssinus</i> , 225 ng/ml	100,0	<i>D.pteronyssinus</i> , 22.5 ng/ml	80,0	<i>D.pteronyssinus</i> , 2.25 ng/ml	N/A
		100,0		100,0		N/A
Barg (2015) [5]	<i>B.verrucosa</i> , 22.5 ng/ml	75,0	<i>B.verrucosa</i> , 2.25ng/ml	71,4	<i>B.verrucosa</i> , 0.225ng/ml	N/A
		96,2		100,0		N/A
Skotny (2016) [52]	<i>S.cereale</i> , 500 SBU/ml	97,0	<i>S.cereale</i> , 50 SBU/ml	95,0	<i>S.cereale</i> , 5 SBU/ml	75,0
		100,0		100,0		100,0
Królewicz i wsp. (2018) [37]	<i>A.alternata</i> , 100 SBU/ml	100,0	<i>A.alternata</i> , 10 SBU/ml	93,8	<i>A.alternata</i> , 1 SBU/ml	90,6
		100,0		100,0		100,0

N/A – niedostępne

przeważnie jest zadowalająca i sięga 80–100% [19, 32, 36]. W tabeli 4 przedstawiono wybrane wyniki BAT z alergenami jadów owadów błonkoskrzydłych.

Zastosowanie BAT w diagnostyce alergii na leki

Test aktywacji bazofilów jest przydatny w diagnostyce reakcji na leki, jego czułość waha się w granicach 50–60%, natomiast swoistość wynosi 80–90% [21]. BAT wykorzystywano m.in. w diagnostyce uczuleń na antybiotyki β-laktamowe, swoistość tego testu była wysoka i wynosiła 90%, natomiast czułość była o wiele niższa – 36,6% [39]. W innych badaniach BAT nad β-laktamami czułość sięgała 50% [21]. Dużą swoistość wykazano również w nadwrażliwości na niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) – 95,1%, choć niestety czułość wynosiła zaledwie 22,4% [39]. BAT jest użyteczny także w nadwrażliwości na cytostatyki. W badaniach nad oksaliplatyną wykorzystano CD203c oraz CD63 jako markery aktywacji bazofila. W przypadku tego eksperymentu, lepsze wyniki uzyskano z CD203c w porównaniu ze „złotym standardem” – CD63 [43]. Test znalazł również zastosowanie w badaniach nad nadwrażliwością na alemtuzumab, przeciwciało monoklonalne, wykorzystywane

jako lek w stwardnieniu rozsianym [26], a także przy diagnozowaniu anafilaksji na Etoricoxib, lek używany m.in. w reumatoidalnym zapaleniu stawów [12]. Można więc stwierdzić, że BAT nadaje się do diagnozowania nadwrażliwości na leki, również wtedy, gdy inne metody diagnostyczne są zawodne [32].

Przyjmuje się, że BAT jest użyteczny w diagnostyce uczuleń na środki zwiotczające [21], jednak w najnowszych badaniach wykazano, że BAT pozwala na identyfikację alergenu sprawczego u 78,9% uczulonych, podczas gdy wyniki SPT były pozytywne u 100% osób z grupy badanej [16]. W tabeli 5 przedstawiono wyniki BAT właściwe dla wybranych badań z poszczególnymi grupami leków.

Zastosowanie BAT w ocenie skuteczności immunoterapii alergicznej

Określenie odpowiedzi bazofila na alergen jest skutecznym narzędziem w monitorowaniu skutków immunoterapii swoistej (SIT, Specific Immunotherapy). Odczulanie jest powszechnie stosowaną metodą leczenia pacjentów z chorobami alergicznymi o mechanizmie z udziałem

przeciwciał IgE. Celem SIT jest wytworzenie tolerancji immunologicznej na alergen sprawczy. Mechanizm tego procesu nadal nie został całkowicie poznany [53]. Istnieją pojedyncze doniesienia, że BAT może być wykorzystany do monitorowania skuteczności immunoterapii w przypadku alergenów wziewnych i jadu owadów błonkoskrzydłych [14, 33]. W przeciwieństwie do pomiaru stężenia sIgE, BAT może być pomocny w ocenie nie tylko reakcji IgE-zależnych, lecz także IgE-niezależnych. W związku z tym, BAT jest pomocny przy potwierdzaniu alergii na jad owadów błonkoskrzydłych przed włączeniem immunoterapii, zwłaszcza u pacjentów z ujemnym wynikiem stężenia sIgE [1]. Z tego powodu w BAT upatruje się potencjalnego narzędzia, dzięki któremu możliwe będzie poszerzenie wiedzy na temat molekularnego mechanizmu odpowiedzi bazofila na alergeny [10], jednak nie jest to jeszcze dokładnie poznane i wymaga dalszych badań.

