

Katarzyna PIOTROWICZ-WÓJCIK
Wojciech DYGA
Krystyna OBTUŁOWICZ

Zakład Alergologii Klinicznej
i Środowiskowej UJCM w Krakowie
Kierownik Zakładu:
Prof. dr hab. med.
Krystyna Obtułowicz

Słowa kluczowe:

- test aktywacji bazofilów
- cytometria przepływową
- bazotest

Key words:

- basophil activation test
- flow cytometry
- bazotest

Test aktywacji bazofilów (CD63+): Porównanie metod BAZOTEST Orpegen oraz Flow2CAST Bühlmann Laboratories

Bazofile stanowią komórki efektorowe IgE-zależnej reakcji alergicznej. Po zadziałaniu odpowiedniego alergenu ulegają degranulacji z gwałtownym uwolnieniem mediatorów takich jak histamina czy serotonina a na ich powierzchni pojawiają się markery aktywacji -CD63 oraz CD 203c. Jedną z coraz bardziej popularnych i wiarygodnych metod diagnozowania natychmiastowych reakcji alergicznych m.in. na leki (przeciwbólowe, antybiotyki), alergeny wziewne, pokarmy, konserwanty i barwniki, jady owadów błonkoskrzydłych, radiologiczne środki kontrastowe oraz inne rzadsze alergeny jest ilościowa ocena aktywacji bazofilów przy zastosowaniu cytometrii przepływową. Jest to metoda bezpieczna, pozwalająca niejednokrotnie uchronić pacjenta przed testami ekspozycyjnymi niosącymi ze sobą ryzyko wywołania groźnych reakcji odtwarzających objawy alergii. Na rynku dostępnych jest kilka różnych zestawów do wykonywania tego typu oznaczeń, z których najpopularniejszy to BAZOTEST firmy ORPEGEN Pharma oraz stosunkowo nowy test Bühlmann Laboratories- Flow2CAST. Różnice w metodyce, sposobie przeprowadzenia testu, długości poszczególnych etapów oraz rodzaju zastosowanych markerów stały się podstawą do przeprowadzenia analizy porównawczej tych dwóch metod.

Basophil (CD 63+) activation test comparison of two methods: BAZOTEST Orpegen versus Flow2CAST Bühlmann Laboratories

Basophils are effector cells of IgE-dependent allergic reaction. After appropriate allergen stimulation they degranulate with sudden release of mediators such as histamine or serotonin. Some special activation markers appear on their surface-CD63 and CD203c. Recently one of the most popular and reliable method for assessment of immediate-type response to different allergens such as medicines (analgetics, antibiotics), airborne allergens, food allergens, preservatives, dyes, venoms, radiological contrasts and other is quantification of basophil activation by flow cytometry. It could be save diagnostic alternative for patients predisposed to dangerous adverse reactions after skin or provocation testing. There is a few different sets for basophil activation test performing. One of the most popular is BAZOTEST from ORPEGEN Pharma and Flow2CAST - new test from Bühlmann Laboratories. Some technical variations, such as different markers, times and other performing conditions were inspiration for comparative analysis of those two methods.

Wstęp

W diagnostyce alergologicznej reakcji natychmiastowych na leki wciąż niesłabnącą popularnością cieszą się skórne testy punktowe oraz testy prowokacyjne, które jednak niosą ze sobą duże ryzyko wywołania groźnych powikłań, m. in. reakcji anafilaktycznych, u predysponowanych pacjentów. Coraz częściej podejmowane są próby zastępowania ich doskonalszymi metodami pozwalającymi prowadzić testy *ex vivo* bez narażania pacjenta na zbędne ryzyko. Analiza aktywacji bazofilów przy użyciu cytometrii przepływową jest jednym z takich testów, który dzięki wysokiej czułości i swoistości stanowi alternatywę dla tradycyjnych

metod diagnostycznych, szczególnie w przypadkach bardziej skomplikowanych alergii i nietypowych alergenów. Test ten jest najczęściej stosowany w diagnostyce nadwrażliwości na leki, m.in. antybiotyki beta-laktamowe, niesteroidowe leki przeciwzapalne [1], blokery płytki nerwowo-mięśniowej [2]. Wykorzystuje się go także w diagnostyce alergii na jad owadów błonkoskrzydłych [3], alergii na pyłki drzew, traw, roztocza oraz alergii pokarmowych. Metoda testu została po raz pierwszy opisana przez *Sainte-Laudy* et al. 1994 i 1996 [4, 5] gdzie bazofile aktywowane przez alergen lub kontrolę pozytywną były wykrywane przy pomocy cytometrii przepływową przez wzrost na ich powierzchni ekspresji molekuł CD63.

