

Rubio A., Vivinus-Nébot 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.

Introduzione: Si tratta di un lavoro che si propone di valutare il possibile ruolo del Test di Attivazione dei Basofili (BAT), nel percorso decisionale volto a definire il timing più appropriato per effettuare un TPO al fine di valutare l'acquisizione della tolleranza in bambini già diagnosticati come allergici alle Proteine del Latte Vaccino e pertanto a dieta di eliminazione per le stesse. A tal fine, gli Autori valutarono il beneficio di tale Test nel predire una reazione al TPO con l'alimento e lo paragonarono a quello delle IgE specifiche e dello SPT.

L'attivazione dei Basofili da parte di un allergene può essere misurata *in-vitro* tramite l'aumento dell'espressione alla superficie della cellula del marker CD63 che è concomitante alla fusione dei granuli dei Basofili alla membrana plasmatica.

Popolazione: 112 bambini (età media 3.8 anni; range 1.2-11.7) con una diagnosi di Allergia alle Proteine del Latte vaccino IgE - mediata prospetticamente ricoverati per eseguire un TPO con latte vaccino al fine di stabilire la persistenza o la risoluzione della loro Allergia.

La diagnosi iniziale di Allergia alle Proteine del Latte Vaccino era stata fatta in base ai seguenti criteri, quando ambedue presenti:

- Una chiara storia di reazione anafilattica su base IgE mediata (almeno un episodio di orticaria o di angio-edema, verificatosi immediatamente dopo la prima o seconda esposizione alle Proteine del Latte Vaccino).
- Presenza di IgE specifiche e positività dello SPT.

TPO in Aperto: Venne effettuato dopo almeno 6 mesi di dieta di eliminazione e dopo l'anno di età. Vennero somministrate dosi crescenti ogni 30 min di latte semi-scremato dopo un "labial test" preliminare; il test venne considerato positivo in caso di comparsa di manifestazioni cutanee (orticaria o angioedema), digestive (vomito o diarrea), respiratorie (rinocongiuntivite, tosse o broncospasmo) e/o shock anafilattico nelle 2 ore successive all'assunzione del latte e venne effettuata anche una graduazione della severità della reazione da lieve (sintomi cutanei o a carico delle alte vie respiratorie), a moderata (angioedema o sintomi digestivi) a severa (presenza di reazioni accompagnate da sintomi a carico delle basse vie respiratorie o a carico dell'apparato cardiovascolare). Il Medico che supervisionò e interpretò il risultato del TPO era all'oscuro dei risultati del BAT e della ricerca delle IgE specifiche.

Analisi di Laboratorio:

- **Test di attivazione dei Basofili:** l'attivazione dei Basofili venne valutata attraverso la misura dell'aumento di espressione del CD63 alla superficie di tali cellule, usando la citometria a flusso. I Basofili vennero incubati o con latte essiccato scremato diluito in una soluzione tampone ad una concentrazione finale di 100, 10 e 1 ng/ml per ogni test, o con la sola soluzione tampone per valutare l'espressione del marker sui Basofili a riposo (controllo negativo). Il controllo positivo fu ottenuto mediante la stimolazione dei Basofili con un anticorpo anti recettore delle IgE FcεR1. Il test fu considerato positivo quando veniva misurato un aumento di almeno il 6% dei Basofili che esprimevano il CD63 in almeno una diluizione delle proteine del latte, rispetto al controllo negativo. Tale soglia venne scelta perché corrispondeva alla migliore combinazione tra Sensibilità e Specificità del Test una volta costruita la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) per il test di Attivazione dei Basofili. I risultati del BAT vennero valutati dallo stesso Biologo che era ignaro dei risultati del TPO e delle IgE specifiche.
- **IgE specifiche:** il livello, nei confronti del latte vaccino scremato, venne valutato tramite ImmunoCap e la soglia di positività venne stabilita a 0,1 kUA/l.

