

Test aktivace bazofilů (BAT) a lékové alergie

Sedláčková L.

Oddělení klinické biochemie, hematologie a
imunologie

Nemocnice Na Homolce, Praha

Test aktivace bazofilů

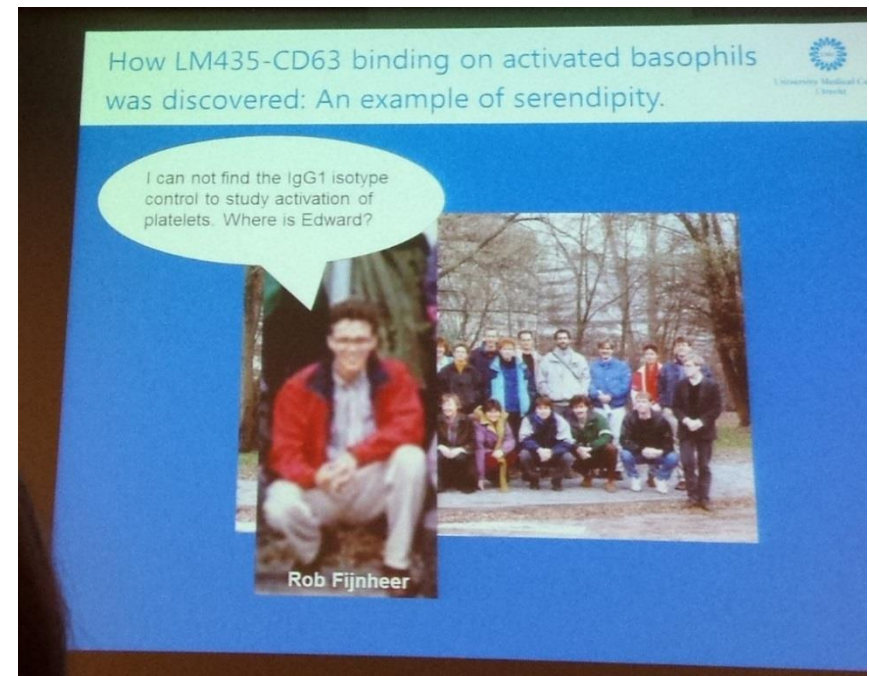
Basophil activation test (BAT)

- **1991 Knol EF**, JACI, 88: 328-38: Monitoring human **basophil activation** via **CD63** monoclonal antibody 435
- **1994 Sainte-Laudy J**, Allerg Immunol, 26: 211-4: Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. **Applications to allergologic diagnosis.**
- **1997 Sabbah A** Immunobiologic diagnosis of **food allergy**
- **1999 Stevens S** BAT in **Hymenoptera venom allergy**
- **1999 Monneret G** Biological diagnosis of immediate **drug allergy**. Comparative study of histamine liberation tests and CD63 expression by flow cytometry.

Dr. **Edward Knol**, Associated professor
Dept. Immunology and Dermatology / Allergology
UMC Utrecht

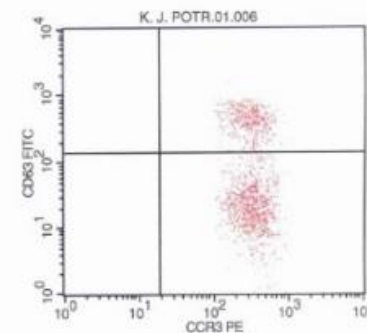
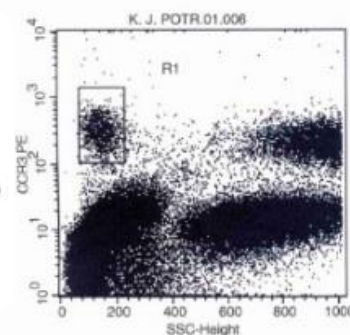
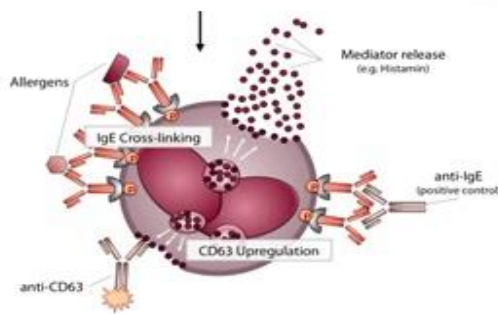


- Analytical Cytometry VIII - Olomouc 3.-6.10.2015: Application of flow cytometry in the diagnostics of allergy
- objevil aktivační znak CD63 na bazofilních granulocytech vlastně náhodou (při studiu trombocytů)



