

# Zastosowanie testu aktywacji bazofili w diagnostyce i monitorowaniu alergii na pokarm u dzieci

## The use of basophil activation test in the diagnosis and monitoring of food allergies in children

JULIA GAWRYJOŁEK, ANETA KROGULSKA

Katedra Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii, Collegium Medicum Bydgoszcz, Uniwersytet Mikołaja Kopernika Toruń, Polska

### Streszczenie

Test aktywacji bazofili (ang. Basophil Activation Test, BAT) jest badaniem czynnościowym, określanym niekiedy mianem „doustnej próby prowokacji w próbówce”. Choć diagnostyka komponentowa przyczyniła się do istotnego wzrostu czułości i swoistości badań diagnostycznych, to żadna z aktualnie stosowanych metod nie pozwala na zróżnicowanie pomiędzy pacjentami uczulonymi, ale tolerującymi alergen a pacjentami uczulonymi z objawami alergii. W związku z tym badanie to ma zastosowanie kliniczne w diagnostyce i monitorowaniu chorób alergicznych m.in. alergii pokarmowej. Test ten może służyć również jako dodatkowe narzędzie do przewidywania ciężkości reakcji klinicznej oraz oceny prognozy reaktywności w alergii na pokarmy. BAT cechuje się bardzo dużą czułością i swoistością. Wprowadzenie BAT do codziennego użytku klinicznego wymagałoby standaryzacji procedur laboratoryjnych i sposobu analizy danych oraz klinicznej walidacji testu. Badania z zastosowaniem BAT wymagają kontynuacji, przede wszystkim celem ustalenia jego miejsca w algorytmach diagnostycznych chorób alergicznych.

**Słowa kluczowe:** *alergia pokarmowa, test aktywacji bazofili, dzieci, mastocyt, orzeszki ziemne*

### Summary

Basophil Activation Test (BAT) is a functional test, sometimes referred as “oral test tube challenge”. Although component-resolved diagnosis contributed to a significant increase in the sensitivity and specificity of diagnostic tests, none of the currently used methods allows for differentiation between allergic but allergen tolerant patients and patients with symptoms of allergy. Therefore, BAT has clinical application in the diagnosis and monitoring of allergic diseases, including food allergy. This test can also serve as an additional tool for predicting the severity of a clinical reaction and assessing the threshold of reactivity in food allergies. BAT is characterized by very high sensitivity and specificity. The introduction of BAT for everyday clinical use would require the standardization of laboratory procedures and methods of data analysis and clinical validation of the test. Research using BAT requires continuation, primarily to determine its place in diagnostic algorithms.

**Keywords:** *food allergy, basophil activation test, children, mast cell, peanuts*

© Alergia Astma Immunologia 2020, 25 (1): 28-34

www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

Julia Gawryjołek,

Katedra Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii,  
Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK Toruń,  
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9,  
85-094 Bydgoszcz,  
e-mail: gawryjolek.j@gmail.com,  
tel. 52 585 4850, fax 52 585 4086

### Wstęp

Bazofile, podobnie jak komórki tuczne, należą do głównych komórek uczestniczących w IgE-zależnej reakcji alergicznej. Pomimo tego, że w warunkach fizjologicznych bazofile stanowią poniżej 1% leukocytów oznaczanych we krwi, to komórki te pełnią ważną rolę w patomechanizmie alergii. Komórki tuczne, znajdujące się głównie w tkankach, nie są dostępne dla testów diagnostycznych in vitro. W związku z tym bazofile stanowią wyjątkową alternatywę dla badań zależnych od sIgE/FcεRI-zależnej degranulacji. Droga pobudzenia mastocytów i bazofili jest inna [1]. Degranulacja mastocytów następuje po aktywacji specyficznego dla nich receptora MRGPRX2. W odróżnieniu od komórek tucznych, bazofile wykazują słabą ekspresję tego receptora [2]. W literaturze opisano przypadki anafilaksji o ciężkim przebiegu bez podwyższonego stężenia tryptazy (mediatora zapalnego uwalnianego przez mastocyty, ale

nie przez bazofile), co sugeruje, że przynajmniej w niektórych przypadkach reakcje alergiczne mogą być mediowane pierwotnie przez bazofile [3].

Do interakcji pomiędzy bazofilem a alergenem dochodzi poprzez receptor FcεRI dla IgE. W efekcie dochodzi do pobudzenia bazofila i uwolnienia mediatorów zapalnych z jego ziarnistości. Tę degranulację można wykryć i określić ilościowo za pomocą technik cytometrii przepływowej [4]. Test aktywacji bazofili (ang. *Basophil Activation Test*, BAT) jest testem funkcjonalnym, pozwalającym na bezpośrednią ocenę aktywacji bazofili w obecności alergenu i ma potencjał do wiernego odtworzenia in vitro przebiegu reakcji nadwrażliwości typu I, które powstają in vivo u alergików po kontakcie z alergenem.

