

Basofilaktiveringstestet CD-sens

– den allergiska patienten i ett provrör

ANNA NOPP, Karolinska Institutet, Stockholm

SAMMANFATTNING

De basofila granulocyterna i blodet har specifika Fc-receptorer på cellytan som binder till sig IgE. Hos allergiska personer är en del av dessa IgE-molekyler antikroppar riktade mot ett eller fler olika allergen. Om ett bivalent allergen träffar på två IgE-antikroppar på basofilens cellyta korsbinds dessa och om c:a 1000 sådana bryggor bildas kommer basofilens cellyta att aktiveras och frisätta en mängd olika substanser, däribland histamin, som ger en inflammation. Vid samma process exponeras även CD63 på cellytan och kan mätas med t.ex. en flödescytometer.

CD-sens används som ett mått på basofilens allergenkänslighet och anger hur mycket allergen som går åt för att aktivera basofilens. Ju mindre allergen som behövs desto känsligare är personens basofiler för allergenet och risken ökar att patienten kommer att reagera med kliniska besvär vid kontakt med allergenet.

CD-sens är ett enkelt, ofarligt och förhållandevis billigt sätt att reproducerbart mäta allergenkänsligheten hos en individ. Analysen stämmer väl överens med resultaten från andra mer traditionella metoder som IgE-antikroppsmätningar, hudpricktester och provokationer och är hittills det enda reproducerbara sättet för att objektivt mäta t.ex. effekten av en behandling riktad mot en IgE-sensibilisering.

Anna Nopp, med. dr. och forskar vid Enheten för klinisk immunologi och allergi, Karolinska Institutet och Universitetssjukhuset Solna.

KONTAKTADRESS:

Anna Nopp
Enheten för klinisk immunologi och allergi
L2:04
Karolinska Universitetssjukhuset Solna
SE 171 76 Stockholm
anna.nopp@ki.se

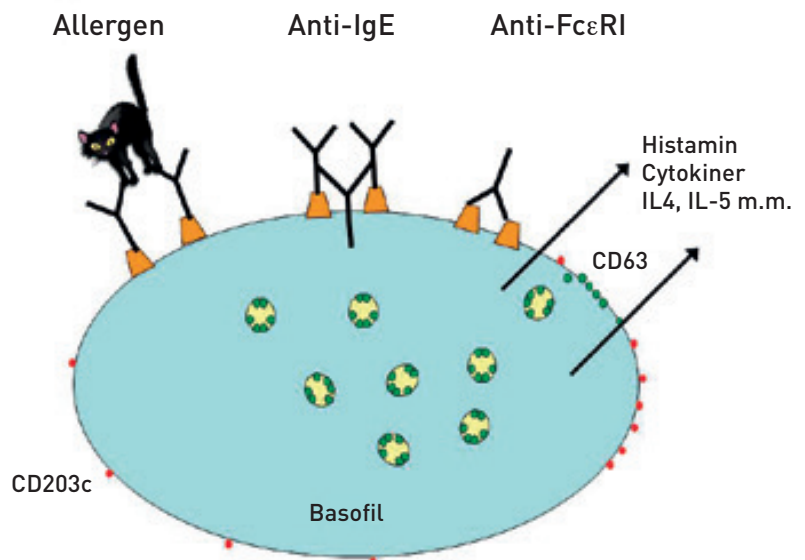
Den basofila granulocyten är den vanligaste leukocyten i cirkulationen, ca 0,5% i normalfallet, men kan snabbt öka i antal efter inflammatoriska signaler. Basofilerna genereras i benmärgen och vandrar vidare till blodet som fullt mogna celler (1), där de p.g.a. sin korta livscykel enbart överlever 1–2 dagar (2). Basofilens är en släkting till mastcellen men finns, till skillnad från den vävnadsbundna mastcellen, lätt tillgänglig i cirkulationen.

Basofilens allergenkänslighet

Vad gäller allergenkänslighet är basofiler och mastceller mycket lika.

