

Ewa CZARNOBILSKA<sup>1</sup>  
 Aleksandra GREGORIUS<sup>2</sup>  
 Grzegorz PORĘBSKI<sup>1</sup>  
 Radosław ŚPIEWAK<sup>2</sup>  
 Małgorzata SACHA<sup>3</sup>

## Korzyści z wykonywania testu aktywacji bazofilów w kwalifikacji do immunoterapii swoistej w alergii wziewnej

The benefits of using basophil activation test as a diagnostic tool prior to specific immunotherapy with inhalant allergens

<sup>1</sup>Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Katedry Toksykologii i Chorób Środowiskowych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków  
 Kierownik: Dr hab. med. Ewa Czarnobilska

<sup>2</sup>Zakład Dermatologii Doświadczalnej i Kosmetologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków  
 Kierownik: Prof. UJ dr hab. med. Radosław Śpiewak

<sup>3</sup>Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Oddział Kliniczny Klinik Chorób Wewnętrznych Poradnia Alergologiczna

### Dodatkowe słowa kluczowe:

alergia pyłkowa  
 swoista immunoterapia  
 test aktywacji bazofilów  
 CD63  
 diagnostyka in vitro

### Additional key words:

pollen allergy  
 specific immunotherapy  
 basophil activation test  
 CD63  
 in vitro diagnosis

Praca została sfinansowana z Pracy Statutowej nr K/ZDS/002431 w CMUJ

**Kwalifikacja do swoistej immunoterapii (SIT) opiera się głównie na wywiadzie oraz skórnym testach punktowych (SPT) lub rzadziej na oznaczeniu swoistych IgE (sIgE) dla podejrzanych alergenów. W przypadku rozbieżności między SPT a oznaczeniami sIgE rozstrzygający może być test aktywacji bazofilów (BAT). Celem pracy była ocena czułości i swoistości BAT, sIgE oraz SPT dla badanych alergenów, oraz analiza przypadków klinicznych, w których kwalifikacja do SIT tylko na podstawie danych klinicznych i wyników SPT byłaby błędna. Pacjenci i metody: U 52 dzieci z alergią oddechową zakwalifikowanych do SIT na podstawie dodatnich SPT dodatkowo wykonaliśmy BAT i oznaczyliśmy sIgE z alergenami roztoczy kurzu domowego (Dp) i roztoczy mącznych (Df). Grupa obejmowała 21 dzieci zakwalifikowanych do SIT z alergenami pyłku brzozy lub tymotki, których wyniki stanowiły punkt odniesienia w obliczeniach czułości i swoistości BAT, sIgE i SPT z alergenami roztoczy. Wyniki: Czułość i swoistość BAT w odniesieniu do testów prick jako „złotego standardu” wynosiła odpowiednio 96,6% i 88,9% dla Dp, a dla Df 89,3% i 100%. Natomiast czułość i swoistość sIgE w odniesieniu do testów prick wynosiła dla Dp 89,7% i 88,9%, a dla Df 92,9% i 94,4%. Kiedy zastosowaliśmy wynik BAT jako „złoty standard”, czułość i swoistość SPT wynosiła dla Dp 90% i 90,5%, a dla Df 92% i 84,6%. Dla sIgE wskaźniki te wynosiły odpowiednio dla Dp 87,1% i 90,5%, dla Df 100% i 87,5%. U dwojga dzieci zakwalifikowanych do SIT na podstawie dodatniego SPT z Dp i Df, test BAT zamiast swoistej odpowiedzi na alergeny wykazał nieswoiste pobudzenie bazofilów. Podjęte w celu rozstrzygnięcia testy prowokacji donosowej Dp i Df były także ujemne, potwierdzając fałszywie dodatni wynik SPT, co tłumaczymy współistnieniem pokrzywki u obu tych dzieci. U dwóch kolejnych pacjentów zakwalifikowanych do SIT na podstawie dodatnich**

**Background: Routine qualification for specific immunotherapy (SIT) is based on clinical history and skin prick tests (SPT) or specific IgE (sIgE). In cases of discordance between these two, basophil activation test (BAT) may be decisive. The aim of the present study was to determine the specificity and sensitivity of BAT, sIgE, and SPT, and to analyse cases, in which clinical data and SPT alone would result in wrongful qualification for SIT. Patients and methods: BAT results and sIgE levels to *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *Dermatophagoides farinae* (Df) were determined in 52 pediatric patients qualified for SIT based on clinical history and positive SPT. The group included 21 children qualified for SIT with birch or timothy grass, used as reference for specificity and sensitivity calculations for BAT, sIgE and SPT. Result: The sensitivity and specificity of BAT, using SPT as "gold standard" was 96.9% and 88.9% for Dp, and 89.3% and 100% for Df, respectively and the sensitivity and specificity of sIgE were 89.7%, 88.9% for Dp, and 92.9% and 94.4% for Df. When using BAT as "gold standard", the sensitivity and specificity of SPT was 90% and 90.5% for Dp, 92% and 84.6% for Df, and these indices for sIgE were 87.1% and 90.5% for Dp, 100% and 87.5% for Df. BAT did not confirm the initial qualification for SIT in 2 patients, revealing an unspecific basophil activation. Negative nasal provocation test ultimately confirmed the false-positive SPT, which could be explained by the co-existence of urticaria in those children. In further 2 children qualified for SIT with timothy and birch, BAT revealed lack of reactivity to respective allergens. Altogether BAT helped in avoiding unnecessary SIT in 4 out of 52 children (7.7%). Conclusions: In most cases, SPT, sIgE and BAT provide comparable information, however, SPT results may be deceptive in a subgroup of patients qualified for SIT. Particular**

