

Streszczenie

Wstęp

Na przestrzeni ostatnich lat można zaobserwować stały, dynamiczny wzrost częstości występowania chorób alergicznych. Aktualnie istnieje potrzeba wdrożenia diagnostyki o jak największej czułości i swoistości, ponieważ tylko prawidłowe rozpoznanie oraz zidentyfikowanie sprawczych alergenów, umożliwi podjęcie adekwatnych działań w tym względzie, przede wszystkim zastosowanie odpowiedniej profilaktyki oraz spersonalizowanej terapii. Od wielu lat złotym standardem w diagnostyce nadwrażliwości IgE-zależnej pozostają punktowe testy skórne, które jednak mają swoje wady i ograniczenia. Ważną i bezpieczną alternatywę w stosunku do metod „in vivo”, stanowią metody „in vitro”, przede wszystkim oznaczenie stężenia asIgE, ale również test aktywacji bazofila, który doskonale wpisuje się w zamysł medycyny precyzyjnej i ukierunkowanej molekularnie. Obecnie najczęściej wykorzystywanymi markerami aktywacji bazofilów są CD63 oraz w mniejszym stopniu CD203c. Należy jednak podkreślić, że żaden z nich nie osiąga absolutnej swoistości i czułości, nawet w przypadku alergii na alergeny wziewne. Alternatywą wartą uwagi, o prawdopodobnie co najmniej porównywalnej czułości i swoistości w stosunku do CD63, wydaje się być antygen CD164. Badania dotyczące znaczenia CD164 w diagnostyce chorób alergicznych jak dotąd mają jednak ograniczony zasięg i wymagają kontynuacji. W przedstawionym badaniu zaprezentowano nowy protokół BAT z zastosowaniem CD164 w diagnostyce alergii na *D. farinae* oraz dokonano bezpośredniego porównania uzyskanych wyników z obecnie najczęściej stosowanym markerem, tj. CD63, a także wynikami oznaczenia asIgE oraz punktowych testów skórnych.

Cel pracy

Głównym celem badania było określenie przydatności diagnostycznej testu aktywacji bazofila z oceną ekspresji markera powierzchniowego CD164 w diagnostyce alergii na *Dermatophagoides farinae* poprzez porównanie uzyskanych wyników z punktowymi testami skórnymi oraz oznaczeniem stężenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE i oceną ekspresji CD63. Kolejnym celem pracy było wykazanie, w jakim stopniu łączne zastosowanie testów podnosi możliwości laboratoryjne analizowanych metod diagnostycznych w badaniu alergii na *Dermatophagoides farinae*.

Material i metody

Badanie przeprowadzono u 28 pacjentów z alergią na roztocze kurzu domowego oraz u 26 zdrowych osób z grupy kontrolnej. U każdego z uczestników badania, po przeprowadzeniu dokładnego wywiadu połączonego z wypełnieniem kwestionariusza, wykonano punktowe testy skórne i oznaczono stężenie swoistych przeciwciał IgE oraz przeprowadzono testy aktywacji bazofilów z wykorzystaniem markerów CD63 oraz CD164. Identyfikacji populacji bazofilów dokonano przy zastosowaniu protokołu CCR3positive/SSClow, stymulacje nieswoiste bazofilów przeprowadzono stosując przeciwciało anti-IgE a swoiste przy użyciu alergenu *D. farinae* w trzech różnych stężeniach (AI = 225 ng/ml, AII = 22,5 ng/ml, AIII = 2,25 ng/ml). Definicję cut off point oparto na wykreśleniu oraz analizie krzywych ROC oraz oszacowaniu indeksu Youdena. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego R w wersji R – 4.1.2. oraz oprogramowania STATISTICA (wersja 13.3). Normalność parametrów została zweryfikowana testem Shapiro-Wilka. Porównania międzygrupowe zostały wykonane przy pomocy testów t dla grup niezależnych oraz testu U Manna-Whitneya. Zestawienia poszczególnych krzywych ROC dokonano przy pomocy testu DeLonga.

Wyniki

W teście aktywacji bazofila z CD63 średnio bramkowano 447 komórek (Me 424), natomiast z CD164, 471 (Me 440). Nie stwierdzono w tym zakresie istotnych statystycznie różnic pomiędzy testami ($p = 0,623$). U wszystkich uczestników badania, liczba aktywowanych bazofilów w próbkach niestymulowanych (Pb) była niska; dla testu z CD63 Me 1,95%; min 1,8%; max 3,45%, a dla testu z CD164 Me 2,04%; min 1,82%; max 2,2%. Pozytywną odpowiedź na stymulację przeciwciałem anti-IgE otrzymano u 51 osób ($n = 54$) dla testu z CD63 (Me 59,85%, Min 4,46%, Max 94,63%) oraz 52 osób dla testu z CD164 (Me 55,47%, Min 4,64%, Max 87,96%). Niedostateczną aktywacją bazofilów (non-responders) odpowiedziało 5,6% uczestników w teście aktywacji bazofila z CD63 oraz 3,7% populacji badanej w BAT z CD164.