Choć diagnostyka komponentowa przyczyniła się do istotnego wzrostu czułości i swoistości badań diagnostycznych, to żadna z aktualnie stosowanych metod (sIgE, PTS,

CRD) nie pozwala na różnicowanie pomiędzy pacjentami uczulonymi, ale tolerującymi alergen a pacjentami uczulonymi z objawami alergii. Badania te nie pozwalają również na ocenę reaktywności progowej i dawki progowej alergenu. BAT jest badaniem czynnościowym, określanym niekiedy mianem „doustnej próby prowokacji w próbówce”. W związku z tym badanie to ma zastosowanie kliniczne w diagnostyce i monitorowaniu chorób alergicznych m.in. w alergii na jady owadów błonkoskrzydłych, leki, pokarmy, lateks, alergii wziewnej, pokrzywce oraz w monitorowaniu immunoterapii.

### Metoda wykonania BAT

BAT jest badaniem o minimalnej inwazyjności, do którego wykonania niezbędna jest mała objętość krwi pełnej (ok 1 ml), co czyni go przyjaznym dla pacjenta (szczególnie dziecka) i jego rodziny. Tym niemniej BAT wymaga świeżo pobranej krwi (test należy wykonać w ciągu 24h od pobrania, najlepiej 3-4h) i nie może być wykonany z użyciem zamrożonej próbki krwi. BAT najlepiej przeprowadzić nie później niż 6-12 tygodni po kontakcie z alergenem, jednak wyniki badania mogą być pozytywne również po wielu latach od przebytej reakcji alergicznej.

Do wykonania BAT wykorzystywane są dwie grupy markerów powierzchniowych: służące do identyfikacji bazofili i oceny ich aktywacji. W cytometrii przepływowej do identyfikacji bazofili w pełnej krwi używa się różnych metod bramkowania. Istnieje kilka kombinacji markerów powierzchniowych, które pozwalają na prawidłową identyfikację bazofili. Obejmują one różne kombinacje, w tym:

- SSClow/ IgE positive [5]
- SSClow/ CD203c positive/ CD123 positive/ HLA-DR negative [6]
- CD45dim/ CD123bright/ HLA-DR negative [7]
- SSClow/ CCR3 positive [8].

Przyjęta metoda bramkowania ma znaczenie dla wartości diagnostycznej BAT, m.in. wpływa na zwiększenie ilości wyników fałszywie dodatnich i ujemnych [9]. Na przykład użycie markera, który nie jest charakterystyczny dla bazofili może prowadzić do włączenia do BAT komórek niebędących bazofilami.

Metoda bramkowania z użyciem dużej ilości markerów błonowych pozwala na selekcję czystej populacji bazofili, ale związana jest z większym nakładem finansowym.

Dla prawidłowej interpretacji wyniku BAT konieczne jest przeprowadzenie kontroli pozytywnej i negatywnej. W kontroli pozytywnej ocenia się ilość aktywowanych bazofili po stymulacji przeciwciałami anti-IgE (alternatywnie anti-FcRI). Prawidłowa wartość wynosi >10% aktywowanych bazofili. U 10-17% pacjentów, pomimo prawidłowej ekspresji receptorów powierzchniowych, po stymulacji FcFRI nie obserwuje się odpowiedzi ze strony komórki [10]. Tą grupę pacjentów określa się mianem *non-responders* („niewydzielaczy”). Wydaje się, że inaktywacja bazofili („anergia bazofili”) u tych pacjentów, jest związana z obniżeniem wrażliwości bazofila Syk [11].

W kontroli negatywnej oceniana jest spontaniczna ekspresja markerów aktywacji. Przeprowadza się ją przez inkubację komórek w płynie płuczącym. Ilość aktywowanych bazofili w kontroli negatywnej nie przekracza zazwyczaj 5%.

### Markery ekspresji bazofila w BAT

Powszechnie do oceny stopnia aktywacji bazofili stosuje się dwa markery - CD63 i CD203c [12].

CD63 jest białkiem strukturalnym związanym z lizozymem (LAMP-3, lysosyme associated membranę protein), zakotwiczonym w błonie ziarnistości bazofili, które podlega ekspresji również na monocytach, makrofagach i płytkach. Ekspresja CD63 jest wysoce swoista dla złożonej degranulacji bazofili [13]. W nieaktywnych bazofilach, CD63 jest prawie niewykrywalny na powierzchni błony komórkowej. Po aktywacji bazofila dochodzi do połączenia ziarnistości egzocytarnych z błoną komórkową i tym samym ekspresji antygeny na powierzchni komórki [14]. Ekspresja CD63 wzrasta natychmiast po stymulacji alergenem lub po aktywacji przeciwciałami anti-IgE. W wyniku aktywacji komórki, CD63 jest silnie wyrażony na powierzchni bazofila i w związku z tym jest uważany za miarodajny marker aktywacji bazofili. Ekspresja CD63 koreluje z wyrzutem histaminy podczas anafilaksji [15] i jest odwrotnie skorelowana z aktywnością wewnątrzkomórkowej diaminooksydazy, enzymem zlokalizowanym w tych samych wewnątrzkomórkowych ziarnistościach co histamina. Badania oceniające ekspresję CD63 i diaminooksydazy w tej samej próbce krwi potwierdzają znaczenie CD63 i BAT w reakcji IgE-założonej [16,17].