Adres do korespondencji:  
 Dr hab. med. Ewa Czarnobilska,  
 Zakład Alergologii Klinicznej  
 i Środowiskowej UJ CM  
 ul. Śniadeckich 10, 31-531 Kraków  
 Tel/fax: 12 423 11 22  
 e-mail: ewa.czarnobilska@uj.edu.pl

SPT z tymotką i brzozą, BAT wykazał brak degranulacji bazo-filów obecności podejrzewanych alergenów. Ostatecz-nie wynik BAT zdecydował o odstąpieniu od niepotrzebnej SIT u czterech (7,7%) spośród 52 badanych.

**Wnioski:** W większości przypadków test aktywacji bazo-filów, testy skórne punktowe i sIgE cechują się zbliżoną wartością w diagnostyce alergii wziewnej, jednak w nie-kórych przypadkach wyniki SPT mogą być zwodniczym kryterium kwalifikacji do SIT. Szczególna ostrożność jest wskazana u pacjentów ze współistniejącą pokrzywką. BAT jest przydatną metodą weryfikacji obecności swoistej nad-wrażliwości na alergeny szczepionki, a w razie ujemnego wyniku pozwala uniknąć długotrwałej, uciążliwej, kosztow-nej i nieskutecznej immunoterapii w nieprawidłowo zakwa-lifikowanych przypadkach.

## Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się istotny wzrost częstości występowania chorób alergicznych na świecie. Według najnowszych danych ponad 35% populacji krajów europejskich zgłasza objawy chorób alergicznych [31]. Opublikowane w ostatnim dziesięcioleciu XX w. wyniki dwóch badań epidemiologicznych o zasięgu światowym - ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) i ECRHS (European Community Respiratory Health Survey) - wykazały, że częstość występowania alergicznego nieżytu nosa (ANN) wśród dzieci i młodzieży wynosi od 1,4 do 39,7%, zaś astmy (AO) od 2,0 do 8,4% [33, 35]. Wyniki badań epidemiologicznych przeprowadzo-nych w latach 2006-2008 w ramach projek-tu ECAP (Epidemiologia Chorób Alergicz-nych w Polsce) wykazały, że choroby alerg-iczne o różnej manifestacji klinicznej wy-stępują u 30-40% mieszkańców Polski, w tym ANN od 22% do 25%, a AO od 4,2% do 6,5% [30]. W tym samym czasie w ra-mach Miejskiego Programu profilaktyki ast-my i chorób alergicznych przebadano 28339 uczniów ze wszystkich krakowskich szkół: 11530 osób w wieku 7-8 lat i 16809 osób w wieku 16-17 lat. Choroby alergiczne dróg oddechowych występowały w tej grupie czę-ściej w porównaniu do badania ECAP: ANN od 26% do 30%, a AO od 9% do 12% re-spondentów [5, 7]. Ten wysoki odsetek aler-gii dróg oddechowych u krakowskich uc-zniów może być związany z zanieczysz-czeniem środowiska [4]. Powszechne i na-rastające występowanie chorób alergicz-nych niesie za sobą konieczność stosowa-nia nowoczesnych i efektywnych metod le-czenia, do których zaliczamy między inny-mi immunoterapię swoistą (SIT). Jej war-tość potwierdzono w licznych pracach speł-niających kryteria medycyny opartej na fak-tach [23, 29, 1]. Efektem tego stało się umieszczenie SIT w międzynarodowych konsensusach leczenia wybranych chorób atopowych, takich jak: alergiczny nieżyt nosa i spojówek, w wybranych postaciach astmy oskrzelowej, a także w alergii na jady owadów błonkoskrzydłych. SIT polega na systematycznym podawaniu uczulonym chorym stopniowo zwiększanych dawek wy-ciągu alergenowego, a następnie dawki podtrzymującej przez okres 3-5 lat w celu zlagodzenia objawów powodowanych po-nownym kontaktem z alergenem. SIT po-zwala na znaczne ograniczenie konieczno-

care is advised in patients with co-existing urticaria. BAT is useful in verifying the actual relevance of allergens se-lected for SIT and helps in avoiding long-lasting, arduous, costly, and ineffective immunotherapy of wrongly qualified cases.