Båda cellsorterna har IgE-receptorer på cellytan och det finns en relation mellan koncentrationen IgE i plasma och antalet IgE-receptorer, och alltså IgE-molekyler, på cellytan. Den procentuella fördelningen IgE-antikroppar av IgE i plasma och på cellytan är också densamma. När IgE-antikroppar mot ett bivalent allergen, bundna till sina receptorer, binder sig till sitt allergen bildas bryggor (FIGUR 1). Det krävs c:a 1 000 allergen-IgE-antikroppsbryggor för att stimulera basofilens eller mastcellens att frisätta de inflammatoriska mediatorerna, t.ex. histamin och cytokiner (3). Dessa 1000 bryggor kan bestå av IgE-antikroppar mot ett eller

FIGUR 1. På basofilens yta finns IgE-receptorer och basofilens aktiveras genom korsbindning av två IgE-antikroppar med aktuellt allergen eller med anti-IgE eller anti-FcεRI. De två senaste varianterna görs enbart in vitro på lab. När basofilens aktiveras kommer granula i cellen att smälta samman med cellytan och frisätta en mängd olika mediatorer däribland histamin och cytokiner. I denna process kommer även CD63 att exponeras på cellytan och den kan användas för att mäta basofilaktivitet. På cellytan uttrycks kontinuerligt CD203c och denna basofilspecifika markör möjliggör identifiering av basofilerna t.ex. i en flödescytometer.

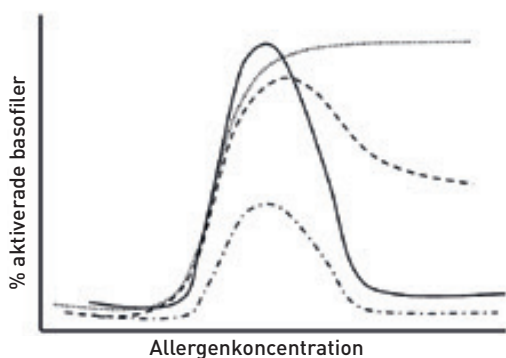




CD-sens har under de senaste åren vidareutvecklats på Karolinska Institutet och testats i många olika sammanhang. Analysen utförs i dagsläget på Karolinska Universitetssjukhuset i Solna. FOTO: MEDICINSK BILD/ PÅ KAROLINSKA UNIVERSITETSSJUKHUSET

mot flera olika allergen som patienten samtidigt exponeras för och vid klinisk utvärdering bör man därför addera dessa icke-korsreagerande IgE-antikroppars koncentrationer (4). Under många år var basofilen en gåtfull immuncell som förutom det låga antalet och den korta överlevnaden också var tekniskt svår att identifiera i blodet. Tack vare utvecklandet av bra flödescytometrar och markörer t.ex. CD203c (5) har basofilen de senaste 10 åren blivit allt mer intressant och viktig vid allergidiagnostik och behandlingsuppföljning. Basofilens korta överlevnad, som tidigare ansågs vara ett problem,

FIGUR 2. Basofilens reaktionsmönster kan skilja sig mellan olika allergen och olika individer men det som anger basofilens allergenkänslighet är den lägsta allergenkonzentration vid vilken de aktiveras. Basofilens reaktivitet (höjden på kurvan) har ännu inte påvisats ha någon klinisk relevans.



kan nu istället ses som en fördel då den avspeglar det aktuella läget i kroppen.

Basofilens reaktionsmönster

När basofilen stimuleras med allergen kommer cellen att degranulera och frisätta bl.a. histamin och cytokiner. I samband med histamin-frisättningen exponeras på cellens yta en struktur, CD63, som kan spåras med flödescytometri (6). CD63-exponeringen är alltså ett alternativ till att påvisa att IgE-antikroppar stimulerat cellerna att initiera en allergisk inflammation med histaminfrisättning som följd (FIGUR 1).

