



Erken ilaç Hipersensitivite Reaksiyonlarında Bazofil Aktivasyonu ve Bazofil Aktivasyon Testi (BAT)

Basophil Activation in Immediate Drug Hypersensitivity Reactions and Basophil Activation Test (BAT)

Öner Özdemir

Öz / Abstract

Bazofil aktivasyon testi (BAT) için, degranulasyon markırı olan ve CD63 de denilen lizozom-ilişkili membran glikoprotein-3 molekülü ya da CD203c'nin upregulasyonu (ekspresyonunda artma) tespit edilir. Degranülasyon granüller denilen önceden oluşmuş medyatörlerle dolu spesifik intrasellüler vesiküllerin plazma membranı ile füzyonu ve bunun sonucunda CD63 molekülünün içeriden dışarıya geçişidir. Yüzey CD63 molekülünün saptanmasına yarayan, floresan yoğunluğunu gösteren sinyalde ani ve bariz artış (sinyalde logaritmik kayma) ile sonuçlanır. Eş zamanlı olarak, CD203c'nin upregulasyonu da gözlenir ve CD203c monoklonal antikora ait ortalama floresan yoğunluğunu gösteren sinyalde anlamlı derecede artış tespit edilir. En sık kullanılan bazofil tanımlama stratejileri yüzey immunoglobulin E (IgE), eotaksin CC kemokin reseptör 3 (CCR3), interleukin-3 reseptör alfa zinciri CD123, prostaglandin D2 reseptörü CRTH-2, veya bazofil-spesifik ektonukleaz CD203c'dir. Ani ilaç hipersensitivite reaksiyonlarında BAT'ın faydası çok değişkendir. Bu ilacın kendisinin yanında serum proteinleriyle spontan olarak konjuge olabilme kapasitesine bağlıdır. Testin duyarlık ve özgünlüğünü ana ilaç ya da metabolitlerinin saf solüsyonlarına karşın ilaç-protein konjugatları ile stimülasyonu etkileyebilmektedir. Diğer etkileyen faktörler arasında stimulan, tanımlama ve aktivasyon markırlarının, stimülasyon protokol, kapılama stratejilerinin seçimi ve cut-off tanımlaması sayılabilir. BAT testi, beta-laktam antibiyotik, nöromuskuler bloker ajanlar, radyokontrast maddeler, platinum-ıçeren kemoterapötikler, analjezikler ve biyolojik ilaçlara veya kinolona karşı gelişen ani ilaç hipersensitivite reaksiyonlarının saptanmasında yararlı bulunmuştur. Genelde, deri testi, ilaç provokasyon testi ve BAT arasında iyi bir korelasyon olmakla beraber, BAT'ın in vivo testlerin tamamlayıcısı olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İlaç, hipersensitivite, bazofil, bazofil aktivasyon testi

In the basophil activation test (BAT), the expression of the degranulation marker lysosomal-associated membrane glycoprotein-3, also termed as CD63, or upregulation of CD203c is determined. Degranulation is the fusion of specific intracellular vesicles filled with preformed mediators, which are the so-called granules, with the plasma membrane and the transition of CD63 from inside out. The result is a sudden and pronounced rise, i.e., log shift, of the fluorescence intensity signal in the detection of surface CD63 molecule. Concomitantly, the upregulation of CD203c has been observed; this can be detected as a significant increase in the mean fluorescence intensity signal of the CD203c detection antibody. The most common identification strategies use surface IgE, eotaxin CC chemokine receptor 3, the interleukin-3 receptor alpha chain CD123, the prostaglandin D2 receptor CRTH-2, or the basophil-specific ectonuclease CD203c. The usefulness of BAT in immediate drug hypersensitivity reactions is highly variable and dependent on the drug and its capacity to spontaneously conjugate to serum proteins. Stimulation with pure solutions of the parent drug or metabolites thereof versus drug-protein conjugates may influence the sensitivity and specificity of the BAT. Other influencing factors are as follows: the selection of stimulants or of identification and activation markers, the protocol for stimulation, strategies for gating, and the definition of the cut-off. The BAT is helpful to detect immediate drug hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics, neuromuscular blocking agents, radiocontrast media, platinum-containing chemotherapeutics, analgesics, and biologicals or quinolone. In general, although there is a good correlation among the skin test, drug provocation test, and BAT; BAT has proven to be useful to complement in vivo tests.

