

# **BAZOFIL AKTIVÁCIÓN ALAPULÓ MÓDSZEREK ALKALMAZÁSAI AZ ALLERGIA DIAGNOSZTIKÁBAN**

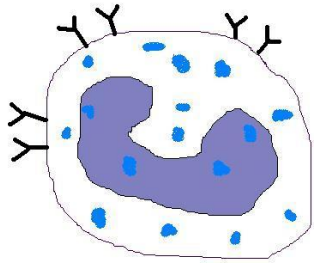
**Dr. Gyimesi Edit**

Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Laboratóriumi Medicina Intézet

XVIII. Laboratóriumi Szakmai Továbbképző Tanfolyam

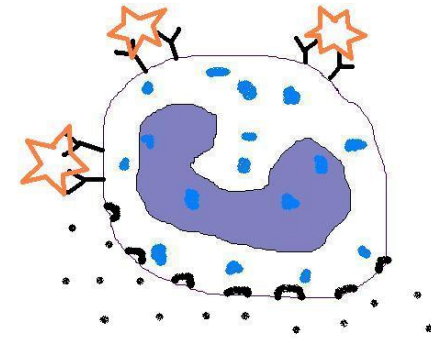
2015 április 22.

# BAZOFIL SEJTEK AKTIVÁCIÓJA



IgE receptor közvetített:  
allergén, autoantitestek  
(„1000 bridges”)

**Aktiváció**



Sejtfelszíni  
molekulák

Szignál  
események

Perfériás fehérvérsejtek < 0.5  
% -a  
IgE receptor  
granulumok

v. IgE receptor független  
(endogén anyagok:  
pl.komplement  
Exogén  
pl.bakteriális peptidek,  
drogok

**Degranuláció,  
szekréció:**  
hisztamin  
proteoglikánok (  
heparin )stb.  
proteolitikus  
enzimek  
leukotriének,  
interleukinok (IL-4)

Egyéb

## FUNKCIÓ:

Gyulladásos reakciók  
effektor sejtje  
Allergiás folyamatok  
Parazitás fertőzések  
T sejtek szabályozása  
Másodlagos immunválasz  
méretének szabályozása  
Antigén prezentálás

## A klasszikus allergia diagnózis hátrányai

- A klinikai diagnózis megbízhatatlan lehet
- Bizonyos esetekben a bőrteszt adverz reakciókat okozhat és egyes bőrbetegségben szenvedőknél nem végezhető el
- Az IgE szint nem mindig korrelál az allergiás reakció súlyosságával, és egyeseknél, akik „kinőtték” az allergiát, pozitív IgE lehet évekkel később
- Ezekben az esetekben, továbbá a funkcionális allergén epitópok megértésében **hasznos lehet egy funkcionális *in vitro* módszer**