BAT z aneksyną V

Aneksyna V (An-V) jest powszechnie wykorzystywana jako marker w wykrywaniu wczesnej apoptozy komórek, ale nie jest stosowana jako marker aktywacji bazofila. Kierowany przez Prof. W. Mędralę zespół z naszego ośrodka jako pierwszy zastosował An-V w charakterze marker aktywacji bazofila.

W 2015 r. Barg przedstawił pierwszy eksperyment wykorzystujący An-V w celu wykazania aktywacji bazofila i zaproponował nazwanie tego protokołu aktywacji bazofila jako: test wiązania aneksyny na powierzchni błony bazofila (A-BBA, Annexin-Basophil Binding Assay) [5]. Badanie przeprowadzono u 28 pacjentów uczulonych na roztocze kurzu domowego (*Dermaphagoides pteronyssinus*) i u 34 uczulonych na pyłek brzozy (*Betula verrucosa*). Wszyscy pacjenci mieli objawy kliniczne po ekspozycji na alergen sprawczy i dodatnie testy skórne na przyjęte do badania alergeny wziewne. W eksperymencie z wyciągiem alergenowym roztocza oszacowana suma czułości i swoistości wynosiła 200% przy stężeniu ekstraktu 225 ng/ml i 180% przy stężeniu 22,5 ng/ml. Nieco mniejszą skuteczność testu uzyskano w BAT z ekstraktem alergenowym brzozy. Suma czułości i swoistości metody wynosiła prawie 171% dla obu stężeń: 22,5 ng/ml i 2,25 ng/ml przyjętych do eksperymentów. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 6.

W innym eksperymencie Skotny i wsp. [52] wykazali, że A-BBA może skutecznie odróżnić pacjentów uczulonych na żyto (*Secale cereale*) od zdrowych osób. Badana grupa obejmowała 37 osób z uczuleniem na żyto i 32 zdrowych ochotników. W celu potwierdzenia lub wykluczenia nadreaktywności, u wszystkich uczestników badania wykonano SPT oraz oznaczenie stężenia sIgE przeciwko alergenowi

żyta. Szczegółowe wyniki BAT z An-V i wyciągiem alergenowym żyta przedstawiono w tabeli 6.

Test wiązania aneksyny przeprowadzili również Królewicz i wsp. z użyciem wyciągu alergenów *Alternaria alternata* [37]. Badanie przeprowadzono u 65 osób, z których 32 były uczulone na *Alternaria*, tj. wykazywały objawy kliniczne w przypadku narażenia na alergen pleśni i miały pozytywny test skórny z tym antygenem, a 33 zdrowych uczestników badania tworzyło grupę kontrolną. Szczegółowe wyniki dla BAT z An-V i wyciągiem alergenowym pleśni *Alternaria alternata* przedstawiono w tabeli 6.

Nowakowska i wsp. [41] rozpoczęli badanie pilotażowe, które ma na celu porównanie skuteczności BAT z CD63 oraz A-BBA w alergii na roztocze kurzu domowego. Eksperyment przeprowadzono dotychczas u 12 pacjentów z alergią na *Dermaphagoides pteronyssinus* (pacjenci z objawami klinicznymi po ekspozycji na alergeny sprawcze i dodatnie testy skórne) oraz 5 osób bez objawów alergii i z negatywnymi wynikami SPT. W przypadku BAT z CD63 średnia aktywność bazofila po stymulacji trzema stężeniami alergenu roztoczy wynosiła 84–92%. W protokole BAT z An-V średnia aktywność bazofila po stymulacji ekstraktem *D. pteronyssinus* u pacjentów uczulonych była niższa (52–55%). Badanie zmierzające ku walidacji metody będzie kontynuowane w większej grupie pacjentów z zastosowaniem protokołów BAT z różnymi markerami aktywacji bazofila.