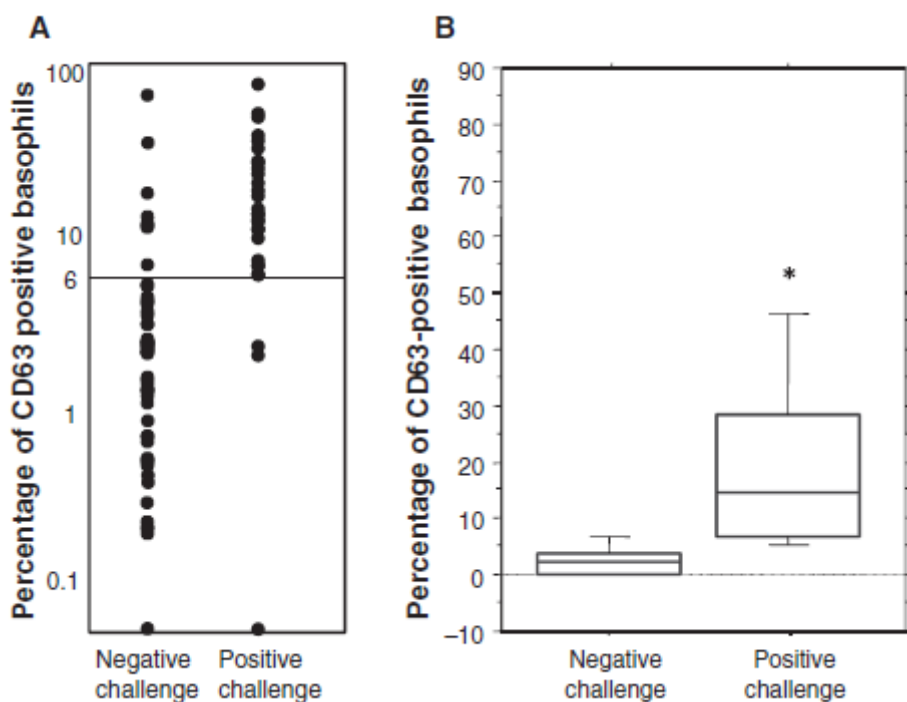
Skin prick tests: vennero effettuati su tutti i pazienti (eccetto 15), usando latte vaccino fresco semi-scremato. Il test fu considerato positivo se il diametro medio del pomfo era pari o superiore a 3 mm.

Analisi Statistiche: vennero calcolati:

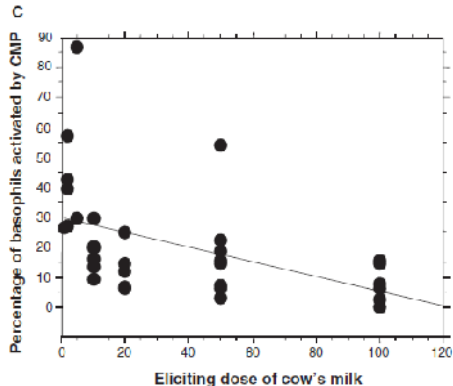
- l'area sotto la curva ROC per quantificare l'accuratezza del BAT e confrontarla con quella delle sIgE e dello SPT.
- la Sensibilità, la Specificità, il Valore Predittivo Positivo (PPV), il Valore Predittivo Negativo (NPV) e l'Efficienza (frazione di individui testati correttamente classificati dal test) per il BAT, le sIgE e lo SPT.
- Il Fattore di Correlazione ϕ tra il risultato del BAT, delle sIgE e dello SPT e l'esito del TPO.

Risultati: Dei 112 bambini inclusi nello studio, 36 (il 32%) risultarono ancora affetti da Allergia alle proteine del Latte Vaccino, in base all'esito del TPO: 25 pazienti presentarono sintomi cutanei, 13 sintomi respiratori, 11 sintomi gastrointestinali e 2 uno shock anafilattico. Il Bat venne effettuato a tutti i bambini, ma il test fu interpretabile in 105 (94%), perché in 7 pazienti il controllo positivo (effettuato con anticorpi contro il Recettore ad alta affinità delle IgE FcR1) dimostrò una risposta inadeguata e tali bambini vennero classificati come "nonresponders".