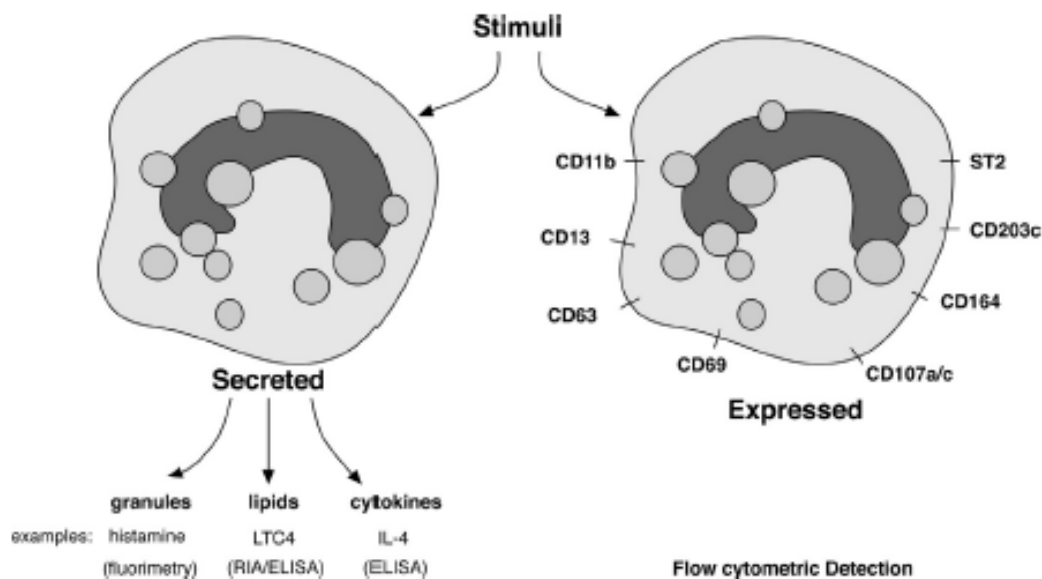
# BAZOFIL AKTIVÁCIÓS TESZTEK

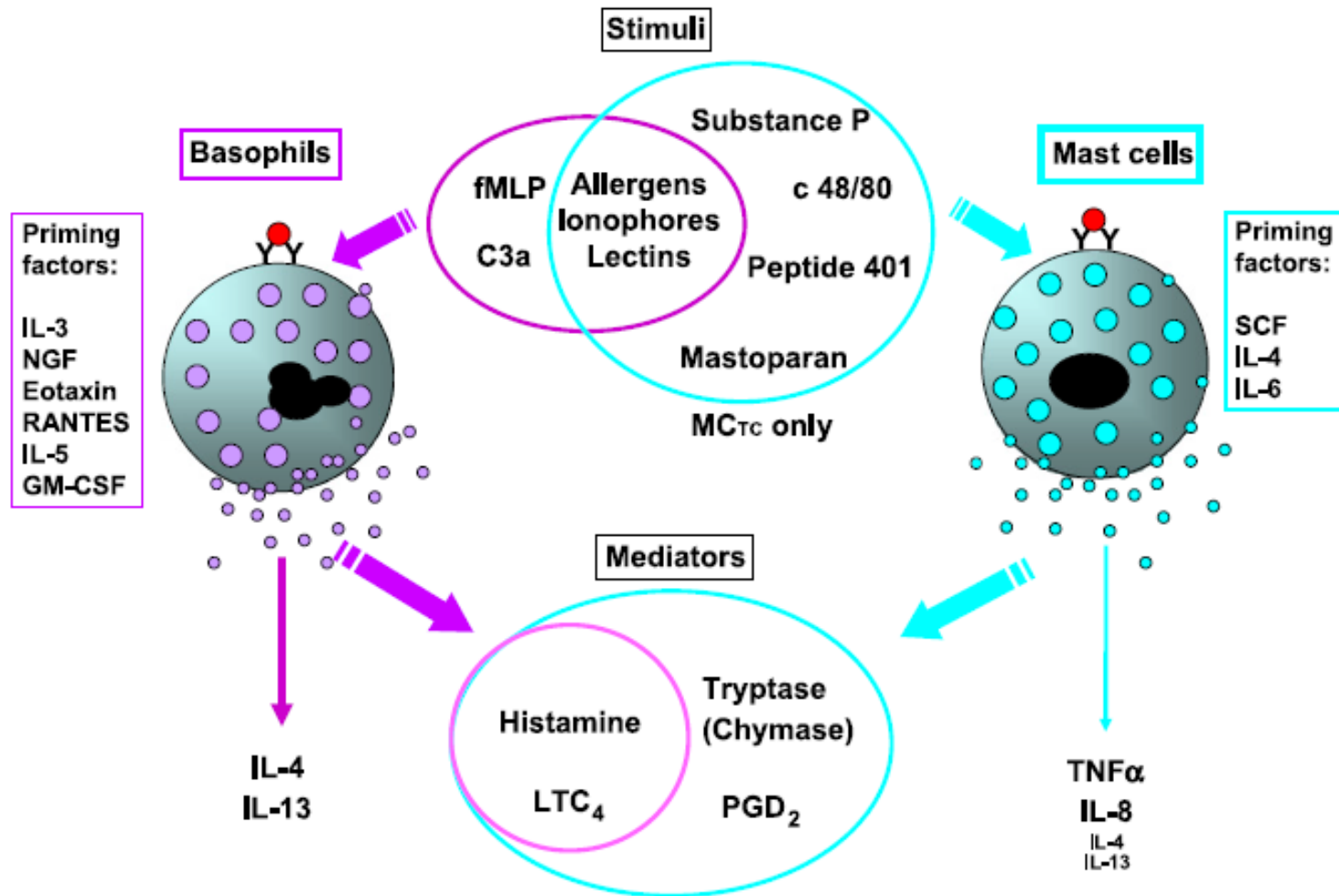
## MEDIÁTOROK FELSZABADULÁSA (tradicionális)

- Hisztamin felszabadulás
- „Stripped basophil histamine release assay”
- Leukotriének
- Interleukinek
- Triptáz

## SEJTFELSZÍNI MARKEREK

- CD63
- CD203c
- Egyéb
- **Intracelluláris markerek**
- p38 MAPK foszforiláció



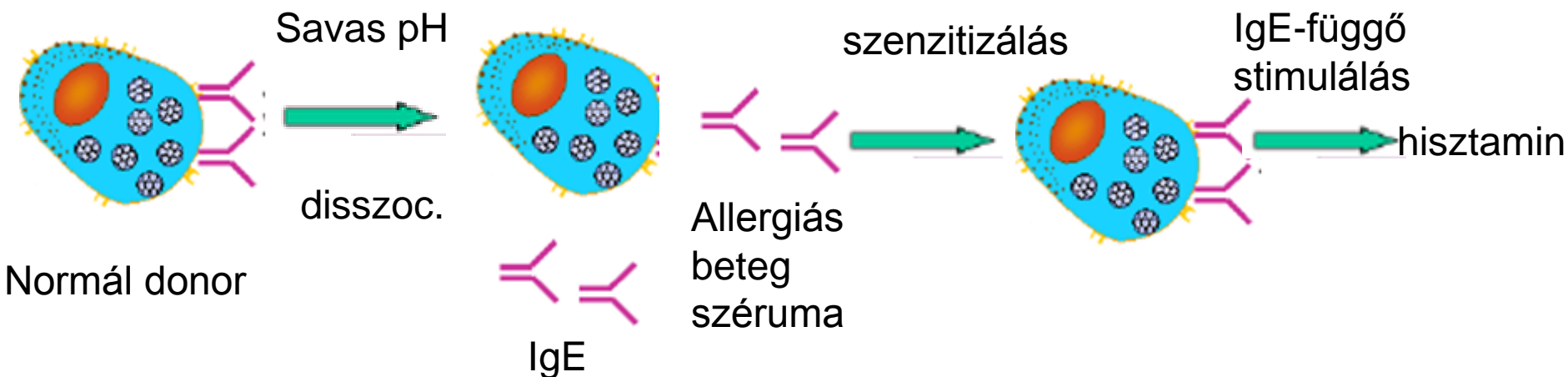


# Bazofil mediátor felszabadulás mérés

## HISTAMIN RELEASE ASSAY

- A legáltalánosabban mért mediátor a hisztamin (1961-től), de mérik a leukotriéneket és az IL-4, IL-13-t is.
- **Alkalmazás:** teljes vérben, leukocita preparátumoknál, szeparált bazofileknél, IL-3 priming, majd stimulálás allergénnel
- A **szenzitivitása és specificitása** széles skálán mozog, amennyiben a gold standardhoz pl. bőrteszthez, nazális provokációs teszthez viszonyítják.
- **RAST és HR bioassay jól korrelált**, egyes esetekben a bioassay érzékenyebb volt (felt.: kevés spec. IgE, vagy minor komponens elleni IgE, amit a RAST nem detektált)
- **BAT és HR teszt jól korrelált:** latex, rovarméreg, pollen, táplálék és gyógyszerallergiákban
- Ha eltávolítjuk az IgE-t a szérumból, akkor az allergének közti **keresztreaktivitást**
- tudjuk vizsgálni
- **MÓDSZEREK:**
- Enzyme immunoassay
- Fluorimetriás teszt
- Intracelluláris diamino oxidáz teszt (áramlási citometria)

# IgE disszociációt követő („Stripped”) bazofil hisztamin felszabadulás mérés (K. Budde)



**Alkalmazás:** a klinikai kép és spec.IgE közt ellentmondás

Cél: hisztamin releasing faktor detektálása (bőrteszt nem mindig alkalmazható)

- Nem „releaselő”, bazofilú betegeknél is mérhetünk HR-t
- Keresztereakció vizsgálható, ha a spec. IgE-t eltávolítjuk
- Ha a spec.IgE negatív eredményt ad hisztamin releaselő extraktum esetén

Hátrány: bazofil donor szükséges

- Ha a HR egy IgE-deficiens szérummal szenzitizált bazofilból van felszabadítva, akkor a reakció IgE-től független (pl kemokin függő)