Drugim markerem używanym do oceny pobudzenia bazofila jest CD203 (neuralny powierzchniowy antygen różnicowania neuronów). Jest to białko należące do rodziny pirofosfataz/ fosfodiesteraz, które jest w niewielkiej ilości obecne na powierzchni błony komórkowej również niepobudzonych bazofili. Pod wpływem stymulacji receptorów dla fragmentów Fc IgE, szybko i wyraźnie wzrasta ekspresja CD203 na wszystkich bazofilach. W odróżnieniu od CD63 jest to marker swoisty wyłącznie dla bazofili [16].

Markery aktywacji bazofili różnią się między sobą dynamiką pobudzenia bazofili. CD63 jest bezpośrednio związany z uwolnieniem histaminy i pełni ważną rolę w patomechanizmie reakcji anafilaktycznej, natomiast CD203c jest wykładnikiem częściowej degranulacji typowej dla reakcji alergicznych o łagodniejszym przebiegu [15].

Wyniki badań nie dają jednoznacznej odpowiedzi, który ze stosowanych antygenów jest lepszym markerem pobudzenia bazofili. Użycie w BAT łącznie dwóch markerów aktywacji CD63 i CD203 pozwala na zmniejszenie liczby wyników fałszywie ujemnych, zwiększenie czułości i swoistości badania [12].

Do rzadziej stosowanych markerów aktywacji bazofili należą również antygeny CD13, CD107a i CD164 oraz analiza wewnątrzkomórkowej zawartości histaminy przy użyciu metody powinowactwa enzymatycznego (HistaFlow) [16].

### Wartości graniczne BAT

Wartość diagnostyczna BAT w alergii na pokarmy jest alergenowo swoista i wymaga walidacji klinicznej poprzez przeprowadzenie badań z różnymi alergenami.

Aktualnie brak jest międzynarodowego konsensusu i standaryzacji wartości punktu odcięcia dla wyniku dodatniego [18]. Z uwagi na różnice metodologiczne zaleca się, aby każde laboratorium zdefiniowało własne wartości graniczne. Najczęściej przyjmowana definicja wyniku po-

zywnego opiera się na ilości aktywowanych bazo-fili po stymulacji. W przypadku alergii pokarmowej wynik badania uznaje się za pozytywny po stwierdzeniu 2-15% aktywowanych bazo-fili i/lub wskaźnik stymulacji o wartości co najmniej 2 (stosunek ilości pobudzonych bazo-fili po stymulacji do ilości pobudzonych bazo-fili w kontroli ujemnej).

Aby precyzyjnie ustalić wartości graniczne specyficzne dla alergenu, konieczne jest przeprowadzenie szerokich badań z ustaleniem dawki, różnych stężeń alergenów użytych do stymulacji oraz analizę ROC.

Wyniki BAT zależą od rozpowszechnienia alergii pokarmowej w populacji i mogą być różne w zależności od wielu czynników, m.in. lokalizacji geograficznej. Podczas gdy diagnostyczne wartości odcięcia mogą być ekstrapolowane na populację o podobnej charakterystyce, użycie ich dla pacjentów z innej populacji będzie wymagało oddzielnej walidacji klinicznej.

### Stymulacja pełnym alergenem vs rekombinantem alergenowym w BAT

Wartość diagnostyczna i czułość BAT może być różna w zależności od rodzaju alergenu użytego do stymulacji bazo-fili. W badaniu można użyć rekombinant alergenowych lub ekstraktu. Przewagą rekombinantów alergenowych jest ich duża stabilność oraz standaryzacja, w porównaniu do oczyszczonych alergenów lub ekstraktów alergenowych. Potencjalnym minusem stosowania rekombinantów alergenowych jest brak ekspozycji na rzadziej spotykane alergeny.

BAT wykonany z Gal d1 i Pru p 3 cechuje się wyższą czułością w porównaniu do BAT dla pełnego alergenu białka jaja (niezależnie od stopnia obróbki termicznej) i brzoskwi-ni w diagnostyce alergii na te pokarmy [19].

### Czułość i swoistość BAT

BAT cechuje się dużą czułością i swoistością diagnostyczną. W niektórych badaniach [10,20,21] swoistość BAT oszacowano nawet na 100%, co pozwala na potwierdzenie diagnozy IgE-zależnej alergii pokarmowej z bardzo dużym prawdopodobieństwem. Z uwagi na wysoką swoistość, BAT ma przewagę nad aktualnie stosowanymi standardowymi badaniami (PTS, sIgE) w diagnozowaniu alergii pokarmowej [20,22].

### Przydatność BAT w diagnostyce IgE-zależnej alergii pokarmowej

Dostępne są liczne badania oceniające użyteczność BAT w diagnostyce alergii pokarmowej. Pierwsze badanie opublikowała w 1999r. Moneret-Vautrin z zespołem [23]. Stwierdzono, dużą przydatność BAT w ocenie spontanicznego uwalniania histaminy w stosunku do testu uwalniania histaminy u pacjentów z alergią pokarmową.