Keywords: Drug, hypersensitivity, basophil, basophil activation test

Giriş

Penisilin gibi antibiyotikler ve aspirin, non-steroid anti-enflamatuvar ilaç (NSAID) gibi ilaçlara karşı gelişen erken ilaç aşırı duyarlık hipersensitivite reaksiyonları (İHR)'nın etyo-patogenezinde her geçen gün yeni yolak ve aşırı duyarlık / hipersensitivite hipotezler tarif edilmeye devam edilmektedir. En iyi bilinen hipotezler haptent/pro-haptent ve farmakolojik interaksiyon (p-i) konseptidir (1).

- **Haptent / Pro-haptent konsepti:** Küçük moleküler ağırlıklı ilaçlar (haptent) ve ilacın metabolizması sonrası oluşan reaktif ara ürünler/ metabolitleri (pro-haptent) kendi başlarına Fcε-R1 ile çapraz bağlanma yapamazlar (2). Haptent ve pro-haptent konseptine göre gelişen erken İHR'larında bazofillerin rol oynadığı düşünülmektedir.

- **P-i konsepti:** İlaçların (lidokain, sulfametoksazol, lamotrigin vb.) immün reseptörler üzerinden T-hücrelerle enteraksiyonu sonucunda T-lenfositler gecikmiş tip immün reaksiyonlar geliştirir ve burada bazofillerin rolü yoktur (3).

Bu üç hipotezden de anlaşıldığı gibi, bazofillerin ve aktivasyonunun erken İHR'nın gelişiminde rolü olduğu anlaşılmaktadır. Erken İHR'ın teşhisi genellikle hikaye/öykü alma, prik ya da intradermal deri testleri ve ilaca karşı oluşan spesifik immunoglobulin E (IgE) antikorlarının miktarının

Bu çalışma XXIII. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi'nde sunulmuştur; 8-12 Ekim 2016, Muğla, Türkiye.

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Alerji-İmmünoloji Bilim Dalı, Sakarya, Türkiye

Yazışma Adresi

Address for Correspondence:

Öner Özdemir

E-posta: oner.ozdemir.md@gmail.com

Geliş Tarihi/Received: 05.12.2016

Kabul Tarihi/Accepted: 27.01.2017

© Telif Hakkı 2017 Makale metnine www.istanbultipdergisi.org web sayfasından ulaşılabilir.

© Copyright 2017 by Available online at www.istanbulmedicaljournal.org

belirlenmesine bağlıdır (4). Bu metotlar IgE-aracılı reaksiyonlarda çoğu zaman yetersiz ve IgE-aracılı olmayanlarda ise faydasızdır. İlaç provokasyon testleri de altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, etik ve pratik nedenlerden ötürü de her zaman yapılamaz (5). Dolayısıyla bu tür alerjik reaksiyonlarda rol oynayan hücrelerin (bazofil ve mast hücresi) incelenmesine dayalı bazofil aktivasyon testi (BAT) gibi in vitro testlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (6).

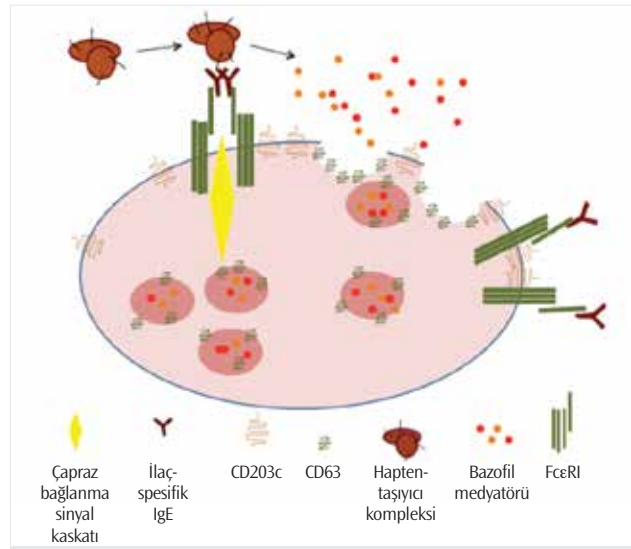
BAT, IgE-aracılı ve IgE-aracılı olmayan mast ve bazofil hücre degranülasyonunu gösteren bir testtir. Sorumlu ilaç ya da metaboliti ile stimülasyonu sonucu akım sitometri ile bazofillerin tanınım (anti- IgE, CCR3, CRTH2 ve CD203c ekspresyonu vb.) onların aktivasyon düzeyinin (CD63 ve CD203c ekspresyonu ile) ölçülmesine dayanır (7).