Az IgE-függés a szérum hőinaktiválásával is vizsgálható, ha szenzitizálás előtt végezzük vagy előinkubáljuk a szérumot blokkoló antitesttel  
agy specifikusan eltávolítjuk a spec.IgE-t



# Antigén-specifikus Cysteinyl-Leukotriene Teszt (CAST)

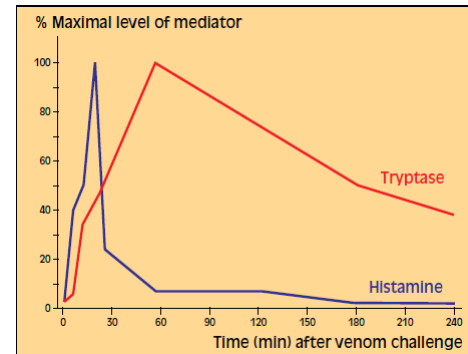
- **Leukotriének (LTs) gyulladássos mediátorok, melyek az arachidonsavból az 5-lipoxygenase (5-LO) útvonalon képződnek. LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, és LTE<sub>4</sub> –t együtt cysteinyl leukotriének**
- **LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub> reotens mediátorai az asztmának és hiperszenzitivitásnak.**
- **Mérés: CysLT EIA Kit (competitive assay, nagy affinitású monoklonális antitestet tartalmaz)**
  
- **Alkalmazás:**
- **Aspirin intolerancia asztmásokban**
- **Gaber F et al. Increased levels of cysteinyl-leukotrienes in saliva, induced sputum, urine and blood from patients with aspirin-intolerant asthma Thorax;Dec2008; 63:1076**
- **A teljes és spec. CysLT ptermelés aspirin-intoleráns asthma. Specifikusnak bizonyult, a nyálból történő mérés nem invazív markere lehet az aspirin intoleráns aszmának**
  
- **Azonnali gyógyszerreakciók**
- **Cys-LT , HR assay és BAT**
- **3 teszt együttes alkalmazásával jelentősen megnövelhető a specifitása a teszteknek.**



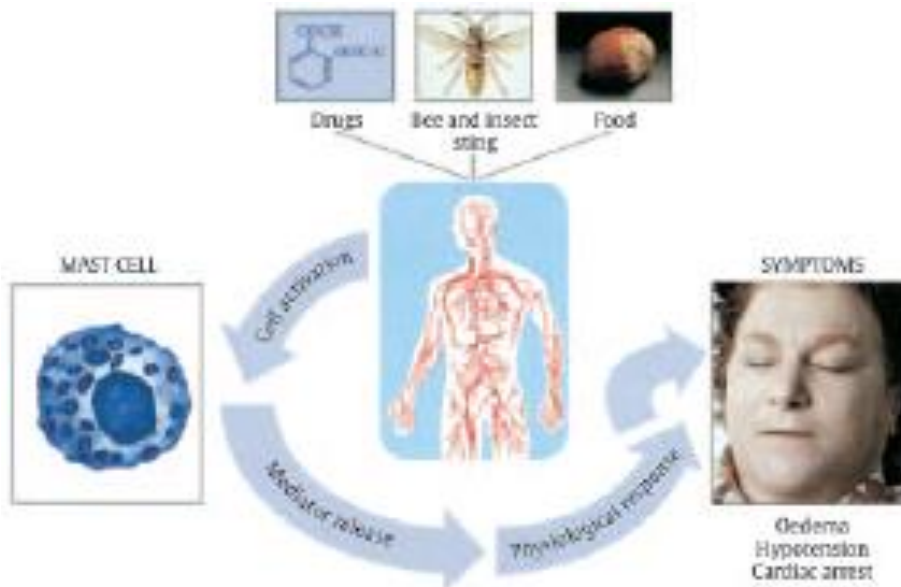
# TRIPTÁZ meghatározás

ANAFILAXIÁS reakció során nagy mennyiségű triptáz szabadul fel

- 13.5 µg/l
- 3 – 6 óra az anafilaxiás reakció után
- Meghatározás: Pharmacia UNICAP FEIA- fluoreszcenciás módszer



12-14 óra

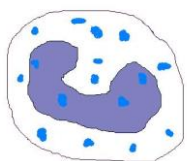


Klinikai relevancia:

1. Anafilaxiás esemény igazolása
2. Allergiás rhinitis megkülönböztetése súlyos gyulladásos nazális betegségektől (triptáz mérés nazális folyadékból)
3. Allergén expozíció után allergiás rhinitis markere

# BAZOFIL SEJTEK AKTIVÁCIÓJA ÉS FENOTÍPUSA

NYUGVÓ



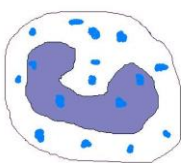
**FcεRIα**  
**CCR3**  
**CD123 (IL-3R)**  
**CD203c**  
**CRTH2**  
 (CD193)  
 2B4  
 CD117  
 CD11b  
 Thy1,2 stb.

IL-3



(?)

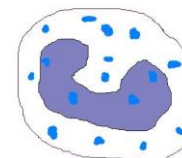
„PRIMED”  
 (ELŐAKTIVÁLT)



Antigén  
 (allergén,  
 autoantitest)



AKTIVÁLT



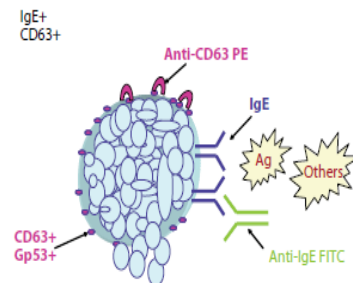
Megnövekedett expresszió:  
 CD13, CD69, CD107a/b,  
 CD164, CD62L, CD11  
**CD63**  
**CD203c**

**BAT:**

**Bazofilek azonosítása + („priming”) + allergén →**

Drog preparálás,  
 dózis

**Aktiváció kimutatása  
 fluoreszcensen jelzett  
 antitestekkel,  
 áramlási citometria**



# CD63 és CD203c bazofil aktivációs markerek összehasonlítása

## CD63

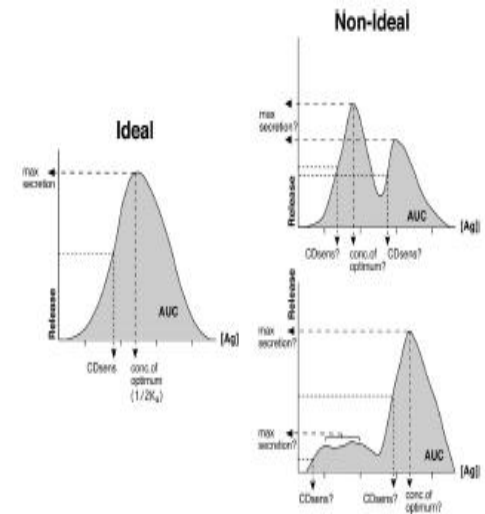
- gp53 lizoszóma asszociált protein (LAMP-3)
- nyugvó bazofileken gyengén expresszálódik
- vvt lízis: normál
- inkubációs idő: 30-40 perc
- értékelés: %
- Mechanizmus:  
„anaphylactic degranulation”

