

UNIVERZA V LJUBLJANI

MEDICINSKA FAKULTETA

VALIDACIJA TESTA AKTIVACIJE BAZOFILCEV V  
DIAGNOSTIKI PREOBČUTLJIVOSTI ZA BETALAKTAMSKE  
ANTIBIOTIKE

VALIDATION OF THE BASOPHIL ACTIVATION TEST IN THE  
DIAGNOSTICS OF ALLERGY TO BETA LACTAM ANTIBIOTICS

DANILO ČEŠLJARAC

Ljubljana, 2024

UNIVERZA V LJUBLJANI

MEDICINSKA FAKULTETA

VALIDACIJA TESTA AKTIVACIJE BAZOFILCEV V  
DIAGNOSTIKI PREOBČUTLJIVOSTI ZA BETALAKTAMSKE  
ANTIBIOTIKE

VALIDATION OF THE BASOPHIL ACTIVATION TEST IN THE  
DIAGNOSTICS OF ALLERGY TO BETA LACTAM ANTIBIOTICS

DANILO ČEŠLJARAC

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad  
študentom,  
pod mentorstvom prof. dr. Mitje Košnika, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Matije  
Rijavca, univ. dipl. mikr.

Ljubljana, 2024

# 1 POVZETEK

**IZHODIŠČE:** Oznako preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike (BLA) nosi veliko ljudi, ki so zaradi tega zdravljeni z drugimi antibiotiki, ki so dražji, z več stranskimi učinki in so nevarni za nastanek bakterijske odpornosti. Le pri majhnem deležu oseb s sumom na preobčutljivost, to potrdimo z diagnostični testi. Diagnostika preobčutljivosti temelji na kožnih testih (KT) in provokacijskih testih (OPT), ki so za bolnike zamudni, neprijetni ter lahko nevarni. Zato se razvijajo diagnostični testi "in vitro", kakršen je test aktivacije bazofilcev (BAT).

**NAMEN:** Z analizo podatkov o bolnikih, ki so opravili BAT z BLA, smo želeli oceniti diagnostično vrednost BAT v primerjavi z drugimi diagnostičnimi metodami, ki se uporabljajo pri diagnostiki takojšnje preobčutljivosti za BLA. Preverili smo naslednje hipoteze: 1. Občutljivost in specifičnost BAT sta primerljivi kot pri KT. 2. Občutljivost BAT se zmanjšuje s časom, preteklim od takojšnje preobčutljivostne reakcije. 3. Občutljivost BAT je večja pri bolnikih s hudo klinično sliko takojšnje preobčutljivostne reakcije. 4. Negativen rezultat BAT s penicilinskimi antibiotiki napoveduje odstornost navzkrižne reaktivnosti s cefalosporinskimi antibiotiki s specifičnostjo, primerljivo s KT.

**METODE:** Retrospektivno smo primerjali rezultate BAT, KT in OPT pri bolnikih s sumom preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike.

**REZULTATI:** Pri 169 bolnikih z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije sta bila občutljivost in specifičnost BAT za osumljeni antibiotik v primerjavi s KT 48% in 89 % ( $p < 0,0001$ ). Vrednost stimulacijskega indeksa (SI) in delež BAT pozitivnih bolnikov sta bila v negativni korekciji s časom preteklim od preobčutljivostne reakcije ( $p = 0,0007$ ). Delež pozitivnih rezultatov BAT je bil večji pri bolnikih, ki so test opravili znotraj 12 mesecev od reakcije (35 %), v primerjavi s tistimi, ki so test opravili kasneje (12 %) ( $p = 0,0015$ ) ter pri bolnikih z anafilaksijo (38 %) v primerjavi z urtikarijo (11 %) ( $p = 0,0011$ ). BAT je pri 98 % bolnikov s preobčutljivostjo za penicilinske antibiotike pravilno napovedal odsotnost navzkrižne reaktivnosti za cefalosporine.

**ZAKLJUČKI:** Z rezultati smo potrdili 3 hipoteze, 1 smo zavrgli. BAT v primerjavi s KT ima slabšo občutljivost in primerljivo specifičnost pri diagnosticiranju takojšnje preobčutljivosti za BLA. Diagnostična vrednost BAT za potrditev senzibilizacije je omejena le na časovno okno znotraj nekaj mesecev po reakciji in predvsem pri bolnikih s hudo klinično sliko preobčutljivosti. BAT ima dobro napovedno vrednost za navzkrižno reaktivnost med penicilinskimi in cefalosporinskimi antibiotiki.

## 1 ABSTRACT

**BACKGROUND:** Many people are labeled as allergic to beta-lactam antibiotics (BLA), leading to treatment with alternative antibiotics that are more expensive, have more side effects, and pose a risk for developing bacterial resistance. Only a small percentage of people suspected of having an allergy are confirmed using standard diagnostic tests. The diagnosis of immediate hypersensitivity relies on skin tests (ST) and oral provocation tests (OPT), which are time-consuming, unpleasant, and potentially dangerous for patients. Therefore, »in vitro« diagnostic tests, such as the basophil activation test (BAT), are being developed.

**AIM:** By analyzing data from patients who underwent BAT with BLA, we aimed to assess the diagnostic value of BAT compared to other diagnostic methods used in the diagnosis of beta-lactam antibiotic hypersensitivity. We tested the following hypotheses: 1. The sensitivity and specificity of BAT are comparable to those of ST. 2. The sensitivity of BAT decreases over time since the hypersensitivity reaction. 3. The sensitivity of BAT is higher in patients with severe clinical manifestations of hypersensitivity reactions. 4. Negative BAT results with penicillin antibiotics in patients with history of hypersensitivity reactions to penicillin predict cross-reactivity with cephalosporin with a specificity comparable to ST.

**METHODS:** We retrospectively compared BAT, ST, and OPT results in patients with suspected hypersensitivity to beta-lactam antibiotics.

**RESULTS:** In the analyzed group of 169 well-characterized patients with a history of immediate hypersensitivity reactions, the sensitivity and specificity of BAT for the suspected antibiotic, compared to ST, were 47% and 89%, respectively ( $p < 0.0001$ ). The stimulation index value and the proportion of BAT-positive patients were negatively correlated with the time elapsed since the hypersensitivity reaction ( $p = 0.0007$ ). The proportion of positive BAT results was higher in patients who were tested within 12 months of the reaction (35%) compared to those who were tested later (12%) ( $p = 0.0015$ ) and in patients with anaphylaxis (38%) compared to those with urticaria (11%) ( $p = 0.0011$ ). In 98% of patients with penicillin allergy, BAT correctly predicted the absence of cross-reactivity with cephalosporins.

**CONCLUSIONS:** The results confirmed 3 hypotheses, while 1 was rejected. Compared to ST, BAT has lower sensitivity but comparable specificity in diagnosing immediate hypersensitivity to BLA. The diagnostic value of BAT for confirming sensitization is limited to a narrow time window within a few months after the reaction and is particularly relevant in patients with severe clinical manifestations of hypersensitivity. BAT has good predictive value for cross-reactivity between penicillin and cephalosporin antibiotics.

