

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Małgorzaty Bulandy pt.: „Zastosowanie testu aktywacji bazofilów (BAT) w immunoterapii swoistej (SIT) alergenami wziewnymi”

Streszczenie

WSTĘP

Jedyną skuteczną metodą leczenia chorób alergicznych atopowych obok ograniczania ekspozycji na uczulające alergeny jest immunoterapia swoista (specific immunotherapy, SIT). Kwalifikacja do SIT wg wytycznych Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii obejmuje objawy kliniczne, testy skórne punktowe (skin prick test, SPT) i/lub pomiar stężenia swoistych IgE (sIgE). W niepewnych przypadkach diagnostycznych wskazane jest wykonanie swoistych prób prowokacyjnych np. testu prowokacji donosowej (nasal provocation test, NPT). Jednakże, istnieją liczne przeciwwskazania do NPT. Poszukiwania testu *in vitro* skutecznego zarówno w ocenie prawdopodobieństwa odpowiedzi na SIT przed jej wdrożeniem, jak również mogącego pomóc przewidzieć jej bezpieczeństwo i długoterminową skuteczność to wciąż gorący temat badań w alergologii i immunologii klinicznej. Jednym z takich testów jest test aktywacji bazofilów (basophil activation test, BAT), badanie przeprowadzane w cytometrze przepływowym, w którym ocenia się ekspresję markerów aktywacji tych komórek m.in. CD63.

Tematem pracy jest zastosowanie BAT w kwalifikacji i monitorowaniu SIT z alergenami wziewnymi. Cel głównym jest porównanie czułości i swoistości BAT w stosunku do NPT w kwalifikacji do SIT z alergenami roztoczy kurzu domowego (*Dermatophagoides pteronyssinus*, Dp) i brzozy. Celami dodatkowymi są ocena zastosowania BAT u pacjentów z niezgodnymi wynikami SPT i sIgE oraz wpływu metodologii na wynik testu. Cele pracy realizowano za pomocą dwóch badań - pierwszego dotyczącego zastosowania BAT w kwalifikacji do SIT oraz drugiego dotyczącego zastosowania BAT w monitorowaniu SIT.

MATERIAŁ I METODY

Do badania pierwszego włączonych zostało 30 dorosłych pacjentów z rozpoznaniem alergicznego nieżyty nosa (allergic rhinitis, AR) na podstawie objawów klinicznych, SPT i/lub sIgE z powodu alergii na Dp lub brzozę przed kwalifikacją do SIT. Wyniki BAT porównywano do wyników NPT, SPT i sIgE z alergenami Dp i brzozy. Bazofile były pobudzane preparatami alergenowymi Dp i brzozy przeznaczonymi do wykonywania NPT (Allergopharma GmbH, Reinbek, Germany) w następujących rozcieńczeniach: 1:1, 1:10, 1:100 odpowiadających stężeniom 5000, 500, 50 SBU/ml.

W 10 próbkach krwi BAT wykonywano również z komercyjnie dostępnymi alergenami Dp. W 12 próbkach krwi BAT wykonywano trzykrotnie - po 1 godzinie, 4 godzinach oraz 24 godzinach od pobrania krwi.

Do badania drugiego włączonych zostało 31 dzieci z AR i/lub astmą zakwalifikowanych do SIT z alergenami Dp na podstawie objawów klinicznych, wyników SPT, oznaczeń sIgE i BAT (BAT 1). W drugim etapie wykonywano kontrolne pomiary BAT podczas SIT po podaniu pacjentom tej samej dawki kumulacyjnej alergenu – odpowiednio 12487,5 PNU po skończeniu jednego (BAT 2) oraz dawki 23750 PNU po dwóch opakowaniach szczepionki (BAT 3). Komórki były pobudzane roztworami alergenów Dp

w pięciu stężeniach od 22,5 ng/ml do 0,00225 ng/ml.

Ocena aktywacji bazofilów przez pomiar ekspresji antygenu CD63 była przeprowadzona testem Flow2 CAST (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland). Wynik BAT wyrażano za pomocą procentu aktywowanych alergenem bazofilów, indeksu stymulacji (stimulation index, SI), reaktywności bazofilów (basophil reactivity, BR), czułości bazofilów (basophil sensitivity, CD-sensitivity, CD-sens).

