

Test di attivazione dei basofili: applicazioni attuali e prospettive future

Basophil activation test: current applications and future perspectives

Cecilia Calabrese¹, Federica Garziano², Chiara De Falco³, Lidia Atripaldi¹, Anna Ciccarelli⁴, Francesco Perna^{5,6}

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", AORN Ospedali dei Colli, Plesso "V. Monaldi", Napoli; ² UOSD Patologia Clinica, AORN Ospedali dei Colli, Plesso CTO, Napoli; ³ UOC Biochimica Clinica, AORN Ospedali dei Colli, Plesso "V. Monaldi", Napoli; ⁴ Ambulatorio di Allergologia, PSP Loreto Crispi, ASL NA1, Napoli; ⁵ Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II"; ⁶ UOC Biochimica clinica, AORN Ospedali dei Colli, Plesso "V. Monaldi", Napoli

Riassunto

Il test di attivazione basofila (BAT) è un test che valuta, in citometria a flusso, la percentuale di attivazione o degranulazione dei basofili del sangue periferico, dopo esposizione "in vitro" a specifici allergeni. Nei pazienti sensibilizzati, la stimolazione dei basofili del sangue periferico con uno specifico allergene induce o aumenta l'espressione di molecole, come CD63 e CD203c, che rappresentano rispettivamente marcatori di degranulazione e di attivazione dei basofili. La validità del BAT richiede un controllo negativo (soluzione salina sterile) e un controllo positivo (molecole anti-IgE). Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo del BAT nel supportare la diagnosi di allergia a farmaci, alimenti e veleno di imenotteri. Il BAT ha dimostrato una scarsa sensibilità ma una buona specificità nella diagnosi di allergia a farmaci quali FANS, antibiotici beta-lattamici, chinoloni e miorilassanti. Nell'allergia alimentare, la sensibilità e la specificità del BAT dipendono dal tipo di alimento; nel caso dell'allergia alle arachidi la sensibilità può raggiungere il 96% mentre la specificità il 100%. Inoltre, il BAT è uno strumento utile per monitorare la risoluzione naturale delle manifestazioni allergiche e gli effetti clinici indotti dall'immunoterapia o dal trattamento anti-IgE. Infine, il BAT è stato utilizzato per lo studio dei meccanismi patogenetici sottostanti diverse condizioni morbose IgE-mediate. Ad esempio, nei pazienti affetti da asma bronchiale grave, il BAT ha dimostrato la capacità delle enterotossine dello *Stafilococcus aureus* di indurre l'attivazione dei basofili, supportando il ruolo delle enterotossine quali "trigger" della cascata infiammatoria nell'asma bronchiale. Nei pazienti affetti da Fibrosi cistica il test può essere utilizzato per discriminare l'Aspergilloso broncopulmonare allergica dalla colonizzazione da *Aspergillus*. Più recentemente, il BAT è stato proposto come un potenziale strumento diagnostico per valutare l'allergia al polietilenglicole (PEG) presente nel vaccino mRNA anti-SARS-CoV-2 BNT162b2.

Parole chiave: test di attivazione basofila, allergia ad alimenti, allergia ai farmaci, *Stafilococcus aureus*, enterotossine, polietilenglicole

Summary

The basophil activation test (BAT) is a flow cytometric assay that evaluates the percentage of activation or degranulation of peripheral blood basophils, after "in vitro" exposure to specific allergens. In sensitized patients, the stimulation of peripheral blood basophils with a specific allergen induces or up-regulates the expression of molecules, such as CD63 and CD203c, which represent markers of degranulation and activation of basophils, respectively. The validity of the BAT requires a negative control (sterile saline) and a positive control (anti-IgE molecules).

Several studies have demonstrated the role of the BAT in supporting the diagnosis of drug, food and hymenoptera venom allergy. The BAT has shown a low sensitivity but good specificity in diagnosing allergy to drugs such as NSAIDs, beta-lactam antibiotics, quinolones and muscle relaxants. In food allergy, the sensitivity and specificity of the BAT depends on the

Ricevuto il 13-01-2022
Accettato il 10-02-2022

Corrispondenza

Cecilia Calabrese

Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", AORN Ospedali dei Colli, Plesso "V. Monaldi" via Leonardo Bianchi, 80131 Napoli
cecilia.calabrese@unicampania.it

Conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non avere nessun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.