PODSUMOWANIE

Test aktywacji bazofilów jest skutecznym narzędziem diagnostycznym, zapewniającym pacjentowi bezpieczeństwo i komfort. Mimo że procedura przeprowadzenia BAT jest bardzo pracochłonna, sam test daje duże możliwości. Przede wszystkim cechą przemawiającą na korzyść testu komórkowego tego typu jest minimalizacja ryzyka związanego z wystąpieniem reakcji niepożądanych u badanego, a także bez odstawiania leków potencjalnie zaburzających wyniki testów *in vivo*. Warto również zauważyć, że BAT umożliwia różnicowanie reakcji krzyżowych i rzeczywistego poliwalentnego uczulenia. Wciąż opracowywane są protokoły, które wykorzystują nowe markery aktywacji tak, aby dawały jak najlepsze wyniki i były możliwie tanie. Liczne badania wskazują, że BAT można wykorzystywać do diagnozowania alergii na wiele różnych alergenów, a sam test charakteryzuje się dużą czułością i swoistością. Pomimo licznych zalet, test aktywacji bazofilów wciąż wymaga walidacji i standaryzacji, aby mógł być rutynowo stosowany w diagnostyce klinicznej. Niemniej jednak BAT jako narzędzie uzupełniające diagnostykę wybranych uczuleń już teraz może być wykorzystywany.