BAT yirmi beş yıl kadar önce tanımlanmasına rağmen, alerjide gereken yerini bulamamıştır. Zamanla gelişen in vitro testlerle beraber, 2016 ENDA/ EAACI (European Network on Drug Allergy and Drug Allergy Interest Group of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology) pozisyon paper (görüş belgesi)'inde denildiği üzere, kişide IgE-aracılı/erken İHR'den şüphelenirse; kişi yüksek riskli grupta ise, anafilaktik reaksiyon geçirmişse ya da in vivo deri testleri yapılamıyorsa bu kişide in vitro testlerin (ilaç spesifik IgE ya da BAT testi vb.) yapılması öncelenebilir (8). Bu derlemede; BAT metodu, önemi, ilaç alerjilerinde kullanım potansiyeli ve limitleri üzerinde duracağız.

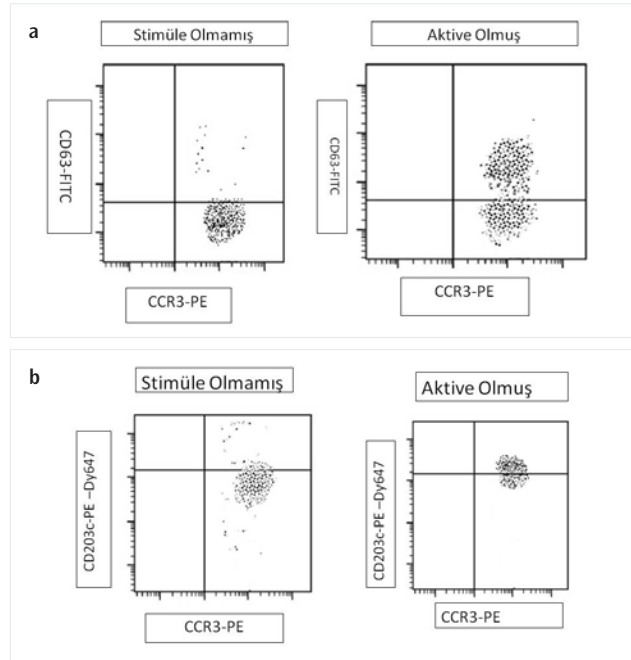
Bazofil Aktivasyon Testi: İn Vitro Bazofillerin Aktivasyonu Nasıl Sağlanır?

BAT için genellikle heparinize, sitrat- veya Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)-ile antikoagüle tam kan kullanılır. Yeterli degranülasyonu sağlamak için, kan EDTA'lı tüpe konulduğunda kalsiyum ilavesi yapılmalıdır. Genellikle alınan 200 µL heparinize tam kan 37°C 'de 20 dakika boyunca, negatif kontrol tüpünde 200µL buffer (tampon), pozitif kontrol tüpünde ise 200µL anti-IgE ile karşılaştırılır. (Bazen anti-IgE antikorları yerine anti-Fcε-RI antikorları veya formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLF) kullanılır. fMLF alternatif degranülasyon /aktivasyon stimulusu olup, in vitro IgE-aracılı yolak stimülasyonuna cevap vermeyen (non-responder: cevapsız) bazofiller için kullanılır). Test tüpünde ise 200µL volümdaki kan değişik (minimum, maksimum ve optimal) konsantrasyonda test edilecek allerjen (örneğin rokuronyum gibi genel anestezi ajanı) ile karşılaştırılır. Allerjen en az iki spesifik IgE/FcεRI ile kompleks oluşturduğunda, bazal (sakin) haldeki bazofil aktive olur. Bu aktivasyon sonrası CD203c ekspresyonu kısmen artsa (upgrade) da, CD63 ekspresyonu ise anafilaktik degranülasyon ile logaritmik bir artış sonucu zirve yapar. Reaksiyon 1 mL buzla soğutulmuş tampon solüsyon (10 mmol/L EDTA içeren) phosphate buffer solution (PBS) ile 20 dakika sonra sonlandırılır. Daha sonra test tüpleri 5 dakika boyunca 4°C ve 200G' de çevrilir. Tüpler hazırlandıktan sonra, akım sitometri'de çalışmaya başlamadan önce bazofili seçmek ve aktivasyonunu ölçmek için; hücreler 20µL monoklonal anti-human IgE, 10µL monoklonal CD63, 10µL CD203c antikorları ile 20 dakika süresince buz üstünde boyanır (9-14). Tüpler daha sonra akım sitometri'de çalışmaya başlanır.