ści stosowania leków, ponadto jest jedyną formą terapii, która może doprowadzić do zmiany naturalnego przebiegu choroby [23, 1,24,25]. Do SIT kwalifikowani są pacjenci tylko z alergią IgE-zależną. Głównymi ko-mórkami efektorowymi odpowiedzialnymi za rozwój reakcji IgE-zależnej są bazofile i ko-mórki tuczne. Na ich powierzchni znajdują się receptory o wysokim powinowactwie dla immunoglobuliny E (FcεRI). Po związaniu receptora z IgE u osób uczulonych docho-dzi do „mostkowania” receptorów za pomo-cą cząsteczki alergenu, co prowadzi do de-granulacji komórek. Skutkiem tej reakcji jest uwolnienie do przestrzeni pozakomórkowej mediatorów reakcji alergicznej, takich jak hi-stamina i liczne cytokiny. Zjawisku temu to-warzyszą zmiany na powierzchni błony ko-mórkowej, polegające między innymi na zwiększeniu ekspresji antygenów charakte-rystycznych dla stanu aktywacji (CD13, CD63, CD107a, CD164, CD203c) [3, 11]. Za pomocą badań *in vitro* można oceniać mię-dzy innymi stężenie mediatorów reakcji aler-gicznych, takich jak histamina i liczne cyto-kiny, uwalnianych z ziarnistości bazo-filów podczas degranulacji. Badania te są jednak bardzo cza-so- i pracochłonne, a ich wyniki nie zawsze korelują ze stanem klinicznym. Do niedawna bazofile były uważane za krą-żące formy komórek tucznych o małym zna-czeniu. Ostatnio jest jednak coraz więcej dowodów, że komórki te mają znaczenie kli-niczne porównywalne do mastocytów [2,3,14]. Ponieważ stanowią mniej niż 0,5% wszystkich leukocytów krwi obwodowej, a ich izolacja z krwi obwodowej jest trudna, opracowano szereg testów czynnościowych oceniających *in vitro* ich aktywację w pełnej krwi. Pierwszą metodą była mikroskopowa ocena degranulacji bazo-filów [16]. Następnie wprowadzono test uwalniania histaminy (basophil histamine-release test, BHR), któ-ry jednak nie znalazł szerszego zastosowa-nia w warunkach klinicznych z powodu nie-

dostatecznej czułości i specyficzności [19]. Alternatywę stanowi test aktywacji bazo-filów (basophil activation test, BAT). Jest to badanie wykorzystujące technikę cytometrii przepływową, dzięki której wykrywa się cha-rakterystyczne antygeny na powierzchni komórek, stosując do tego przeciwciała monoklonalne znakowane fluorochromami [3,8,14]. Identyfikacja bazo-filów w cytome-trii przepływową opierała się początkowo na ekspresji wspólnego antygeny leukocytów CD45 i obecności IgE na powierzchni ko-mórki, gdyż bazofile mają receptory o wy-sokim powinowactwie do IgE (FcεRI) [15, 16,22]. W zidentyfikowanej w ten sposób populacji bazo-filów oceniano ich aktywację w odpowiedzi na antygen poprzez ekspre-sję antygeny CD63 na powierzchni komó-rek [13, 26]. Antygen ten jest białkiem o masie 53 kDa zakotwiczonym w błonie ziarn-istości bazo-fila zawierających histaminę i inne mediatory alergiczne, a jego pojawie-nie się na powierzchni komórki odzwierc-dla degranulację bazo-fila (skutek fuzji ziarn-istości i błony komórkowej). Fuzja ziarn-istości z błoną plazmatyczną komórki (eg-zocytoza) jest kluczowym zjawiskiem w przebiegu degranulacji inicjowanej przez „mostkowanie” receptorów IgE przez aler-geny. Ekspresja CD63 wzrasta natychmiast po degranulacji bazo-filów a badanie ekspre-sji tego markera jest uważane za miarodaj-ny sposób oceny aktywacji tych komórek (tabela I) [21,27,36].

Kwalifikacja do swoistej immunoterapii (SIT) wg wytycznych EAACI opiera się głów-nie na objawach klinicznych oraz skórnych testach punktowych (SPT). Oznaczenie sIgE dla podejrzanych alergenów jest uzna-wane za badanie uzupełniające, jednak jego wykonanie nie jest obowiązkowe, co stano-wi istotny problem decyzyjny w procesie kwalifikacji [1]. Lekarze oznaczający oprócz SPT również sIgE obserwują niekiedy roz-bieżność między wynikami tych dwóch ba-

**Tabela I**  
Charakterystyka antygeny CD63.  
Characteristics of antigen CD63.

Antygen	CD63
struktura	białko błonowe związane z lizozymem (LAMP-3, lysosyme-associated membrane protein)
pochodzenie	nadrodzina białek transbłonowych (tetraspaniny - białko z 4 domenami transbłonowymi)
występowanie	bazofile, mastocyty, makrofagi, płytki krwi
sposób aktywacji	podczas aktywacji bazo-fila ulega ekspresji de novo na powierzchni badanych komórek

dań. W takich przypadkach rozstrzygający może być test aktywacji bazofilów (BAT).

Celem pracy było przedstawienie przypadków klinicznych, w których kwalifikacja do SIT tylko na podstawie objawów klinicznych i wyników SPT byłaby błędna oraz ocena czułości i swoistości BAT i sIgE w odniesieniu do punktowych testów skórnych dla badanych alergenów.