## 2 KAZALO

<b>1</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>KAZALO .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>PREDGOVOR.....</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>RAZLAGA KRATIC.....</b>	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>9</b>
<b>6.1</b>	<b>PREOBČUTLJIVOST ZA BETALAKTAMSKE ANTIBIOTIKE .....</b>	<b>16</b>
6.1.1	Epidemiologija .....	16
6.1.2	Imunologija.....	17
6.1.3	Klinična slika .....	18
<b>6.2</b>	<b>DIAGNOSTIKA PREOBČUTLJIVOSTI ZA BETALAKTAMSKE ANTIBIOTIKE .....</b>	<b>20</b>
6.2.1	Diagnostični postopek.....	20
6.2.1	Anamneza pri diagnostiki preobčutljivosti .....	20
6.2.2	Vloga kožnih testov pri diagnostiki .....	21
6.2.4	Provokacijski test .....	22
6.2.3	Vloga testov »in vitro« pri diagnostiki .....	22
6.2.4	Specifični IgE testi.....	23
<b>6.3</b>	<b>TEST AKTIVACIJE BAZOFILCEV - OZADJE .....</b>	<b>24</b>
<b>7</b>	<b>NAMEN IN HIPOTEZA.....</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>METODE .....</b>	<b>27</b>
<b>8.1</b>	<b>PREISKOVANCI .....</b>	<b>27</b>
8.1.1	Retrospektivna raziskava bolnikov .....	27
8.1.2	Prospektivna raziskava bolnikov .....	29
<b>8.2</b>	<b>KOŽNI TESTI.....</b>	<b>29</b>
<b>8.3</b>	<b>ORALNI PROVOKACIJSKI TESTI .....</b>	<b>29</b>
<b>8.4</b>	<b>TEST AKTIVACIJE BAZOFILCEV .....</b>	<b>30</b>
<b>8.5</b>	<b>STATISTIČNE METODE .....</b>	<b>31</b>
<b>8.6</b>	<b>STATISTIČNA ANALIZA .....</b>	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>34</b>
9.1	Klinične značilnosti bolnikov .....	34
9.2	Rezultati kožnih testov in oralnih provokacijskih testov.....	35
9.3	Določanje optimalne mejne vrednosti testa aktivacije bazofilcev v primerjavi z rezultati kožnih testov in analiza občutljivosti in specifičnosti .....	36
9.4	Časovna korelacija rezultatov testa aktivacije bazofilcev .....	40
9.5	Analiza ponovljenih testov aktivacije bazofilcev.....	42
9.6	Korelacija testa aktivacije bazofilcev z težo klinične slike .....	43
9.7	Korelacija testa aktivacije bazofilcev z navzkrižno reaktivnostjo med penicilinskimi in cefalosporinskimi antibiotiki.....	45
<b>10</b>	<b>RAZPRAVLJANJE .....</b>	<b>46</b>
10.1	Klinične značilnosti bolnikov .....	46

10.2	Rezultati kožnih testov in oralnih provokacijskih testov .....	48
10.3	Določanje optimalne mejne vrednosti testa aktivacije bazofilcev v primerjavi z rezultati kožnih testov in analiza občutljivosti in specifičnosti .....	49
10.4	Časovna korelacija rezultatov testa aktivacije bazofilcev in analiza ponovljenih testov aktivacije bazofilcev .....	51
10.5	Korelacija rezultatov testa aktivacije bazofilcev z resnotjo klinične slike takojšnje preobčutljivostne reakcije.....	52
10.6	Korelacija rezultatov testa aktivacije bazofilcev z navzkrižno reaktivnostjo med penicilinskimi in cefalosporinskimi antibiotiki.....	53
10.7	Uporabnost raziskave.....	54
10.8	Omejitve raziskave .....	54
<b>11</b>	<b>ZAKLJUČKI .....</b>	<b>56</b>
	<b>PRILOGA 1: OCENA ETIČNOSTI RAZISKAVE .....</b>	<b>57</b>

### **3 PREDGOVOR**

Raziskavo smo izvajali v Pnevmoški in alergološki ambulanti Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik v Ljubljani ter v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik med julijem 2023 in avgustom 2024.

Posebej bi se rad zahvalil mentorju, prof. dr. Mitji Košniku, dr. med., ki mi je s svojim strokovnim znanjem in dolgoletnimi izkušnjami pomagal pri izdelavi raziskovalne naloge. Z nasveti me je usmerjal pri zasnovi in izvedbi dela kot tudi pisanju naloge. Zahvalil bi se tudi somentorju, doc. dr. Matiji Rijavcu, univ. dipl. mikr., za zbiranje podatkov o izvedenih testih aktivacije bazofilcev, za pomoč pri statistični analizi in pri pisanju naloge.

Zahvaljujem se tudi celotnemu osebju v alergološki ambulanti in laboratoriju Klinike Golnik. Največja zahvala gre mojima staršema Snežani in Dobrici, ki sta me podpirala in spodbujala skozi celoten čas raziskovanja.

## **4 RAZLAGA KRATIC**

BAT – test aktivacije bazofilcev

BLA – betalaktamski antibiotiki

EAACI – Evropska akademija alergologije in klinične imunologije

IDT – intradermalni kožni test

KVT – kožni vbodni test

KT – kožni test

OPT – oralni provokacijski test

SI (BAT) – stimulacijski indeks (testa aktivacije bazofilcev)



## 5 LITERATURA

1. Macy E, Contreras R. Health care use and serious infection prevalence associated with penicillin "allergy" in hospitalized patients: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 790 – 6.
2. Solensky R. Penicillin allergy as a public health measure. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 797– 8.
3. Torres MJ, Blanca M. The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity: penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, and clavams. *Med Clin North Am.* 2010; 94: 805–20.
4. Doña I, Blanca-López N, Torres MJ, et al. Drug hypersensitivity reactions: response patterns, drug involved, and temporal variations in a large series of patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; 22: 363–71.
5. Zambonino MA, Torres MJ, Muñoz C, et al. Drug provocation tests in the diagnosis of hypersensitivity reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013; 24 (2): 151 –159.
6. Shenoy ES, Macy E, Rowe T, et al. Evaluation and Management of Penicillin Allergy: A Review. *JAMA.* 2019; 321 (2): 188 –199.
7. Košnik M, Kopač P, Zidarn M. Sum na preobčutljivost za antibiotike. In: Fras, Z (ur.), Poredoš P, eds. Zbornik prispevkov. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za interno medicino, 2014. p. 267-273.
8. Sacco KA, Bates A, Brigham TJ, et al. Clinical outcomes following inpatient penicillin allergy testing: A systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 2017; 72 (9): 1288 –1296.
9. Blumenthal KG, Lu N, Zhang Y, et al. Risk of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* in patients with a documented penicillin allergy: population based matched cohort study. *BMJ.* 2018; 361: k2400.
10. Su T, Broekhuizen BDL, Verheij TJM, et al. The impact of penicillin allergy labels on antibiotic and health care use in primary care: a retrospective cohort study. *Clin Transl Allergy.* 2017; 7: 18.
11. Poon K-YT. Self-reported antibiotic allergy incidence and prevalence: age and sex effects. *Am J Med.* 2009; 122 (8): 778.e1-7
12. Dhopeswarkar N, Sheikh A, Doan R, et al. Drug-Induced Anaphylaxis Documented in Electronic Health Records. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019; 7 (1): 103-111