## CD203c

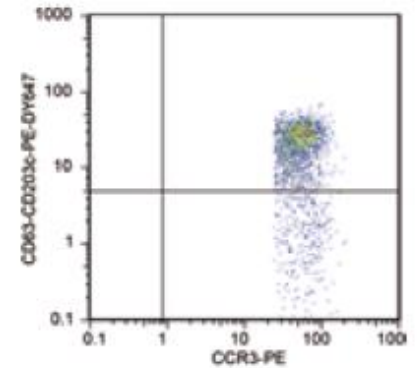
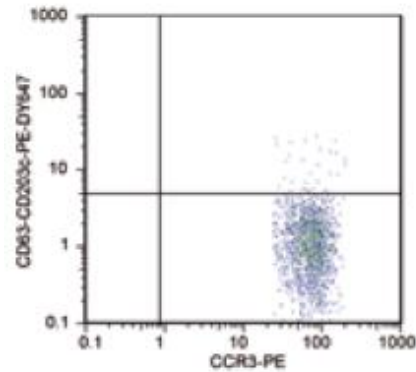
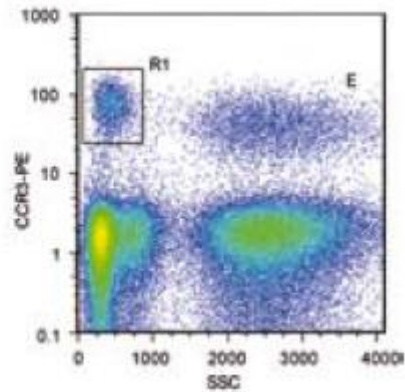
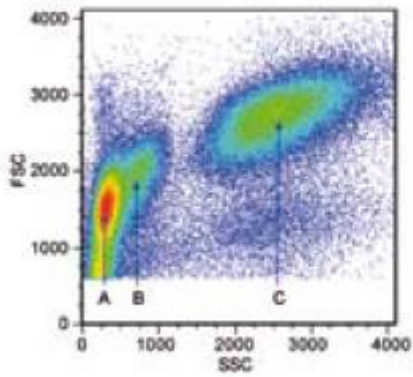
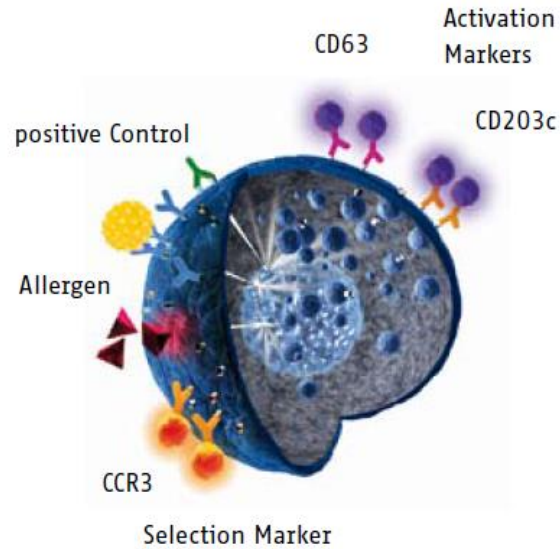
- 97A6/NPP3 transzmembrán ectoenzim (ectonukleotide pyrophosphatasephosphodiesterase 3)
- nyugvó bazofileken is jelen van, nem szükséges külön bazofil sejt jelölés
- vvt lízis: enyhe
- inkubációs idő: 10-20 perc
- értékelés: MFI vagy %
- Mechanizmus:  
„piecemeal degranulation”

# A BAZOFIL SEJTEK AKTIVÁLHATÓSÁGA

- Fc $\epsilon$ RI-on- receptor aggregáció
- Antigén-antitest precipitációs reakció, haranggörbe.
- Az antigének komplexitása és a kül. epitópok rel. affinitása változatos dózis-válasz görbéket eredményezhetnek
- Az antigén IgE-hez való affinitása meghatározza az optimális aktivációs pontot – személyenként változó
- Fontos: széles dózis válasz vizsgálat  
vérvétel és vizsgálat közt eltelt idő meghatározása
- (Endogén IgE eltávolítása)
- Bazofil aktiváció szenzitivitásának növelése



# BÜHLMANN Flow-Cast highsens



# Eredmények interpretálása

## Szenzitivitás jellemzése (sens)

- **Bőr teszt (Skin Prick Test, SPT)**

- **SPTsens** - Allergén titrálás végpontja

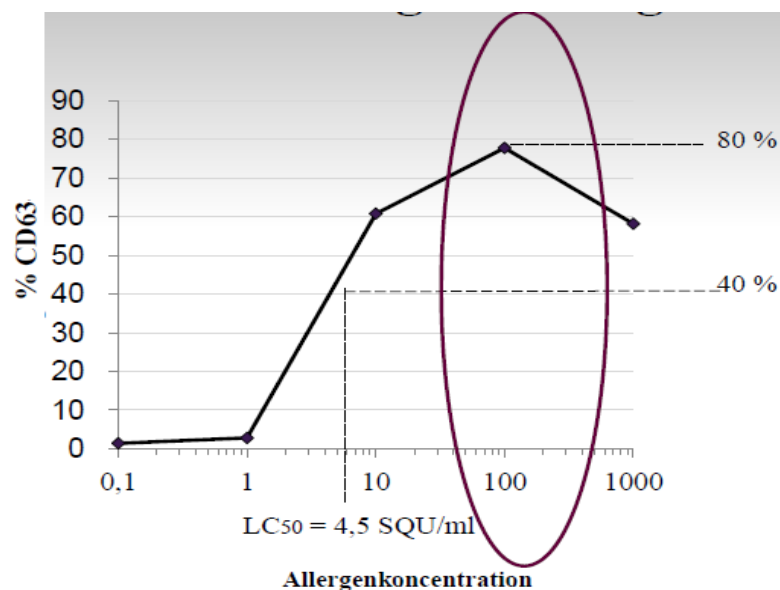
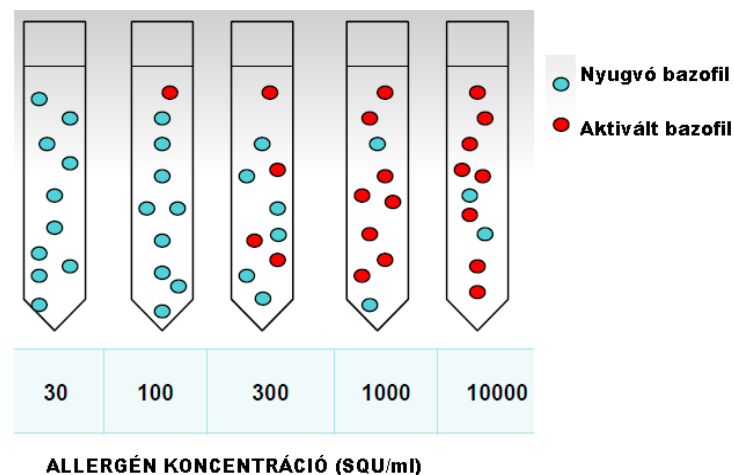
- **CD63 mérés**