Sitometri' de bazofil tanımlama stratejisi olarak en sık ve yaygın kullanılan yüzey IgE molekülleridir (side scatter ((SSC) ^{low/düşük}+IgE pozitif granülasyonu düşük ve IgE pozitif hücre). Yine tanımlama stratejilerinin içinde, eotaxin CC chemokine receptor 3 (CCR3), IL-3 receptor α-chain (CD123), prostaglandin D2 reseptörü (CRTH-2) ve bazofil-spesifik ektonükleaz CD203c gibi molekül ekspresyonları kullanılır (10).



Resim 1. Bazofilde degranülasyonun şematik anlatımı. Hapten-taşıyıcı kompleksi ilaca spesifik IgE ile çapraz bağlanma ile oluşan sinyal sonucu veziküllerdeki medyatörler membrandan salınır. Bu sırada CD63 ekspresyonunda logaritmik ve CD203c ekspresyonunda ise kısmi bir artış (upregülasyon) olmaktadır (3)



Resim 2.a.b. Akım sitometride bazofil degranülasyonunun gösterilmesi; (a) Degranülasyon sırasında bazal halde stimüle olmamış bazofile göre, aktive olmuş hücrelerde CD63 ekspresyonunda logaritmik ve (b) CD203c ekspresyonunda ise kısmi bir artış (upregülasyon) histogramlarda görülmektedir (3)

Sitometri' de bazofillerin aktivasyon belirteçleri olarak CD63 ve CD203c ekspresyonlarına bakılır. Bunların bazen değerlendirmede beraber kullanıldığı da olur. Beraber kullanıldıklarında BAT' ın duyarlık ve özgünlüğünün arttığı bilinmektedir (9-14).

CD63 (LAMP-3) ekspresyonu, hücrede degranülasyonu gösteren belirteçtir. Granüller, medyatörle dolu intrasellüler veziküllerin üstündeki CD63, plazma membranı ile birleşerek degranüle olur (Resim 1) ve CD63 ekspresyonuna çıkar. Bu hücre yüzeyi CD63 ekspresyonunda, ortalama floresan yoğunluk mean floresan intensity (MFI) sinyalin-

Tablo 1. Bazofil aktivasyon testinin duyarlık ve özgünlüğü

Test	Sık kullanılan ilaç grupları			
	Antibiyotikler		NMBA	RKM
BAT	Beta-laktam	Kinolon	Rokuronyum, vb.	Radyokontrast madde
	Duyarlık	%22-55	%0-100	%36-92
Özgünlük	%79-100	%90-100	%90-100	%89-100
BAT	Nadir kullanılan ilaç grupları			
	Kemoterapötikler	Biyolojik ajanlar	Analjezik / NSAID	
BAT	-Platin içeren-		Pirazolon	ASA
	Duyarlık	%67-100	%67-100	%42-55
Özgünlük	% 82-100	% 82-100	%86-100	%40-100

ASA: asetil salisilik asit; BAT: bazofil aktivasyon testi; NMBA: nöromuskuler bloker ajan; RKM: radyokontrast madde; NSAID: non-steroid anti-enflamatuar ilaç

Sık kullanılan ilaçlardan olan antibiyotik, nöromuskuler bloker ajan, radyokontrast madde ve nadir kullanılan kemoterapötik, biyolojik ajan ve analjezik / non-steroid anti-enflamatuar ilaç gruplarına bağlı reaksiyonlarda uygulanan testin duyarlık ve özgünlük oranları görülmektedir.

de ani ve bariz bir yükselişe, log-shift (logaritmik kayma)'e yol açar. CD203c ekspresyonu, normal /bazal durumda hücre yüzeyinde belli oranda zaten ekspresyona edilmekle beraber, aktivasyon sonrasında ise CD203c ekspresyonunu yansıtan MFI sinyalinde önemli derecede artışla (upgrade) kendini gösterir (9-14; Resim 2).

BAT'ın Değerlendirilmesinde Teknik Meseleler

Akım sitometri'de çalışma yaparken; minimum 200, optimal 500-1,000 bazofilde aktivasyon markırlarına bakılmalıdır. BAT değerlendirilmesinde; spontan olarak (kendiliğinden) aktif olan bazofilleri ayırt etmek için, cut-off değeri %5 olarak kabul edilmiştir. Bu bazal oranın alerjenle temas sonrası aktive olan bazofillerin oranından çıkarılması gerekmektedir. Yine aktivasyonun şiddeti de stimülasyon indeksi (SI) (%) ile ölçülür. Negatif kontrole göre alerjenle % CD63- / CD203c- pozitif hale gelen bazofil hücreleri SI (%), veya aktivasyon markırlarının MFI sinyali ile ölçülür (10, 15). Yine doz kürevü altı alanı/under the dose curve (AUC) denilen ölçüm de, bazofil reaktivite (maksimal aktivasyon) ve sensitivitesinin (maksimal aktivasyonun yarısı) kombine değerlendirilmesine bağlıdır. Bu daha çok, alerjen-spesifik immunoterapinin monitörizasyonunda yararlıdır (16-18).