WYNIKI

W badaniu pierwszym odpowiednimi stężeniami alergenu do stymulacji bazofilów okazały się 500 i 50 SBU/ml. Mediana SI oraz BR dla alergenów w przypadku pozytywnego NPT była znacząco wyższa niż

dla alergenów przy negatywnym NPT. Parametry porównujące BAT do NPT dla odpowiednich stężeń wynosiły: czułość 83-100%, swoistość 78-89%, wartość predykcyjna dodatnia (positive predictive value, PPV) 75-87%, wartość predykcyjna ujemna (negative predictive value, NPV) 89-100%, korelacja 0,584-0,748.

Parametry porównujące BAT do SPT oraz sIgE jako „złotych standardów” wynosiły kolejno: czułość 82-100% i 93-100%, swoistość 50-94% i 47-89%, PPV 65-94% i 61-87%, NPV 86-100% i 93-100%, korelacja 0,59 do 0,84 i 0,51 do 0,72. Wynik BAT był pomocny u 2 z 3 pacjentów z niezgodnymi wynikami SPT i sIgE.

Aktywacja bazofilów nie zmniejszyła się znacząco przez 24 godziny obserwacji. Nie obserwowano istotnych różnic w wynikach zastosowanych metod diagnostycznych ocenianych przez analizę krzywych ROC.

W badaniu drugim CD-sens obniżyło się znacząco u wszystkich pacjentów w BAT 2, a w BAT 3 obserwowano dalszy spadek wartości tego parametru w porównaniu do BAT 1. W analizie dla poszczególnych stężeń uzyskano istotny statystycznie spadek aktywacji bazofilów po skończeniu pierwszego opakowania szczepionki (BAT 2) dla stężenia 0,225 ng/ml ($p=0,004$) i dalszy spadek dla stężeń 0,225 ng/ml i 0,0225 ng/ml po skończeniu drugiego opakowania szczepionki (BAT 3) w porównaniu do pierwszego pomiaru (BAT 1).

WNIOSKI

BAT może być rozważany jako alternatywna metoda diagnostyczna w przypadku, gdy istnieją przeciwwskazania do NPT w kwalifikacji do SIT. Preparat alergenowy stosowany do NPT w odpowiednich rozcieńczeniach jest również dobrym odczynnikiem do zastosowania w BAT. Optymalnymi stężeniami preparatów alergenowych stosowanych w NPT do stymulacji bazofilów są 50 i 500 SBU/ml dla populacji dorosłych. Optymalnym stężeniem alergenu Dp do stymulacji bazofilów jest 0,225 ng/ml dla populacji pediatrycznej. Zarówno procent aktywowanych alergenem bazofilów, SI jak i BR są dobrymi wskaźnikami aktywacji bazofilów. CD-sens wydaje się być lepszym parametrem do monitorowania SIT niż procent aktywowanych alergenem bazofilów. BAT z alergenami wziewnymi można wykonywać przez okres 24 godzin od pobrania krwi do próbki z EDTA. Konieczne są dalsze badania nad zastosowaniem BAT w kwalifikacji i monitorowaniu SIT z alergenami wziewnymi.

Summary

INTRODUCTION

The only effective treatment method of allergic diseases next to limiting exposure to sensitizing allergens is specific immunotherapy (SIT). Qualification for SIT according to the guidelines of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology includes clinical symptoms, skin prick test (SPT) and/or measurement of specific IgE (sIgE) concentrations. In uncertain diagnostic cases in vivo specific provocation for example nasal provocation test (NPT) should be performed. However, there are several contraindications to performing NPT.

The need for in vitro assays assessing the probability of response to SIT before it is initiated, as well as tests predicting the safety and long-term efficacy is crucial and is still a hot topic in allergy researches. One such assay is basophil activation test (BAT), the test performed in a flow cytometer, which assesses the expression of activation markers e.g. CD63.