Komerční soupravy BAT

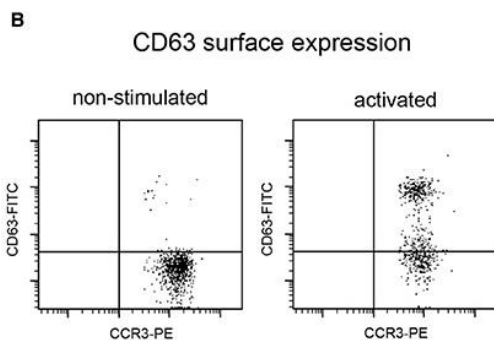
Název soupravy	Výrobce	Detekční znak	vzorek
FlowCAST	Bühlmann	CD63	Krev s EDTA
Basotest	Orpegen / Glycotope / BD Biosciences	CD63	Krev s heparinem
Allergenicity kit	Beckman Coulter	CD203c	Krev s EDTA
Baso Flow – Ex kit	Exbio	CD63 (+ detekce bazofilů CD203c)	Krev s heparinem



Detekční znaky aktivace bazofilů

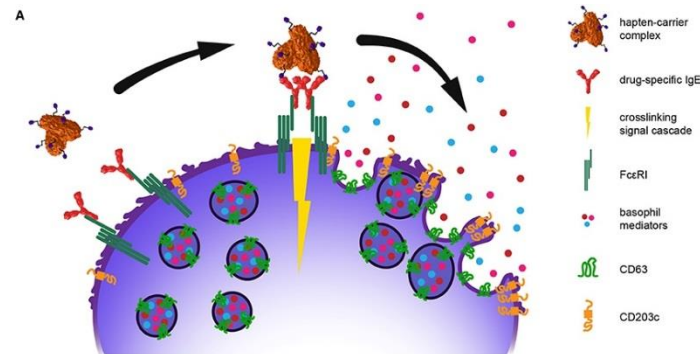
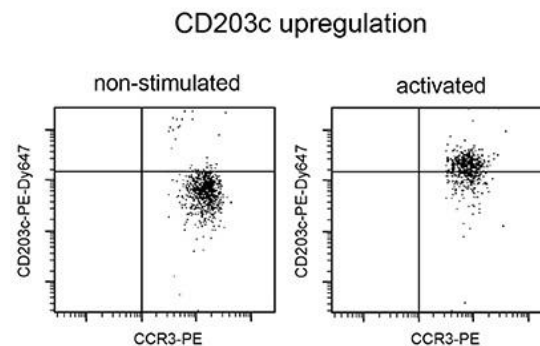
CD63

- Protein z rodiny tetraspaninů, lokalizovaný v membráně lysozomů obsahujících histamin
- Povrchová exprese odpovídá **degranulaci** bazofilního granulocytu
- Nejlépe klinicky validovaný



CD203c

- Rodina pyrofosfatáz / fosfodiesteráz
- Konstituční znak bazofilních granulocytů (**identifikační marker**)
- Exprese stoupá při stimulaci (**aktivační marker**)



POSITION PAPER

The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease

H. J. Hoffmann¹, A. F. Santos^{2,3,4}, C. Mayorga⁵, A. Nopp⁶, B. Eberlein⁷, M. Ferrer⁸, P. Rouzaire⁹, D. G. Ebo¹⁰, V. Sabato¹⁰, M. L. Sanz⁸, T. Pecaric-Petkovic¹¹, S. U. Patil¹², O. V. Hausmann^{13,14}, W. G. Shreffler¹², P. Korosec¹⁵ and E. F. Knol¹⁶

- Diagnosis of allergy (prior to provocation)
 - Drugs
 - Useful supplement for b-lactam antibiotics and quinolones
 - Unique for muscle relaxants, radio contrast media and pyrazolones
 - Food allergy – allows reduction in the number of OFC required
 - Unique for many occupational allergens
 - Useful supplement for insect venom allergen detection
 - Can replace ASST in diagnosing autoimmune urticaria
 - Useful in diagnosis of local allergic rhinitis
- Monitoring allergic disease
 - Reproducible *ex vivo* correlate of clinical allergy
 - Identification of clinically relevant allergen in insect venom allergy
 - Monitoring natural and induced resolution of food allergy
 - Predicting success of allergen immunotherapy
 - Monitoring anti-IgE treatment