### Material i metody

U 52 losowo wybranych dzieci (19 dziewcząt, 33 chłopców) w wieku od 7 do 18 lat (średnia: 11 lat) zakwalifikowanych między lutym 2010 i marcem 2012 do SIT na podstawie objawów alergicznego nieżytu nosa lub astmy oskrzelowej atopowej i dodatnich SPT, dodatkowo oznaczyliśmy sIgE i wykonaliśmy BAT z alergenami planowanej szczepionki (roztocze kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus* - Dp, roztocze mączne *Dermatophagoides farinae* - Df, tymotka lub brzoza). W celu obliczenia czułości i swoistości poszczególnych testów z alergenami roztoczymi, grupę podzieliliśmy na 31 pacjentów z alergią na roztocze kurzu domowego i/lub mączne i grupę kontrolną 21 pacjentów bez alergii na Dp i Df zakwalifikowanych do SIT z powodu alergii na pyłek brzozy lub tymotki. Cytometryczny test aktywacji bazofilów (BAT) został wykonany przed rozpoczęciem immunoterapii swoistej. Do testu BAT użyto 400 µl krwi pozostałej po rutynowych badaniach hematologicznych, pobranej na wersenian sodu (EDTA). Badanie było przeprowadzone w ciągu maksymalnie 2 godzin od pozyskania materiału. Ocena wyniku polegała na porównaniu odsetka bazofilów wykazujących ekspresję markera powierzchniowego CD63 przed stymulacją badanym alergenem i po niej. Komórki były inkubowane z roztworami alergenów Dp, Df (wszystkie dzieci), oraz brzozy lub tymotki (dzieci z objawami alergii sezonowej na odpowiedni alergen). Ocena aktywacji bazofilów przeprowadzono z użyciem testu Flow2CAST (Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Szwajcaria) posiadającego certyfikat do diagnostyki *in vitro* (CE IVD) zgodnie z instrukcją producenta. Jako kontrolę pozytywną zastosowano przeciwciała monoklonalne anti-Fcε-RI (przeciwciała przeciw receptorowi o wysokim powinowactwie do IgE) i fMLP (oligopeptyd nieswoiście degranulujący bazofile), jako kontroli negatywnej użyto bufor do rozcieńczenia alergenów. Do zawiesiny komórek dodawano mieszaninę przeciwciał monoklonalnych anti-CD63, anti-CCR3 sprzężonych z fluorochromami, odpowiednio izotiocjanianem fluoresceiny (FITC) i fikocytryną (PE), inkubowano przez 15 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, dodawano 2 ml roztworu lizującego erytrocyty, wirowano, zawieszano w 0,3 ml buforu płuczącego i analizowano w ciągu godziny na cytometrze przepływowym (BD FACs Calibur). Swoistą aktywację bazofilów (dodatni wynik BAT) stwierdziliśmy gdy badany alergen powodował ekspresję CD63 na co najmniej 15% analizowanych bazofilów, definiowanych w cytometrii jako komórki SSC-low, CCR3+. Próg 15% przyjęto na podstawie doniesień innych autorów [23-31]. Kontrola negatywna służyła ustaleniu progu odcięcia spontanicznej lub nieswoistej aktywacji bazofilów. Następnie porównaliśmy czułość i swoistość BAT oraz sIgE przyjmując wynik testów skórnych punktowych z roztoczymi kurzu domowego i mącznymi za „złoty standard”, oraz czułość i swoistość SPT i sIgE przy zastosowaniu wyników BAT jako „złotego standardu”. Ostatni etap pracy polegał na analizie pacjentów, u których wystąpiła rozbieżność między wynikami BAT a wynikiem rutynowej kwalifikacji do immunoterapii swoistej.

### Wyniki i omówienie

Nie stwierdziliśmy znacznych różnic między czułością i swoistością BAT i sIgE w odniesieniu do punktowych testów skórnych dla badanych alergenów (tabela II). Kiedy zastosowaliśmy wyniki BAT jako „złoty standard”, czułość i swoistość SPT wyniosła dla Dp 90% i 90,5%, dla Df 92% i 84,6%, a dla sIgE wskaźniki te wyniosły dla Dp

Tabela II

Czułość i swoistość BAT i sIgE przy zastosowaniu skórnych testów punktowych jako „złotego standardu”. Sensitivity and specificity of BAT and specific IgE using skin prick tests as the "gold standard".

	Alergen	Czułość (%)	Swoistość (%)
BAT	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	96,6	88,9
	<i>Dermatophagoides farinae</i>	89,3	100,0
sIgE	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	89,3	88,9
	<i>Dermatophagoides farinae</i>	92,9	94,4

Tabela III

Czułość i swoistość skórnych testów punktowych (SPT) i sIgE przy zastosowaniu wyniku BAT jako „złotego standardu”. Sensitivity and specificity of skin prick tests (SPT) and specific IgE using BAT results as the "gold standard".