W wyniku stymulacji swoistej, w grupie zdrowych uczestników średni poziom aktywacji bazofilów we wszystkich stężeniach alergenów był niski – 1,05% dla BAT z CD63 oraz 1,19% dla BAT z CD164. W grupie osób z alergią na *D. farinae* obserwowano zdecydowany wzrost komórek CD63 lub CD164 dodatnich (w porównaniu z grupą kontrolną różnica istotna statystycznie; $p < 0,001$). Największą średnią aktywację bazofili osiągnięto w obu testach BAT przypadku alergenu w najwyższym stężeniu – 225 ng/ml (AI) (dla BAT z CD63: Me 44,78%, Min 0%, Max 95,55%; dla BAT z CD164: Me 38,24%; Min 1,17%; Max 93,02%). Niższe

stężenie alergenu skutkowało spadkiem aktywacji. W obu testach BAT najwyższą wartość indeksu Youdena osiągnięto dla alergenu w najwyższym stężeniu tj. AI (0,81 oraz 0,92, odpowiednio dla BAT z CD63 i CD164). W przypadku BAT z CD164 przy wartości odcięcia 7,29% osiągnięto czułość 92,3% oraz 100% swoistość. Niższe stężenia alergenu skutkowały spadkiem czułości – do 88% dla próbki AII oraz 73,1% dla AIII, przy punktach odcięcia 8,13% oraz 5,98%. W teście aktywacji bazofila z CD63 maksymalna czułość była mniejsza niż w BAT z CD164 i wyniosła – 80,8% dla AI przy 100% swoistości oraz cut off 8,84%. W pozostałych próbkach stymulowanych alergenem osiągnięto czułość 73,1% oraz 42,4% (cut off kolejno 4,87% oraz 10,29%) oraz swoistość 96% oraz 100%. Dla oznaczenia asIgE czułość testu była nieco większa – 96,4% (cut off point 0,24 kU/l). Porównanie krzywych ROC i wartości AUC między testami o największej efektywności diagnostycznej (BAT z CD164 w zakresie stężenia AI oraz oznaczeniem asIgE) nie wykazało istotnie statystycznych różnic.

Przy zastosowaniu obu markerów – CD164 oraz CD63 osiągnięto niewielką zmianę czułości testu w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla pojedynczo stosowanego testu BAT z CD164. – tj. 92,8% versus 92,3% (swoistość wyniosła 100%). Połączenie testu aktywacji bazofila o największej efektywności tj. z zastosowaniem CD164 oraz oznaczenia stężenia asIgE pozwoliło na osiągnięcie 100% czułości i swoistości.

Wnioski

1. Test aktywacji bazofila z oceną ekspresji CD164 ma wysoką przydatność diagnostyczną w diagnostyce alergii na *Dermatophagoides farinae*. Czułość tego testu wynosi 92,3%, a swoistość 100%. Wartości te są równorzędne z badaniem stężenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE i oceną ekspresji CD63.
2. Łączne zastosowanie obu markerów aktywacji bazofilów - CD164 oraz CD63 nie przynosi korzyści w porównaniu z BAT opartym jedynie na protokole z CD164.
3. Kombinacja dwóch różnych metod „in vitro” - testu cytometrycznego z CD164 oraz oceny asIgE skutkuje zwiększeniem dokładności diagnostycznej w zakresie badanego profilu alergicznego i w przeciwieństwie do prób skojarzenia pozostałych testów pozwala na osiągnięcie 100% czułości i swoistości.

Summary

Introduction

In recent years, a steady, dynamic increase in the incidence of allergic diseases can be observed. Currently, there is a need for introducing diagnostics with the highest sensitivity and specificity, because only the identification of causative allergens enables the implementation of appropriate prophylaxis and personalized therapy. For many years, the gold standard in the diagnosis of IgE-mediated hypersensitivity has been skin prick tests, which however have their disadvantages and limitations. An alternative to “in vivo” methods is “in vitro” diagnostics, primarily the determination of allergen-specific IgE serum concentration, but also the basophil activation test, which fits perfectly into the concept of precision and molecularly targeted medicine. Currently, the most commonly used markers of basophil activation are CD63, and to a lesser extent CD203c. Nonetheless, it should be emphasized that none of them achieves absolute specificity and sensitivity, even in the case of allergies to inhalant allergens. An alternative worth considering, with probably at least comparable sensitivity and specificity to CD63, seems to be the CD164 antigen. However, research on the clinical significance of CD164 in the diagnosis of allergic diseases so far has limited scope and requires continuation. The presented study compares new basophil activation protocol using CD164 in patients with allergy to *D. farinae* with currently most commonly used marker – CD63, as well as sIgE and skin prick tests results.