13. Moreno E, Laffond E, Muñoz-Bellido FJ, et al. Using  $\beta$ -lactam antibiotics in patients with a history of  $\beta$ -lactam allergy: current concepts. *Pol Arch Intern Med.* 2017; 127 (7-8): 540-549
14. Levine BB. Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases of man. *N Engl J Med.* 1966; 275 (20): 1115-1125.
15. Ariza A, Mayorga C, Fernandez TD, et al. Hypersensitivity reactions to  $\beta$ -lactams: relevance of hapten-protein conjugates. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2015; 25 (1): 12-25.
16. Perez-Inestrosa E, Suau R, Montañez MI, et al. Cephalosporin chemical reactivity and its immunological implications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005; 5 (4): 323-330.
17. Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park BK. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127 (3 Suppl): S 74–81.
18. Romano A, Atanaskovic-Markovic M, Barbaud A, et al. Towards a more precise diagnosis of hypersensitivity to beta-lactams — an EAACI position paper. *Allergy.* 2020; 75 (6): 1300–15.
19. Torres MJ, Blanca M, Fernandez J, et al. Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy.* 2003; 58 (10): 961-972.
20. Stone CA Jr, Trubiano J, Coleman DT, et al. The challenge of de-labeling penicillin allergy. *Allergy.* 2020; 75 (2): 273-288.
21. Mohamed OE, Beck S, Huissoon A, et al. A Retrospective Critical Analysis and Risk Stratification of Penicillin Allergy Delabeling in a UK Specialist Regional Allergy Service. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019; 7 (1): 251-258.
22. Solensky R, Earl HS, Gruchalla RS. Penicillin allergy: prevalence of vague history in skin test-positive patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000; 85 (3): 195-199.
23. Blanca M, Torres MJ, García JJ, et al. Natural evolution of skin test sensitivity in patients allergic to beta-lactam antibiotics. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103 (5 Pt 1): 918-924.
24. Mirakian R, Leech SC, Krishna MT, et al. Management of allergy to penicillins and other beta-lactams. *Clin Exp Allergy.* 2015; 45 (2): 300-327.
25. Sullivan TJ, Wedner HJ, Shatz GS, et al. Skin testing to detect penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 171–80.
26. Romano A, Gaeta F, Valluzzi RL, et al. Natural evolution of skin-test sensitivity in patients with IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins. *Allergy* 2014; 69: 806–9.

27. Macy E, Mangat R, Burchette RJ. Penicillin skin testing in advance of need: multiyear follow-up in 568 test result-negative subjects exposed to oral penicillins. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1111–1115.
28. Torres MJ, Romano A, Mayorga C, et al. Diagnostic evaluation of a large group of patients with immediate allergy to penicillins: the role of skin testing. *Allergy* 2001; 56: 850–856.
29. Padial A, Antunez C, Blanca-Lopez N, Fernandez TD, et al. Non-immediate reactions to beta-lactams: diagnostic value of skin testing and drug provocation test. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 822–828.
30. Blanca-Lopez N, Zapatero L, Alonso E, et al. Skin testing and drug provocation in the diagnosis of nonimmediate reactions to aminopenicillins in children. *Allergy* 2009; 64: 229–233
31. Chiriac AM, Vasconcelos MJ, Izquierdo L, et al. To challenge or not to challenge: Literature data on the positive predictive value of skin tests to beta-lactams. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019; 7 (7): 2404-2408.e11
32. Romano A, Blanca M, Torres MJ, et al. Diagnosis of non immediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy.* 2004; 59: 11153 -1160.
33. Blanca M, Romano A, Torres MJ, et al. Update on the evaluation of hypersensitivity reactions to betalactams. *Allergy.* 2009; 64: 183-193.
34. Aberer W, Bircher A, Romano A, et al. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy.* 2003; 58: 854-863.
35. Solensky R, Khan DA, Bernstein IL, et al. Drug allergy: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010; 105: 259-273.
36. Sousa-Pinto B, Tarrío I, Blumenthal KG, et al. Accuracy of penicillin allergy diagnostic tests: A systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2021; 147 (1): 296-308.
37. Zidarn M, Silar M, Vegnuti M, et al. The specificity of tests for anti-beta-lactam IgE antibodies declines progressively with increase of total serum IgE. *Wien Klin Wochenschr.* 2009; 121 (9-10): 353-356.
38. Santos AF, Douiri A, Becares N, et al. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134 (3): 645-652.

39. Eguiluz-Gracia I, Fernandez-Santamaria R, Testera-Montes A, et al. Coexistence of nasal reactivity to allergens with and without IgE sensitization in patients with allergic rhinitis. *Allergy*. 2020; 75(7): 1689-1698.
40. Santos AF, Alpan O, Hoffmann HJ. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy*. 2021; 76( 8): 2420-2432.
41. Ebo DG, Bridts CH, Mertens CH, et al. Principles, potential, and limitations of ex vivo basophil activation by flow cytometry in allergology: A narrative review. *J Allergy Clin Immunol*. 2021; 147 (4): 1143-1153.
42. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, et al. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008; 74 (4): 201-210.
43. Campos L, Galvão VR, Kalil J, et al. BAT in the Diagnosis of Drug Allergy: a Novel Tool in Clinical Daily Practice?. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019; 19 (4): 20.
44. Sturm GJ, Böhm E, Trummer M, et al. The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy*. 2004; 59 (10): 1110-1117.
45. Piletta-Zanin A, Ricci C, Santos AF, et al. BAT and MAT for diagnosis of peanut allergy: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2024; 35 (6): e14140.
46. Sanz ML, Gamboa PM, Antépara I, et al. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32 (2): 277-286.
47. Erdmann SM, Ventocilla S, Moll-Slodowy S, et al. Basophilenaktivierungstests in der Diagnostik von Arzneimittelreaktionen [Basophil activation tests in the diagnosis of drug reactions]. *Hautarzt*. 2005; 56 (1): 38-43.
48. Eberlein B, León Suárez I, Darsow U, et al. A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clin Exp Allergy*. 2010; 40 (3): 411-418.
49. Gamboa PM, García-Avilés MC, Urrutia I, et al. Basophil activation and sulfidoleukotriene production in patients with immediate allergy to betalactam antibiotics and negative skin tests. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004; 14 (4): 278-283.
50. De Week AL, Sanz ML, Gamboa PM, et al. Diagnosis of immediate-type beta-lactam allergy in vitro by flow-cytometric basophil activation test and sulfidoleukotriene production: a multicenter study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19 (2): 91-109.