Dotychczas przeprowadzone badania z zastosowaniem BAT w diagnostyce alergii pokarmowej dotyczyły różnych pokarmów, w tym: mleka krowiego [19,21,24], jajek [10,19], pszenicy [25-29], orzeszków ziemnych [10, 20, 30-32], orzechów laskowych [33-35] i brzoskwi-ni [36]. Niektóre z badań zostały przeprowadzone na małej grupie chorych i nie we wszystkich przeprowadzono próbę doustnej prowokacji pokarmem (OFC). Badanie z największą

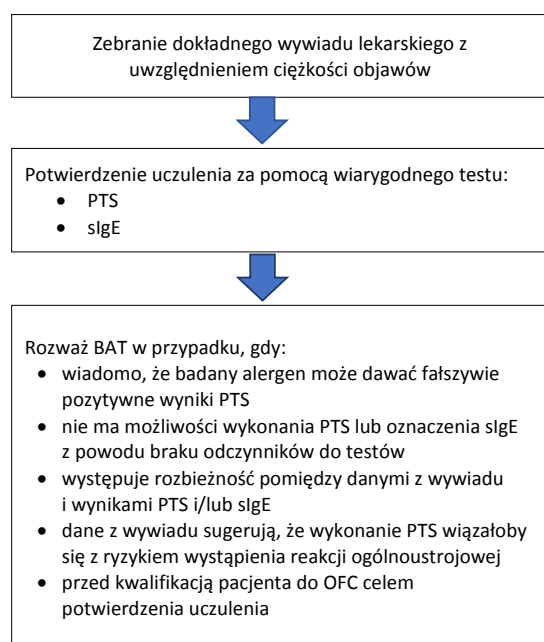
grupą pacjentów oceniające zastosowanie BAT dotyczyło orzeszków ziemnych [20]. W badaniu wzięło udział łącznie 105 dzieci, u których jako uzupełnienie standardowej diagnostyki (sIgE, PTS) wykonano BAT. Pacjentów podzielono na grupy: dzieci zdrowe, dzieci uczulone, ale tolerujące orzeszki ziemne i dzieci uczulone, z objawami alergii po kontakcie z orzeszkami ziemnymi. Wykonanie BAT pozwoliło na zmniejszenie ilości koniecznych OFC o 2/3. Czulość testu oceniono na 97%, a jego swoistość i pozytywną wartość predykcji na niemal 100%.

W badaniach Sato i wsp. [19] oceniano korzyści płynące z zastosowania BAT w diagnostyce alergii na mleko krowie i jajko. Do badania zakwalifikowano 71 pacjentów z potwierdzoną alergią na mleko krowie i/lub jajko kurze. Wartość pozytywnej predykcji dla białka jaja kurzego oszacowano na 94,7%, 100% dla owomukoidu, 85,7% dla mleka krowiego i 75% dla kazeiny.

Wprowadzenie diagnostyki molekularnej z zastosowaniem komponent alergenowych znacząco zwiększyło swoistość pomiarów sIgE z zastosowaniem komponent alergenowych w porównaniu do oceny sIgE dla pełnych ekstraktów alergenowych, jednak nawet tak szczegółowe badanie nie pozwala na odróżnienie alergii od uczulenia, czyli na ostateczne ustalenie rozpoznania alergii pokarmowej.

Na przykład ocena sIgE dla Ara h2 charakteryzuje się wyższą trafnością prawidłowego rozpoznania alergii na orzeszki ziemne niż sIgE dla pełnego alergenu orzeszka, ale nadal niższą niż BAT dla orzeszka ziemnego [20, 30]. U niektórych pacjentów, zastosowanie BAT jako alternatywy lub uzupełnienia oceny sIgE dla Ara h 2 może przynieść znaczące korzyści [20]. Podobnie oznaczenie Cor a 9 i Cor a 14 sIgE zwiększa szansę na prawidłowe rozpoznanie alergii na orzechy laskowe niż ocena sIgE dla ekstraktu orzecha laskowego [37,38]. Zastosowanie BAT łącznie z oceną komponent alergenowych zwiększa swoistość diagnostyki do 97% w porównaniu do 94% Cor a 14 i 72% Cor a 9 sIgE [21]. Większa skuteczność diagnostyczna BAT niż oznaczenie stężenia komponentów alergenowych jest prawdopodobnie związana z faktem, że BAT jest badaniem czynnościowym, którego wyniki są zależne nie tylko od stężenia IgE, ale także od jego właściwości (takich jak powinowactwo i klonalność) oraz obecności przeciwciał innego typu, np. takich jak IgG4 [39].