Basofilens reaktionsmönster kan variera från person till person och från allergen till allergen. Basofilens allergenkänslighet bedöms av den minsta allergenkonzentration cellen reagerar på, och det är den som avgör hur känslig en individ är för allergenet (7–8). Basofilens reaktivitet, dvs. hur stor andelen basofiler som aktiveras och höjden på kurvan, har hittills inte visats ha någon relation till patientens allergenkänslighet (FIGUR 2) (7–9).

CD-sens-metoden

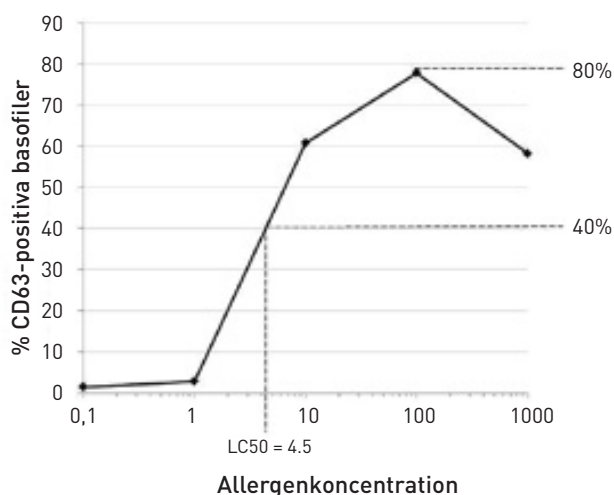
Till denna analys används blod med heparin som antikoagulantia eftersom basofilens degranulering är

beroende av en intakt calciumnivå. Blodet stimuleras med RPMI (negativ kontroll), anti-FcεRI (positiv kontroll) eller allergen i minskande doser vid +37°C i 20 minuter. Aktiveringen avslutas genom att sätta rören på is. Därefter tillsätts antikropparna CD203c (basofilspecifik markör) och CD63 (aktivitetsmarkör) och inkuberas till sammans med cellerna i 25 min. Testen avslutas med hemolysering av erytrocyterna och tvätt av leukocyterna innan de slutligen analyseras i en flödescytometer (8,10).

Definition av CD-sens

Om basofiler med t.ex. IgE-antikroppar mot katt stimuleras med sjunkande doser kattextrakt får man en dos-respons kurva för antalet CD63-positiva celler (FIGUR 3, SE SIDAN 32). Ju lägre allergendos som behövs för att stimulera basofilerna desto känsligare är de, och i förlängningen patienten, för detta allergen. Vi har valt att uttrycka denna allergenkänslighet som det inverterade värdet för den lägsta allergendos som ger 50% (LC50) av maximal uppreglering av CD63 och har döpt värdet till CD-sens d.v.s. $(1/LC50) \times 100$ (= $100/LC50$) (10–11). Som en konsekvens av inverteringen får vi att högre CD-sens innebär högre allergenkänslighet.





FIGUR 3. CD-sens är ett sätt att ange allergenkänsligheten och beräknas $(1/LC50) \times 100 (= 100/LC50)$.

Non- och low-responders

Det finns individer (<5%) som trots att de har IgE-antikroppar på basofilens yta inte kan aktivera sina celler med aktuellt allergen. Dessa individer kallas non-responders (11–13). Ytterligare en grupp av individer är s.k. low-responders och dessa svarar mycket svagt på stimulering (11). Båda dessa grupper är svåra att utvärdera med en basofiltest och bör därför även utredas med andra metoder. Vad som påverkar en basofil att bli en non- eller low-responder är inte känt och inte heller om detta är ett övergående eller bestående fenomen. Det är heller inte känt om detta fenomen även påverkar personens mastceller.

Reproducerbarhet och stabilitet

Reproducerbarheten av CD-sens-metoden har testats och visats vara mycket bra och där intra assay variationen var c:a 13% och inter assay variationen var 5,5% (8). Vid upprepade provtagning med en veckas

mellanrum ökade variationen till 25% men i detta ingår också den biologiska variationen (9).