51. Torres MJ, Padial A, Mayorga C, et al. The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34 (11): 1768-1775.
52. Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38 (6): 921-928.
53. Torres MJ, Ariza A, Fernández J, et al. Role of minor determinants of amoxicillin in the diagnosis of immediate allergic reactions to amoxicillin. *Allergy*. 2010; 65 (5): 590-596.
54. Torres MJ, Ariza A, Mayorga C, et al. Clavulanic acid can be the component in amoxicillin-clavulanic acid responsible for immediate hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125 (2): 502-505.e502.
55. Uyttebroek AP, Sabato V, Cop N, et al. Diagnosing cefazolin hypersensitivity: Lessons from dual-labeling flow cytometry. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016; 4 (6): 1243-1245.
56. Thinnes A, Merk HF, Wurpts G, et al. Individual risk assessment in the diagnosis of immediate type drug hypersensitivity reactions to betalactam and non-betalactam antibiotics using basophil activation test: a single center experience. *Cutan Ocul Toxicol*. 2018; 37 (4): 309-318.
57. Salas M, Fernández-Santamaría R, Mayorga C, et al. Use of the Basophil Activation Test May Reduce the Need for Drug Provocation in Amoxicillin-Clavulanic Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018; 6 (3): 1010-1018.e2.
58. Leecyous B, Bakhtiar F, Tang MM, Yadzir ZHM, Abdullah N. Minimal agreement between basophil activation test and immunoassay in diagnosis of penicillin allergy. *Allergologia et immunopathologia*. 2020; 48 (6): 626-632.
59. Céspedes JA, Fernández-Santamaría R, Ariza A, et al. Diagnosis of immediate reactions to amoxicillin: comparison of basophil activation markers CD63 and CD203c in a prospective study. *Allergy*. 2022; 78: 2745-2755.
60. Heremans K, Toscano A, Elst J, et al. Basophil Activation Test Shows Poor Sensitivity in Immediate Amoxicillin Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023; 11 (2): 500-505.
61. Bogas G, Doña I, Dionicio J, et al. Diagnostic approach of hypersensitivity reactions to cefazolin in a large prospective cohort. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021; 9 (12): 4421-4430.e4424
62. Bennett MR, Mathioudakis AG, Wu J, et al. Performance Characteristics of Basophil Activation Tests for Diagnosing Penicillin Allergy: A Meta-Analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2024; 12 (3): 714-723.e5.

63. Steiner M, Harre A, Himly M. Basophil reactivity as biomarker in immediate drug hypersensitivity reactions—potential and limitations. *Front Pharmacol.* 2016; 7: 171.
64. Park MA, Li JTC. Diagnosis and management of penicillin allergy. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 405–10.
65. Romano A, Valluzzi RL, Gaeta F, et al. The Combined Use of Chronological and Morphological Criteria in the Evaluation of Immediate Penicillin Reactions: Evidence From a Large Study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022; 10 (12): 3238-3248.e2
66. Nahm FS. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J Anesthesiol.* 2022; 75 (1): 25-36.
67. Torres MJ, Ariza A, Mayorga C, Doña I, Blanca-Lopez N, Rondon C, et al. Clavulanic acid can be the component in amoxicillin- clavulanic acid responsible for immediate hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: 502-5.e2.
68. Blanca-Lopez N, Perez-Alzate D, Ruano F, et al. Selective immediate responders to amoxicillin and clavulanic acid tolerate penicillin derivative administration after confirming the diagnosis. *Allergy.* 2015; 70: 1013-9.,
69. Silveira AM, Gaspar Â, Benito-Garcia F, et al. Anaphylaxis to Clavulanic Acid: A 7-Year Survey. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2019; 29 (4): 311-313.
70. Torres-Rojas I, Pérez-Alzate D, Somoza ML, et al. Clavulanic Acid Is a Leading Culprit Beta-Lactam in Immediate Allergic Reactions to Penicillins. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2023; 15 (2): 201-213.
71. Mayorga C., Çelik GE, Pascal M., et al. Flow-based basophil activation test in immediate drug hypersensitivity. An EAACI task force position paper. *Allergy.* 2024; 79: 580-600.
72. Fernandez TD, Torres MJ, Blanca-Lopez N, et al. Negativization rates of IgE radioimmunoassay and basophil activation test in immediate reactions to penicillins. *Allergy* 2009; 64: 242–248.
73. Barni S, Mori F, Valleriani C, et al. The utility of the basophil activation test in the diagnosis of immediate amoxicillin or amoxicillin-clavulanate hypersensitivity in children and adults. *Ital J Pediatr.* 2017; 43 (1): 42.
74. Kopač P, Koren A, Bidovec-Stojkovič U, et al. Basophil Activation Test Predicts Cetuximab Anaphylaxis Severity in Alpha-Gal IgE-Positive Patients. *Diagnostics (Basel).* 2024; 14 (13): 1403.
75. Kopač P, Custovic A, Zidarn M, et al. Biomarkers of the Severity of Honeybee Sting Reactions and the Severity and Threshold of Systemic Adverse Events During Immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021; 9 (8): 3157-3163.

76. Barni S, Mori F, Valleriani C, et al. Anaphylaxis to the amoxicillin skin prick test: utility of the basophil activation test in diagnosis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016; 116 (3): 259-260.
77. Barni S, Mori F, Valleriani C, et al. Anaphylaxis to the amoxicillin skin prick test: utility of the basophil activation test in diagnosis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016; 116 (3): 259-260.
78. Miranda A, Blanca M, Vega JM, et al. Cross-reactivity between a penicillin and a cephalosporin with the same side chain. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 98 (3): 671-677.

## 6 UVOD

### 6.1 PREOBČUTLJIVOST ZA BETALAKTAMSKE ANTIBIOTIKE

#### 6.1.1 Epidemiologija

Antibiotiki so med najpogosteje predpisanimi zdravilnimi učinkovinami, ki se večinoma uporabljajo za zdravljenje akutnih stanj in v nekaterih primerih kot življenjsko pomembno življenjsko pomembna zdravila pri hudih okužbah. Med vsemi antibiotiki je najbolj razširjena uporaba betalaktamskih antibiotikov, zlasti penicilinov in cefalosporinov, zaradi njihovega dobrega varnostnega profila, ozkega spektra delovanja in nizkih stroškov (1,2). Zato je za zdravnika zelo pomembno, če ob predpisovanju antibiotika bolnik pove, da je za tovrstna zdravila preobčutljiv. Epidemiološke analize pokažejo, da ima 5 – 15 % prebivalstva v svoji zdravstveni dokumentaciji označeno, da imajo neke vrste preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike (3). Ob opravljenih diagnostičnih testih je preobčutljivost izključena pri več kot 70 % odraslih in pri več kot 90 % otrok (3,4,5). Večina primerov, označenih kot alergija za antibiotike, je namreč posledica pojava izpuščajev kot posledica virusnih okužb ali neželenih učinkov zdravil, ki jih je pacient ob pojavu reakcije užival (3,6).

Razsežnost problema preobčutljivosti in predpisovanja antibiotika najbolje ponazarja vsakdanji primer v urgentni ambulanti: Bolnikom, preobčutljivim za penicilin se pri zdravljenju gnojne streptokokne angine ponavadi predpiše makrolid azitromicin. Čeprav sta zdravili cenovno primerljivi, je vsaj 30 % piogenih streptokokov odpornih na makrolide. Odpornost proti makrolidom je visoka v državah, kjer se ti antibiotiki pogosto predpisujejo. Z neracionalnim predpisovanjem antibiotikov iz te skupine zdravniki sami prispevamo k naraščanju odpornosti. Vsi piogeni streptokoki so zaenkrat občutljivi na fluorokinolone, ki so z vidika odpornosti dobra zamenjava, vendar so približno štirikrat dražji od penicilina (7). Drug problem je, da se v primerjavi z ozkospektralnim antibiotikom, kot je naravni fenoksimetilpenicilin, pri uporabi širokospektralnih antibiotikov (makrolidov oziroma fluorokinolonov) beleži večje število predvidljivih stranskih učinkov (7,8).