Dichotomous decision: % pos, SI, AUC

Change in sensitivity: EC50 – CD-sens

Preanalytické a analytické poznámky

- Kortikosteroidy a cyklosporin A mohou ovlivnit
- Antihistaminika BAT neovlivňují (*PP - Hoffman et al 2015*)
- Vyšetřit během 1 roku od poslední expozice (léky!)
- Stabilizátory krve typu EDTA / citrát brání degranulaci, přidání kalcia tento efekt ruší
- IL-3 zvyšuje alergen-specifickou up-regulaci CD63, ale též nespecifickou up-regulaci CD203c
- Zdroj lékových alergenů – komerční; čisté substance; parenterální roztoky; 2-3 ředění (např. 1:10, 1:100, 1:1000); chinolony držet ve tmě
- BAT nemá EHK - mezilaboratorní porovnání je žádoucí, ale zatím chybí

Interpretace BAT s léky

- Léky – výrazně slabší stimul pro BAT než proteiny
- Koncentrace v řádu mg/ml (0,1 .. 1) $\rightarrow$ SI > 4
- Potravinové a inhalační alergenů v řádu μ g/ml .. ng/ml .. pg/ml $\rightarrow$ SI > 100
- Negativní výsledek alergie na lék nevylučuje !!!

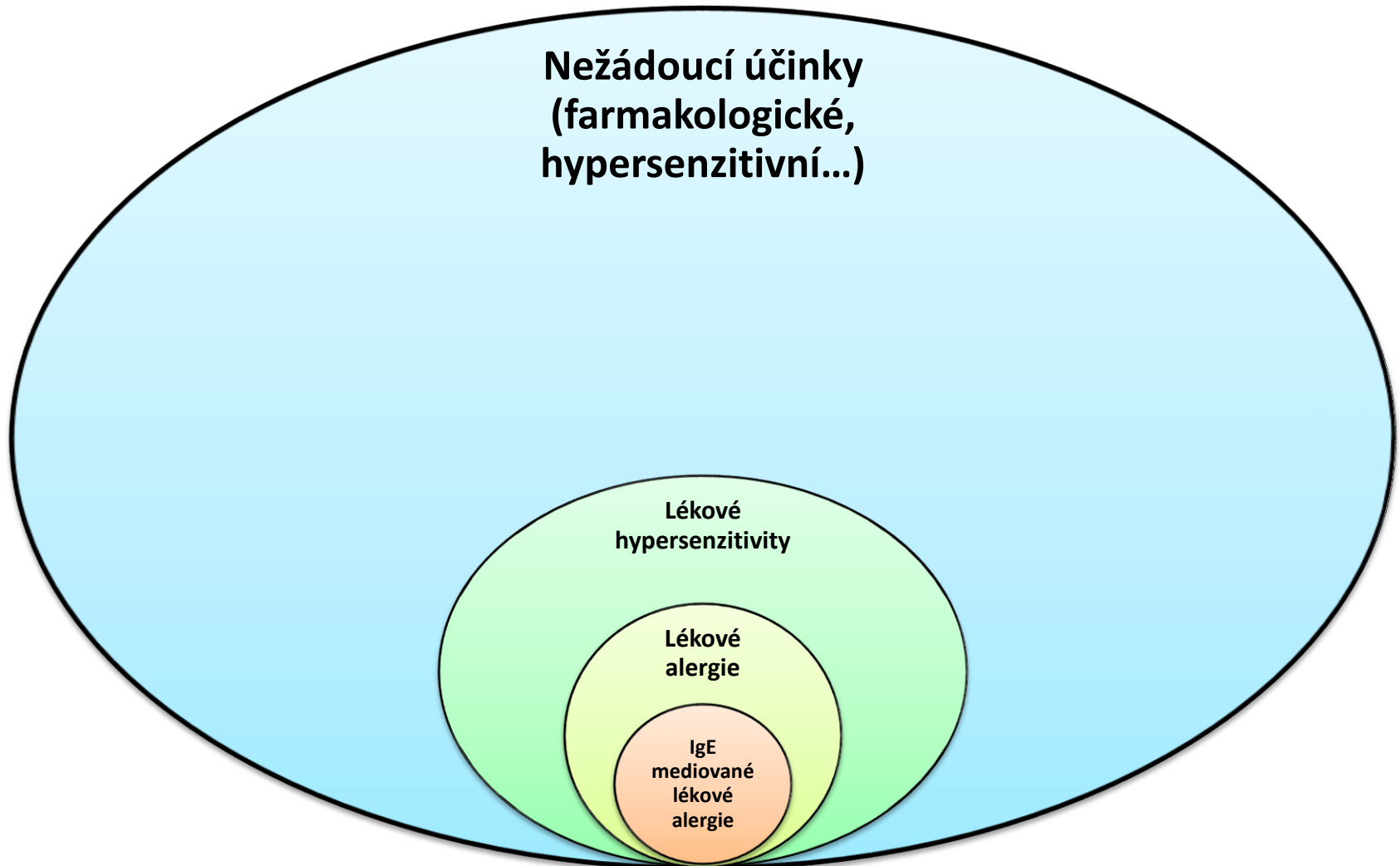
Specificita, senzitivita

(Hoffmann et al 2015)