Aktualnie BAT nie jest zalecany w rutynowej diagnostyce alergii na pokarmy. U części pacjentów ewidentny wywiad kliniczny oraz potwierdzone uczulenie IgE-zależne wobec pełnych alergenów lub komponent alergenowych są wystarczające dla ustalenia rozpoznania alergii IgE-zależnej. U pozostałych pacjentów można rozważać wykonanie BAT po przeprowadzeniu standardowej diagnostyki (sIgE, PTS), a następnie po uzyskaniu wyników ocenić wskazania do przeprowadzenia OFC. Zastosowanie dwuetapowej diagnostyki alergii na orzeszki ziemne, z oceną BAT, pozwoliło na zmniejszenie ilości wykonywanych OFC o 67% [20]. Aktualnie wydaje się, że największe korzyści z wykonania BAT występują u pacjentów z niejasnym wywiadem chorobowym, brakiem informacji w wywiadzie o doustnej ekspozycji na alergen i wątpliwym wynikiem dotychczas wykonanych badań (Ryc. 1).



Ryc. 1. BAT w diagnostyce alergii na pokarmy [50 w modyfikacji własnej].

### Przydatność BAT w ocenie stopnia ciężkości reakcji alergicznej

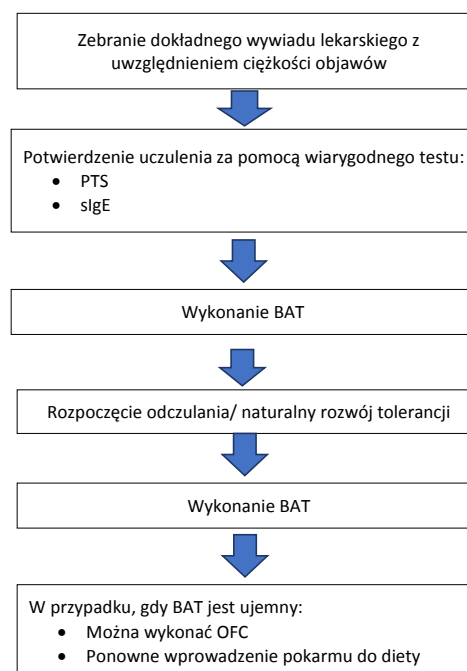
Wykazano zależność między wynikami BAT a nasileniem objawów i dawką alergenu, wywołującego reakcję alergiczną podczas OFC [13,40-42]. Ilość aktywowanych bazofili w odpowiedzi na stymulację alergenem *in vitro*, tak zwana reaktywność, jest bezpośrednio związana z ciężkością objawów podczas OFC, zwłaszcza w przypadku orzeszków ziemnych i mleka. W badaniu opublikowanym przez Schocker i wsp. większą reaktywność bazofili wobec Bos d2 w BAT stwierdzono u pacjentów z ciężkimi reakcjami alergicznymi w wywiadzie w przeciwieństwie do pacjentów z łagodnymi objawami alergii na białka mleka krowiego [42]. Pomiar czułości bazofili, np. jako CD-sens [40] i stosunek pomiędzy aktywowanymi bazofilami po stymulacji alergenem i kontrolą pozytywną [13] korelują z dawką alergenu wywołującą objawy podczas OFC, co sugeruje, że BAT może dostarczać informacji o indywidualnym wzorcu uczulenia, przewidywanej ciężkości przebiegu choroby i dawce alergenu wywołującego reakcję alergiczną.

Wykazano również, że reaktywność bazofili w BAT po stymulacji pełnym alergenem mleka krowiego była różna, w zależności od fenotypu alergii na białka mleka krowiego [23]. Pacjenci tolerujący mleko w postaci przetworzonej termicznie (np. w postaci wypieku) uzyskiwali wyniki pośrednie pomiędzy pacjentami, którzy nabyli tolerancję pełnego mleka i tymi, którzy nie tolerowali mleka krowiego w żadnej postaci.

Analiza wyniku BAT w połączeniu z obrazem klinicznym (jak np. współistniejąca ciężka astma) może pozwalać na identyfikację pacjentów z grupy wysokiego ryzyka wystąpienia alergii.

### BAT a immunoterapia

Poziom aktywacji bazofili jest niższy u pacjentów podanych doustnej immunoterapii na mleko krowie, jakko



Ryc. 2. BAT w monitorowaniu alergii na pokarmy [50 w modyfikacji własnej].

i orzeszki ziemne (43-45). Co więcej, supresja bazofili podczas odczulania jest obserwowana nie tylko w stosunku do pokarmu objętego odczulaniem, ale również w stosunku do innych uczulających alergenów i wartości kontroli pozytywnej (46). Jednak nadal brak jest informacji, czy supresja bazofili utrzymuje się po zaprzestaniu alergenowo-swoistej immunoterapii.

Punktem końcowym badań oceniających skuteczność immunoterapii w IgE-zależnej alergii pokarmowej jest ocena tolerowanej dawki alergenu po zakończeniu odczulania, w stosunku do dawki, którą pacjent tolerował przed interwencją. Ponadto wyniki badań wskazują, że u części pacjentów immunoterapia w przebiegu alergii pokarmowej nie daje trwałego efektu. Aktualnie dostępne badania diagnostyczne nie pozwalają na identyfikację tej grupy pacjentów, stąd celem oceny nabycia tolerancji konieczne jest wykonanie OFC. Przeprowadzenie OFC jest czasochłonne, kosztochłonne i naraża pacjenta na wystąpienie objawów alergii, w tym anafilaksji. BAT znajduje zastosowanie zarówno do monitorowania nabywania naturalnej tolerancji na alergeny pokarmowe, jak i tolerancji nabywanej w wyniku immunoterapii. BAT jest z pewnością badaniem tańszym i bezpieczniejszym niż OFC, jednak wymagającym bardziej zaawansowanego zaplecza laboratoryjnego (Ryc 2.) [47].