BAT'ın duyarlık, özgünlüğü ve erken İHR'da kullanılabilirliği stimülasyonun ana ilaç veya metabolitlerinin pür solüsyonlarıyla mı, yoksa ilaç-protein konjugatları ile mi yapıldığına bağlıdır. Testi etkileyen diğer faktörler olarak; stimulanın seçimi, stimülasyon protokolü, bakılan aktivasyon markırları, gating (kapılama) stratejisi ve cut-off oranının tanımlanması olarak sayılabilir (10, 15).

Erken İHR'ı Saptamada Bazofil Aktivasyon Testi

Literatürde BAT ile en çok çalışma yapılan alan ilaç alerjileri olup, bunlardan da en sık beta-laktam antibiyotik alerjileri araştırılmıştır. Burada literatürden değişik ilaç grupları ile yapılmış çalışmalar kısaca özetlenecektir (Tablo 1).

Antibiyotik Hipersensitivite Reaksiyonları

Beta-laktam Hipersensitivitesi

Tanıda en sık kullanılan deri testlerinin (prik ve intradermal) duyarlılığı %50-70 arasındadır. BAT duyarlılığı da çok değişken olup, median %50 (22-55) civarında ve özgünlüğü %79-100 arasındadır. BAT ve deri testi sonuçları her zaman örtüşmez. Pozitif deri testi BAT

tarafından %50-60 vakada doğrulanır. Deri testinin negatif bulunduğu 1/3 allerjik hasta da BAT tarafından yakalanabilir. BAT deri testlerinden olmasa bile, ilaç-spesifik IgE immunoassay testlerinden İHR'ı saptamada üstün kabul edilmektedir (8, 11). BAT, ilaç-spesifik IgE'nin gösterilemediği vakaları (beta-laktamaz inhibitörü klavulanik asid reaksiyonlarında olduğu gibi) da saptar. Bunlardan dolayı, BAT günümüzde deri testlerine komplementer bir test olarak kabul edilmektedir (8, 11, 19).

Kinolon Hipersensitivitesi

Kinolonlara karşı gelişen İHR'ların saptanmasında deri testleri kullanılabilmesine rağmen, test dozlarındaki meydana gelen cilt irritasyonundan dolayı yanlış pozitif reaksiyonlar oluşmakta, cilt testinin pozitif prediktif değerini iyice düşürüp tesadüfi sonuçlara kadar yaklaştırmaktadır. Yine bu ilaçlarda meydana gelen fotodegradasyon da yalancı negatif sonuçlara yol açar. Örneğin, florokinolon moksifloksasin reaksiyonlarını saptamak için yapılan BAT karanlıkta yapıldığında pozitif sonuçlar ikiye katlanır (8, 11). Literatürde bildirilen az sayıda çalışmada, kinolon alerjilerinde BAT duyarlılığı yine çok değişken olup, çalışmaların ortalaması %43 (0-100) ve özgünlüğün ortalaması ise %95 (90-100) saptanmıştır (11).

Nöromuskuler Bloker Ajan (NMBA) Hipersensitivitesi

Rokuronyum, vekuronyum, atrakuryum, cis-atrakuryum ve suk-sametonyum alerjileri %60 'ını oluşturur. Bunlar arasında çapraz reaksiyonlar da yaygındır. Deri testleri en güvenilir olarak kabul edilir ve diğer testler negatif ise, BAT kullanılır. Literatürde NMBA ile yapılan çalışmalarda, BAT duyarlılığı yine çok değişken olup, çalışmaların kabaca ortalaması %62 (36-92) civarında ve özgünlüğü ortalama %97 (81-100) arasındadır (11). Leysen ve ark. (20) yüzdört hastalık büyük bir gruptaki çalışmasında deri testi, BAT ve ilaç-spesifik IgE (ImmunoCAP) testlerinin hepsi kullanılarak rokuronyum için pozitif prediktif değer %98 olarak bulunmuştur.

Radyokontrast Madde (RKM) Hipersensitivitesi

Radyokontrast Madde (RKM) hipersensitivitesini saptamada deri testleri, provokasyon testi ve BAT teşhis yöntemleridir. Literatürde bildirilen çalışmalarda, BAT duyarlılığı yine çok değişken olup, medyanı %60 (46-100) ve özgünlüğü %95 (89-100) civarındadır. Deri testleri ve ilaç provokasyon testi arasında iyi bir korelasyon tespit edilmiştir. BAT bu yöntemlere komplementer bir test olarak kabul edilir (11).