La percentuale di Basofili attivati dalle Proteine del Latte vaccino nei bambini con TPO positivo fu significativamente più alta (media: 20.9; DS: 18.8) rispetto a quella dei bambini con TPO negativo (media:3.9; DS: 9.8), $P < 0.0001$ (Fig.2A,B).



Tra i bambini con TPO positivo, fu riscontrata una significativa correlazione tra percentuale di basofili attivati e dose di latte scatenante la reazione (Fig 2C; $P = 0.006$).



L'area sotto la curva ROC (AUC) per il Test di Attivazione dei Basofili con Latte Vaccino fu pari a 0.866 (Fig.1).

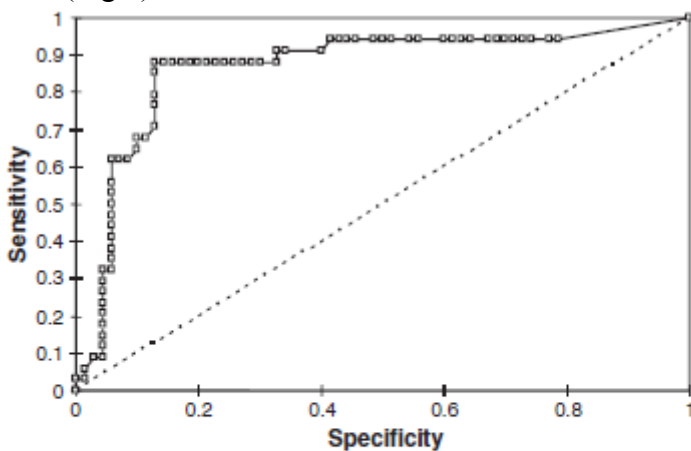
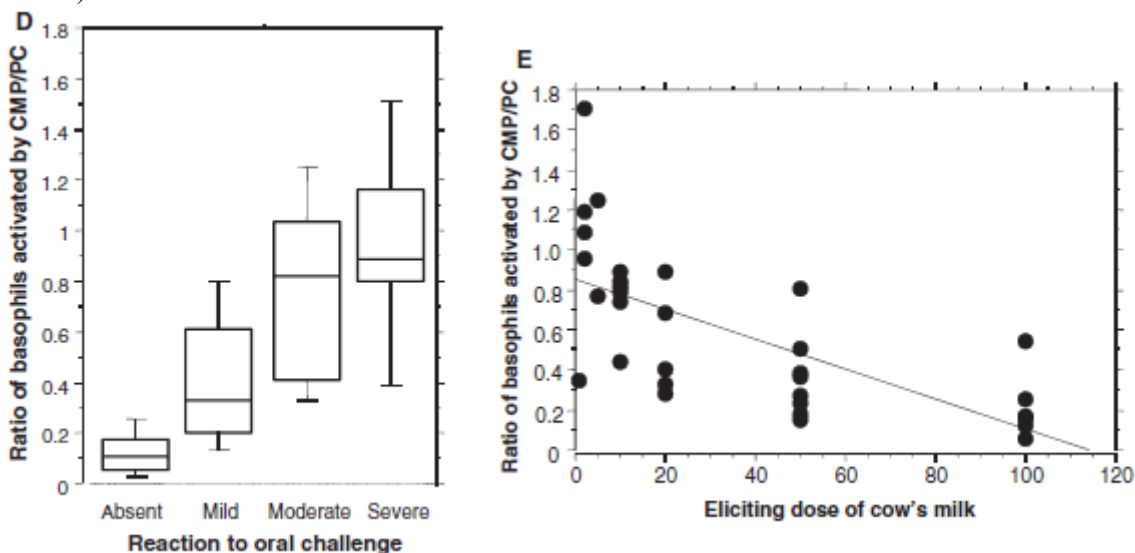


Figure 1 Receiver operating characteristic (ROC) curve for the basophil activation test (BAT) with cow's milk. Receiver operating characteristic curve for the percentage of basophils activated by cow's milk proteins (CMP). The area under ROC curve (AUC) = 0.866.