Skupina	senzitivita	specificita
Beta-laktamová ATB	22 - 53 %	79 – 100 %
Chinolonová ATB	17,9 – 60 %	88 – 93 %
Periferní myorelaxancia	36 – 86 %	93 – 100 %
Pyrazolonová NSA	42 – 55 %	86 – 100 %

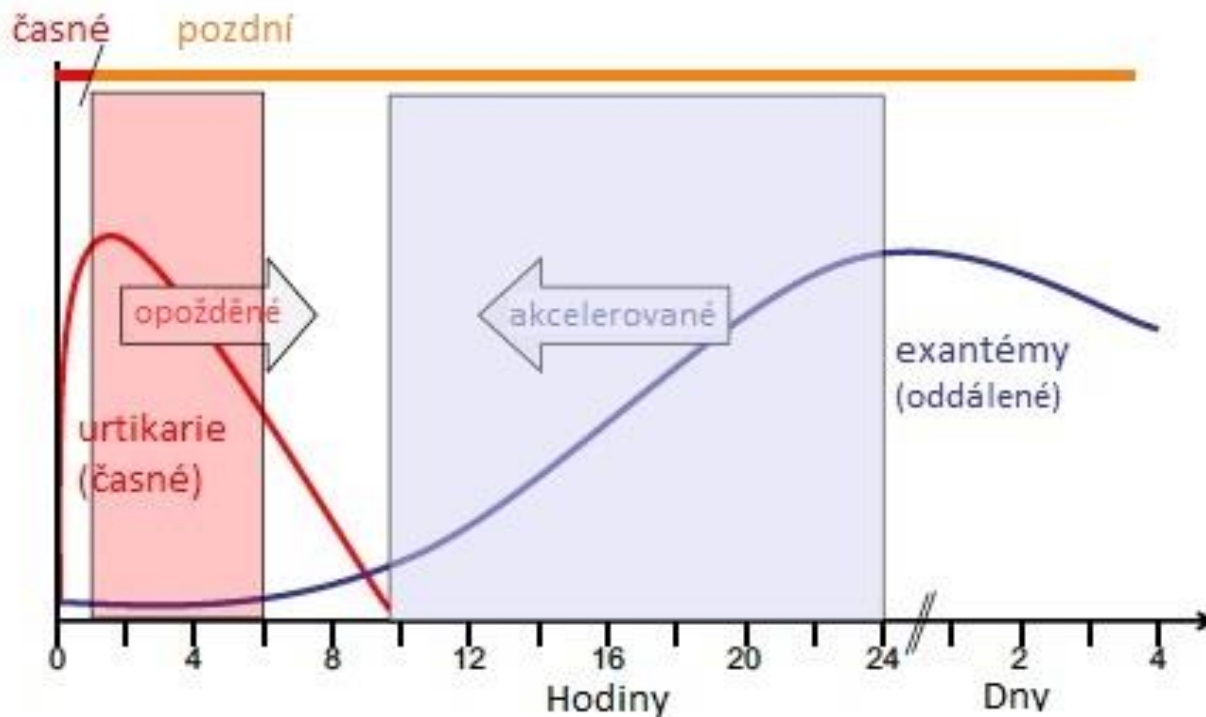


„Alergie“ na léky



Klinická klasifikace lékových hypersenzitivit

- podle intervalu od podání léku do začátku reakce
- **časné** = immediate (.. IgE, do 1-6 hod)
- **pozdní** = non-immediate (.. T-lymfo)



anafylaxe
angioedém
urtika
bronchospasmus



makulopapulozní
exantém

Laboratorní diagnostika lékové alergie

časná reakce

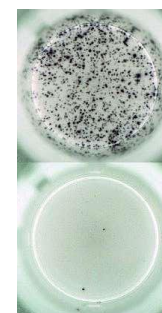
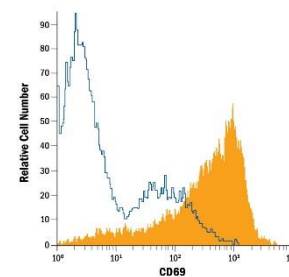
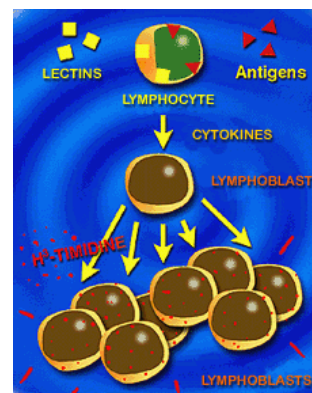
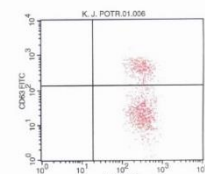
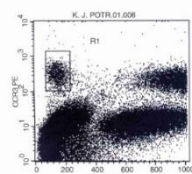
IgE

sIgE, BAT ..

pozdní reakce

T-lymfo

LTT / LBT ..