Objectives

The main aim of the study was to determine the diagnostic usefulness of the basophil activation test with assessment of the surface marker CD164 expression in the diagnosis of *Dermatophagoides farinae* allergy, by comparing the results with those obtained from skin prick tests, determination of allergen-specific IgE antibodies, and evaluation of CD63 expression. Another aim of the study was to demonstrate to whether the combined use of these tests enhances the laboratory capabilities of the analyzed diagnostic methods in the assessment of *Dermatophagoides farinae* allergy.

Materials and methods

Twenty eight patients with a house dust mite allergy and twenty six healthy individuals as the control group were examined. First, the a detail history was taken combined with questionnaire completion. Then the participants underwent skin prick tests and the specific IgE antibodies serum concentrations were measured. Basophil activation tests using CD63 and CD164 markers were also performed. Basophil identification was based on the CCR3positive/SSClow protocol. Non-specific basophil stimulation was carried out using anti-IgE antibodies and specific stimulation using *D. farinae* allergen at three different concentrations (AI = 225 ng/ml, AII = 22.5 ng/ml, AIII = 2.25 ng/ml). The cut-off point was defined based on ROC curve analysis and calculation of the Youden index. Statistical analysis was performed using R software version 4.1.2 and STATISTICA version 13.3. The normality of the parameters was verified using the Shapiro-Wilk test. Inter-group comparisons were performed using t tests for independent groups and the U Mann-Whitney test. The ROC curves were compared using the DeLong's test.

Results

In the basophil activation test using CD63, the mean value of gated cells was 447 (Me 424) whereas using CD164, 471 cells (Me 440). No statistically significant differences were observed between the tests in this regard ($p = 0.623$). In all participants, the number of activated basophils in unstimulated samples (Pb) was low, with a mean of 1.95% (Min 1.8%, Max 3.45%) for the CD63 test and 2.04% (Min 1.82%, Max 2.2%) for the CD164 test. A positive response to anti-IgE antibody stimulation was obtained in 51 individuals ($n = 54$) for the CD63 test (Me 59.85%, Min 4.46%, Max 94.63%) and 52 individuals for the CD164 test (Me 55.47%, Min 4.64%, Max 87.96%). Insufficient basophil activation (non-responders) occurred in 5.6% of the participants tested with CD63 and in 3.7% when CD164 was used. As a result of specific stimulation, in the group of healthy participants, the mean percentage of activated basophils in all allergen's concentrations was low – 1.05% for BAT with CD63 and 1.19% for BAT with CD164. In the group of patients allergic to *D. farinae*, a significant increase in CD63 or CD164 positive cells was observed (compared to the control group, the difference was statistically significant; $p < 0.001$). The highest basophil activation was achieved in both BAT tests in the case of the allergen at the highest concentration – 225 ng/ml (AI) (for CD63 BAT: Me 44.78%, Min 0%, Max 95.55%; for CD164 BAT: Me 38.24%; Min 1.17%, Max 93.02%). Lower allergen concentrations resulted in a decrease in activation. In both BAT tests, the highest value of the Youden index was achieved for the allergen at the highest concentration – AI (0.81 and 0.92, respectively, for CD63 and CD164 BAT). In the case of CD164 BAT, at the cutoff value of

7.29%, a sensitivity of 92.3% and a specificity of 100% were achieved. Lower allergen concentrations resulted in a decrease in sensitivity – to 88% for sample AII and 73.1% for AIII, at cutoff points of 8.13% and 5.98%, respectively. In the basophil activation test with CD63, the maximum sensitivity was lower than in CD164 BAT and was 80.8% for AI at 100% specificity and a cutoff of 8.84%. Sensitivity of 73.1% and 42.4% (cutoffs were 4.87% and 10.29%) and specificity of 96% and 100% were achieved in other allergen-stimulated samples. The sensitivity of the asIgE test was slightly higher – 96.4% (cutoff point 0.24 kU/l). Comparison of ROC curves and AUC values between the most diagnostically efficient tests (CD164 BAT within the AI range, and asIgE) did not show any statistically significant differences. When both markers – CD164 and CD63 were used, there was a slight change in the sensitivity of the test compared to the values obtained for the BAT test with CD164 used alone, 92.8% versus 92.3% (specificity was 100%). Combining the most efficient basophil activation test using CD164 and measuring asIgE concentration allowed achieving 100% sensitivity and specificity.

Conclusions

1. Basophil activation test with CD164 expression assessment has high diagnostic usefulness in diagnosing allergy to *Dermatophagoides farinae*. The sensitivity of this test is 92.3%, and specificity is 100%. These values are equivalent to those obtained when measuring the concentration of allergen-specific IgE antibodies and assessing CD63 expression.
2. The combined use of both basophil activation markers – CD164 and CD63 – does not provide any benefits compared to the BAT based solely on the CD164.
3. The combination of two different “in vitro” methods - the cytometric test with CD164 and the assessment of allergen-specific IgE serum concentration results in increased diagnostic accuracy for the examined allergic profile. In contrast to attempts to associate other diagnostic tests, this combination achieves 100% sensitivity and specificity.