Ma gli Autori si posero anche un altro problema: il significato di un certo livello di attivazione dei Basofili può non essere lo stesso se questo viene ottenuto in presenza di un'alta risposta ("High Responders") o di una bassa risposta ("Low Responders") al controllo positivo tramite la stimolazione delle cellule con l'anti-FcεR1. Calcolarono, allora, il rapporto tra l'attivazione specifica ottenuta in risposta alle Proteine del Latte e quella non specifica ottenuta tramite l'anti-FcεR1. Il Rapporto risultò significativamente più alto nei bambini ancora reattivi al TPO (media: 0.58; DS: 0.39), rispetto a quelli con TPO negativo e quindi divenuti tolleranti (media: 0.15; DS: 0.17; $P < 0.0001$).

Inoltre, questo rapporto risultò significativamente correlato alla severità della reazione clinica al "challenge" (Fig. 2D; $P < 0.0001$) e alla dose scatenante la reazione nei TPO positivi (Fig.2E; $P < 0.0001$).



La soglia di positività ottimale scelta dagli Autori per il Test di Attivazione dei Basofili fu una percentuale di attivazione del 6%. Con questo "cut point" il Test risultò positivo in 37 bambini e negativo in 67 e, sempre con questo valore soglia, la Sensibilità risultò del 91%, la Specificità del 90%, il PPV dell'81% , il NPV del 96% e l'efficienza del 90% (Tab1).

Table 1 Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV and NPV), efficiency, and correlation factor ϕ with oral challenge across a spectrum of BAT cut-points (P was calculated with the Fischer's exact test)

BAT cut-off: percentage of basophils activated by CMP	Se (%)	Spe (%)	PPV (%)	NPV (%)	Efficiency (%)	Correlation factor ϕ with oral challenge	P (χ^2)
2	97	51	48	97	65	0.463	<0.0001
4	91	75	63	95	80	0.612	<0.0001
5	91	82	70	95	85	0.686	<0.0001
6	91	90	81	96	90	0.752	<0.0001
8	70	89	74	86	83	0.595	<0.0001
12	64	92	78	84	83	0.586	<0.0001
15	45	94	79	79	79	0.480	<0.0001

BAT, basophil activation test; CMP, cow's milk proteins; Se, sensitivity; Spe, specificity.

La concordanza tra il BAT e il TPO fu eccellente con un fattore di correlazione ϕ di 0.767. Il beneficio ottenibile dal BAT nella predizione dell'esito del TPO, venne poi messa a confronto con quello dei livelli delle sIgE; poiché non esiste consenso circa il livello soglia di queste ultime in grado di predire la reattività clinica, i risultati vengono presentati in relazione ai "cut-points" usati più comunemente (Tab.2). Nella stessa tabella, gli Autori mostrano i valori di Sensibilità, Specificità, PPV, NPV ed Efficienza, calcolati per differenti combinazioni dei risultati del BAT, delle sIgE e degli SPT (Tab.2).

Table 2 Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV and NPV), efficiency and correlation factor ϕ with oral challenge for the most commonly used specific IgE (sIgE) cut-points and for different combinations of BAT, sIgE and skin prick tests (SPT) results (P was calculated with the Fischer's exact test)

Positivity cut-off	Se (%)	Spe (%)	PPV (%)	NPV (%)	Efficiency (%)	Correlation factor ϕ with oral challenge	P (χ^2)
sIgE: 0.35 kUA/l	94	21	37	89	45	0.176	0.115
sIgE: 2 kUA/l	67	67	50	81	67	0.354	0.0005
sIgE: 5 kUA/l	44	82	57	73	68	0.339	0.0009
sIgE: 15 kUA/l	19	97	78	72	72	0.348	0.0011
sIgE with the 2 kU/l cut-off + SPT	52	68	44	74	62	0.187	0.113
BAT + sIgE with the 2 kUA/l cut-off	61	96	87	84	84	0.630	<0.0001
BAT + sIgE with the 5 kUA/l cut-off	43	96	83	77	78	0.491	<0.0001
At least 2 positive results among: BAT + SPT + sIgE with the 2 kUA/l cut-off	97	82	72	98	87	0.743	<0.0001

BAT, basophil activation test; Se, sensitivity; Spe, specificity.