- **CDmax** - egy adott allergén koncentrációnál kapott maximális CD63 érték (%)

- **CDsens** - =  $(1 / LC50) \times 100$

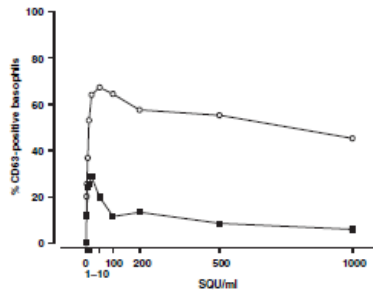
- **LC50** - a CDmax 50%-t adó allergén koncentráció

- **AUC** – ROC görbe alatti terület



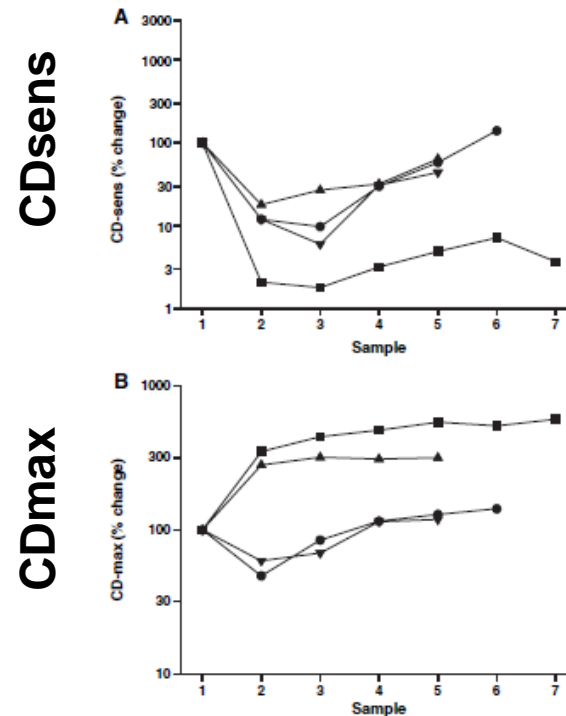
# Bazofil allergén „treshold” szenzitivitás (CDsens) alkalmazása

- **Pollen allergiások vizsgálata**  
(Nopp *et al.* (Allergy 2006; 61:298-302))
- Allergén titrálási görbe:



- 2 beteg: **eltérő CDmax, azonos CDsens**
- **Korreláció:**
- **CDsens ↔ SPTsens**
- **CDsens ↔ Relative IgE** (specIgE/IgEtot)
- Nincs korreláció:
- SPTsens / CDmax
- CDsens / CDmax

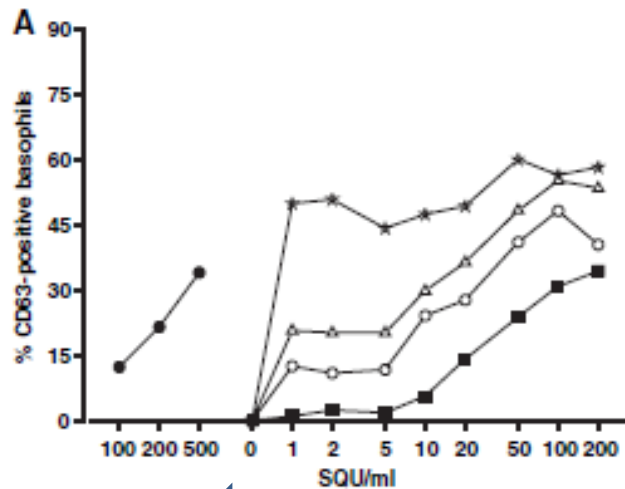
## Anti-IgE (Omalizumab) terápia monitorozása



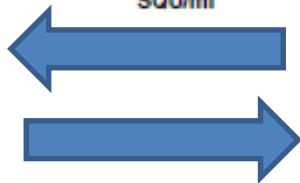
CDsens alkalmas,  
CDmax nem alkalmas  
az anti-IgE terápia monitorozására

# Allergének additív hatása a többszörösen szenzitizált bazofil sejtekre

- Nopp A. *et al.* (Allergy 2006; 61:1366-1368)
- Beteg: pázsitfű: spec.IgE: 3,9 kU/l; CDsens: 3,1
- házipor: spec.IgE 7,4 KU/l ; CDsens: 0,2



Pázsitfű+ házipor c3  
Pázsitfű+ házipor c2  
Pázsitfű+ házipor c1  
Pázsitfű csökk. hígításban



Házipor konc nő, görbe balra tolódik  
CDsens nő

Multiszenzitizált egyéneknél alacsonyabb egyedi allergénszint  
klinikai tüneteket vált ki az additív hatás következtében



# Preanalitika

- EDTA-s vér tárolása hűtőben 24 ó (max.48 ó) – nem fagyasztható!
- Vérvétel: a bőrteszt ill. az *in vivo* provokáció előtt
- EDTA-s csövet >75%-ban megtölteni, mert az EDTA gátolja a CD63 ill. CD203c expressziót
- Vérvétel előtt legalább 24 órával a kortikoszteroidok ill. kromoglikánsav terápiát fel kell függeszteni!