Tretji problem se pokaže pri hospitaliziranih bolnikih. Bolniki označeni kot »alergični na penicilin« namesto penicilina dobijo fluorokinolone, klindamicin, vancomicin ali cefalosporine tretje generacije. V ameriški raziskavi so bolniki z anamnezo »alergije na penicilin« imeli za 10 % daljšo ležalno dobo, za 23 % več okužb s *C. difficile*, 14 % več MRSA in 30 % več VRE okužb (1,9,10). Nепreverjene diagnoze »alergije na penicilin« tako postajajo javnozdravstveni problem in kazalnik kakovosti zdravstvenega sistema (2,10).



Po podatkih farmakovigilance se letno pri 2 % hospitaliziranih pacientov antibiotično zdravljenje zaplete s preobčutljivostno reakcijo (1,11). Anafilaksijo po uporabi penicilinskih antibiotikov je doživelo 459 na 100.000 prebivalcev v ZDA, kar je v letu 2013 predstavljalo 27,8 % vseh primerov anafilaksij, povzročenih z zdravili, s čimer so penicilini na prvem mestu med najpogostejšimi povzročitelji anafilaksije med vsemi zdravili (12). Po drugi strani pa je pogostost anafilaksije po uporabi cefalosporinskih antibiotikov bistveno nižja, in sicer le 61 primerov na 100.000 prebivalcev ZDA (12).

### **6.1.2 Imunologija**

Betalaktamski antibiotiki so skupina antibiotikov, ki se razlikujejo po spektru delovanja, a vsi vsebujejo štiri-členski betalaktamski obroč (13). Glede na njihovo kemično strukturo so betalaktami razvrščajo v dva glavna razreda, peniciline in cefalosporine, ter štiri manjše razrede (13).

Betalaktami delujejo kot imunološki hapteni, kar pomeni, da se morajo vezati na nosilne molekule, da postanejo popolnoma imunogeni (13,14,15). Ko se antibiotik veže na amino radikale aminokislin plazemskih proteinov, najpogosteje albuminov, se spremeni njihova konformacija, kar omogoča imunskemu sistemu, da jih prepozna kot tuje(13,14). Tako betalaktamski obroč kot stranske skupine betalaktamskih antibiotikov imajo potencialno imunogene lastnosti (13,14). Betalaktamski obroč je intrinzično reaktiven, vendar se zaradi svoje kemične nestabilnosti v krvi bolnika hitro odpre, kar omogoča karbonilnim skupinam tvorbo amidnih vezi z amino skupinami lizinskih ostankov bližnjih plazemskih proteinov (13). Ker je približno 95 % penicilinskih metabolitov na ta način vezanih na proteine, nastane antigenska determinanta benzilpeniciloil (BPO), ki je glavna antigenska determinanta penicilina (13). Za pripravo reagentov za kožne teste se BPO veže na šibko imunogeno nosilno molekulo, imenovano polilizin, in tvori benzil peniciloil polilizin (BPOPPL) (13). Preostali penicilinski metaboliti se razgradijo v vrsto metabolitov, ki prav tako delujejo kot hapteni (13). To so t.i. «minor» determinante penicilina, ki povzročajo alergijske reakcije pri približno 10 % do 20 % bolnikov (13). Pri kožnih testih se uporablja tudi mešanica »minor« determinant (MDM) (13).

Pogostokrat ugotavljamo, da bolniki, preobčutljivi za amoksicilin, dobro prenašajo benzilpenicilin (3,13,15). Te bolnike imenujemo »selektivni reaktorji za amokscilin« (3,13,15). Glavna antigenska determinanta amoksicilina je amoksiciloil amid, ki nastane z odpiranjem

betalaktamskega obroča z amino skupinami (3,13,15). Druga pomembna antigenska determinanta amoksicilina je stranska veriga, ki je identična stranski verigi nekaterih cefalosporinov prve in druge generacije, zaradi česar so ti navzkrižno reaktivni (13). Čeprav natančna struktura možnih antigenskih elementov cefalosporinov ni dobro znana, so študije dokazale, da lahko ustvarijo strukture, ki lahko izzovejo specifičen imunski odziv (16). Protitelesa IgE, ki reagirajo s cefalosporini, zaznavajo širok spekter specifičnosti, čeprav je temeljni antigenska struktura v stranski verigi R1 in delu betalaktamskega obroča (16).

Glede na specifičnost IgE ali specifičnih T - limfocitov lahko bolniki s kliničnega vidika razvijejo: 1) selektivne preobčutljivostne reakcije na določen antibiotik; 2) reakcije na različne betalaktame, ki imajo enako stransko verigo, kot sta amoksicilin in cefadroksil; ali 3) reakcije na betalaktamsko jedro antibiotika, kar vodi do navzkrižne reaktivnosti med različnimi betalaktami (13).

### **6.1.3 Klinična slika**

Glede na imunološki mehanizem preobčutljivostne reakcije jih po Gellu in Coombsu razvrstimo v štiri tipe (Tabela 1) (3,17). Preobčutljivostne reakcije na betalaktamske antibiotike so najpogosteje posledica imunološkega odziva, ki ga posredujejo protitelesa IgE, kar opredeljuje reakcijo kot tip I preobčutljivosti. Klinično se te reakcije manifestirajo kot urtikarija, angioedem, konjunktivitis, rinitis, bronhospazem, gastrointestinalni simptomi ali anafilaksija (3,17). Pri 20 % primerov se reakcija lahko razvije v anafilaksijo, v drugih primerih pa ostaja omejena na izolirano urtikarijo, ki vztraja več ur (3,17,18).

Pozne preobčutljivostne reakcije so najpogosteje posledica aktivnosti specifičnih T- limfocitov (Tabela 1)(3). Najpogostejša oblika pozne preobčutljivostne reakcije je enostaven makulopapulozni izpuščaj (MPE) ali zapoznela urtikarija, ki se lahko pojavita že prvi dan zdravljenja, najpogosteje pa med tretjim in enajstim dnevom zdravljenja. Včasih se izpuščaj pojavi tudi več dni po zadnjem odmerku antibiotika (3,17). Izpuščaj vztraja nekaj dni po prekinitvi zdravljenja s povzročiteljem, nato pa spontano izzveni in ni življenjsko nevaren. Alergija za zdravila poznega tipa praviloma ne izzveni z leti (3,17).

Klinično so preobčutljivostne reakcije na betalaktamske antibiotike glede na čas pojava po zaužitju zdravila in za diagnostične namene razvrščajo na takojšnje in pozne (3,17). Takojšnje reakcije se pojavijo v 1 do 6 urah po zadnjem odmerku zdravila, medtem ko se lahko pozne reakcije pojavijo kadarkoli po 1 uri od začetka zdravljenja (3,17). Za hude kožne neželene

reakcije (SCAR) in druge resne sistemske imunološko posredovane reakcije (SSIMR), kot so hepatitis, nefritis, imunsko pogojene citopenije in serumska bolezen je značilen daljši čas do pojava, običajno med 4 in 24 dnevi (3,17). Večina zapletov, ki jih opazimo med zdravljenjem z antibiotiki, niso preobčutljivostne reakcije, temveč manifestacije osnovne bolezni (npr. virusne okužbe, sistemske bolezni vezivnega tkiva) ali predvidljive neželene učinke antibiotika (npr. gastrointestinalne težave). Lahko gre tudi za neželene učinke drugih zdravil, ki jih bolnik jemlje sočasno (npr. analgetiki, zeliščni pripravki) (3,17).