Obecnie także w metodach diagnostycznych z użyciem aktywowanych bazofilów wykorzystuje się zjawisko w którym u predysponowanej osoby po kontakcie z alergenem dochodzi do aktywacji bazofilów oraz ekspresji na ich powierzchni antygenów CD63, ale także innych m.in. CD203c. Metodą cytometrii przepływową można oznaczać te markery po wcześniejszej stymulacji alergenem *in vitro* komórek krwi obwodowej. Oznaczanie antygenów powierzchniowych odbywa się przy udziale przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko nim. Przeciwciała te są

Adres do korespondencji:

Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński
31-531 Kraków, ul. Śniadeckich 10
Tel./Fax: 12 423 11 22

Tabela I
Porównanie metodyki BAZOTEST (Orpegen) oraz Flow2CAST (Bühlmann Laboratories).
Comparison of the BAZOTEST (Orpegen) and Flow2CAST (Bühlmann Laboratories) methodology.

Metodyka	BAZOTEST	Flow2CAST
Degranulacja	-100 µl krwi pełnej heparynizowanej; -20 µl buforu stymulacji - mieszać, inkubować 10 min w 37°C; -100 ul alergenu lub roztworu myjącego(kontrola negatywna) lub fMLP (kontrola pozytywna) - inkubacja 20 min w temp 37°C	-50 µl krwi pełnej z EDTA; -100 µl buforu stymulacji; -50 µl alergenu lub roztworu myjącego(kontrola negatywna) lub anti-FcεRI Ab (1 kontrola pozytywna) lub fMLP (2 kontrola pozytywna)
Barwienie	-Stop degranulacji- inkubacja na lodzie - 5min -20 µl staining reagent (anty-CD63-PE z anty-IgE-FITC) - 20min 0°C	-20 µl staining reagent (anty-CD63-FITC z anty-CCR3-PE)-15 min 37°C
Liza	-2 ml (18-28°C) lysing reagent- inkubacja 10 min w 18-28°C, wirować 5 min 250 x g w 2-8°C, dekantacja	-2 ml(18-28°C) lysing reagent- inkubacja 5-10 min w 18-28°C, wirować 5 min 500 x g, Dekantacja
Przemycanie	-3 ml roztworu myjącego, wirować 5 min 500 x g, dekantacja	-300 ul roztworu myjącego, delikatnie zamieszać
	Próbka gotowa do oznaczeń (przechowywać w temp. 0°C)	Próbka gotowa do oznaczeń (przechowywać w temp 2-8°C)
Czas wykonania procedury	około 2-3 h	około 1 h
Czas na wykonanie cytometrii	2 h	nawet > 8h

znakowane przy pomocy fluorochromów – czyli barwnych związków z których najpopularniejsze to: izotiocyjanian fluoresceiny (FITC) oraz fikoerytryna (PE). Przeciwciała związane z antygenami i odpowiednio oznakowane fluorochromami są analizowane i zliczane przy pomocy cytometru przepływowego. Na rynku dostępnych jest kilka różnych zestawów do wykonywania oznaczeń na aktywowanych bazofilach, z których najpopularniejsze to BAZOTEST firmy ORPEGEN Pharma oraz stosunkowo nowy test Bühlmann Laboratories- Flow2CAST. Różnice w sposobie przeprowadzenia testu oraz różnice w rodzaju zastosowanych markerów (tabela I) zostały zawarte w opracowaniu.

Metodyka

Do przeprowadzenia testu potrzebne jest około 100 µl krwi pełnej. W zależności od metody jest ona pobierana do próbek z EDTA lub cytrynianem (Flow2CAST) oraz w drugiej metodzie do próbek z heparyną (BAZOTEST). Krew jest inkubowana początkowo z buforem stymulacji potem dodawane są: alergen w różnych stężeniach, do kolejnej próbki roztwór myjący (kontrola negatywna), do następnej próbki pierwsza kontrola pozytywna – anty FcεRI oraz do kolejnej próbki-druga kontrola pozytywna – fMLP.