Conclusioni: nella sezione "Discussion", gli Autori sottolineano i seguenti risultati del loro studio:

- Il Test di attivazione dei basofili è fattibile anche in bambini molto piccoli perché esso era interpretabile in tutti i pazienti tranne 7. Il "cut-point" ottimale, stabilito in questo studio (6%), può variare nelle diverse popolazioni in studio, così come avviene per i "cut-points" delle sIgE.
- Con un'efficienza del 90% e una AUC di 0.866, il BAT dimostra un alto grado di performance nell'aiutare a stabilire il momento appropriato per eseguire un challenge orale con latte vaccino. In particolare, il buon valore dell'NPV (96%) implica che esso può essere usato nel decidere di effettuare il TPO con un margine minimo di rischio. In modo analogo, il buon PPV (81%) indica che il challenge dovrebbe essere effettuato con grande precauzione o rimandato, qualora il BAT fosse positivo, soprattutto se associato ad alti livelli di sIgE.
- Interessante appare la correlazione statistica del rapporto tra la percentuale di Basofili CD63- positivi dopo incubazione con le Proteine del Latte Vaccino e quella ottenuta con il controllo positivo (anti-FcR1) e il risultato del challenge, in termini di assenza/presenza di reazione clinica (AUC di 0.857), ma anche in termini di severità della reazione e di dose di latte scatenante nei TPO positivi.

- Nella popolazione in studio, il BAT apparve meglio correlato al risultato del TPO, rispetto ai livelli di sIgE, qualunque fosse il cut-point di positività prescelto. D'altra parte, il risultato degli SPT non si dimostrò utile nel predire la regressione dell'allergia sintomatica alle Proteine del Latte Vaccino. Con un "cut-point" di 3 mm. di diametro medio, lo SPT dimostrò un'eccellente Sensibilità (100%) e un eccellente NPV (100%) nel predire la persistenza dell'allergia, ma la Specificità fu bassa (22%), così come il PPV (40%) e l'efficienza generale del test (48%).
- I risultati, dunque, suggeriscono che, aggiungendo il BAT al "work-up" diagnostico, si potrebbe migliorare l'interpretazione dello stato allergico del paziente. Gli Autori, pertanto, propongono un algoritmo decisionale in cui vengono presi in considerazione i risultati del BAT, delle sIgE, degli SPT e i Dati Clinici e aggiungono che l'applicazione di questo algoritmo ha permesso loro di identificare il 94% dei soggetti divenuti tolleranti, così come il 94% dei pazienti persistentemente allergici (Fig.4).

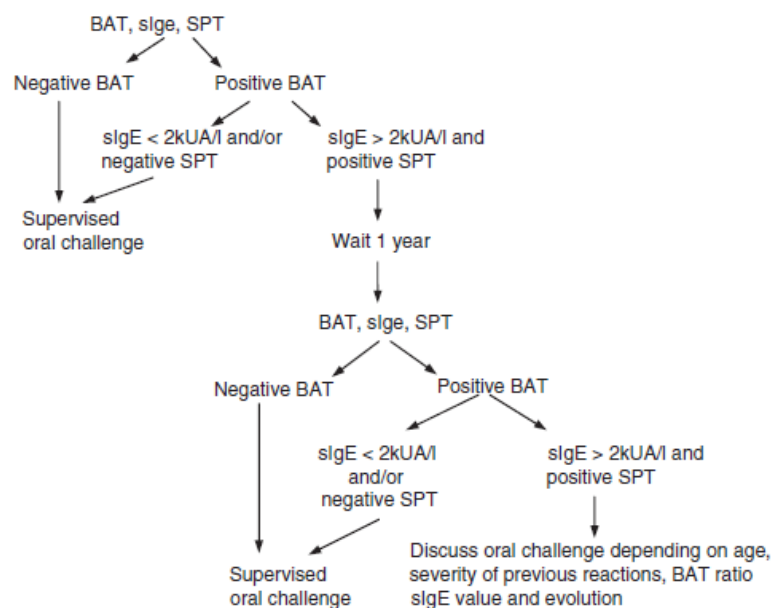


Figure 4 Decisional algorithm taking into account basophil activation test (BAT), specific IgE and skin prick tests (SPT) results and clinical elements.