Tabela 1: Razdelitev preobčutljivostnih reakcij po Gellu in Coombsu glede na imunološki mehanizem. Klinično potekajo takojšnje reakcije po tipu I, pozne reakcije pa lahko potekajo po tipih II, III ali IV (3)

		Reaktant	Efektor	Primeri reakcij
I (takojšnja preobčutljivost)		IgE	mastociti	anafilaksija, urtikarija, angioedem
II (citotoksična protitelesa)		IgG, IgM	fagociti, celice NK	hemolitična anemija
III (imunski kompleksi)		IgG	imunski kompleksi	serumska bolezen, akutni intersticijski nefritis
IV (pozna preobčutljivost)	IV a	citokini Th1	makrofagi	kontaktni dermatitis
	IV b	citokini Th2	eozinofilci	makulopapulozni izpuščaj z eozinofilijo
	IV c	citotoksični mehanizem	celice T	Stevens-Johnsonov sindrom, toksična epidermalna nekroliza
	IV d	citotoksični mehanizem	nevtrofilci	pustulozne reakcije

## **6.2 DIAGNOSTIKA PREOBČUTLJIVOSTI ZA BETALAKTAMSKE ANTIBIOTIKE**

### **6.2.1 Diagnostični postopek**

Diagnoza preobčutljivost za betalaktamske antibiotike se začne z natančno anamnezo, ki ji sledijo kožni testi, morebitni testi »in vitro« in končno nadzorovano dajanje osumljenega zdravila, znano kot provokacijski test (18,19). Kožni testi so najpogosteje uporabljena metoda za diagnozo preobčutljivosti pri takojšnjih reakcijah (19). Testi »in vitro« so bistveno manj občutljivi (18,19). Zaradi njihove suboptimalne občutljivosti teh bolniki z negativnimi kožnimi ali testi »in vitro« pogosto potrebujejo provokacijski test, da se izključi preobčutljivost, zlasti če je klinična anamneza nejasna ali so alergijski testi negativni.

### **6.2.1 Anamneza pri diagnostiki preobčutljivosti**

Podobna anamneza je ključna za diagnozo preobčutljivosti za zdravila. Na podlagi anamneze zdravnik oceni, ali je bila reakcija resnično posledica preobčutljivosti, posredovane z imunskim mehanizmom, ter opredeli tip reakcije. Diagnostični koraki vključujejo oceno morfologije in časovnega poteka domnevne preobčutljivostne reakcije, prepoznavanje dejavnikov tveganja za preobčutljivost za zdravila, dokumentiranje prejšnjih reakcij na isto zdravilo, ugotavljanje, katera zdravila so bila potrebna za razrešitev reakcije, in ugotavljanje, katere antibiotike je bolnik po reakciji dobro prenašal.

Dve študiji (Stone in sod., Mohamed in sod.) sta poročali o dobri negativni napovedni vrednosti anamneze pri opredelitvi majhnega tveganja za preobčutljivost za antibiotike (20,21). Vendar pa je anamneza pogosto nezanesljiva, saj so bolniki pogosto alergološko obravnavani več let po reakciji in ne morda ne spomnijo vseh podrobnosti. Poleg tega lahko v tem času preobčutljivost za antibiotik spontano izzveni. Solensky in sodelavci so analizirali različne študije in ugotovili, da je pozitiven rezultat alergijskega testa pri bolnikih z nejasnimi ali nesugestivnimi alergijskimi reakcijami pogost in predstavlja do 33 % primerov s pozitivnimi rezultati kožnih testov (22). Na podlagi anamneze tako obstaja določen odstotek bolnikov z lažno negativnimi rezultati, ki jih je treba upoštevati, saj se lahko ob ponovni izpostavitvi antibiotiku odzovejo s preobčutljivostno reakcijo (22).

## 6.2.2 Vloga kožnih testov pri diagnostiki

Kožni testi (KT) s takojšnjim odčitavanjem, vključno s kožnimi vbodnimi testi (KVT) in intradermalnimi testi (IDT), so indicirani za oceno bolnikov s takojšnjimi reakcijami (19). Kožni testi s kasnim odčitavanjem in/ali »epikutani test« se uporabljajo za oceno bolnikov s kasnimi reakcijami (18). Pri takojšnjih reakcijah se kožni testi izvajajo z injekcijskimi raztopinami, ki vsebujejo sumljive betalaktamske antibiotike, v postopno naraščajočih koncentracijah do najvišje nedražilne koncentracije, v intervalih po 20 minut, in če je KVT negativen, IDT v enakih intervalih (18,19). Postopek prekinemo, če ugotovimo pozitiven KT (18,19). Pri osebah s kasnimi reakcijami je IDT pozitiven pri odloženih odčitkih (npr. po 24, 48 ali 72 urah) (18,19).

Pri takojšnjih reakcijah se s KT počaka 3-6 tednov od reakcije, da se omogoči razrešitev kliničnih simptomov, odstranitev osumljenih zdravil in umik antialergijskih zdravil, s čimer se izogne morebitnemu pomanjkanju odziva, ki je posledica refraktarnega obdobja (18,19).

Vendar z IgE posredovana preobčutljivostna reakcija na betalaktamske antibiotike s časom izzveni, zato je priporočljivo opraviti KT čim prej po omenjenih 3-6 tednov (18,19,23,24). To velja zlasti, če je bolnik senzibiliziran le za en antibiotik (penicilin, amoksicilin ali en izmed cefalosporinov) (18,19,24). Le 20–30 % bolnikov, ki so selektivno pozitivni pri KT s penicilinom, ostane pozitivnih po 10 letih (25). Pet let po pozitivnem kožnem testu 100 % bolnikov s preobčutljivostjo za amoksicilin izgubi odzivnost, v primerjavi s 40 % tistih bolnikov, ki so poleg amoksicilina bili pozitivni tudi za benzilpenicilin (23). Približno tretjina tistih, ki so selektivno pozitivni pri KT s cefalosporini, ohrani odzivnost po 5 letih spremljanja, medtem ko več kot polovica bolnikov, pozitivnih peniciline in cefalosporine, ostane pozitivna po 5 letih (26). Kljub temu ni določene zgornje časovne meje, kjer bi lahko rezultati KT veljali za diagnostične za senzibiliziranost (18,24).

Študije kažejo, da negativna napovedna vrednost kožnih testov ni absolutna, saj nekateri bolniki pokažejo pozitivnost pri provokacijskem testu po negativnih kožnih testih (24). Macy in sodelavci poročajo o 71 reakcijah pri 65 (11,4 %) od 568 bolnikov, preobčutljivih za penicilin, z negativnimi KT, kar kaže na negativno napovedno vrednost 88,6 % (27). Podobno so Torresova in sodelavci poročali o 49 (16,9 %) bolnikih s takojšnjimi reakcijami na peniciline in negativnimi rezultati kožnih testov in sIgE, vendar s pozitivnimi rezultati provokacije (28). Ista skupina je pokazala nizko občutljivost kožnega testiranja tako pri odraslih kot pri otrocih, ki poročajo o kasnim reakcijah za betalaktame (29). Pravzaprav so bili poleg kožnih testov

potrebni izzivi za postavitev diagnoze preobčutljivosti pri 20 od 22 odraslih (29) in 19 od 20 otrok (30). Pozitivna napovedna vrednost kožnega testiranja temelji na zelo redko narejenih provokacijskih testih bolnikov s pozitivnim kožnim testom in je ocenjena na 40 % do 100 % (24). Novejše študije kažejo, da je bilo pri 21 od 26 bolnikov z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije na betalaktamske antibiotike, pri katerih je bil KT pozitiven, tudi po izvedenem oralnem provokacijskem testu (OPT) z istim antibiotikom 21 (80 %) testov pozitivnih (31).