PÍSMIENICTWO

- [1] Ansoategui I, Melioli G, Canonica G.W., Caraballo L., Villa E., Ebisawa M., Passalacqua G., Savi E., Ebo D., Gómez R.M., Luen-go Sánchez O., Oppenheimer J.J., Jensen-Jarolim E., Fischer D.A., Haahtela T. i wsp.: IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ. J.*, 2020; 13: 100080
- [2] Appel M.Y., Nachshon L., Elizur A., Levy M.B., Katz Y., Goldberg M.R.: Evaluation of the basophil activation test and skin prick testing for the diagnosis of sesame food allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 2018; 48: 1025–1034
- [3] Ariza A., Fernandez T.D., Doña I., Aranda A., Blanca-Lopez N., Melendez L., Canto G., Blanca M., Torres M.J., Mayorga C.: Basophil activation after nonsteroidal anti-inflammatory drugs stimulation in patients with immediate hypersensitivity reactions to these drugs. *Cytometry A*, 2014; 85: 400–407
- [4] Balzer L., Pennino D., Blank S., Seismann H., Darsow U., Schneider M., McIntyre M., Ollert M.W., Durham S.R., Spillner E., Ring J., Cifuentes L.: Basophil activation test using recombinant allergens: Highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. *PLoS One*, 2014; 9: e108619
- [5] Barg W.: Annexin-V binding assay as a marker for the activation of a basophil induced by specific allergens. DSc thesis. Wrocław: Wrocław Medical University, 2015, Poland
- [6] Bidad K., Nawijn M.C., Van Oosterhout A.J., Van Der Heide S., Elberink J.N.: Basophil activation test in the diagnosis and monitoring of mastocytosis patients with wasp venom allergy on immunotherapy. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2014; 86: 183–190
- [7] Bousquet J., Heinzerling L., Bachert C., Papadopoulos N.G., Bousquet P.J., Burney P.G., Canonica G.W., Carlsen K.H., Cox L., Haahtela T., Lodrup Carlsen K.C., Price D., Samolinski B., Simons F.E., Wicknam M. i wsp.: Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*, 2012; 67: 18–24
- [8] Calabria C.W., Hagan L.: The role of intradermal skin testing in inhalant allergy. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.*, 2008; 101: 337–347
- [9] Chinthrajah R.S., Purington N., Andorf S., Rosa J.S., Mukai K., Hamilton R., Smith B.M., Gupta R., Galli S.J., Desai M., Nadeau K.C.: Development of a tool predicting severity of allergic reaction during peanut challenge. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2018; 121: 69–76.e2
- [10] Chirumbolo S.: Immunotherapy in allergy and cellular tests: State of art. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2014; 10: 1595–1610
- [11] Chirumbolo S., Ortolani R., Vella A.: CCR3 as a single selection marker compared to CD123/HLADR to isolate basophils in flow cytometry: Some comments. *Cytometry A*, 2011; 79: 102–106
- [12] Couto M., López-Salgueiro R., Gaspar Â.: Anaphylaxis to Etoricoxib. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2018; 28: 135–136
- [13] Curto-Barredo L., Yelamos J., Gimeno R., Mojal S., Pujol R.M., Giménez-Aarnau A.: Basophil activation test identifies the patients with chronic spontaneous urticaria suffering the most active disease. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2016; 4: 441–445
- [14] Czarnobilska E.M., Bulanda M., Śpiewak R.: The usefulness of the basophil activation test in monitoring specific immunotherapy with house dust mite allergens. *Postępy Dermatol. Alergol.*, 2018; 35: 93–98
- [15] Deng S., Yin J.: Clinical utility of basophil activation test in diagnosis and predicting severity of mugwort pollen-related peach allergy. *World. Allergy. Organ. J.*, 2019; 12: 100043
- [16] Dewachter P., Chollet-Martin S., Mouton-Faivre C., De Chaisemartin L., Nicaise-Roland P.: Comparison of basophil activation test and skin testing performances in NMBA allergy. *J. Allergy. Clin. Immunol. Pract.*, 2018; 6: 1681–1689
- [17] Eberlein B., Hann R., Eyerich S., Pennino D., Ring J., Schmidt-Weber C.B., Buters J.: Optimizing of the basophil activation test: Comparison of different basophil identification markers. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, 2015; 88: 183–189
- [18] Eberlein B., Krischan L., Darsow U., Ollert M., Ring J.: Double positivity to bee and wasp venom: Improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2012; 130: 155–161
- [19] Eberlein-König B., Varga R., Mempel M., Darsow U., Behrendt H., Ring J.: Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy*, 2006; 61: 1084–1085
- [20] Ebo D.G., Bridts C.H., Hagendorens M.M., De Clerck L.S., Stevens W.J.: Scampi allergy: From fancy name-giving to correct diagnosis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2008; 18: 228–230
- [21] Ebo D.G., Faber M., Elst J., Van Gasse A.L., Bridts C.H., Mertens C., De Clerck L.S., Hagendorens M.M., Sabato V.: In vitro diagnosis of immediate drug hypersensitivity during anesthesia: A review of the literature. *J. Allergy. Clin. Immunol. Pract.*, 2018; 6: 1176–1184
- [22] Fernández T.D., Ariza A., Palomares F., Montañez M.I., Salas M., Martin-Serrano A., Fernández R., Ruiz A., Blanca M., Mayorga C., Torres M.J.: Hypersensitivity to fluoroquinolones: The expression of basophil activation markers depends on the clinical entity and the culprit fluoroquinolone. *Medicine*, 2016; 95: e3679
- [23] Georgis V., Rolla G., Raie A., Geuna M., Boita M., Lamberti C., Nebbia S., Giribaldi M., Giuffrida M.G., Brussino L., Corradi F., Bacco B., Gallo Cassarino S., Nicola S., Cavallarin L.: A case of work-related donkey milk allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2018; 28: 197–199
- [24] Gómez E., Campo P., Rondón C., Barrionuevo E., Blanca-López N., Torres M.J., Herrera R., Galindo L., Mayorga C., Blanca M.: Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013; 132: 975–976.e1-5
- [25] Goswami K., Mazumdar I., Mookherjee S., Pal P.: Qualitative assessment of allergen skin test and in vitro allergen specific immunoglobulin E (IgE) measurement as a method of detection of allergic symptoms. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2016; 5: 614–619
- [26] Gutiérrez-Fernandez D., Saldaña-Valderas M., De La Varga-Martínez R., Foncubierta-Fernández A., Fernández-Anguita M.J., Fernández-Valle M.D., Medina-Varo F.: Hypersensitivity to alemtuzumab. A safe and effective desensitization protocol: A case report. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, 2019; 25: 1016–1020
- [27] Hagau N., Gherman-Ionica M., Sfichi M., Petrisor C.: Threshold for basophil activation test positivity in neuromuscular blocking agents hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2013; 9: 42
- [28] Hausmann O.V., Gentinetta T., Fux M., Ducrest S., Pichler W.J., Dahinden C.A.: Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy*, 2011; 66: 85–91
- [29] Hayen S.M., Den Hartog Jager C.F., Knulst A.C., Knol E.F., Garsen J., Willemsen L., Otten H.G.: Non-digestible oligosaccharides can suppress basophil degranulation in whole blood of peanut-allergic patients. *Front. Immunol.*, 2018; 9: 1265