This paper concentrates on evaluation of the usefulness of BAT in the qualification for and monitoring of SIT with inhalant allergens. The main aim is to compare the sensitivity and specificity of BAT in relation to the NPT in the qualification for SIT with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*, Dp) and birch allergens. Additional aims are to evaluate the usefulness of BAT in patients with incompatible SPT and sIgE for inhalant allergens and the impact of BAT methodology on the test results. Above

mentioned goals are achieved in two studies - the first concerning the application of BAT in the qualification for SIT and the second concerning the application of BAT in the monitoring of SIT.

MATERIAL AND METHODS

The first study included 30 patients with the diagnosis of allergic rhinitis (AR) on the basis of clinical symptoms, SPT and/or sIgE caused by allergy to Dp or birch pollen who were qualified for SIT. NPTs and BATs were performed in all patients. The study compared the results of SPT, sIgE and NPT against BAT for Dp and birch allergens. Basophils were stimulated with allergen preparation in the following dilutions: 1: 1, 1:10, 1: 100 corresponding to 5000, 500, and 50 SBU/ml concentrations used in NPTs. In 10 blood samples BAT was performed also with commercially available allergens Dp. In 12 blood samples BAT was performed three times - after 1 hour, 4 hours and 24 hours after blood was collected. The second study included 31 children with AR and/or asthma who were qualified for SIT with Dp allergens on the basis of clinical symptoms, the results of SPT, sIgE and BAT (BAT 1). In a second stage, during the SIT, BAT was carried out after patients had been administered the same cumulative dose of allergen - upon finishing the initial pack of allergy vaccine (cumulative dose of allergen 12487.5 PNU; BAT2), as well as after the second vaccine pack (cumulative dose of allergen 23750.0 PNU; BAT3). Basophils were stimulated with allergen solutions in five concentrations from 22.5 ng/ml to 0.00225 ng/ml. BAT with CD63 antigen expression was performed using a Flow2 CAST test. BAT results were expressed as a percentage of CD63-expressing basophils, stimulation index (SI), basophil reactivity (BR), basophil sensitivity (CD-sensitivity, CD-sens).

RESULTS

In the first study 500 and 50 SBU/ml concentrations proved to be appropriate for basophil stimulation. In positive NPTs, SI and BR median was higher than in negative NPTs. SI and BR sensitivity was 83-100%, specificity 78-89%, the positive predictive value 75-87%, while the negative predictive value was 89-100%. The correlation of analyzed parameters was high (0.58-0.74).

Parameters comparing BAT to SPT and sIgE as the gold standards consecutively ranged: sensitivity 82-100% and 93-100%, specificity 50-94% and 47-89%, PPV 65-94% and 61-87%, NPV 86-100% and 93-100%, correlation 0.59-0.84 and 0.51-0.72. BAT was helpful in 2 of 3 patients with incompatible results of SPT and sIgE.

Basophil activation did not decline significantly up to 24 h. We did not observe substantial differences in results of the investigated diagnostic methods determined by a ROC analysis.

In the second study median CD-sens index decreased significantly in all patients in BAT2 and in the BAT 3 was observed further decrease in this parameter versus BAT 1. The analysis for each concentration gave a statistically significant decrease in basophil activation after finishing the first pack vaccine (BAT 2) for concentration of 0.225 ng/ml, and a further decrease in the concentrations of 0.225 ng/ml and 0.0225 ng/ml after the end of the second pack vaccine (BAT 3) compared to the first measurement (BAT 1).

CONCLUSIONS

With contraindications for the specific provocation test, BAT may be regarded as a replacement for NPT in qualifying for SIT. Allergen suitable for NPT in appropriate dilutions is a good reagent for use in BAT. The optimal concentrations of allergen preparations used in NPT were 500 and 50 SBU/ml for the adult population. The optimal concentration of Dp allergen to stimulate basophils is 0.225 ng/mL for the pediatric population. The percentage of CD63-expressing basophils, SI and BR are credible basophil activation indicators. The CDsens index seems the best monitoring parameter. BAT with inhalant allergens can be performed within 24 hours after blood was collected into a tube with EDTA. Further researches are needed on the use of BAT in the qualification for and monitoring of SIT with inhalant allergens.