#### **6.2.4 Provokacijski test**

Provokacijski test (največkrat oralni, lahko tudi intravenski) priporočajo tako evropske smernice kot ameriške kot del obravnave preobčutljivosti z betalaktami (19,24,32-35). Ameriške pa priporočajo provokacijo le, če je verjetnost preobčutljivosti majhna in klinični scenarij upravičuje možno tveganje; na primer, ni primerljivega alternativnega zdravila (35). Evropske smernice priporočajo provokacijo z osumljenim betalaktamskim antibiotikom pri bolnikih z nizkim tveganjem z anamnezo kasnih reakcij (zpoznala urtikarija, blaga do zmerna MPE) ter pri bolnikih z anamnezo takojšnjih reakcij, ki imajo negativne kožne teste in »in vitro« teste (19,24,32-34). Provokacija z osumljenim  $\beta$ -laktamskim antibiotikom je kontraindicirana pri bolnikih hudih netakojšnjih reakcij (Steven – Johnsonov sindrom, transepidermalna nekroliza...) ali skoraj smrtne anafilaksije, previdnost pa je priporočljiva pri bolnikih s sistemsko mastocitozo, pri katerih obstaja večje tveganje za hude reakcije zaradi povečanega števila efektorskih celic (19,24,32-34). Priporočajo se stopenjska provokacija s cefalosporini tretje/četrte/pete generacije pri osebah, ki so reagirale na peniciline ali s penicilini s stranskimi verigami, ki se razlikujejo od tistih pri odgovornih cefalosporinih pri osebah, ki so reagirale na cefalosporine (19,24,32-34).

#### **6.2.3 Vloga testov »in vitro« pri diagnostiki**

Testi »in vitro« dopolnjujejo kožne teste v skladu s smernicami EAACI iz leta 2020 pri bolnikih z jasno anamnezo takojšnje preobčutljivosti za betalaktame, vendar z negativnimi kožnimi testi (18). Pri bolnikih z anamnezo hude anafilaksije se testi »in vitro« priporočajo pred kožnim testiranjem, da se zmanjša potreba po kožnem testiranju in zmanjša tveganje za sistemske reakcije (18). V primerih z manjšim tveganjem za sistemske reakcije se testi »in vitro« priporočajo po kožnem testiranju (18). Poleg tega lahko testi »in vitro« nadomestijo

kožne teste, ko so ti kontraindicirani, neprimerni ali neizvedljivi (npr. pri nosečnicah, pri bolnikih z imunosupresijo ali v nestabilnem kliničnem stanju, pri osebah z dermografizmom) (18,19,24,32,34). Najpogosteje uporabljeni »in vitro« testi so merjenje specifičnih IgE in test aktivacije bazofilcev (18).

#### 6.2.4 Specifični IgE testi

Kvantifikacija za zdravilo specifičnega IgE (sIgE) z imunskimi testi najpogosteje temelji na detekciji kompleksa zdravilo-(haptent)-nosilec-protitelo (18,24). Konjugat zdravila-(haptent)-nosilca je vezan na trdno fazo in inkubiran s serumom bolnikov (18,24). Količina vezanih specifičnih IgE se zazna s sekundarnim protitelesom proti človekovemu IgE z odčitkom fluorescence v fluorescentnem encimskem imunotestu (FEIA) (18,24). Rezultati so izraženi arbitrarnih enotah (kU/l), s kvantifikacijo na podlagi krivulj protiteles IgE, ki segajo od 0,00 do 100 kU/l, z mejo zaznavanja, določeno na 0,1 kU/l in pragom 0,35 kU/l za pozitivne rezultate (18,24).

Vendar pa je občutljivost ImmunoCAP® za betalaktame majhna (0–50 %), in korelira z resnostjo kliničnih simptomov (18,24). Meta-analiza iz leta 2021 je pokazala, da je občutljivost specifičnih IgE pri bolnikih s sumom na takojšnjo preobčutljivostno reakcijo s penicilinskimi antibiotiki v primerjavi z anamnezo 26,2 % (95 % IZ, 18,7 % – 35,3 %) in specifičnost 92,1 % (95 % IZ, 64,7 % – 98,7 %) (36).

Študije, v katerih so mejno vrednost postavili nižje - 0,1 kU/l, so pokazale, da se občutljivost s tem poveča na do 85 %, vendar se specifičnost zmanjša do 54 %, zlasti za primere s cIgE > 200 kU/l (36,37). Poleg tega je več študij poročalo o lažno pozitivnih rezultatih penicilina V (36,37). Zidarni in sodelovci so določali s IgE pri bolnikih brez alergije za penicilin, vendar z visokimi vrednostmi celotnega IgE in so pokazali, da lahko test kvantifikacije za zdravilo specifičnega IgE daje lažno pozitivne rezultate pri tistih s skupnimi vrednostmi IgE > 500 kU/l (36). Specifičnost testov za specifične IgE pri alergiji na β-laktame je torej <100 % in postopoma upada z naraščanjem celokupnega IgE ter se približa 0 %, ko je skupni IgE > 3000 kU/l (36). Zato se zadnje čase vse bolj raziskujejo in uveljavljajo drugi testi »in vitro« med katerimi se najbolj uveljavlja test aktivacije bazofilcev.

### 6.3 TEST AKTIVACIJE BAZOFILCEV - OZADJE

Test aktivacije bazofilcev (BAT) je laboratorijski test, ki uporablja pretočno citometrijo za merjenje izražanja beljakovin, znanih označevalcih aktivacije, na površini krvnih bazofilcev. Označevalce CD63 (engl. *cluster of differentiation*) je odkril Edward Knol leta 1991 in od takrat BAT postopoma pridobiva pomen pri diagnostiki in spremljanju alergijskih bolezni (38). BAT je funkcionalni test, ki temelji na stimulaciji živih celic v sveži polni krvi z alergenom. Test ocenjuje navzkrižno vezavo protiteles IgE, vezanih na površino bazofilcev, in velja za natančnejši pokazatelj preobčutljivosti kot merjenje koncentracije za alergen specifičnega IgE (38,39). V primerjavi s provokacijskim testom je BAT manj invaziven, časovno in logistično udobnejši za izvedbo.

BAT se uporablja v primerih, ko rutinski klinični testi (npr. kožni testi) in laboratorijski testi (sIgE) dajajo dvoumne ali neskladne rezultate z anamnezo, so preveč tvegani ali če ni na voljo reagentov za njihovo izvedbo (40,41,42). Ker gre za laboratorijski test, BAT omogoča diagnostiko brez neposredne izpostavljenosti bolnika alergenu, kar povečuje varnost in udobje diagnostičnega postopka in za bolnike in njihove družine (40,41).

Test deluje tako, da se bazofilci stimulirajo z alergenom, kar povzroči navzkrižno vezavo kompleksov protiteles IgE - alergen, vezanih na receptorje FcεRI (40,41). To vodi do fosforilacije β- in γ- podenot FcεRI, kar spodbuja eksocitozo sekretornih lizosomov, ki vsebujejo histamin, histidin dekarboksilazo, heparin in proteaze (40,41). Pri inaktiviranih bazofilcih se beljakovine CD63 in CD203c vežejo na znotrajcelične granule in se le komaj izrazijo na površinski membrani (40). Med aktivacijo se kot posledica eksocitoze sekretornih lizosomov CD63 in CD203c začnejo izražati z visoko gostoto na degranuliranih bazofilcih, kar omogoča njihovo merjenje (40,41).