Come citare questo articolo: Calabrese C, Garziano F, De Falco C, et al. Test di attivazione dei basofili: applicazioni attuali e prospettive future. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio 2022;37:57-60. <https://doi.org/10.36166/2531-4920-A094>

© Copyright by Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri – Italian Thoracic Society (AIPO – ITS)



OPEN ACCESS

L'articolo è open access e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

food; in the case of peanut allergy the sensitivity reaches 96% while the specificity the 100%. In addition, the BAT is an useful tool to monitor the natural resolution of allergies and the clinical effects induced by either immunotherapy or anti-IgE treatment. Finally, the BAT has been utilized to study the pathogenetic mechanisms underlying several IgE-mediated diseases. For example, in patients affected by severe bronchial asthma, the BAT has demonstrated the ability of Staphylococcus aureus enterotoxins to induce the activation of basophils supporting the role of these enterotoxins as "triggers" of the inflammatory cascade in bronchial asthma. In patients with cystic fibrosis the BAT can be used to discriminate allergic bronchopulmonary aspergillosis from Aspergillus colonization. More recently, the BAT has been demonstrated as a potential diagnostic tool to evaluate allergy to the polyethylene glycol (PEG) present in the anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccine.

Key words: basophil activation test, food allergy, drug allergy, staphylococcus aureus enterotoxins, polyethylene glycol

Come funziona?

Il test di attivazione basofila (BAT) è una metodica che valuta, in citometria a flusso, la percentuale di attivazione o degranulazione dei basofili del sangue periferico, dopo esposizione "in vitro" a specifici allergeni ¹. Sebbene i basofili rappresentino meno dello 0,5% dei leucociti totali del sangue periferico e per anni siano stati considerati esclusivamente come forme circolanti di minore importanza delle mastcellule, recenti evidenze hanno dimostrato un ruolo fondamentale svolto da tali cellule nella patogenesi delle malattie allergiche e delle reazioni di ipersensibilità. Il BAT è un "test funzionale" che mima "in vitro" il contatto tra gli allergeni e le cellule responsabili del rilascio di istamina. In questo test i basofili del sangue periferico sono dapprima esposti "in vitro" a uno specifico allergene e successivamente sottoposti ad analisi citofluorimetrica per misurare l'espressione di *marker* di attivazione sulla loro superficie.

I basofili vengono selezionati mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali rivolti verso specifici marcatori quali, ad esempio, il CCR3 (recettore per le chemochine CC di tipo 3), il CRTH2 (recettore per la prostaglandina D2 espresso da eosinofili, basofili e linfociti Th2), e il CD123 (subunità del recettore di IL3). Successivamente la risposta agli specifici stimoli allergenici viene valutata mediante l'espressione di molecole, quali il CD63 e il CD203c. Il CD63 è una proteina transmembrana della famiglia delle tetraspanine che è presente sulla superficie dei granuli intracellulari dei basofili non attivi sia dei soggetti normali sia dei soggetti allergici. Dopo esposizione a stimoli allergenici viene rapidamente espresso sulla superficie cellulare, in circa 60 secondi, per cui la sua espressione riflette la degranulazione dovuta alla fusione tra la membrana dei granuli e la membrana cellulare. Il CD203c è l'enzima ectonucleotidasi pirofosfatasi/fosfodiesterasi, appartenente alla famiglia delle proteine transmembrana, che opera il clivaggio di numerose molecole ma la cui funzione non è completamente definita. Il CD203c è espresso costitutivamente a basse concentrazioni sulla membrana cellulare dei basofili non attivi e viene up-regolato in seguito alla loro stimolazione. Il CD63 può, pertanto, essere definito un *marker* di degranulazione e il CD203c un *marker* di attivazione cellulare. CD63 e CD203c rappresentano differenti *pathways* della degranulazione basofila e sono entrambi utilizzati come *marker* del BAT. La validità del BAT richiede la negatività del controllo negativo (esposizione a soluzione salina sterile) e la positività del controllo positivo (esposizione a molecole anti-IgE). I risultati del BAT possono essere espressi in maniera differente. Nel caso del CD63, non espresso dai basofili "a riposo" né da altri tipi cellulari, la positività del test viene riferita in termini di percentuale di basofili che esprimono il CD63. Nel caso del CD203c, normalmente espresso sulle membrane dei basofili, ma iper-espresso sulle membrane dei basofili attivati, la positività del test viene riferita mediante l'indice di stimolazione, vale a dire il rapporto tra l'intensità media di fluorescenza (MFI) ottenuta dall'esposizione allo specifico allergene e dal controllo negativo. Il test viene considerato positivo quando l'indice di stimolazione risulta maggiore di 2 o, in alternativa, se la percentuale assoluta di basofili esprimenti CD203c dopo il contatto con lo specifico allergene sia uguale o superiore al 5%.