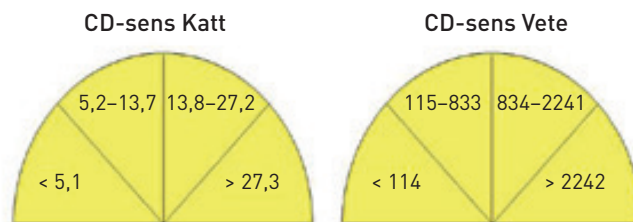
Basofilerna är stabila i ett blodprov och förvaring i kylskåp över natten möjliggör transport av ett blodprov från en del av landet till en annan. Det bör observeras att vid rutinmässig användning av CD-sens-analysen måste blodprovet analyseras inom 24–48 timmar, och att patienten några dagar före provtagningen bör avstå perorala steroider eller höga doser antihistamin.

Allergen

Vi har utfört CD-sens mot ett 25-tal olika allergen inom grupperna pollen, djurepitel, födoämnen, allergenkomponenter och läkemedel (TABELL 1). Vid denna analys, precis som vid alla analyser som innefattar allergenextrakt, är det viktigt att komma ihåg att det svar man får i analysen är direkt beroende av styrkan på allergenextraktet. Det är mycket svårt, eller till och med omöjligt, att i dagsläget få tag på bra allergenpreparationer och tyvärr är även de kommersiella

allergenextrakten så dåligt standardiserade att det inte går att jämföra CD-sens-siffran mellan olika allergen (TABELL 2). Det går däremot alldeles utmärkt att jämföra CD-sens-siffran mellan olika individer för ett och samma allergenextrakt. Det gör det möjligt för oss att beräkna ett referensområde för de vanligaste förekommande allergenerna och att använda det kliniskt för bedömning av prover (FIGUR 4).

Ett sätt att komma runt problemet med dåligt standardiserade allergenextrakt skulle kunna vara att använda rekombinanta proteiner i stället. I en del fall t.ex. för Bet v 1 (björk) eller Ara h 2 (jordnöt) kan det fungera bra, men i många fall finns ett flertal svårigheter. Det kan vara svårt att få tillgång till sådana proteiner, de är dyra, många olika rekombinanta proteiner måste kombineras, men framför allt kan de vara tekniskt svåra att hantera. Då proteinkoncentrationen är mycket låg finns en risk att proteinet kan bindas till platen i provrören, vilket då gör det svårt att ha kontroll på den exakta allergenmängden. Ett annat problem



0–25% = Låg basofil allergenkänslighet
26–50% = Måttlig basofil allergenkänslighet
51–75% = Hög basofil allergenkänslighet
>75% = Mycket hög basofil allergenkänslighet

FIGUR 4. Exempel på referensområden från Karolinska Universitetssjukhuset i Solna, Sverige, för klinisk bedömning av CD-sens. CD-sens-siffrorna är direkt beroende av styrkan på allergenextrakten. Det går därför inte att jämföra CD-sens-siffran mellan olika allergen, däremot går det alldeles utmärkt att jämföra CD-sens-siffran mellan olika individer för ett och samma allergen.

LUFTVÄGSALLERGEN	FÖDOÄMNET	LÄKEMEDEL	KOMPONENTER	ÖVRIGT
Björk	Mjök	Penicillin	Bet v 1	SAE
Timotej	Ägg	Patent Blå	Ara h 1-9	Aspergillus
Katt	Vete	Fluorescein	Hev b 1-11	Bi
Hund	Soja	NMBA	Tri a 19	Geting
Häst	Jordnöt		Gly m 4	
Kvalster	Hasselnöt			

TABELL 1. Exempel på allergen använda i CD-sens

TABELL 2. CD-sens i tre grupper av patienter. CD-sens-siffrorna är direkt beroende av styrkan på allergenextrakten.

ALLERGEN	ANTAL PATIENTER	GEOM. MEDELVÄRDE	+/- 2 SD
Björk	37	1	0,03-34
Katt	16	5	0,1-244
Timotej	27	16	1-325

är att många rekombinanta proteiner måste befinna sig i en miljö, t.ex. pH eller lösningsmedel, som inte fungerar tillsammans med levande celler.