Kontrola negatywna

zwana jest również stymulacją podstawową. Pożądaną jest uzyskanie jak najniższego wyniku kontroli negatywnej szczególnie w odniesieniu do alergenów wywołujących mało specyficzną aktywację. Stymulacja podstawowa może zostać zwiększona - co jest niekorzystne – w różnych przypadkach, np.: po naturalnej ekspozycji na alergen, przy stałej ekspozycji na czynnik wywołujący aktywację lub w czasie immunoterapii. Jako kontroli negatywnej używa się roztworu myjącego (Wash Buffer).

Kontrola pozytywna

Bühlmann Laboratories we Flow2CAST proponuje użycie przeciwciała anti-FcεRI (1µg/ml) jako kontroli pozytywnej w stosunku do IgE-zależnych bodźców. W porównaniu do przeciwciała anti-IgE, także wykorzystywanych jako kontrola pozytywna, monoklonalne przeciwciała anti-FcεRI charakteryzuje większa czułość potwierdzona badaniami [2]. W przypadku braku odpowiedzi na anti-IgE lub anti-FcεRI wykorzystuje się IgE-niezależne bodźce, jak fMLP (N-formyl-metionyl-leucylo fenyloalanina). FMLP jest chemotaktycznym peptydem który jest stosowany jako druga kontrola pozytywna zarówno w BAZOTEST jak i we Flow2CAST. Sytuacja kiedy nie uzyskujemy odpowiedzi na anti-IgE lub anti-FcεRI zdarza się w około 5-20% przypadków i wskazuje na defekt we wczesnej sygnalizacji, a pacjenci okreśani są jako

'IgE non responders'.

Aktywacja bazofilów pod wpływem alergenu lub kontroli pozytywnej indukuje zjawisko fuzji ziarnistości cytoplazmatycznych z błoną komórkową oraz uwolnienie z nich mediatorów. Na powierzchni bazofilów ekspresji ulegają białka powierzchniowe m.in. CD 63. Ten etap testu nosi nazwę etapu degranulacji.

W kolejnym etapie – oznaczaniu (barwieniu) – do próbek dodawane jest 20 µl odczynnika barwiącego w którego skład wchodzi w zależności od zestawu mieszanina przeciwciał monoklonalnych wraz z fluorochromami: anti-CD63 oznakowane przy pomocy FITC i anti-CCR3 znakowane PE w zestawie Flow2CAST oraz anti-CD63 znakowane PE z anti-IgE oznakowane FITC w zestawie BAZOTEST.