- Gli Autori ottennero 10 risultati discordanti tra il risultato del BAT e l'esito del TPO. Sette pazienti con BAT positivo tollerarono il latte al TPO; questi pazienti avevano un'età paragonabile ai bambini tolleranti con BAT negativo, ma erano più intensamente "responders" in quanto la percentuale di Basofili al controllo positivo con anti-FcR1 era del 66.8% contro il 45.2%. Inoltre presentavano un livello di sIgE più alto (5.4 kUA/l vs 2.2) e una maggiore risposta agli SPT (7.4mm. vs 4.3mm.). Questa discrepanza, secondo gli Autori, potrebbe derivare dal fatto che il BAT è eseguito *in-vitro* su Basofili isolati e non valuta tutti i meccanismi regolatori coinvolti nell'induzione della tolleranza clinica *in-vivo*, sia a livello gastro-intestinale che sistemico. Ad es. studi condotti da altri Autori hanno evidenziato che la risposta dei Basofili può essere inibita da un fattore autologo presente nel siero che gli stessi Autori hanno ipotizzato essere una IgG allergene-specifica e studi più recenti hanno rafforzato il ruolo dei Linfociti T-regolatori allergene-specifici nella risoluzione spontanea dell'allergia al latte vaccino. Tre pazienti, invece, presentarono una reazione clinica al TPO, nonostante un BAT negativo. Tali pazienti erano più piccoli, erano meno "responders" al test di controllo positivo, avevano livelli più bassi di sIgE e un risultato degli SPT paragonabile a quello dei pazienti persistentemente allergici con BAT positivo. Due di questi 3 pazienti presentarono una reazione lieve, ma uno presentò una grave Anafilassi dopo aver tollerato 37 ml. di latte. Gli Autori non riescono a prospettare una spiegazione plausibile per questa discrepanza, ma ipotizzano un diverso tipo di anafilassi, dove le

Mastcellule possano giocare un ruolo preminente. A causa di questi risultati falsamente negativi e della presenza di una reazione grave (sebbene rara: 1 su 112 pazienti e cioè nello 0.89% dei casi), il BAT non consente una modifica delle modalità di esecuzione del challenge. Ad esempio non ci si può affidare ad un risultato negativo e decidere di effettuarlo a domicilio, ma è ancora necessaria la supervisione di un Medico.

- Potrebbe essere, invece, presa in considerazione la possibilità di partire, nell'effettuazione del challenge, con dosi più alte in bambini con BAT negativo, oppure in quelli con bassa percentuale di Basofili attivati o con basso rapporto tra Basofili attivati dall'allergene e quelli attivati dall'anti-FcR1, vista l'eccellente correlazione che gli Autori trovarono tra il risultato del BAT e la dose scatenante nei TPO positivi, ma anche questo aspetto richiede ulteriori conferme.

Considerazioni conclusive dello scrivente: a noi sembra che anche questo test, nonostante possa rappresentare un nuovo mezzo per aiutarci a decidere quali siano i pazienti da sottoporre al TPO, non sia in grado di sostituirsi a questo nel percorso diagnostico che porta alla verifica della acquisizione o meno della tolleranza alimentare. Con una Specificità del 90% e un PPV dell'81% (al "cut-point" adoperato dagli Autori), lascerebbe ancora una percentuale non indifferente di bambini inutilmente a dieta di eliminazione, senza contare che non esiste al momento, come gli stessi Autori fanno notare, un "cut-point" definito e che questo potrebbe variare a seconda delle popolazioni considerate (ad es. popolazione selezionata vs popolazione generale).

Giovanni Cosimo Indirli.