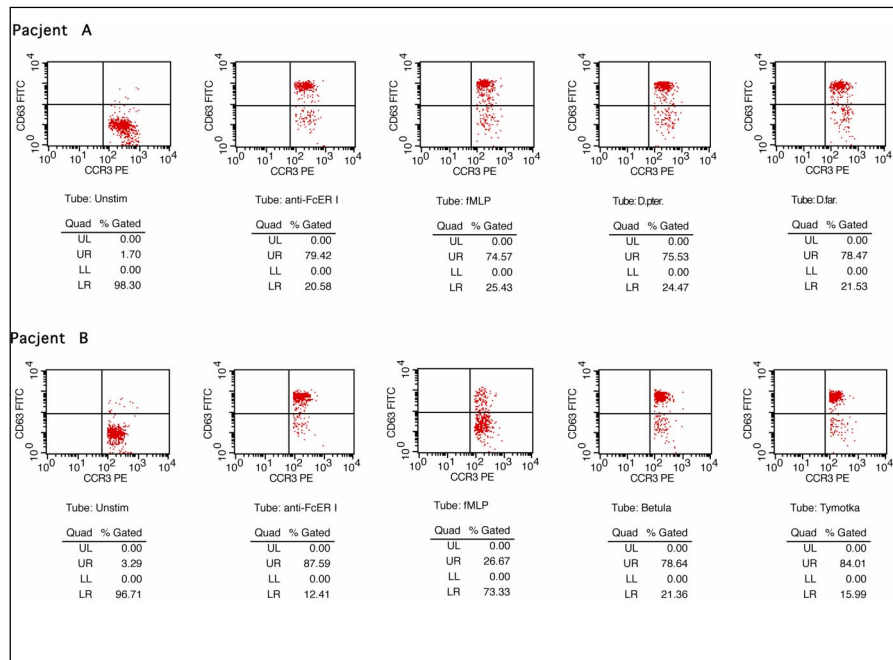
	Alergen	Czułość (%)	Swoistość (%)
SPT	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	90,0	90,5
	<i>Dermatophagoides farinae</i>	92,9	94,4
sIgE	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	87,1	90,5
	<i>Dermatophagoides farinae</i>	100,0	87,5

Tabela IV

Charakterystyka dwóch pacjentek spełniających kryteria EAACI kwalifikacji do SIT na roztocze kurzu domowego i/lub mączne z ostatecznie wykrytym samoistną aktywacją bazofilów.

Characteristics of two patients fulfilling EAACI criteria for specific immunotherapy with house dust mites and/or flour mites but ultimately found with spontaneous basophil activation.

Pacjent	Wiek (lat) /pleć	Rozpoznanie kliniczne	Roztocze kurzu domowego ( <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> )			Roztocze mączne ( <i>Dermatophagoides farinae</i> )		
			Prick (mm)	sIgE kUA/l	BAT	Prick (mm)	sIgE kUA/l	BAT
C	18 /K	Alergiczny nieżyt nosa Pokrzywka	4/5	< 0,35 (kl.0)	Ujemny (ryc. 2)	3/3	< 0,35 (kl.0)	Ujemny (ryc. 2)
D	17 /K	Astma oskrzelowa Pokrzywka	3/3	< 0,35 (kl.0)	Ujemny (ryc. 2)	5/5	< 0,35 (kl.0)	Ujemny (ryc. 2)

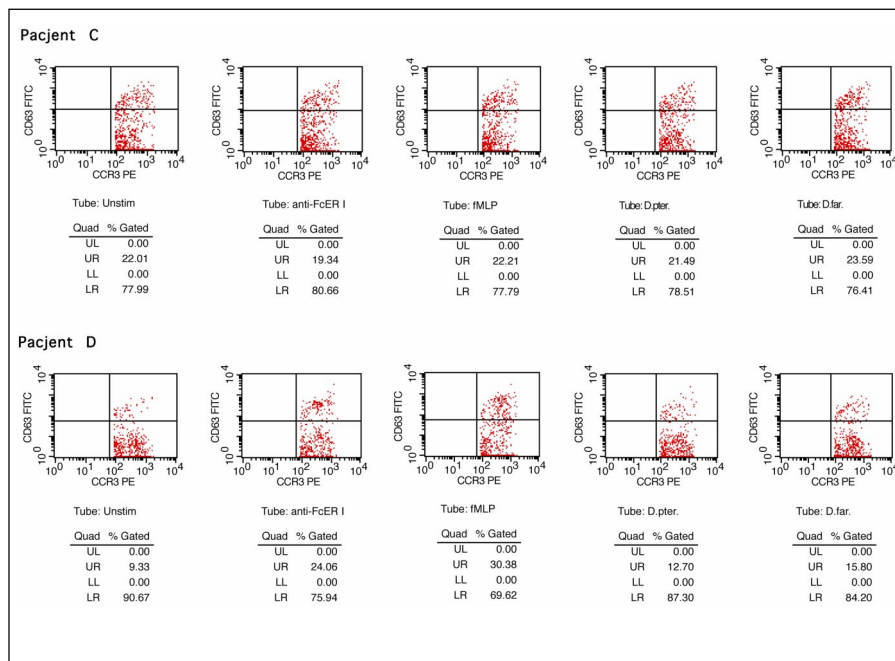


Rycina 1

Przykładowe wyniki BAT potwierdzające alergię na roztocze kurzu domowego (pacjent A) oraz brzozy i tymotki (pacjent B). Bazofile spoczynkowe (komórki CCR3+, CD63-) znajdują się w prawych dolnych kwadrantach wykresów, reprezentowanych w tabelkach jako LR, bazofile pobudzone (CCR3+, CD63+) - w prawym górnym kwadrancie (UR). Populacja przedstawiona na wykresach została uprzednio ograniczona do komórek o niskim rozproszeniu bocznym (SSC-low).