- [30] Heinzerling L., Mari A., Bergmann K.C., Bresciani M., Burbach G., Darsow W., Durham S., Fokkens W., Gjomarkaj M., Haahntela T., Bom A.T., Wöhrl S., Maibach H., Lockey R.: The skin prick test – European standards. *Clin. Trans. Allergy*, 2013; 3: 3
- [31] Hemmings O., Kwok M., McKendry R., Santos A.F.: Basophil activation test: Old and new applications in allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2018; 18: 77
- [32] Hoffmann H.J., Knol E.F., Ferrer M., Mayorga L., Sabato V., Santos A.F., Eberlein B., Nopp A., MacGlashan D.: Pros and cons of clinical basophil testing (BAT). *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2016; 16: 56
- [33] Hoffmann H.J., Santos A.F., Mayorga C., Nopp A., Eberlein B., Ferrer M., Rouzairé P., Ebo D.G., Sabato V., Sanz M.L., Pecaric-Petkovic T., Patil S.U., Hausmann O.V., Shreffler W.G., Korosec P., Knol E.F.: The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, 2015; 70: 1393–1405
- [34] Kahlert H., Cromwell O., Fiebig H.: Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *Clin. Exp. Allergy*, 2003; 33: 1266–1272
- [35] Kim Z., Choi B.S., Kim J.K., Won D.I.: Basophil markers for identification and activation in the indirect basophil activation test by flow cytometry for diagnosis of autoimmune urticaria. *Ann. Lab. Med.*, 2016; 36: 28–35
- [36] Korošec P., Šilar M., Eržen R., Čelesnik N., Bajrović N., Zidarn M., Košnik M.: Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2013; 161: 363–368
- [37] Królewicz E., Gomułka K., Wolańczyk-Mędrala A., Mędrala W., Barg W., Kustrzeba-Wójcicka I.: The diagnostic usefulness of the basophil activation test (BAT) with annexin V in an allergy to *Alternaria alternata*. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2018; 27: 1737–1744
- [38] MacGlashan D.Jr.: Expression of CD203c and CD63 in human basophils: Relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin. Exp. Allergy*, 2010; 40: 1365–1377
- [39] Marraccini P., Pignatti P., D'Apos Alcamo A.D., Salimbeni R., Consonni D.: Basophil activation test application in drug hypersensitivity diagnosis: An empirical approach. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018; 177: 160–166
- [40] Nopp A., Johansson S.G., Ankerst J., Bylin G., Cardell L.O., Grönneberg R., Irander K., Palmqvist M., Oman H.: Basophil allergen threshold sensitivity: A useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy*, 2006; 61: 298–302
- [41] Nowakowska K., Królewicz E., Barg W.: The comparison of basophil activation tests with annexin V and CD63 in house dust mite allergy. W: *Imunopatologija pri zahvoruvannâh organiv di-hannâ ì travlennâ: mižnarodna pul'monologična škola. Materiali VI naukovogo simpozijumu. Ternopil, Ukraïna, 20–22 veresnâ 2018 roku*; 50: 77–78
- [42] Ogulur I., Kiykim A., Baris S., Ozen A., Yuze E.G., Karaok-Aydiner E.: Basophil activation test for inhalant allergens in pediatric patients with allergic rhinitis. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2017; 97: 197–201
- [43] Ornelas C., Caiado J., Campos Melo A., Pereira Barbosa M., Castells M.C., Pereira Dos Santos M.C.: The contribution of the basophil activation test to the diagnosis of hypersensitivity reactions to oxaliplatin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018; 177: 274–280
- [44] Özdemir S.K., Göloğlu D., Sin B.A., Elhan A.H., İkinciogulları A., Mısırlıgil Z.: Reliability of basophil activation test using CD203c expression in diagnosis of pollen allergy. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2011; 25: e225–e231