Qual è lo stato dell'arte?

Diversi studi di letteratura hanno dimostrato il ruolo del BAT nel supportare la diagnostica allergologica ad alimenti, farmaci e al veleno degli imenotteri ²⁻⁴. Nell'allergia a farmaci (FANS, antibiotici beta-lattamici, chinolonici e miorilassanti) l'uso del BAT è condizionato da una scarsa sensibilità ma da una sufficiente specificità. La sensibilità del test aumenta quando viene testato un pannello di farmaci piuttosto che un singolo farmaco ⁵. Nell'allergia ad alimenti la sensibilità e la specificità del BAT variano a seconda degli alimenti; ad esempio nel caso dell'allergia alle arachidi la sensibilità raggiunge il 96% mentre la specificità raggiunge il 100% ⁵. Nell'allergia a latte vaccino e all'uovo il BAT ha una capacità predittiva negativa che si avvicina al 96% ⁵. Il vantaggio principale del test "in vitro" BAT consiste nell'evitare l'esposizione del paziente allergico ai potenziali specifici allergeni come si verifica nei "test in vivo" quali il *prick by prick* con l'alimento stesso, l'intradermoreazione e il test di provocazione orale che,

nell'allergia alimentare resta, comunque, il "best test". A tal proposito il BAT può essere di "ausilio" nel prevedere il rischio di reazioni gravi nel caso in cui sia necessario eseguire il test di provocazione con l'allergene specifico ². Infine, il BAT costituisce uno strumento utile nel monitoraggio dei cambiamenti dello stato allergico nel tempo sia fisiologici che conseguenti a terapie con immunomodulanti o immunoterapia specifica. In particolare, il BAT è stato utilizzato per valutare la sospensione dell'immunoterapia specifica nei pazienti con allergia agli imenotteri, per prevenire le reazioni anafilattiche ad anestetici, per consentire la reintroduzione di farmaci antineoplastici che hanno determinato reazioni di ipersensibilità e per valutare l'avvenuta desensibilizzazione nei bambini allergici a componenti del latte vaccino ⁶⁻⁸.

Quali sono le prospettive di utilizzo in futuro?

Il BAT è un test che può consentire lo studio dei meccanismi patogenetici responsabili di differenti condizioni morbose IgE-mediate. Recentemente, il BAT è stato utilizzato per valutare il ruolo patogenetico svolto dalle enterotossine secrete dallo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nei pazienti affetti da asma bronchiale grave. Questo batterio, che frequentemente colonizza le vie aeree superiori, può rilasciare enterotossine che agiscono sia come superantigeni, inducendo la produzione di IgE policlonali, che come allergeni determinando la produzione di IgE specifiche. Diversi studi di letteratura hanno dimostrato un'associazione tra la presenza di IgE verso le enterotossine dello *S. aureus* e il rischio di sviluppare asma grave, dimostrando una correlazione positiva tra i livelli sierici delle IgE specifiche e la gravità della malattia, in termini di riacutizzazioni, ospedalizzazioni e mancato controllo dei sintomi. In questo lavoro è stata dimostrata, mediante il BAT, la capacità delle enterotossine dello *S. aureus* di indurre l'attivazione dei basofili in circa un terzo dei pazienti affetti da asma bronchiale grave, supportando il ruolo delle enterotossine quali "trigger" della cascata infiammatoria nell'asma bronchiale ⁹. Il BAT si è rivelato, inoltre, un test in grado di discriminare l'aspergillosi broncopulmonare allergica dalla colonizzazione da *Aspergillus fumigatus* nei pazienti affetti da fibrosi cistica ¹⁰.