### BAT a leczenie omalizumabem

Pobudzenie bazofili u pacjentów z alergią pokarmową jest niższe w trakcie leczenia omalizumabem i ponownie wzrasta po zakończeniu leczenia [48]. Zmniejszona aktywność bazofili podczas leczenia omalizumabem wydaje się występować u pacjentów z niskim wskaźnikiem asIgE / IgE całkowitego [49].

### Wątpliwości dotyczące BAT

Wyniki badań oceniające przydatność BAT w diagnostyce IgE-zależnej alergii pokarmowej różnią się w zależności

od badanych populacji, zastosowanych procedur laboratoryjnych czy metod analizy wyników cytometrii przepływowowej [12,50]. Wprowadzenie BAT do codziennego użytku klinicznego wymagałoby standaryzacji procedur laboratoryjnych i sposobu analizy danych oraz klinicznej walidacji testu.

Aktualnie w opublikowanych badaniach istnieje duże zróżnicowanie w zakresie większości wymienionych aspektów. Na rynku dostępne są znacząco zróżnicowane procedury laboratoryjne, dostępne również jako zestawy możliwe do wykonania w warunkach domowych. Badanie jest możliwe i bezpieczne do przeprowadzenia nawet przez osoby mniej zaawansowane w znajomości technik laboratoryjnych. Jednak każdy z etapów wykonania BAT może wpłynąć na wartość diagnostyczną testu, a wyniki badań wymagają szczegółowej i specjalistycznej interpretacji [30,51-56].

Ekstrakty alergenowe użyte do stymulacji komórek w BAT muszą podlegać standaryzacji; w innym przypadku mogą dawać zmienne wyniki badania.

Sposób wykonania cytometrii przepływowowej (użyte przyrządy i ich ustawienia) mogą również znacząco wpłynąć na wynik BAT; zatem powinny również podlegać standaryzacji i być dokładnie opisane [57]. Zaleca się zastosowanie zautomatyzowanych metod i platform analitycznych w trakcie wykonywania cytometrii przepływowowej [58,59]. Przewaga metod zautomatyzowanych nad manualnymi związana jest z szybkością, odtwarzalnością i wysoką przepustowością, jednak metody manualne pozwalają na pozyskiwanie wysokiej jakości danych z cytometrii przepływowowej.

Wszystkie te aspekty utrudniają przeprowadzenie porównań pomiędzy badaniami prowadzonymi w różnych ośrodkach. Dla oceny odtwarzalności i zróżnicowania procedur BAT, konieczne jest zaplanowanie badań wielośrodkowych, ciągła kontrola jakości BAT, ocena jego opłacalności oraz dowodów korzyści dla zdrowia społeczeństwa.

Podsumowaniem aktualnego stanu wiedzy oraz ustaleniem zaleceń dotyczących wykonywania BAT zajmuje się zespół ekspertów z grupy EUROBAT pod auspicjami EAACI.

### Zalety BAT w diagnostyce alergii

W przeciągu ostatnich dwudziestu lat, wskutek postępu technologicznego, BAT stał się atrakcyjnym narzędziem diagnostycznym *in vitro*, do którego zalet należą:

- możliwość zastąpienia OFC u niektórych pacjentów,
- możliwość precyzyjnego określenia dawki alergenu wywołującego reakcję, niezależnie od stopnia jej ciężkości,

### Piśmiennictwo

1. McNeil BD, Pundir P, Meeker S, i wsp. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature*. 2015;519(7542): 237-241.
2. Van Gasse AL, Sabato V, Uytendaele AP, i wsp. Immediate moxifloxacin hypersensitivity: is there more than currently meets the eye? *Allergy*. 2017;72(12):2039-2043.
3. Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med*. 1992;327:380-384.
4. Bridts CH, Sabato V, Mertens C, i wsp. Flow cytometric allergy diagnosis: basophil activation techniques. *Methods Mol. Biol*. 2014;1192:147-159.
5. Mayorga C, Gomez F, Aranda A, i wsp. Basophil response to peanut allergens in Mediterranean peanut-allergic patients. *Allergy*. 2014;69: 964-968.
6. Wanich N, Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA, i wsp. Allergen-specific basophil suppression associated with clinical tolerance in patients with milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:789-794. e20.
7. Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R, i wsp. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy*. 2008;6:12.
8. Hausmann OV, Gentinetta T, Fux M, i wsp. Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy*. 2011;66:85-91.