Jämförelse mellan CD-sens och andra metoder

Vid jämförelse mellan CD-sens och allergenkänslighet mätt som hudprickstitrering (8), nasal provokation (8) och bronkial inhalation med allergen titrering får man en mycket god korrelation (9). Studier med jämförelser av födoämnesprovokationer med jordnöt har också utförts med mycket goda resultat för positivt/negativt utfall i de båda testerna (11).

Användningsområden

CD-sens har under de senaste 10 åren vidareutvecklats på Karolinska Institutet/Universitetssjukhuset och testats i många olika sammanhang. Analysen utförs i dagsläget på Karolinska Universitetssjukhuset i Solna, Sverige, men diskussioner pågår angående möjlighet till CD-sens-analys även i Lund, Göteborg och Uppsala, samt i Norge och Danmark. Här beskrivs några av de områden där CD-sens kan användas.

Läkemedelsreaktioner:

Vid diagnostik av läkemedelsreaktioner kan CD-sens vara ett bra komplement då andra lämpliga alternativ helt enkelt saknas t.ex. då patientens reaktion var så kraftig vid exponeringen att det vore oetiskt att testa igen eller då serologiska analyser inte är möjliga (14–15). Diagnostik av läkemedel är dock svårt av många olika anledningar. Det är inte alltid ursprungsläkemedlet som är allergenet utan det kan vara en nedbrytningsprodukt. En annan svårighet är att en del läkemedel består av en så liten molekyl (haptent) att den måste bindas till en bärare (carrier) för att tillsammans med denna bli ett fungerande allergen. Det kan då vara svårt att veta vad som verkligen är allergenet; haptentet eller kombinationen haptent-carrier. Ytterligare en svårighet är att en del läkemedel t.ex. NMBA (Neuro Muscular Blocking Agents, muskelrelaxantia) påverkar



CD-sens är ett enkelt och ofarligt sätt att mäta allergenkänsligheten hos en individ. Analysen stämmer väl överens med resultaten från andra mer traditionella metoder som IgE-antikroppsmätningar, hudpricktester och födoämnesprovokationer med till exempel jordnöt. FOTO: COLOURBOX.COM

basofilen kemiskt utan att involvera IgE-antikroppar. För att utesluta sådana reaktioner är det mycket viktigt att noggrant stimulera cellerna med flera olika koncentrationer av allergenet för att få en dos-responskurva. CD-sens-analys är dock helt riskfri för patienten då ett blodprov är det enda som behövs och vid de tillfällen en positiv basofilstimulering erhålls tillför det mycket viktig information för den fortsatta behandlingsstrategin av patienten.

Provokationer:

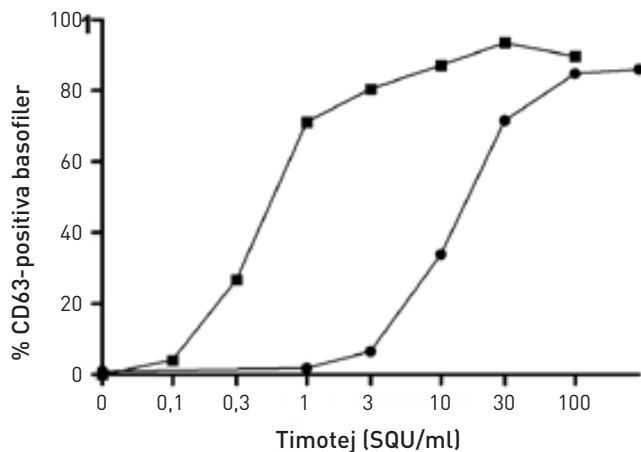
Vid diagnostik och utredning av allergier anses provokationer t.ex. bronkial-, nasal- och födoämnesprovokationer, vara «gold standard». Dessa undersökningar anses visa hur patienten verkligen reagerar när den kommer i kontakt med ett allergen. Det finns dock ett flertal problem med dessa metoder. De utförs på få platser i landet, är alla mycket resurskrävande både i form av tid och pengar, resultaten kan påverkas mycket av patientens förväntningar och rädsla och de är heller inte ofarliga för patienten då det finns risk för allvarliga reaktioner. Ett annat problem är att reproducerbarheten för dessa metoder hittills är dåligt undersökta. Vi har vid jämförelser mellan CD-sens och bronkialprovokationer funnit en mycket bra korrelation mellan allergenkänslig-