Diğer İlaçlar (Platin- içeren Kemoterapötik) ve Biyolojik Ajanlara Hipersensitivite

Bu tür ilaç alerjilerinde az sayıda hastada ilaç-spesifik IgE rol oynamasına rağmen, BAT ciddi erken İHR'larında reaksiyon farmakolojik (IgE-aracılı olmayan) mekanizma ile bile olsa faydalıdır (11). Kemoterapötik ve biyolojik ajan hipersensitivitesi ile ilgili literatürde bildirilen çalışmalarda, BAT duyarlılığı yine çok değişken olup medyan %75 (67-100) ve özgünlüğü %90 (82-100) civarındadır (11).

Analjezik / NSAID Hipersensitivitesi

Pirazolon'a IgE-aracılı alerjiyi saptamada kullanılan BAT'ın duyarlılığı %42-55 ve özgünlüğü %86-100 arasında bulunmuştur. Aspirin'e karşı alerjiye CD63 ekspresyonu ile bakıldığında: duyarlılığı %30-78 ve özgünlüğü %40-100; CD203c ekspresyonu ile bakıldığında ise %17-70 ve %45-100 arasında idi. NSAID hipersensitivitesine bağlı respiratuar semptomların olduğu vakalarda (NERD) BAT duyarlılığı %30-78, cilt semptomlu /ürtiker-anjiödemli vakalarda (NECD ve NIUA) %37-100 bulunmuştur. BAT özgünlüğü NERD için %40-83, cilt semptomlu olanlarda (NECD ve NIUA) %31-90 arasında saptanmıştır (8).

NSAID reaksiyonlarında kullanılmasına rağmen bazofil aktivasyonunun nasıl meydana geldiği ile ilgili belirsizlik vardır. Nonspesifik cevaba yol açabilen bu ilaçların toksik konsantrasyonları testlerde kullanılmamalıdır (21). Yüksek konsantrasyonda (5 mg/mL) NSAID ile bazofil aktivasyonu belli derecede ilacı tolere edenlerde bile oluşabilir (8). EAACI position paper'ına göre, NSAID hipersensitivitesinde reaksiyon zamanı ve test arasında 18 aydan daha kısa zaman olmalıdır (8). NSAID hipersensitivitesini saptamada, aktivasyon markırı olarak ne CD203c'nin CD63 ile, ne de CAST ile kombinasyonu testin duyarlık ve özgünlüğü artırmamıştır. Bazofillerin CCR3 ve CD203c kombinasyonunun sitometride tanımlayıcı olarak seçilmesi BAT duyarlılığını artırır (8).

Erken İHR'dan İlaça Bağlı Anafilakside Kullanımı

Kim ve ark. (22) tarafından bildirilen çalışmada, ilaca-bağlı gelişen anafilakside kullanımı yararlı ve güvenilir bulunmuştur. Bu çalışmada 48 yaş ortalamasında, 19 hasta (9 erkek+10 kadın), orta-şiddetli (beşi şiddetli) ilaca bağlı anafilaksi öyküsü ile çalışmaya alınmıştır. Anafilaksi geliştiren ilaçlar sefalosporin, kas gevşetici ve H2 blokerleri idi. Deri testlerine (prik: %42, intradermal: %58) benzer şekilde BAT hastaların %58'inde pozitif sonuç verdi. Bazofillerde her iki (CD63 ve CD203c) aktivasyon markırına bakıldığında pozitiflik %74'e ulaşmıştır. Çalışma sonucuna göre, hızlı-güvenilir bir test yöntemi olarak bulunmuştur.

Erken İHR'de BAT Kullanımı Konusundaki Derleme

Mangodt ve ark. (11, 12) 2015 yılındaki derlemesinde; NMBA, anti-biyotikler, NSAID ve iyotlu RKM'ye karşı gelişene allerjilerde yararlı bir teşhis aracı olarak görülmüştür. Kinolon ve NSAID dışındaki ilaç alerjilerinde; genelde duyarlılığı %50-60, özgünlüğünün ise %80'lere ulaştığı belirtilmiştir. Test protokollerini optimize etmek ve ilaç alerjilerinde geçerliliğini göstermek için, geniş çapta işbirliğine ihtiyaç duyulduğu da vurgulanmıştır.