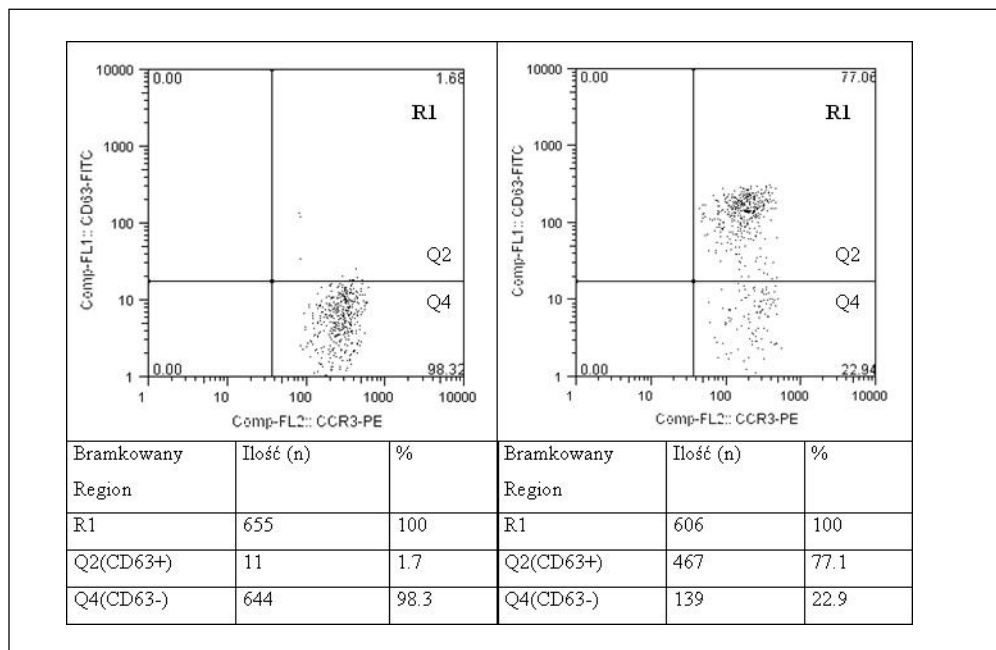
Antygen CD63

(Gp53, LAMP-3 lysosyme-associated membrane protein)

jest białkiem transbłonowym(glikoproteina) z czterema domenami, o masie cząsteczkowej 53kDa. Antygen ten jest obecny nie tylko w błonie bazofilów, ale także monocytów, makrofagów oraz płytek krwi, dlatego w celu skutecznej identyfikacji bazofilów muszą one zostać oznaczone przez inny selektywny marker – najczęściej specyficzne fluorescencyjne przeciwciała anti IgE. Antygen CD63 pojawia się na powierzchni badanych komórek wyłącznie po aktywacji i w związku z tym jest on ściślej związany z degranulacją, co czyni go doskonałym narzędziem do oceny reakcji bazofilów na alergen. W nieaktywnych bazofilach jest on zakotwiczony w błonie ziarnistości, dlatego aby był wykryty na zewnątrz musi dojść do fuzji błon ziarnistości z błoną komórkową. Do analizy wykorzystywane są następnie przeciwciała monoklonalne anti-CD63 znakowane PE (BAZOTEST) lub FITC (Flow2CAST) jako marker aktywacji bazofilów. Testy z ich użyciem charakteryzuje bardzo wysoka czułość i swoistość [6,7].

CCR3-(C-C receptor chemokin typ 3)

jest białkiem, receptorem dla eotaksyny stale obecnym na bazofilach (ulega bardzo silnej ekspresji na bazofilach i eozynofiliach), jest także wykrywany na komórkach CD3+, TH1 i TH2 jak również w komórkach epitelialnych dróg oddechowych, stąd przypuszczenie, że receptor ten może odgrywać rolę w gromadzeniu i aktywacji eozynofiliów oraz innych komórek zapalnych w drogach oddechowych u alergików. Jego gen wraz z siedmioma innymi genami dla receptorów chemokin wchodzi w skład skupiska genów dla receptorów chemokin na chromosomalnym regionie 3p21. Receptor CCR3 jest wykrywany przy pomocy przeciwciała monoklonalnego znakowanego fikoerytryną (PE). Zastosowanie tego wysoce specyficznego przeciwciała jako nowego markera w znakowaniu bazofilów pozwala wyeliminować kontaminację monocytami [8,9].



Rycina 1
Wynik analizy cytometrycznej przy zastosowaniu protokołu Flow2CAST- pacjent uczulony: pierwszy wykres - kontrola negatywna, drugi wykres - po zadziałaniu alergenu.
Result of cytometric analysis with use of Flow2CAST protocol - an allergic patient: first diagram - negative control, second diagram - after allergen stimulation.

anty-IgE

monoklonalne przeciwciało skoniugowane z fluorescencyjnym barwnikiem fikoerytryną reaguje z ludzka IgE bazofilów i tkankowych mastocytów.

Po oznaczeniu odpowiednimi przeciwciałami z dołączonymi fluorochromami przeprowadza się kolejny etap badania – etap lizy – w którym poprzez dodanie do próbek 2 ml roztworu lizującego usuwane są erytrocyty. Roztwór lizujący przed użyciem musi zostać podgrzany do temperatury 18-28°C. Następnie próbki są wirowane. Po zakończeniu wirowania przeprowadzana jest dekantacja. Ostatnim etapem przygotowania próbek do cytometrii jest etap przemywania przy pomocy roztworu myjącego dodawanego w różnych ilościach w zależności od metody.

Oznaczenie ilości aktywowanych bazofilów na cytometrze przepływowym powinno zostać przeprowadzone w ciągu kilku godzin – najlepiej w ciągu pierwszych 4 godzin od pobrania próbki krwi, gdyż wtedy nieuniknione straty bazofilów są najmniejsze.