heten hos de två metoderna (9). Däremot korrelerar inte CD-sens med den ospecifika bronkiella hyperreaktiviteten mätt t.ex. med metakolin. CD-sens skulle därför kunna användas som ett komplement eller ersätta denna typ av analyser t.ex. vid studier av nya läkemedel. Vid jämförelser mellan CD-sens och DBPCFC (Double Blind Placebo Controlled Food Challenge, födoämnesprovokation) mot jordnöt har mycket god överensstämmelse erhållits vad gäller positiv och negativ provokation (11). Däremot var reproducerbarheten av DBPCFC för dålig för att möjliggöra en bedömning av graden av allergenkänslighet (16). Fortsatta studier inom detta område pågår.

Följ ett förlopp över tid:

Det område där CD-sens troligtvis kommer att ha störst värde är då man vill följa ett förlopp över tid t.ex. för att utvärdera behandlingsstart eller behandlingsutsättning, eller för att följa naturlig toleransutveckling t.ex. hos barn. Allergenspecifik immunterapi (ASIT) är i dagsläget den enda sjukdomsmodifierande behandlingen som finns. Vid denna behandling går det mycket bra att följa effekten med CD-sens (17). Det är dock viktigt att påpeka att vi inte vid något tillfälle har sett att basofilens reaktionen helt





FIGUR 5. Förändring i timotej-CD-sens före (■) och efter (●) 16 veckors behandling med ASIT.

släcks ut, men den kan minskas kraftigt (FIGUR 5).

Vid studier med Xolair (omalizumab) finns det, till skillnad från vad vi sett vid ASIT-behandling, en mycket god möjlighet att helt släcka ut den allergiska reaktionen under förutsättning att den är medierad av IgE-antikroppar (FIGUR 6A) (18). Xolair, som är en humaniserad monoklonal antikropp mot IgE, binder upp fritt cirkulerande IgE vilket medför att antalet IgE-receptorer på basofilens och mastcellens yta minskar, då det alltid är en balans mellan dessa två. Om mängden IgE-receptorer minskar på cellytan minskas också andelen platser för IgE-antikropparna att binda och risken för att en allergisk reaktion kan starta (3). I de fall doseringen efter doseringstabellen inte ger full verkan kan man överväga att höja dosen för bättre effekt (FIGUR 6B) (19). Detta är dock något som varje enskild kliniker måste ta ställning till.

Summering

CD-sens är ett enkelt, ofarligt och förhållandevis billigt sätt att reprodu-

cerbart mäta allergenkänsligheten hos en individ. Analysen stämmer väl överens med resultaten från andra mer traditionella metoder som IgE-antikroppsmätningar, hudpricktester och provokationer och är hittills det enda reproducerbara sättet för att objektivt mäta t.ex. effekten av en behandling riktad mot en IgE-sensibilisering.