Vlastní zkušenosti

- BAT FlowCAST, Bühlmann: včelí a vosí jed (od 2002), léky (od 2005), potraviny (od 2008)
- Léky 2005 – 2019: cca 10-12 pozitivních nálezů
- Různé dg metody často vzájemně diskrepantní (specifické IgE – BAT – kožní testy)

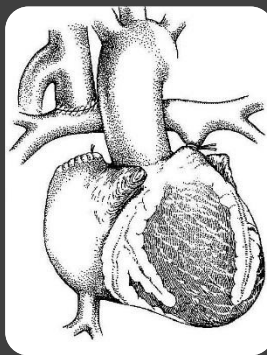
Kazuistika 1

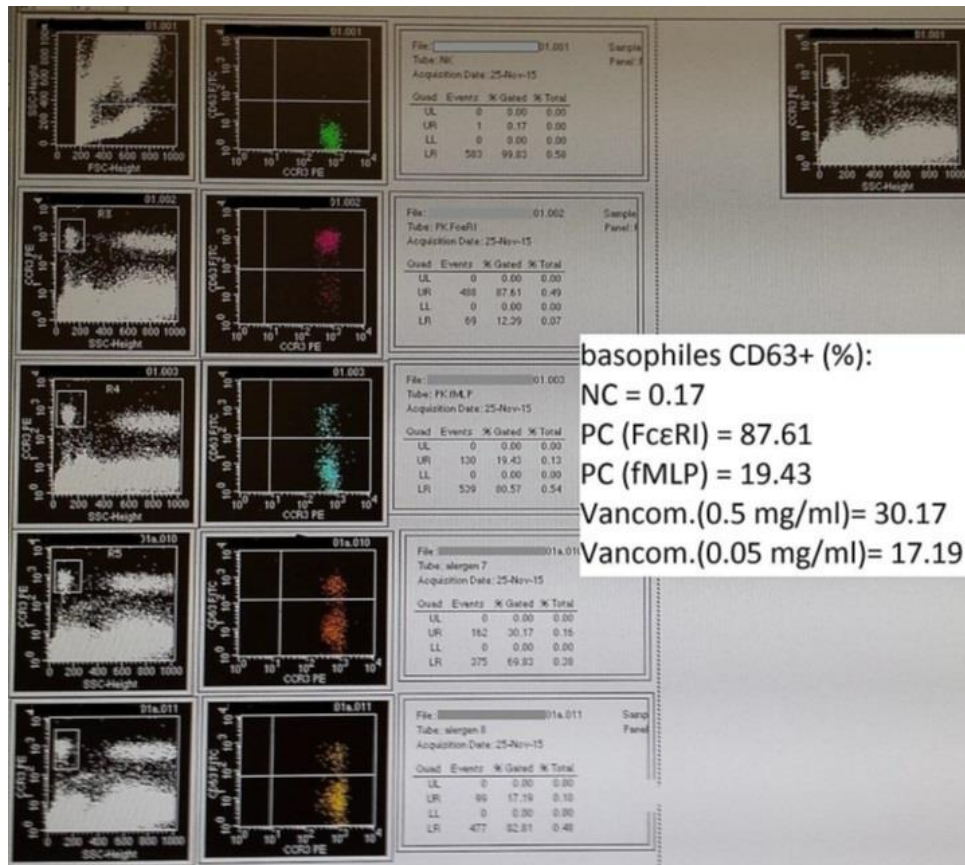
Nar. 1962

OA: Vrozená cyanotická
srdeční vada, 1990 + 1991
infekční endokarditis, 2006
Kawashimova operace srdce,
implantován ICD

AA: 1) PNC i.v. 1990: akutní
slabost a dušnost – vs
počínající anafylaxe

2) Vankomycin i.v. 11/2015 –
akutní svědivý exantém,
slabost





Vyšetřena 2 týdny po reakci:

- BAT vankomycin: pozitivní
- KT vankomycin:
- prick 50 mg/ml: negativní
- Intradermální test 0,005 mg/ml: pozitivní