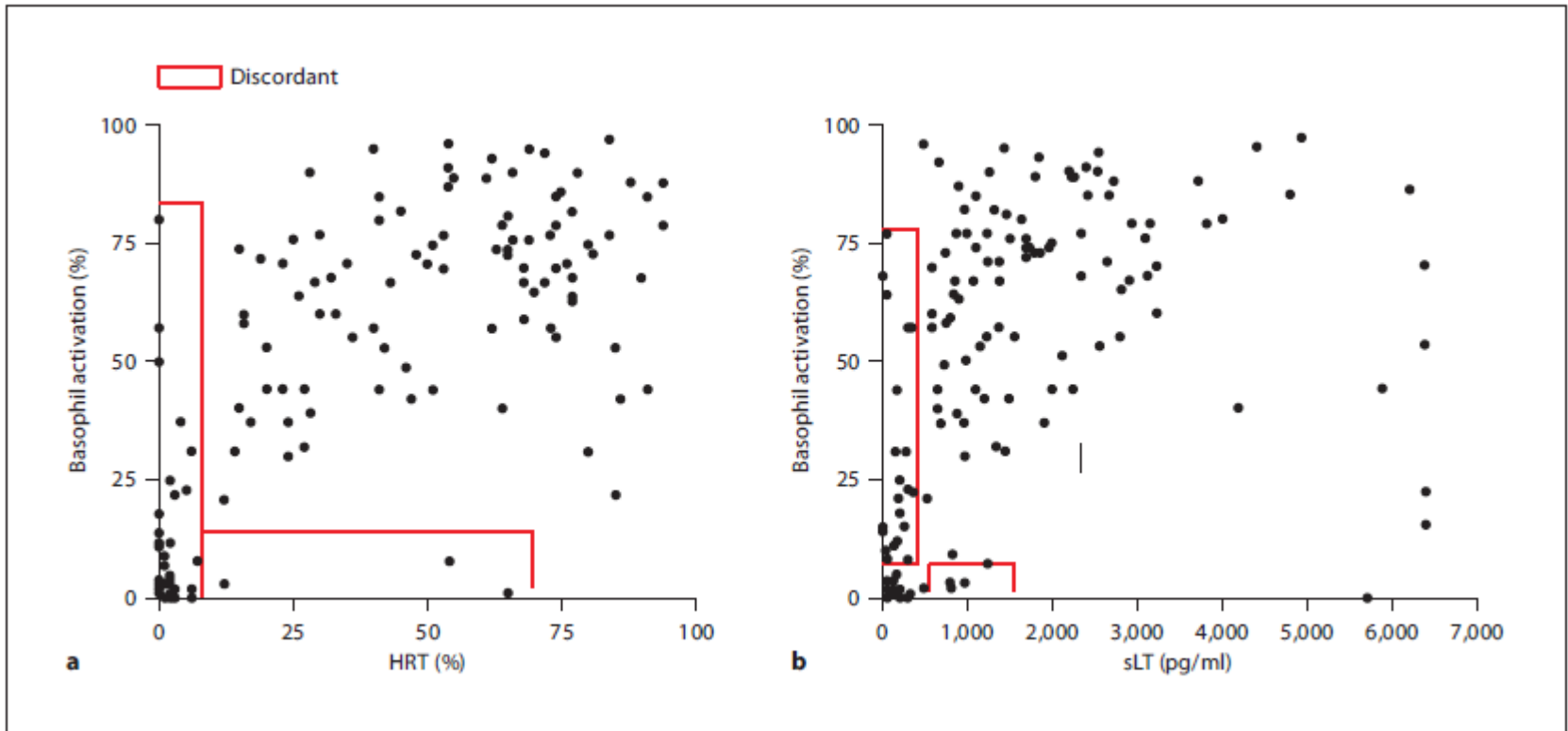
# Technikai szempontok

- Sejtek (teljes vér, buffy coat, izolált leukociták)
- Stimulálást elősegítő anyagok (IL-3, C5a)
- Allergének (standardizáltak, endotoxin és konzerválószer mentes)
- Pozitív kontroll (anti-IgE, anti-FcεRI, FMLP)
- A stimulálás leállításának módszere
- Áramlási citometriás mérés és értékelés
- A mintavétel után eltelt idő (<48 ó)
- Az utolsó allergén expozíció óta eltelt idő

# A CD63 és allergén spec.IgE mérés szenzitivitása és specifitása

ALLERGIA	CD63		Spec. IgE	
	Szenzitivitás	Specifitás	Szenzitivitás	Specifitás
Táplálék	80-82%	63-100%	69-79%	78%
Latex	90-93%	100%	70-88%	100%
Ciprus pollen	91%	100%	76%	100%
Myelorelaxans	54%	100%	62%	100%
$\beta$ -laktám antibiotikumok	42-50%	93%	25-39%	86%

# Eltérés a HR, BAT és LTC<sub>4</sub> mérésben



**Fig. 2.** Dissociation between CD63 expression, histamine release and LTC<sub>4</sub> production. Despite strong overall correlation between CD63 expression, histamine release and sLT production (CAST), a sizeable number of patients show total dissociation between these outcomes. Data from patients allergic to aeroallergens (house dust mite d 1 and *Lolium perenne*) [data from ref. 26]. HRT = Histamine release test. **a**  $r = 0.79$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 144$ . **b**  $r = 0.7$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 180$ .

# BAT ALKALMAZÁSA

## „INHALATÍV” ALLERGIÁBAN

- Allergia szezonban és azon kívül is használható
- Pollen szezonban csökken a bazofilok in vitro aktivációja
- Pl. cypress pollen allergiában BAT 91,2% szenzitivitás (CAP specIgE 76%)

## ÉTELALLERGIÁBAN

- **Pollen asszociált ételallergia**
- Orális provokációs tesztet nehéz végrehajtani – instabil allergén
- Jó kiegészítő egyéb tesztek mellett
- **Mogyoróallergia** (Javaollines 2012) –Arah9
- specIgE (FEIA) és BAT hasonló szenz és spec.
  