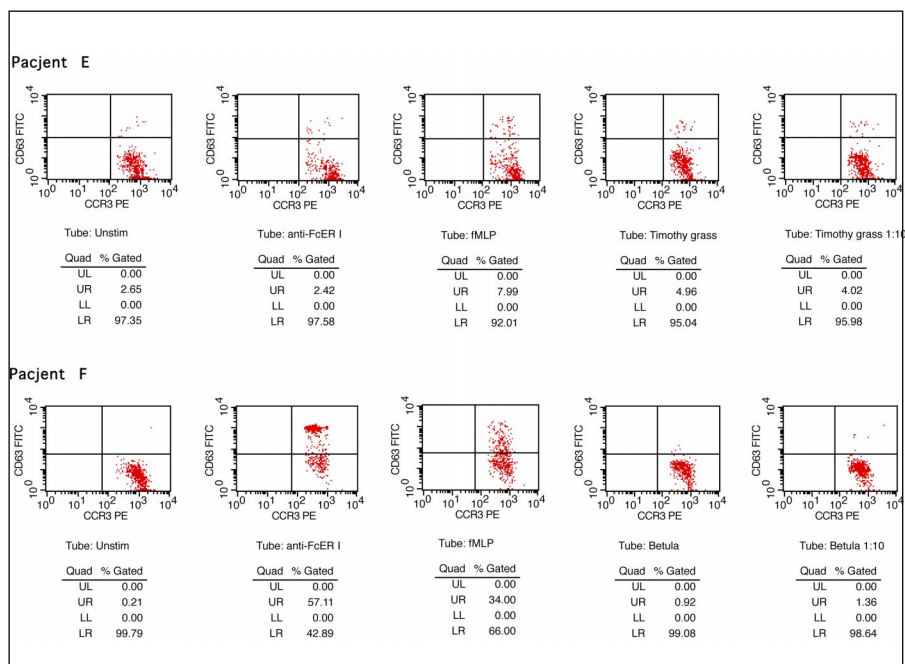
Examples of BAT results confirming allergy to house dust mites (patient A), as well as to birch and timothy grass (patient B). Resting basophils (cells CCR3+, CD63-) are represented in the lower right quadrants of the graphs, referred to in the tables as LR, activated basophils (CCR3+, CD63+) are in the upper right (UR) quadrant. The population shown in the graphs was previously gated for cells with low side scatter (SSC-low).





**Rycina 2**  
Pacjenci C i D z tab. IV: Wyniki testu BAT wykazały znaczne samoistne pobudzenie bazofilów przy ujemnym wyniku testu z alergenami roztoczy.

Patients C and D from table IV: BAT results have demonstrated an excessive spontaneous activation of basophils, with no specific reaction to mite allergens



**Rycina 3**  
Pacjent E nie zareagował w teście BAT na alergen planowanej szczepionki (tymotka), ale także na kontrolne degranulatory anti-FcεRI i fMLP ("non-reactor"). Bazofile krwi obwodowej pacjenta F wykazały się prawidłową reaktywnością na degranulatory, jednak alergen planowanej szczepionki (brzoza) nie spowodował reakcji (porównaj z tab. IV).

Patient E did not react in BAT to the allergen of planned allergy vaccine (timothy grass), nor to control degranulators anti-FcεRI and fMLP ("non-reactor"). Peripheral blood basophils of patient F showed normal reactivity to the degranulators, however, there was no reaction to the planned vaccine allergen (birch, compare table IV).

Pacjent	Wiek (lat) /płeć	Rozpoznanie kliniczne	Pylek tymotki			Pylek brzozy		
			Prick (mm)	slgE kUA/l	BAT	Prick (mm)	slgE kUA/l	BAT
E	6 /K	Alergiczny nieżyt nosa Asthma oskrzelowa	3/5	< 2,58 (kl. 2)	Ujemny (ryc.3)	5/5	2,26 (kl. 2)	Ujemny (ryc.3)
F	7 /K	Asthma oskrzelowa Pokrzywka	0/0	< 0,35 (kl. 0)	Ujemny (ryc. 3)	3/5	< 0,35 (kl. 0)	Ujemny (ryc.3)