Alergie na vankomycin
prokázána BAT i KT



Dg alergie na PNC

- Neúspěšná – dlouhý odstup od reakce (25 let)
- sIgE PNC V, PNC G, ampicilin, amoxicilin neg
- BAT PPL, MD, PNC G, ampicilin, amoxicilin neg
- KT PPL, MD, PNC G, ampicilin, amoksiklav, cefazolin, cefuroxim – negativní, ale od 2. den krupičkovitý exantém na trupu v trvání několika dní (možný projev senzibilizace)
- DPT cefuroxim p.o. negativní
- Ré: stp anafylaxi na PNC, toleruje cefalosporin 2. generace

Kazuistika 2

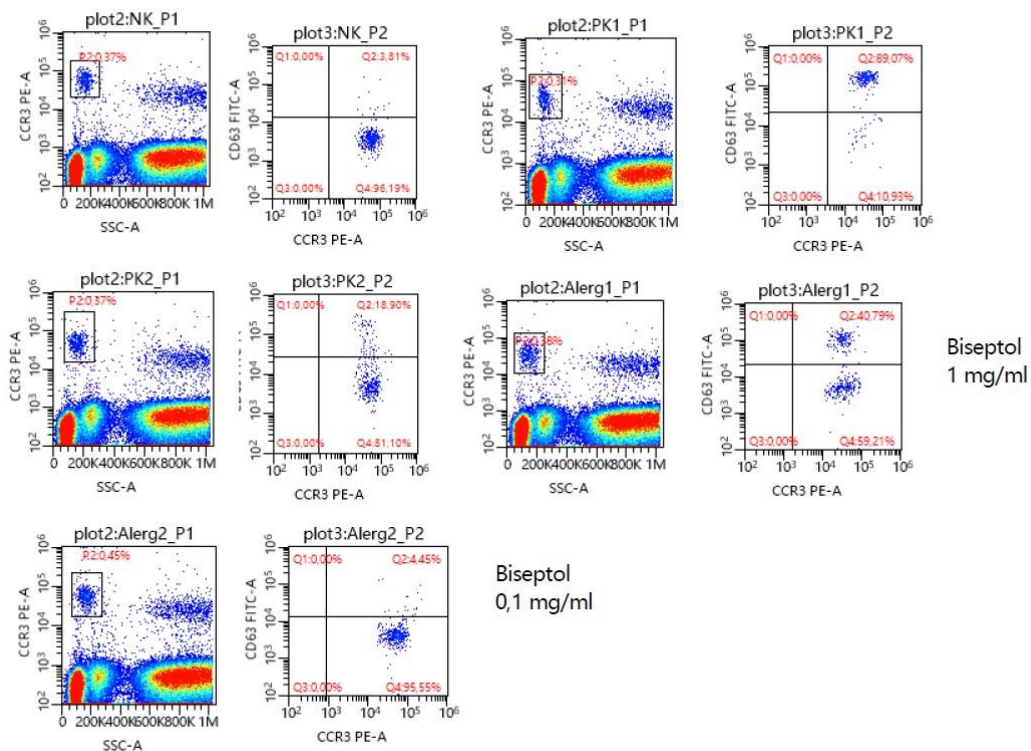
Nar. 1964

OA: diabetes mellitus II.typu
na inzulinu; cholecystolitis
(CHCE 2015); urolithiasis (koliky);
pyelonefritis 2/2017, uroinfekce
2/2018

AA: Biseptol p.o. 960 mg á 12 hod pro
uroinfekci od 6.2.2018

12.2.2018 - 15 min po dávce svědění, pálení a otok očí, zrudl,
vyrážka → RZS ad nem. pohotovost, th SoluMedrol, Dithiaden s
ústupem projevů, za několik hod doma recidiva, Prednison p.o. s
efektem; Ré: 2-fázová anafylaxe I. st – exantém + otoky





Biseptol
1 mg/ml

Biseptol
0,1 mg/ml

Vyšetřen 2,5 týdne po reakci:

- BAT biseptol: pozitivní
- (konc. 1 mg/ml CD63 = 41 %)
- KT biseptol:
- prick 1 mg/ml: negativní
- Intradermální test 0,1 mg/ml: pozitivní