- **Orális tolerancia tojásallergénre:** BAT és pec.IgE hasonló csökk.(Vita *et al.*2013)
- **Tehéntej tolerancia** (Ford *et al.* 2013)
- CD63(bright)CD203c(+)CD123(+)HLA-DR(dim/-)CD41a-
- A tej egyes formái tolerálhatók voltak. Bazális CD203c nagyobb volt a súlyosabb klin. kép esetén
- Funkcionálisan aktív élelmiszernyomok kimutatása– biztonságos élelmiszerek allergiásoknak (Sabato 2011) (mogyoróallergének)
- **Élelmiszer adalékok** kimutatása CU betegekben (Kang *et al.*2014)

# BAT – Irritábilis bél szindróma-szerű betegekben

(Carozzio *et al.* Clin Chem Lab Med 2012 DOI 10.1515/cclm-2012-0609)

- Étel hiperszenzitivitás detektálása gyakran bonyolult felnőttekben
- US guideline: spec.IgE + tünetek
- Gyakran nem IgE-közvetített reakció
- Double blind placebo kontrollált provokáció a gold standard a diagnózisban
- BAT: búza és tehéntej: leukocitákon sokkal szenzitívebb volt, mint teljes vérrel

# BAT ALKALMAZÁSA

## LATEX ALLERGIÁBAN

- Hemery *et.al.*2005, Basotest Prick test allergénekkal kül. hígításban
- Sens. 79,3%
- Spec. 96,7%
- (Cutoff ROC görbe alapján)

## ROVARMÉREG ALLERGIÁBAN

- Erdmann *et al.*
- |                     | Sens. %   | Spec.%    |
|---------------------|-----------|-----------|
| Intrakután bőrteszt | 100       |           |
| specIgE             | 76        | 85        |
| <b>BAT</b>          | <b>92</b> | <b>80</b> |



# BAT ALKALMAZÁSA ROVARMÉREG ALLERGIÁBAN

Kosnik *et al.* Allergy (2005, 60:1401-1405)

Venom immunterápia (VIT) mellékhatásának megítélésére:

Allergén dózisfüggő aktiváció – bazofil szenzitivitás  
poz. korr. a mellékhatás klinikai súlyosságával

Gober *et al.* (JACI 2007, 119:1181-1188)

**Anaphilaxis modell:**

CD69 és CD203c expr. VIT előtt és után

Betegek: szisztémás v. nagy helyi reakció

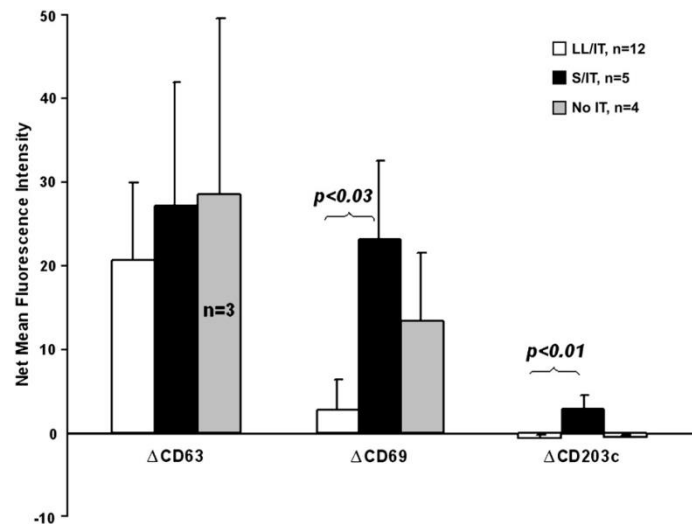
Szisztémásokban: terápia előtt sign >CD63 expr

Terápia után sign. nagyobb CD69 és CD203c expr.

Bazofil akt. marker expr. *in vitro* venom stim. után > *in vivo* beadás után

Következtetés:

A bazofil aktivációs markerek az anafilaxis potenciális biomarkerei lehetnek



# Gyógyszerallergiák kimutatása

- Gold standard: drog provokációs teszt (DPT)
- Szisztémás reakció veszélye
- Drog bőrteszt: standardizált és megbízható – alacsony szenzitivitás és specificitás
- Spec.IgE mérés: beta-laktam antibiotikumokra
- BAT: gyógyszer konjugátumok szükségesek az aktivációhoz
- **BAT: párhuzamosan és biztonságosan több gyógyszer vizsgálható**
- Direkten méri a bazofil választ az IgE szenzitizáció helyett
- Nem olcsó és technikailag kihívást jelent
- a BAT eredménye feltételezhetően más gyógyszerekre is extrapolálható
- BAT szenzitivitása növelhető, ha más módszerekkel kombináltan alkalmazzák (pl. BAT+ bőrteszt+ spec.IgE)

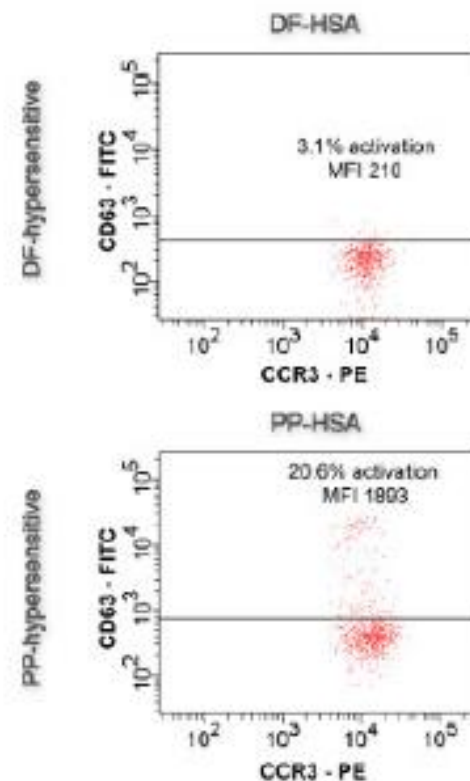
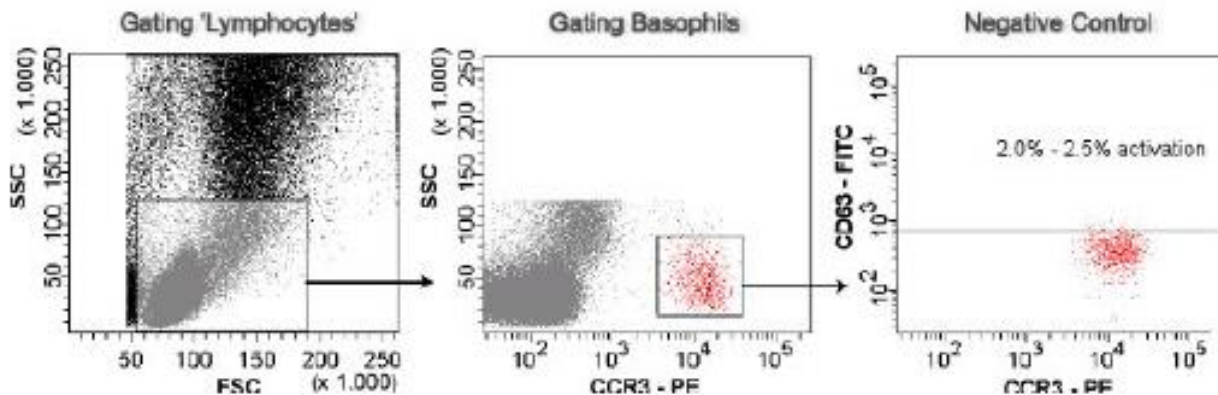
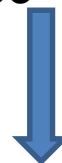