87,1% i 90,5%, dla Df 100% i 87,5% (tabela III). Rycina 1 przedstawia przykładowe wyniki BAT jednoznacznie potwierdzające alergię typu natychmiastowego na alergeny roztoczy (pacjent A) oraz brzozy i tymotki (pacjent B). U 4 pacjentów (7,7% badanych, 4 dziewczęta w wieku 6-18 lat) wynik BAT okazał się niezgodny z wynikiem kwalifikacji do SIT. U dwóch dzieci pierwotnie zakwalifikowanych do SIT na podstawie dodatniego SPT z Dp i Df, test BAT zamiast swoistej odpowiedzi na te alergeny wykazał nieswoiste pobudzenie bazofilów (pacjenci C i D, ryc. 2). W związku z rozbieżnością wyników, oznaczyliśmy u nich dodatkowo slgE wobec Dp i Df - wyniki były ujemne (tabela IV). Fałszywie dodatnie SPT tłumaczymy współistnieniem pokrzywki u obu tych dzieci. Dlatego u pacjentów z alergią dróg oddechowych i towarzyszącą pokrzywką przed kwalifikacją do SIT należy oznaczyć poziom slgE i wykonać BAT z alergenami planowanej szczepionki, ponieważ w przypadku nieswoistej nadreaktywności bazofilów SIT najprawdopodobniej będzie nieskuteczna, za to może wiązać się z większym ryzykiem reakcji anafilaktycznej.

U dwóch kolejnych pacjentów zakwalifikowanych do SIT na podstawie dodatnich SPT z tymotką i brzożą, BAT wykazał brak degranulacji bazofilów w obecności alergenów planowanej szczepionki (tymotka u pacjenta E i brzoza u pacjenta F, rycina 3). W przypadku pacjenta E nie było degranulacji bazofilów w odpowiedzi na działający przez receptory IgE degranulator anti-FcεRI oraz nieswoisty degranulator fMLP. Osobę tę zidentyfikowano jako tzw. „non-responder”. Wydaje się, że SIT u pacjentów z brakiem degranulacji bazofilów zarówno w obecności podejrzewanych alergenów, jak i nieswoistych degranulatorów może wiązać się z większym ryzykiem nieskutecznej immunoterapii swoistej. Bazofile krwi obwodowej pacjenta F wykazały się prawidłową reaktywnością na degranulatory, jednak alergen planowanej szczepionki (brzoza) nie spowodował reakcji. U obydwu tych dzieci slgE dla tymotki i/lub brzozy okazało się ujemne, co ostatecznie zaważyło na decyzji odstąpienia od SIT (tabela V).

W alergii na jady owadów błonkoskrzydłych test aktywacji bazofilów może potwierdzić dane uzyskane z wywiadu przy braku dodatnich wyników testów skórnych lub obecności swoistych IgE. Ponadto często pozwala na identyfikację owada odpowiedzialnego za objawy uczulenia i potwierdzenie wskazań do immunoterapii [9,10,12,17,34]. Wyniki BAT u pacjentów uczulonych na alergeny wziewne jak pyłki traw czy roztozce kurzu domowego porównano z wynikami testów skórnych, poziomem swoistych

**Tabela V**  
Charakterystyka pacjentów spełniających kryteria kwalifikacji do SIT na pyłek brzozy lub tymotki, u których BAT wykazał brak degranulacji bazofilów w obecności alergenów planowanej szczepionki.  
Characteristic of the patients, fulfilling criteria for specific immunotherapy to birch and timothy grass, but ultimately found with lack of degranulation of basophils after stimulation with allergens planned for SIT.

IgE (CAP, RAST) i wynikiem testów uwalniających mediatorów (HRT, CAST) i potwierdzono dużą efektywność diagnostyczną testów BAT [8, 32]. Należy pamiętać, że rozbieżności między wynikami badań in vivo (np. testy skórne) i in vitro (sIgE) nie są rzadkie [18], a wynik testu BAT może w takich przypadkach pomóc w rozstrzygnięciu ponieważ w warunkach pozaustrojowych, a zatem bez ryzyka dla pacjenta odtwarza przebieg reakcji alergicznej w odpowiedzi na dany alergen.

#### Wnioski

• BAT, testy skórne punktowe i sIgE wnoszą porównywalne informacje do diagnostyki alergii wziewnej, jednak w niektórych przypadkach skórne testy punktowe są zawodnym kryterium kwalifikacji do immunoterapii swoistej. Szczególna ostrożność jest wskazana u pacjentów ze współistniejącą pokrzywką.

• Test aktywacji bazofilów weryfikuje obecność swoistej nadwrażliwości na alergeny szczepionki, a w przypadku jej braku pozwala uniknąć długotrwałej, uciążliwej, kosztownej i nieskutecznej immunoterapii.