Alergie na biseptol
prokázána BAT i KT

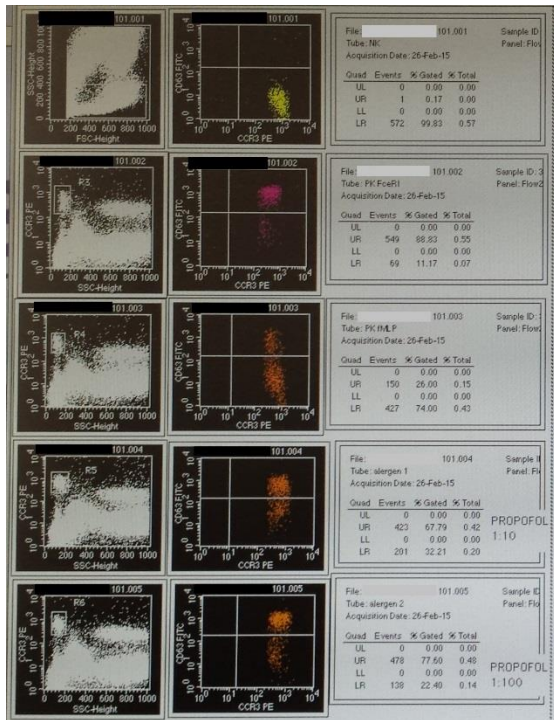
Kazuistika 3

- Nar. 1938
- OA: hypertenze, chronická hepatitis C, stp Ca prostaty, stp resekci žaludku pro VCHGD, porfyria cutanea tarda, cholecystolithiasis (koliky)
- AA: elektivní CHCE 20.1.2015 – anafylaxe se zástavou srdce při úvodu do CA, KPR úspěšná, ale posthypoxické poškození CNS
- Suspektní příčinné léky: atracurium, propofol, sufentanil, ephedrin; (premedikace morfin + atropin); skryté příčiny: latex; chlorhexidin



Lab dg

- tryptáza: 146 .. 11 ng/ml
- 26.2.2015
- slgE latex 0,8 kUA/l, morfin, pholcodin, succinylcholin neg
- BAT **propofol** 1:10 = 67 %
- **propofol** 1:100 = 77 %
- atracurium, sufentanil, morfin, ephedrin, atropin negativní
- vejce 37 %, soja, arašíd neg



Kazuistika 3 - interpretace

- Příčinou reakce pravděpodobně propofol. Vedlejší nálezn senzibilizace na latex a vejce nutno posoudit v kontextu klinických projevů (informace v době vyšetření pro nás nedostupné).
- Klinický stav neumožňoval doplnit kožní testy, vyšetření je tedy nekompletní

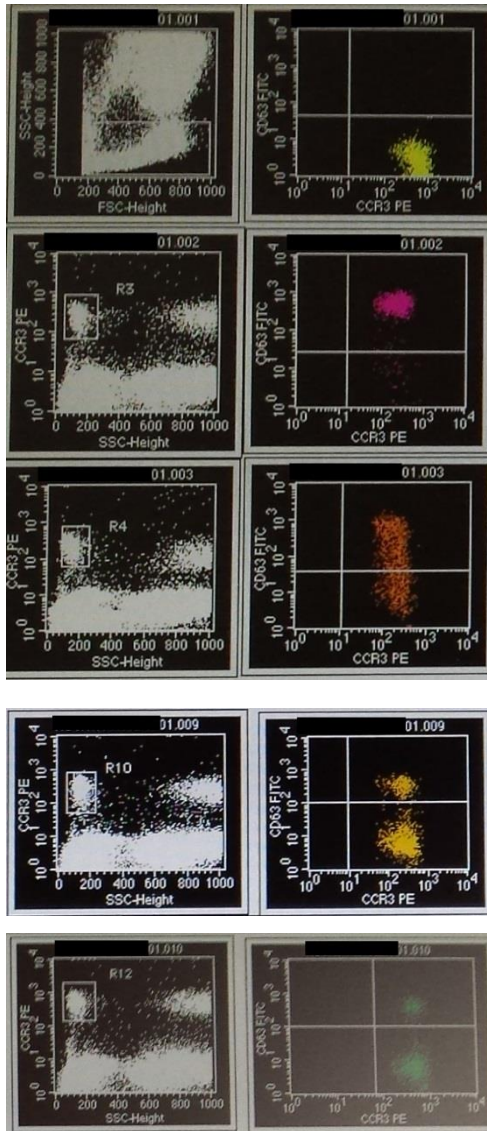


Kazuistika 4



- Nar. 1964
- OA: ICHDK (opakované cévní intervence – endarterektomie 2011 a 2014, stent 2014, angioplastika 2016), hypertenze, hepatopatie ethylické etiologie, nikotinismus
- AA: 29.3.2017 anafylaktický šok při infuzi cefuroximu před plánovaným cévním výkonem: po vykapání cca 20 ml (ze 110 ml) slzení, kašel, ztráta vědomí, bradykardie, hypotenze, hyposaturace, th infuze ex, KPR + adrenalin, SoluMedrol, úspěšná, přechodně UPV na ARO.
- Nespolupracující pacient, k odběrům ani ambulantnímu vyšetření nedorazil
- Nová hospitalizace v 6/2017, doplněny odběry