- brak zależności od stosowania leków przeciwhistaminowych,
- możliwość oceny reaktywności pacjenta w przypadku obecności nie-IgE-zależnych przeciwciał alergenowo-swoistych (np. IgG, IgA), które mogą być inhibitorami reakcji alergicznej [39],
- możliwość wykonania u pacjentów z nasilonymi zmianami skórnymi,
- możliwość oceny niezależnie od wieku pacjenta,
- mała ilość krwi niezbędna do wykonania badania,
- duży profil bezpieczeństwa.

### Wady BAT w diagnostyce alergii

W celu poprawnego zinterpretowania danych, należy wziąć pod uwagę niektóre aspekty metodologiczne badania:

- ok 10-17% pacjentów należy do grupy *non-responder* [10],
- u części pacjentów zbyt niska reprezentacja liczbowa bazofoili uniemożliwia wykonanie badania,
- u części pacjentów przed wykonaniem BAT mogą być wykrywalne pobudzone bazofoile/ dodatnia kontrola negatywna,
- badanie musi być wykonywane z użyciem świeżo pobranej krwi (test należy wykonać w ciągu 24h od pobrania, najlepiej 3-4h) [43],
- konieczność użycia w badaniu standaryzowanych alergenów w stężeniu zależnym od cech charakterystycznych alergenu,
- wymogi zaplecza laboratoryjnego – konieczność wykonania cytometrii przepływowowej, a następnie wnikliwa ocena wyniku.
- wysoki koszt badania.

### Podsumowanie

Aktualnie BAT nie jest badaniem łatwo dostępnym w praktyce klinicznej. Dzięki BAT wzrasta szansa na zróżnicowanie między alergią i uczuleniem. Test ten może służyć również jako dodatkowe narzędzie do przewidywania ciężkości reakcji klinicznej oraz oceny prognozy reaktywności w alergii na pokarmy. Badania z zastosowaniem BAT wymagają kontynuacji, przede wszystkim celem ustalenia jego miejsca w algorytmach diagnostycznych.