#### Piśmiennictwo

1. Alvarez-Cuesta E., Bousquet J., Canonica G., W. et al.: Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2006, 61 (Suppl. 1), s82
2. Benveniste J.: The human basophil degranulation test as an in vitro method for diagnosis of allergies. *Clin. Allergy* 1981, 11, 1.
3. Boumiza R., Debard A.-L., Monneret G.: The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin. Mol. Allergy* 2005, 3, 5.
4. Czarnobilska E., Dyga W., Krzystyniak D. et al.: The influence of environmental exposures on the frequency of contact allergies in children and adolescents. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2012, 2, 18.
5. Czarnobilska E., Gawlik J.: Alergie górnych dróg oddechowych u dzieci - odrębności diagnostyczne i terapeutyczne. [Upper respiratory tract allergies in children - diagnostic and therapeutic distinctions.]. *Alergologia Immunologia* 2006, 3, 40.
6. Czarnobilska E., Gregorius A., Żyła M. i wsp.: Korzyści z wykonywania testu aktywacji bazofilów (BAT) w kwalifikacji do immunoterapii swoistej/The benefits of using the basophil activation test (BAT) in the qualifications for specific immunotherapy. *Alergia Astma Immunologia* 2011, 16 (Suppl. 1), 31.
7. Czarnobilska E., Obtulowicz K., Porębski G.: Allergic diseases among schoolchildren in a questionnaire survey and allergic tests carried out in schools of Krakow in 2007-2009. *Alergologia Immunologia* 2011, 8, 1.
8. De Weck A.L., Sanz M.L., Gamboa P.M. et al.: Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008, 146, 177.
9. Dubois A.E.J., van der Hiede S.: Basophil-activation tests in hymenoptera allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 7, 346.
10. Eberlein-König B., Schmidt-Leidescher C., Rakoski J. et al.: In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2006, 16, 5.
11. Eberlein-König B., Varga R., Mempel M. et al.: Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy* 2006, 61, 1084.
12. Ebo D.G., Hagendorens M.M., Schuerwegh A.J. et al.: Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom-specific immunotherapy. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2007, 72, 196.
13. Fureder W., Agis H., Sperr W.R. et al.: The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils. *Allergy* 1994, 49, 861.
14. Galli S. J.: Mast cells and basophils. *Curr. Opin. Hematol.* 2000, 7, 32.
15. Gane P., Pecquet C., Crespeau H. et al.: Flow cytometric monitoring of allergen induced basophil activation. *Cytometry* 1995, 19, 361.
16. Gane P., Pecquet C., Lamblin P. et al.: Flow cytometric evaluation of human basophils. *Cytometry* 1993, 14, 344.
17. González-Munoz M., Villota J., Moneo I. et al.: Analysis of basophil activation by flow cytometry in pediatric house dust mite allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2008, 19, 342.
18. Gregorius A., Czarnobilska E., Śpiewak R.: Optimisation of the basophil activation test with *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae* in pediatric population with respiratory allergy to house dust mite Allergy diagnosis: new in vitro methods. *Allergy* 2011, 66, (Suppl. 94), 320.
19. Hamilton R.G., Adkinson N.F.: Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003, 111 (Suppl. 2), 687.
20. Hauswirth A.W., Natter S., Ghannadan M. et al.: Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophil in sensitized individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002, 110, 102.
21. Hennersdorf F., Florian S., Jakob A. et al.: Identification of CD13, CD107a, and CD 164 as novel basophil activation markers and dissection of two reaction patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. *Cell. Res.* 2005, 15, 326.
22. Jensen B.M., Assing K., Hummelshoj L. et al.: Are basophile histamine release and high affinity IgE receptor expression involved in asymptomatic skin sensitization? *Allergy* 2006, 61, 303.
23. Jutel M., Kuna P., Bocheńska-Marciniak M. i wsp.: Stanowisko ekspertów PTA nt. immunoterapii podjęzykowej. *Allerg. Astma Immunol.* 2007, 12, 181.
24. Kay A.B.: Allergy and allergic diseases (part 1). *N. Engl. J. Med.* 2001, 344, 30.
25. Kay A.B.: Allergy and allergic diseases (part 2). *N. Engl. J. Med.* 2001, 344, 109.
26. Knol E.F., Mul F.P., Jansen H. et al.: Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991, 88, 328.
27. Monneret G., Gutowski M.C., Bienvenu J.: Detection of allergen induced basophil activation by expression of CD63 antigen using flow cytometric method. *Clin. Exp. Immunol.* 1999, 115, 393.
28. Ocmant A., Peignois Y., Mulier S. et al.: Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J. Immunol. Meth.* 2007, 320, 40.
29. Sak-Rusek D., Czarnobilska E., Obtulowicz K.: Swoista immunoterapia w alergii pyłkowej. Specific immunotherapy in pollen allergy. *Allergol. Immunol.* 2011, 8, 35.
30. Samoliński B., Bodzenta-Lukaszyk A., Szpak A. i wsp.: Epidemiologia astmy w Polsce według programu ECAP. *Terapia* 2009, 3, 13.
31. Samoliński B., Hałat Z., Samolińska-Zawisza U. i wsp.: Epidemiologia nieżytów nosa, astmy i AZS na podstawie badań ECRHS i ISAAC w Polsce. *Alergia* 2007, 3, 10.
32. Sanz M.L., Sanchez G., Gamboa P.M. et al.: Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clin. Exp. Allergy* 2001, 31, 1007.
33. Saporta M., Kamei S., Persi L. et al.: Basophil activation during pollen season in patients mono-sensitized to grass pollen. *Allergy* 2001, 56, 442.
34. Sturm G.J., Bohm E., Trummer M. et al.: The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy* 2004, 59, 1110.
35. Sudheer P.S., Hall J.E., Read G.F. et al.: Flow cytometric investigation of per-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia* 2005, 60, 251.
36. Valent P., Hauswirth A.W., Natter S. et al.: Assay for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. *Methods* 2004, 32, 265.