BAT Kullanımı Konusundaki ENDA/EAACI Pozisyon Paper'ı (Görüş Belgesi)

ENDA / EAACI ilaç alerjisi interest (meraklı) grubunun İHR'da in vitro testlerin önemi üzerine olan 2016 yılındaki görüş belgesinde, literatürdeki değişik çalışmalardan örnekler verilerek bu konudaki literatür irdelenmiştir. BAT için kanıt ve öneri düzeyi: "2B" olarak verilmiştir (8).

Teknik öneriler bölümünde; kite dayalı testlerin ticari olarak yapılabilmesine rağmen, 'standardize edilemediği' söylenmektedir (8). Laboratuvarlar arasında kullanılan test protokollerini, belirteçler, prosedürler ve ilaç konsantrasyonları açısından farklılıklar vardır. Yine ilaç-spesifik IgE zamanla azalacağından in vitro BAT testinin reaksiyon oluştuktan sonraki en geç üç yıl içinde yapılması gereklidir. Vakaların %10'unda normal test prosedürlerine cevapsızlık (non-responder vaka) olduğu da bilinmekte olup, BAT sonuçları yorumlanamaz (8).

Klinik öneriler kısmında; 'beta-laktam antibiyotik ve NMBA reaksiyonlarının teşhisinde BAT önerilir ve diğer invitro testlere komplementer olabilir' denilmektedir. IgE- aracılı pirazolon, florokinolon ve RKM'lere allerjik reaksiyonlarının teşhisinde BAT önerilebilir' denilmektedir. Non-allerjik NSAID hipersensitivitesi teşhisinde düşük özgünlüğünden dolayı sınırlı değerinin olduğu bildirilmektedir (8).

BAT'a Alternatif Metot: HistaFlow

Teknik olarak bazofilden histamin salınımını tek hücre düzeyinde enzim histaminaz diamin oksidaz (DAO) affinite metodu ile multi-kolor akım sitometrik ölçülmesi olarak tarif edilmektedir (23, 24). HistaFlow aynı zamanda aktivasyon markırına ilaveten ve histamin salınımının analizine dayanan bir metottur. Tek hücre düzeyinde, bazofillerde farklı aktivasyon ve degranulasyon durumunun varlığını doğrulayabilir. Histaflow metodu son dekatta geliştirilmesine rağmen, alerjide kullanımı günümüzde BAT gibi sınırlı olarak kalmıştır.

HistaFlow Tekniğinin In vitro Ortamda Hazırlanması

Yukarıda anlatılan BAT metoduna ilaveten, intrasellüler histamini boyamak için: monoklonal antikolar konulduktan sonra, 2 mL Phosflow Lyse / Fix buffer ile 20 dakikada (37°C) hücrelerin permeabilizasyon ve fiksasyonu sağlanır. Hücreler 0,1% Triton-X-100 içerikli PBS (PBS-TX) ile yıkanır ve yeniden süspansiyon haline getirilir. Daha sonra 10µL PE-etiketli DAO ilave edilir, 37°C'de, 45 dakikada inkube edilir. Hücreler 0,1% sodyum azid içeren PBS ile yıkanır, yeniden süspansiyon haline getirilir ve ölçüm yapılır (22). Böylece, florokromla konjuge DAO ile histamin boyanır. Aktivasyon öncesi ve sonrasında hücre içinde histamin salınımı görülmüş olur (23-25).

Cop ve ark. (9) rokuronyum gibi bir ilaca karşı gelişen IgE-aracılı bazofil hücrelerinin reaksiyonlarında güvenilirliğini göstermişlerdir. 10 hasta ve 3 kontrolü olan bu çalışmada; her kişide 2 değişik dozla HistaFlow testi uygulandı. Hastalar optimal konsantrasyondaki rokuronyuma maruz kaldıktan sonra, kontrolde aktivasyon görülmemesine rağmen, %11-86 arasında CD63 ekspresyonu ve %68-100 arasında histamin salınımı gösterdi. Tek hücre düzeyinde bazofilden histamin salınımının Histaflow metodunun kullanımı ile akım sitometrik ölçülmesi güvenli bulunmuştur.

Sonuç

HistaFlow metot olarak literatürdeki çalışmalarda erken İHR saptamada BAT'tan kısmen daha üstün gözükmektedir. Yakın gelecekte birbirini tamamlayan bu testlerin ilaç ve diğer allerjik hastalıkların teşhis ve tedavisinde yeni geliştirilen tekniklerle gerektiği yeri ve önemini kazanacağını düşünmekteyiz.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the author.

Financial Disclosure: The author declared that this study has received no financial support.