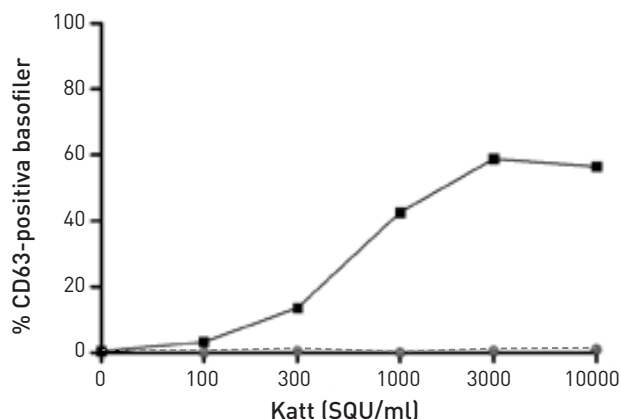
REFERENSER

1. Falcone FH, Zillikens D, Gibbs BF. The 21st century of the basophil? Current insights into its role in allergic responses in innate immunity. *Exp Dermatol* 2006; 15: 855–64.
2. Ohnmacht C, Voehringer D. Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood* 2009; 113: 2816–25.
3. MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Down-regulation of FcεRI expression in human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol* 1997; 158: 1438–45.
4. Nopp A, S.G.O. Johansson, Lundberg M, Öman H. Simultaneous exposure of several allergens has an additive effect on multisensitized basophils. *Allergy* 2006 ;61: 1366–8.
5. Bühring H-J, Simmons PJ, Pudney M, Müller R, Jarrossay D, van Agthoven A, Wilhelm M, Brugger W, Valent P, Kanz L. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; 94: 2343–56.
6. 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.

7. MacGlashan DW Jr, Releasability of human basophils: cellular sensitivity and maximal histamine release are independent variables. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 605–15.
8. Nopp A, Johansson S.G.O., Ankerst J, Bylin G, Cardell L.O., Grönneberg R, Irander K, Palmqvist M, Öman H. Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy* 2006; 61: 298–302.
9. Dahlén B, Nopp A, Johansson S.G.O., Edwards M, Skedinger M, Adéyoin J. Basophil allergen threshold sensitivity, CD-sens, is a measure of allergen-sensitivity in asthma. *Clin Exp Allergy* 2011; 41: 1091–7.
10. Johansson S.G.O., Nopp A, van Hage M, Olofsson N, Lundahl J, Wehlin L, Söderström L, Stiller V, Öman H. Passive IgE-sensitization by blood transfusion. *Allergy* 2005; 60: 1192–9.
11. Glaumann S, Nopp A, Johansson S.G.O., Rudengren M, Borres MP, Nilsson C. Basophil allergen threshold sensitivity, CD-sens, IgE-sensitization and DBPCFC in peanut-sensitized children. *Allergy* 2012; 67: 242–7.
12. Rubio A, Vivinus-Nebot M, Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy* 2011; 66: 92–100.
13. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, Mascart F, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1234–45.
14. Johansson S.G.O., Nopp A, Öman H, Stahl-Skov P, Hunting AS, Guttormsen AB. Anaphylaxis to Patent Blue V. II. A unique IgE-mediated reaction. *Allergy* 2010; 65: 124–9.
15. Breidablik A, De Pater GH, Walther C Nopp A, Guttormsen AB. Intravenous fluorescein as a cause of immunoglobulin E-mediated anaphylactic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012; 56: 1066–8.
16. Glaumann S, Nopp A, Johansson S.G.O., Borres MP, Nilsson C. Oral peanut challenge identifies an allergy but the peanut allergen threshold sensitivity is not reproducible. *PLoS ONE* 2013; 8(1): e53465.
17. Nopp A, Cardell LO, Johansson S.G.O., Öman H. CD-sens, a biological measure of immunological changes stimulated by ASIT. *Allergy* 2009; 64: 811–4.
18. Johansson S.G.O., Nopp A, Öman H, Ankerst J, Cardell L.O., Grönneberg R, Matsols H, Ruddlad S, Strand V, Stålenheim G. The size of the disease relevant IgE antibody fraction in relation to "total-IgE" predicts the efficacy of anti-IgE (Xolair®) treatment. *Allergy* 2009; 64: 1472–7.
19. Ankerst J, Nopp A, Johansson S.G.O., Adéyoin J, Öman H. Xolair is effective in allergics with a low serum IgE level. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 152: 71–4.

FIGUR 6A. Förändring i katt-CD-sens före (■) och efter (●) 16 veckors behandling med Xolair enligt doseringsschema.



FIGUR 6B. Förändring i katt-CD-sens hos två olika patienter efter behandling med Xolair i olika doser. Xolair-dosen måste dubblas för att nå optimal effekt.