# BAT alkalmazása a nem-szteroid gyulladásgátlók (NSAIDs) IgE-közvetítette hiperszenzitivitás kimutatására

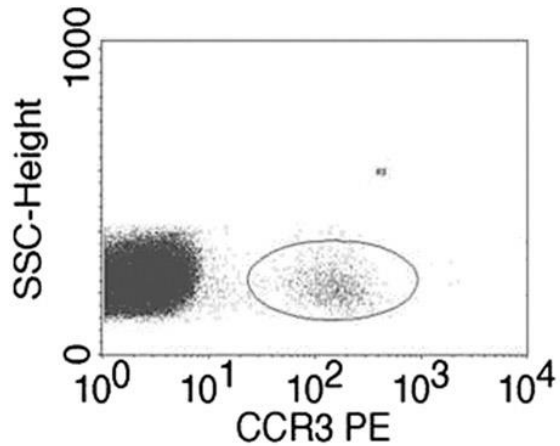
(Steiner M. et al. Basophil activation test for IgE-mediated mechanism in Drug hypersensitivity. J. Vis. Exp. 2011 (55)e3263)

- NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs)  
pl. diclophenac (DP), propyphenazone (PP)
- Karrier: HSA (human serum albumin)
- HSA – DP HSA - PP konjugátumok előállítása
- Kovalens kötés a HSA karboxyl csop. és a lizin részek elsődleges aminocsoportja közt
- DF- van saját karboxyl csoportja
- PP – szerveskémiail szintézissel módosították

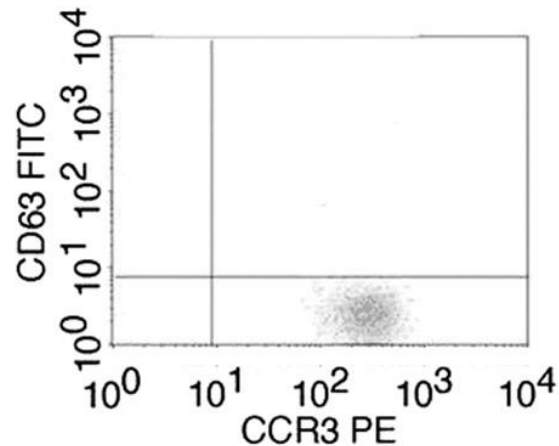
PP – IgE-közvetítette reakció: CD63 pozitív  
DP – nem IgE-közvetítette reakció: CD63 negatív



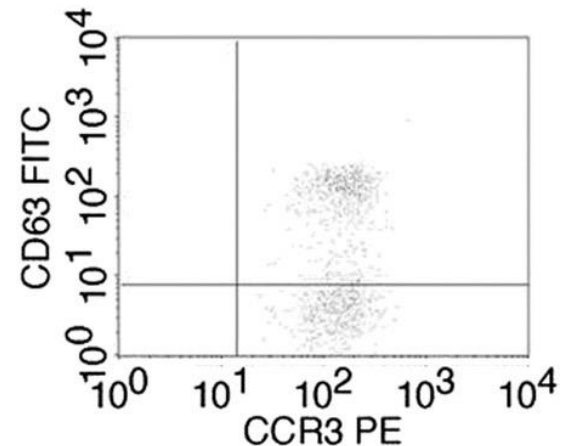
# BAT – Radiocontrast media



A. Basophil selection



B. Negative BAT



C. Positive BAT

Pinnobhum *et al.* The diagnostic value of basophil activation test in patients with immediate hypersensitivity reaction to contrast media *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011;106:387–393.

	Beta-laktám antibiotikumok	Neuro-muszkuláris szerek	Aspirin /nem-szteroid gyulladásgátlók	Fluoro-quinolonok	Radio-kontraszt media	Anti-neoplasztikus és egyéb biológiai
Kivizsgálás	Klinikai történet, poz.bőrteszt sp.IgE		IgE-közvetített allergiás és nem immunológiai intolerancia	Bőrteszt limitált irritáció miatt (88% falspoz)		
BAT	9 tanulmány	7 tanulmány	Ellentmondások	7 tanulmány		
Szenzitivitás (függ a cutoff-tól)	28,6-55% BAT > specIgE (kb.10%)	36,1-91,7% Anaphylaxis és BAT közti idő befolyásolja	Aszpirin: 33,3% diclofenac, naproxen erősebb farmakológiai akt., szenz.jobb Dipyron: 42,3-70%	36-83%	46,2-62,5%	Asparagináz: 75% (NPV:96%) Cisplatin,Ritux. Infliximab Metilprednisolone Szukcinált kortokszteroidok Anti-hisztaminok
specifitás	>90%	93-100%		Kitúnó NPV	Nem korrelál a bőrteszttel	
indokolt	Feltételezhető gyógyszerallergiánál, ha bőrteszt v. specIgE neg.	Keresztreaktivitások és alternatív szerek kimutatására	Szelektív diclophenac allergiára nem, Propyphenazone allergiára	Feltételezett fluoroquinolon szenzitivitásban	Bőrteszt nem mutatja a nem IgE közvetített reakciót	Bőrteszt nem mindig kivitelezhető

# BAT módszerek standardizálása

1997-től



- Különböző allergének
- Számos faktor befolyásolja a BAT prediktivitását és analitikai jellemzőit
- Pl. pollen szezonban a bazofilek kevésbé reagálnak a pollen allergénekre, mert a CD63 felregulálódik a fűpollen monoszennitizált egyéneknél, és így nagyon megváltoztatja a CD63-alapú BAT tesztek szenzitivitását
- **Az EUROBAT munkacsoport célja a különböző tesztek és paramétereik harmonizálása**

# Összefoglalás

- A bazofil aktivációs tesztek az allergia diagnosztikában megfelelő körültekintéssel alkalmazva alkalmasak:
  - I. típusú allergiák kimutatására
  - II. Segít az allergénspecifikus terápia monitorozásában
  - III. Alkalmas lehet nem IgE-közvetítette hiperszenzitivitás kimutatására is.