Kaynaklar

- Dona I, Barrionuevo E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Fernandez TD, Mayorga C, et al. Trends in hypersensitivity drug reactions: more drugs, more response patterns, more heterogeneity. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2014; 24: 143-53.
- Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR. Role of drug disposition in drug hypersensitivity: a chemical, molecular, and clinical perspective. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 969-88. [\[CrossRef\]](#)
- Pichler WJ, Beeler A, Keller M, Lerch M, Posadas S, Schmid D, et al. Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int* 2006; 55: 17-25. [\[CrossRef\]](#)
- Romano A, Torres MJ, Castells M, Sanz ML, Blanca M. Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 67-73. [\[CrossRef\]](#)
- Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, et al. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy* 2003; 58: 854-63. [\[CrossRef\]](#)
- Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA, et al. International Consensus on drug allergy. *Allergy* 2014; 69: 420-37. [\[CrossRef\]](#)
- Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 328-38. [\[CrossRef\]](#)
- Mayorga C, Celik G, Rouzairé P, Whitaker P, Bonadonna P, Rodrigues-Cernadas J, et al. In vitro tests for drug hypersensitivity reactions: an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy* 2016; 71: 1103-34. [\[CrossRef\]](#)
- Cop N, Uyttebroek AP, Sabato V, Bridts CH, De Clerck LS, Ebo DG. Flow cytometric analysis of drug-Induced basophil histamine release. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90: 285-8. [\[CrossRef\]](#)
- Steiner M, Harrer A, Himly M. Basophil reactivity as biomarker in immediate drug hypersensitivity reactions-potential and limitations. *Front Pharmacol* 2016; 7: 171. [\[CrossRef\]](#)
- Mangodt EA, Van Gasse AL, Bastiaensen A, Decuyper II, Uyttebroek A, Faber M, et al. Flow-assisted basophil activation tests in immediate drug hypersensitivity: two decades of Antwerp experience. *Acta Clin Belg* 2016; 71: 19-25. [\[CrossRef\]](#)
- Mangodt EA, Van Gasse AL, Decuyper I, Uyttebroek A, Faber MA, Sabato V, et al. In vitro diagnosis of immediate drug hypersensitivity: should we go with the flow. *Int Arch Allergy Immunol* 2015; 168: 3-12. [\[CrossRef\]](#)
- Hausmann OV, Gentinetta T, Bridts CH, Ebo DG. The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29: 555-66. [\[CrossRef\]](#)
- Sturm EM, Kranzelbinder B, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W, Sturm GJ. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78: 308-18. [\[CrossRef\]](#)
- De Week AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; 18:143-55.
- González-Munoz M, Villota J, Moneo I. Analysis of basophil activation by flow cytometry in pediatric house dust mite allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 342-7. [\[CrossRef\]](#)
- Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 2004; 59: 1102-9. [\[CrossRef\]](#)
- Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS, et al. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72: 196-203. [\[CrossRef\]](#)
- Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, Gaouar H, Autegarden JE, Leynadier F, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 921-8. [\[CrossRef\]](#)
- Leysen J, Bridts CH, De Clerck LS, Vercauteren M, Lambert J, Weyler JJ, et al. Allergy to rocuronium: from clinical suspicion to correct diagnosis. *Allergy* 2011; 66: 1014-9. [\[CrossRef\]](#)
- Bavbek S, İkinciöğulları A, Dursun AB, Guloğlu D, Arıkan M, Elhan AH, et al. Upregulation of CD63 or CD203c alone or in combination is not sensitive in the diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug intolerance. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 150: 261-70. [\[CrossRef\]](#)
- Kim SY, Kim JH, Jang YS, Choi JH, Park S, Hwang YI, et al. The basophil activation test is safe and useful for confirming drug-induced anaphylaxis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016; 8: 541-4. [\[CrossRef\]](#)
- Ebo DG, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Stevens WJ, De Clerck LS. Analyzing histamine release by flow cytometry (HistaFlow): a novel instrument to study the degranulation patterns of basophils. *J Immunol Methods* 2012; 375: 30-8. [\[CrossRef\]](#)
- Nullens S, Sabato V, Faber M, Leysen J, Bridts CH, De Clerck LS, et al. Basophilic histamine content and release during venom immunotherapy: insights by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84: 173-8. [\[CrossRef\]](#)
- Shamji MH, Layhadi JA, Scadding GW, Cheung DK, Calderon MA, Turka LA, et al. Basophil expression of diamine oxidase: A novel biomarker of allergen immunotherapy response. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 913-21. [\[CrossRef\]](#)

Cite this article as: Özdemir Ö. Basophil activation in immediate drug hypersensitivity reactions and Basophil Activation Test (BAT). *Istanbul Med J* 2017; 18: 109-13.