- [45] Ruinemas-Koerts J., Schmidt-Hieltjes Y., Jansen A., Savelkoul H.F., Plaisier A., Van Setten P.: The basophil activation test reduces the need for a food challenge test in children suspected of IgE-mediated cow's milk allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 2019; 49: 350–356
- [46] Sainte-Laudy J., Vallon C., Guérin J.C.: Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg. Immunol.*, 1994; 26: 211–214
- [47] Salas M., Gomez F., Fernandez T.D., Doña I., Aranda A., Ariza A., Blanca-Lopéz N., Mayorga C., Blanca M., Torres M.J.: Diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to radiocontrast media. *Allergy*, 2013; 68: 1203–1206
- [48] Samoliński B., Raciborski F., Lipiec A., Tomaszewska A., Krzych-Fałta E., Samel-Kowalik P., Walkiewicz A., Lusawa A., Borowicz J., Komorowski J., Samolińska-Zawisza U., Sybilski A.J., Piekarska B., Nowicka A.: Epidemiology of allergic diseases in Poland. *Pol. J. Allergol.*, 2014; 1: 10–18
- [49] Santos A.F., Douiri A., Bécares N., Wu S.Y., Stephens A., Radulovic S., Chan S.M., Fox A.T., Du Toit G., Turcanu V., Lack G.: Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014; 134: 645–652
- [50] Sato S., Yanagida N., Ebisawa M.: How to diagnose food allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2018; 18: 214–221
- [51] Scherer K., Weber J.M., Jermann T.M., Krautheim A., Tas E., Ueberschlag E.V., Cammarata M., Bircher A.J.: Cellular in vitro assays in the diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2008; 146: 122–132
- [52] Skotny A.: Annexin-V binding assay on the basophil surface in the diagnosis of rye allergy. PhD Dissertation. Wrocław: Wrocław Medical University 2016, Poland
- [53] Sokolowska M., Boonpiyathad T., Escribese M.M., Barber D.: Allergen-specific immunotherapy: Power of adjuvants and novel predictive biomarkers. *Allergy*, 2019; 74: 2061–2063
- [54] Sturm G.J., Jin C., Kranzelbinder B., Hemmer W., Sturm E.M., Griesbacher A., Heinemann A., Vollmann J., Altmann F., Crailsheim K., Focke M., Aberer W.: Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One*, 2011; 6: e20842
- [55] Tokuda R., Nagao M., Hiraguchi Y., Hosoki K., Matsuda T., Kouno K., Morita E., Fujisawa T.: Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol. Int.*, 2009; 58: 193–199
- [56] Uasuf C.G., Sano C.D., Gangemi S., Albeggianni G., Cigna D., Dino P., Brusca I., Gjomarkaj M., Pace E.: IL-33/s-ST2 ratio, systemic symptoms, and basophil activation in Pru p 3-sensitized allergic patients. *Inflamm. Res.*, 2018; 67: 671–679
- [57] Uyttebroek A.P., Sabato V., Cop N., Decuyper I.I., Faber M.A., Bridts C.H., Mertens C., Hagendorens M.M., De Clerck L.S., Ebo D.G.: Diagnosing cefazolin hypersensitivity: Lessons from dual-labeling flow cytometry. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2016; 4: 1243–1245
- [58] Wolańczyk-Mędrala A., Barg W., Mędrala W.: CD164 as a basophil activation marker. *Curr. Pharm. Des.*, 2011; 17: 3786–3796
- [59] Zenarruzabeitia O., Vitallé J., Terrén I., Orrantia A., Astigaraga I., Dopazo L., Gonzalez C., Santos-Díez L., Tutau C., Gamboa P.M., Bilbao A., Borrego F.: CD300c costimulates IgE-mediated basophil activation, and its expression is increased in patients with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019; 143: 700–711.e5
- [60] Žitnik S.E., Vesel T., Avčin T., Šilar M., Košnik M., Korošec P.: Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2012; 23: 166–172

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.