Metodyka

Przedstawiono w tabeli I.

Normy i wyniki testu

BAI, SI (*Basophil Activation Index, Stimulation Index*)

– określa procent bazofilów aktywowanych odpowiednim alergenem w stosunku do ilości bazofilów aktywowanych w kontroli negatywnej. Aktywowane bazofile wykazują na swej powierzchni wzrost ilości molekuł CD63 (CD63+).

Test uznajemy jako dodatni, a pacjenta jako uczulonego na dany alergen, gdy BAI spełnia odpowiednie normy:

- antybiotyki betalaktamowe: SI ≥ 2 , aktywacja $\geq 5\%$
- NLPZ: SI ≥ 2 , aktywacja $\geq 5\%$
- inhalanty: aktywacja $\geq 15\%$
- alergeny pokarmowe: aktywacja $\geq 15\%$
- jad owadów błonkoskrzydłych: aktywacja $\geq 10\%$

Liczba aktywowanych bazofilów w kontroli negatywnej nie przekracza zwykle 5%. Czasem może się zdarzyć, że wartość ta jest wyższa np. u pacjentów z alergią pyłkową badanych w porze kwitnienia, ale wtedy i tak aby test uznać za dodatni BAI musi wynosić co najmniej 2. Aby kontrola pozytywna mogła zostać uznana za prawidłową, procent aktywowanych bazofilów w stosunku do wszystkich bazofilów musi przekroczyć 10%, przynajmniej w jednej z dwóch kontroli pozytywnych. Na rycinie 1 przedstawiono przykładowy wynik z cytometru przepływowego dla pacjenta uczulonego na testowany alergen. W tym przypadku BAI wyniósł 45.

Podsumowanie

Metoda testu aktywacji bazofilów wg Bühlmann Laboratories wydaje się być mniej skomplikowana technicznie i niewątpliwie szybsza do przeprowadzenia. Zastosowanie w tej metodzie wysoce specyficznego przeciwciała anty-CCR3 jako markera w znakowaniu bazofilów pozwala wyeliminować kontaminację monocytami, co nie jest do końca możliwe przy zastosowaniu anty-IgE. Dodatkowo w zestawie Flow2CAST wykorzystywana jest druga kontrola pozytywna w odniesieniu do bodźców IgE-zależnych, która również wpływa na wyższą jakość testu.

Mimo kilku różnic technicznych w metodyce, obydwie metody reprezentują podobną wartość diagnostyczną i z powodzeniem mogą być stosowane zamiennie w zależności od preferencji badacza.

Piśmiennictwo

1. Obtulowicz A, Zdziłowska E, Antoszczyk G, Obtulowicz K, Skotnicki A. Test aktywacji bazofilów w diagnostyce alergii na leki. *Przegl Dermatol* 2004; 1/91: 23-28.
2. Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E, Levy DA, Pecquet C, Chabane H, Leynardier F. Validation of flow cytometry assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 411-418.
3. Eberlein-Konig B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *J. Invest. Allergol Clin Immunol* 2006; 16: 5-10.
4. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guérin JC. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg Immunol (Paris)* 1994; 26: 211-214.
5. Sabbah A, Sainte-Laudy J. Flow Cytometry applied to the analysis of Lymphocyte and Basophil activation. *ACI International* 1996; 8: 116-119.
6. Crockard AD, Ennis M. Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow? *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 975-977.
7. Eberlein-Konig B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *J. Invest. Allergol Clin Immunol* 2006; 16: 5-10.
8. Ugucioni, M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhis S, LaRosa GJ, Rao P, Ponath PD, Baggiolini M, Dahinden CA. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 1997; 100: 1137-1143.
9. Ducrest S, Meier F, Tschopp C, Pavlovic B, Dahinden CA. Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers. *Allergy* 2005; 60: 1446-1450.
10. Obtulowicz K, Dyga W, Obtulowicz A, Czarnobilska E, Zdziłowska E, Piotrowicz-Wójcik K. Bazotest. Cytometryczny test aktywacji bazofilów (CD63+) w diagnostyce alergii na leki. *Alergologia Immunologia* 2009; 6: 131-135.