Kazuistika 4



- BAT:
- **cefuroxim** 20 mg/ml = 24 %
- **cefuroxim** 2 mg/ml = 21 %
- **ceftriaxon** 20 mg/ml = 5 %
- **ceftriaxon** 2 mg/ml = 4 %
- PPL, MD, PNC G, ampicilin, amoxicilin, piperacilin, cefazolin, ceftazidim, meropenem neg
- slgE:
- **penicilin V** 0,89 kUA/l
- penicilin G 0,32 kUA/l
- **ampicilin** 0,66 kUA/l
- **amoxicilin** 0,77 kUA/l

Ré: alergie na cefuroxim (stp anafylaktickém šoku, potvrzeno BAT), široká zkřížená reaktivita (PNC řada – dle slgE, cefalosporiny 3. generace – ceftriaxon – dle BAT)

Kazuistika 5

Nar. 1976

OA: dosud zdrav

AA: 22.10.2016 po 1. tbl
Xorimaxu (cefuroxim) na
respirační infekci během 5 min
anafylaxe: dušnost, slabost,
zvracení, otok obličeje a jazyka,
krátce i bezvědomí, s RZS ad
nem, TK90/50, exantém, průjem



Kožní testy

- 24.11.2016 **cefuroxim** prick
2 mg/ml: silně pozitivní
- IDT nedoplňován
- 29.11.2016 **ceftriaxon** prick
pozitivní; PPL, MD, PNC G,
ampicilin, amoksiklav,
cefazolin prick + IDT neg
- 5.1.2017 **cefotaxim** prick
pozitivní; oxacilin,
ceftazidime, cefepime prick
+ IDT neg



Specifické IgE (ImmunoCAP)

- Amoxicilin 0,14 kUA/l
- PNC V neg
- PNC G neg
- ampicilin: neg



BAT

Nehodnotitelný
pro vysokou spontánní
aktivaci bazofilů

NK (opakované odběry 11/2016 .. 2/2019):
85 .. 83 .. 60 .. 68 .. 1 .. 48 %



Provokační test s penicilinem



Pod dohledem, i.v. přístup

p.o. postupně á 30 min

1 mg .. 5 mg .. 25 mg .. 100 mg .. 500 mg .. 1 g

Pozitivní při kumulativní dávce 131 mg: nával, pachuť v ústech, tachykardie, horší dech, závrať, zimnice; ustoupilo po léčbě

	5.1.2017	25.5.2017	28.6.2018	20.2.2019		Immunia 21.2.2019
NK	83 / 60	68	1	48		3
PK1 (IgE)	85 / 70	81	74	91		
PK2 (fMLP)	96 / 92	94	80	85		91
Cefuroxim 20 mg/ml	2	2	25	43		44
Cefuroxim 2 mg/ml	1	1	33	47		44
PPL	85	1		68		69
MD	78	2		57		66
PNC G	92	2		49		3
Ampicilin	93	1		60		6
Amoxicilin	85	2		41		4
Oxacilin 20 mg/ml	0					
Oxacilin 2 mg/ml	23					
Cefazolin 20 mg/ml	28	3		36		1
Cefazolin 2 mg/ml	81	2		51		61
Ceftriaxon 20 mg/ml	0			0		3
Ceftriaxon 2 mg/ml	0			0		4
Cefotaxim 20 mg/ml	92			44		35
Cefotaxim 2 mg/ml	92			42		42
Ceftazidim 20 mg/ml	0			33		44
Ceftazidim 2 mg/ml	1			44		55
Cefepim 20 mg/ml	0					
Cefepim 2 mg/ml	0					

Kazuistika 5 – interpretace a doporučení

Diagnóza

Alergie
časného
typu
(IgE)

Eliminace

Cefuroxim

Cefalosp. I.gen, II.gen,
III.gen, IV.gen

Peniciliny, aminopeniciliny

Karbapenemy, monobactamy ?

Drug hypersensitivity meeting Amsterdam 19-21 April 2018

- **Edward Knoll** (Utrecht)
- BAT in drug allergy – Pro / Con
- Skvělý test na potravinové alergie, u léků – výzkum ano, rutina zatím ne



Závěr - já

- Take home message:
- BAT s léky – sporadicky velice užitečné doplňující vyšetření
- Cílená indikace (nedávná anafylaxe), parenterální formy, více ředění
- Negativní nálezy nespolehlivé
- Unmet needs:
- Reproducibilita?
- Mezilaboratorní srovnání a standardizace