Il BAT è stato utilizzato come potenziale strumento diagnostico per confermare l'allergia all'eccipiente polietilenglicole (PEG) presente nel vaccino anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA. Uno studio recente ha dimostrato, nei pazienti con anamnesi di pregressa allergia al PEG, la capacità del vaccino BNT162b2, ma non del PEG nel suo stato nativo, di indurre l'attivazione dei basofili. Al contrario, la doxorubicina liposomiale PEGilata determinava l'attivazione dei basofili, suggerendo che il PEG, come modificato e disposto sulla nanoparticella lipidica del vaccino, costituisce il potenziale *trigger* della reazione anafilattica a BNT162b2. In aggiunta, lo studio sottolineava la carenza degli attuali protocolli dei test cutanei per l'allergia ai farmaci liposomiali PEGilati, in quanto non tutti i pazienti con anamnesi di reazioni allergiche al PEG risultavano positivi ai test cutanei con il PEG ¹¹. Inoltre, un altro studio ha dimostrato che il BAT rappresenta un potenziale strumento diagnostico per valutare l'allergia all'eccipiente PEG ma non al vaccino BNT162b2 mRNA, in quanto un risultato positivo del BAT al vaccino era presente anche nei soggetti con pregressa infezione COVID-19 ma non allergici al PEG ¹¹. È da sottolineare che il BAT, essendo un test "in vitro", non determina la sensibilizzazione del paziente alle eventuali molecole che vengono testate.

In conclusione, molti lavori hanno dimostrato l'efficacia del BAT nella diagnostica allergologica *in vitro*, suggerendo le più svariate applicazioni, poiché il test si presta all'utilizzo di "qualsiasi sostanza che possa essere messa in soluzione".

Bibliografia

- Hemmings O, Kwok M, McKendry R, et al. Basophil activation test: old and new applications in allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2018;18:77. <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0831-5>. Erratum in: *Curr Allergy Asthma Rep* 2019;19:58.
- Santos AF, Alpan O, Hoffmann HJ. Basophil activation test: mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy* 2021;76:2420-2432. <https://doi.org/10.1111/all.14747>
- Briceno Noriega D, Teodorowicz M, Savelkoul H, et al. The basophil activation test for clinical management of food allergies: recent advances and future directions. *J Asthma Allergy* 2021;14:1335-1348. <https://doi.org/10.2147/JAA.S237759>
- Gomułka K, Wrześniak M, Mędrala W, et al. Basophils priming in patients with chronic spontaneous urticaria. *Postepy Dermatol Alergol* 2021;38:608-610. <https://doi.org/10.5114/ada.2021.108910>
- Doña I, Blanca-Lopez N, Boteanu C, et al. Clinical practice guidelines for diagnosis and management of hypersensitivity reactions to quinolones. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2021;31:292-307. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0669>
- Takazawa T, Yamaura K, Hara T, et al.; Working Group for the Preparation of Practical Guidelines for the Response to Anaphylaxis, Safety Committee of the Japanese Society of Anesthesiologists. Practical guidelines for the response to perioperative anaphylaxis. *J Anesth* 2021;35:778-793. <https://doi.org/10.1007/s00540-021-03005-8>

- ⁷ Caiado J, Castells MC. Drug desensitizations for chemotherapy: safety and efficacy in preventing anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2021;21:37. <https://doi.org/10.1007/s11882-021-01014-x>
- ⁸ Santos AF, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool? *Clin Transl Allergy* 2016;6:10. <https://doi.org/10.1186/s13601-016-0098-7>
- ⁹ Flora M, Perna F, Abbadessa S, et al. Basophil activation test for *Staphylococcus aureus* enterotoxins in severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2021;51:536-545. <https://doi.org/10.1111/cea.13772>
- ¹⁰ Gernez Y, Waters J, Mirković B, et al. Blood basophil activation is a reliable biomarker of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2016;47:177-185. <https://doi.org/10.1183/13993003.01068-2015>
- ¹¹ Troelnikov A, Perkins G, Yuson C, et al. Basophil reactivity to BNT162b2 is mediated by PEGylated lipid nanoparticles in patients with PEG allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2021;148:91-95. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.04.032>
- ¹² Labella M, Céspedes JA, Doña I, et al. The value of the basophil activation test in the evaluation of patients reporting allergic reactions to the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *Allergy* 2021;10.1111/all.15148. <https://doi.org/10.1111/all.15148>