9. Santos AF, Becares N, Stephens A, i wsp. The expression of CD123 can decrease with basophil activation: implications for the gating strategy of the basophil activation test. *Clin Transl Allergy*. 2016;6:11.
10. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, i wsp. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:1234-1245.
11. Puan KJ, Andiappan AK, Lee B, i wsp. Systematic characterization of basophil anergy. *Allergy*. 2017;72(3):373-384.
12. Santos AF, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool? *Clin Transl Allergy*. 2016;6:10.
13. Rubio A, Vivinus-Nebot M, Bourrier T, i wsp. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*. 2011;66:92-100.
14. Potapińska O., Demkow U., Wąsik M. Cytometryczna ocena aktywacji bazofili w diagnostyce chorób alergicznych. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009;77:152-158.
15. MacGlashan DJ Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:1365-1377.
16. Ebo DG, Bridts CH, Mertens CH, i wsp. Analyzing histamine release by flow cytometry (Hista-Flow): a novel instrument to study the degranulation patterns of basophils. *J Immunol Methods*. 2012;375:30-38.
17. Shamji MH, Layhadi JA, Scadding GW, i wsp. Basophil expression of diamine oxidase: a novel biomarker of allergen immunotherapy response. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135:913-921. e9.
18. Ansotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, i wsp. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ. J.*, 2020; 13(2):100080.
19. Sato S, Tachimoto H, Shukuya A, i wsp. Basophil activation marker CD203c is useful in the diagnosis of hen's egg and cow's milk allergies in children. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152(Suppl 1):54-61.
20. Santos AF, Douiri A, Becares N, i wsp. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:645-652.
21. Ruinemans-Koerts J, Schmidt-Hieltejs Y, Jansen A, i wsp.. Basophil Activation Test reduces the need for a food challenge test in children suspected of IgE-mediated cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(3):350-356.
22. Lotzsch B, Dolle S, Vieths S, i wsp. Exploratory analysis of CD63 and CD203c expression in basophils from hazelnut sensitized and allergic individuals. *Clin Transl Allergy*. 2016;6:45.
23. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, i wsp. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999;82:33-40.
24. Ciepela O, Zwiazek J, Zawadzka-Krajewska A, i wsp. Basophil activation test based on the expression of CD203c in the diagnostics of cow milk allergy in children. *Eur J Med Res*. 2010;15(Suppl 2):21-26.
25. Carroccio A, Brusca I, Mansueto P, i wsp. A comparison between two different in vitro basophil activation tests for gluten- and cow's milk protein sensitivity in irritable bowel syndrome (IBS)-like patients. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:1257-1263.
26. Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, i wsp. Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol Int*. 2009;58:193-199.
27. Chinuki Y, Kaneko S, Dekio I, i wsp. CD203c expression-based basophil activation test for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1404-1406.
28. Carroccio A, Mansueto P, Iacono G, i wsp. Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: exploring a new clinical entity. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1898-1906; quiz 907.
29. Carroccio A, Brusca I, Mansueto P, i wsp. A cytologic assay for diagnosis of food hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8:254-260.
30. Glaumann S, Nopp A, Johansson SG, i wsp. Basophil allergen threshold sensitivity, CD-sens, IgE-sensitization and DBPCFC in peanut-sensitized children. *Allergy*. 2012;67:242-247.
31. Javaloyes G, Goikoetxea MJ, Garcia Nunez I, i wsp. Performance of different in vitro techniques in the molecular diagnosis of peanut allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22:508-513.
32. Glaumann S, Nopp A, Johansson SG, i wsp. Oral peanut challenge identifies an allergy but the peanut allergen threshold sensitivity is not reproducible. *PLoS One*. 2013;8:e53465
33. Cucu T, De Meulenaer B, Bridts C, i wsp. Impact of thermal processing and the Maillard reaction on the basophil activation of hazelnut allergic patients. *Food Chem Toxicol*. 2012;50:1722-1728.
34. Worm M, Hompes S, Fiedler EM, i wsp. Impact of native, heat-processed and encapsulated hazelnuts on the allergic response in hazelnut-allergic patients. *Clin Exp Allergy*. 2009;39: 159-166.
35. Brandstrom J, Nopp A, Johansson SG, i wsp. Basophil allergen threshold sensitivity and component-resolved diagnostics improve hazelnut allergy diagnosis. *Clin Exp Allergy*. 2015;45:1412-1418.
36. Gamboa PM, Sanz ML, Lombardero M, i wsp. Component-resolved in vitro diagnosis in peach-allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19:13-20
37. Masthoff LJ, Mattsson L, Zuidmeer-Jongejan L, i wsp. Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:393-399.
38. Eller E, Mortz CG, Bindslev-Jensen C. Cor a 14 is the superior serological marker for hazelnut allergy in children, independent of concomitant peanut allergy. *Allergy*. 2016;71:556-562.
39. Santos AF, James LK, Bahnson HT, i wsp.. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135:1249-1256.
40. Santos AF, Du Toit G, Douiri A, i wsp. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135:179-186.
41. Song Y, Wang J, Leung N, i wsp. Correlations between basophil activation, allergen-specific IgE with outcome and severity of oral food challenges. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015;114:319-326.
42. Schocker F, Kull S, Schwager C, i wsp.. Individual Sensitization Pattern Recognition to Cow's Milk and Human Milk Differs for Various Clinical Manifestations of Milk Allergy. *Nutrients*. 2019;11(6). pii:E1331.
43. Burks AW, Jones SM, Wood RA, i wsp. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med*. 2012;367:233-243.
44. Goldberg MR, Nachshon L, Appel MY, i wsp. Efficacy of baked milk oral immunotherapy in baked milk-reactive allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:1601-1606
45. Elizur A, Appel MY, Goldberg MR, i wsp. Clinical and laboratory 2-year outcome of oral immunotherapy in patients with cow's milk allergy. *Allergy*. 2016;71:275-278
46. Thyagarajan A, Jones SM, Calatroni A, i wsp. Evidence of pathway-specific basophil anergy induced by peanut oral immunotherapy in peanut-allergic children. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:1197-1205
47. Krogulska A, Wood RA. Peanut allergy diagnosis: Moving from basic to more elegant testing. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020 Jan 16. doi: 10.1111/pai.13215
48. Gernez Y, Tirouvanziam R, Yu G, i wsp. Basophil CD203c levels are increased at baseline and can be used to monitor omalizumab treatment in subjects with nut allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154:318-327.
49. MacGlashan DW Jr, Savage JH, Wood RA, i wsp. Suppression of the basophil response to allergen during treatment with omalizumab is dependent on 2 competing factors. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:1130-1135. e5.

50. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, i wsp. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015;70:1393-1405.
51. Mukai K, Gaudenzio N, Gupta S, i wsp. Assessing basophil activation by using flow cytometry and mass cytometry in blood stored 24 hours before analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139:889-899. e11.
52. Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, i wsp. Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141:79-90.
53. Gober LM, Eckman JA, Sterba PM, i wsp. Expression of activation markers on basophils in a controlled model of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:1181-1188
54. Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, i wsp. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:102-109.
55. Amano T, Furuno T, Hirashima N, i wsp. Dynamics of intracellular granules with CD63-GFP in rat basophilic leukemia cells. *J Biochem*. 2001;129:739-744.
56. Aljadi Z, Kalm F, Nilsson C, i wsp.. A novel tool for clinical diagnosis of allergy operation a microfluidic immunoaffinity basophil activation test technique. *Clin Immunol*. 2019 Dec;209:108268
57. Lee JA, Spidlen J, Boyce K, i wsp. MIFlowCyt: the minimum information about a Flow Cytometry Experiment. *Cytometry A*. 2008;73: 926-930.
58. Finak G, Frelinger J, Jiang W, i wsp. OpenCyto: an open source infrastructure for scalable, robust, reproducible, and automated, end-to-end flow cytometry data analysis. *PLoS Comput Biol*. 2014;10: e1003806.
59. Patil SU, Calatroni A, Schneider M. i wsp. Data-driven programmatic approach to analysis of basophil activation tests. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017; Epub ahead of print. doi: 10.1002/cyto.b.21537.