Pri približno 10 % populacije se bazofilci ne odzovejo na stimulacijo prek FcεRI kljub temu, da izražajo normalno gostoto IgE na površini in dobro uravnavajo CD63 kod odziv na od- IgE neodvisen dražljaj (40,41). Klinična uporabnost BAT je omejena zaradi potrebe po sveži krvi, specializirani laboratorijski opremi in zahtevni analizi., zato test še ni široko razširjen po svetu (41,42,43).

BAT je natančno validiran in dobro uveden v alergološko prakso pri preobčutljivosti za hrano, kot so arašidi (občutljivost 86 %, specifičnost 96 %, mejna vrednost >8,11 % aktiviranih



bazofilcev), ter za strupe kožekrilcev, kot so čebele (občutljivost 91 %, specifičnost 93 %, mejna vrednost >15 % aktiviranih bazofilcev) (40,43,44,45).

Številne raziskave so preučile uporabnost BAT pri diagnostiki preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike (46-61). Učinkovitost BAT je bila različna med študijami, z občutljivostjo 55,3 % (95 % IZ, 27,9 % - 72,4 %) in specifičnostjo 89 % (95 % IZ 85 % - 93%) glede na mejno vrednost za pozitiven rezultat, nabor testiranih betalaktamov in standard za dokaz preobčutljivosti (62). BAT se je izkazal za boljši test kot merjenje specifičnih IgE za zdravilo, ne pa kot kožni testi (62). Pomembno je omeniti, da se rezultati kožnih testov in BAT ne ujemajo v vseh primerih. Le pri približno 50–60 % bolnikov s pozitivnimi kožnimi testi je bilo pozitivno pri BAT z istim betalaktamom (50,53), medtem ko je bil BAT pozitiven pri do tretjine bolnikov z negativnimi kožnimu testi (50). BAT torej trenutno služi kot dopolnilno orodje pri diagnozi preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike (19).

Dejavniki, ki lahko vplivajo na variabilnost občutljivosti BAT, vključujejo resnost klinične slike preobčutljivostne reakcije, čas od preobčutljivostne reakcije do izvedbe testa, razlike v predpisovanju zdravil po državah in zmožnosti testiranih betalaktamov, da identifikacijo navzkrižno reaktivne betalaktame (63). Vendar je na tem področju še vedno malo raziskav, marsikatero pa kažejo nasprotno si rezultate (63).

## 7 NAMEN IN HIPOTEZA

Glede na nizko občutljivost kožnih testov, nezanesljivost klinične anamneze in tveganja oralnega provokacijskega testiranja, obstaja potreba po razvoju zanesljivega testa »in vitro« za potrditev preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike in oceno navzkrižne reaktivnosti z drugimi betalaktami, ki bi zdravnikom omogočil izbiro varnih alternativ in zmanjšal potrebo po provokacijskih testih (41-44,62). Test aktivacije bazofilcev (BAT) se v zadnjih desetletjih intenzivno preučuje kot zanesljivo diagnostično orodje za preobčutljivost za betalaktamske antibiotike pri bolnikih, ki so doživeli anafilaksijo ali akutno urtikarijo (41-62).

Skozi analizo podatkov o bolnikih, ki so opravili BAT v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko UKPA Golnik smo želeli oceniti možne prednosti BAT v primerjavi z drugimi diagnostičnimi metodami, ki se uporabljajo pri diagnostiki preobčutljivosti na betalaktamske antibiotike ter določiti klinične indikacije in vlogo testa BAT v diagnostičnem postopku. S tem želimo zagotoviti učinkovitejšo in natančnejšo obravnavo bolnikov.

Hipoteza 1: Občutljivost in specifičnost BAT pri bolnikih z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije za betalaktamske antibiotike (v okviru mejne vrednosti za pozitiven rezultat BAT), ki jo uporablja rutinski laboratorij) sta primerljivi kot pri trenutnih standardnih diagnostičnih metodah, kot so kožni testi.

Hipoteza 2: Občutljivost BAT se zmanjšuje s časom, preteklim od takojšnje preobčutljivostne reakcije, kar kaže na časovno upadanje specifične aktivacije bazofilcev z osumljenim betalaktamskim antibiotikom.

Hipoteza 3: Občutljivost BAT je večja pri bolnikih s hudo klinično sliko takojšnje preobčutljivostne reakcije (anafilaksija) kot pri bolnikih z blago klinično sliko (generalizirana urtikarija).

Hipoteza 4: Negativni rezultati BAT s penicilinskimi antibiotiki pri bolnikih z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije s penicilinom napovedujejo navzkrižno reaktivnost s cefalosporinskimi antibiotiki s specifičnostjo, primerljivo s kožnimi testi.

## 8 METODE

Izvedbo raziskave je 06. 06. 2023 odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (soglasje številka 0120-195/2023/3, Priloga 1).

### 8.1 PREISKOVANCI

V retrospektivnem delu klinične raziskave smo v bazi podatkov Laboratorija za klinično imunologijo in molekularno genetiko Klinike Golnik poiskali bolnike, ki so imeli od januarja 2015 do novembra 2023 narejen test aktivacije bazofilcev (BAT) za enega izmed beta-laktamskih antibiotikov. V prospektivnem delu raziskave smo v obdobju od avgusta do novembra 2023 izbranim bolnikom odvzeli vensko kri za ponovitev BAT.

#### 8.1.1 Retrospektivna raziskava bolnikov

Med 361 bolniki, ki so imeli v obdobju 8 let opravljen BAT za vsaj enega izmed  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, smo iz nadaljnje analize izključili 28 bolnikov, ki so imeli neodzivne bazofilce z manj kot 10 % CD63+ celic po inkubaciji s pozitivno kontrolo.

Preostalim bolnikom smo v Bolnišničnem integriranem računalniško podprtem informacijskem sistemu (BIRPIS) pogledali anamnezo in rezultate opravljenih diagnostičnih preiskav. Štiriindvajset bolnikov je imelo podatke za opravljenih več BAT, v takšnih primerih smo v analizi obdržali le časovno prvi BAT narejen po preobčutljivostni reakciji.

Pogledali smo, ali so imeli narejen BAT za osumljeni antibiotik, ki je domnevno povzročil preobčutljivostno reakcijo ter ali se bolniki spomnijo preobčutljivostne reakcije. Bolnike, ki niso imeli opravljen BAT z osumljenim antibiotikom (12) ter bolnike, ki se niso spomnili preobčutljivostne reakcije (60) smo izključili iz raziskave.

Glede na anamnezo smo bolnike razvrstili v dve skupini: prvo skupino so sestavljali bolniki (169) z anamnezo, sumljivo za takojšnjo preobčutljivostno reakcijo, verjetno posredovano s protitelesi IgE ter skupino, ki so jo sestavljali tisti bolniki, pri katerih je bila anamneza sumljiva za kasno preobčutljivostno reakcijo, verjetno posredovano z limfociti T. Skupino bolnikov (92) s kasno reakcijo smo vzeli za kontrolno skupino.

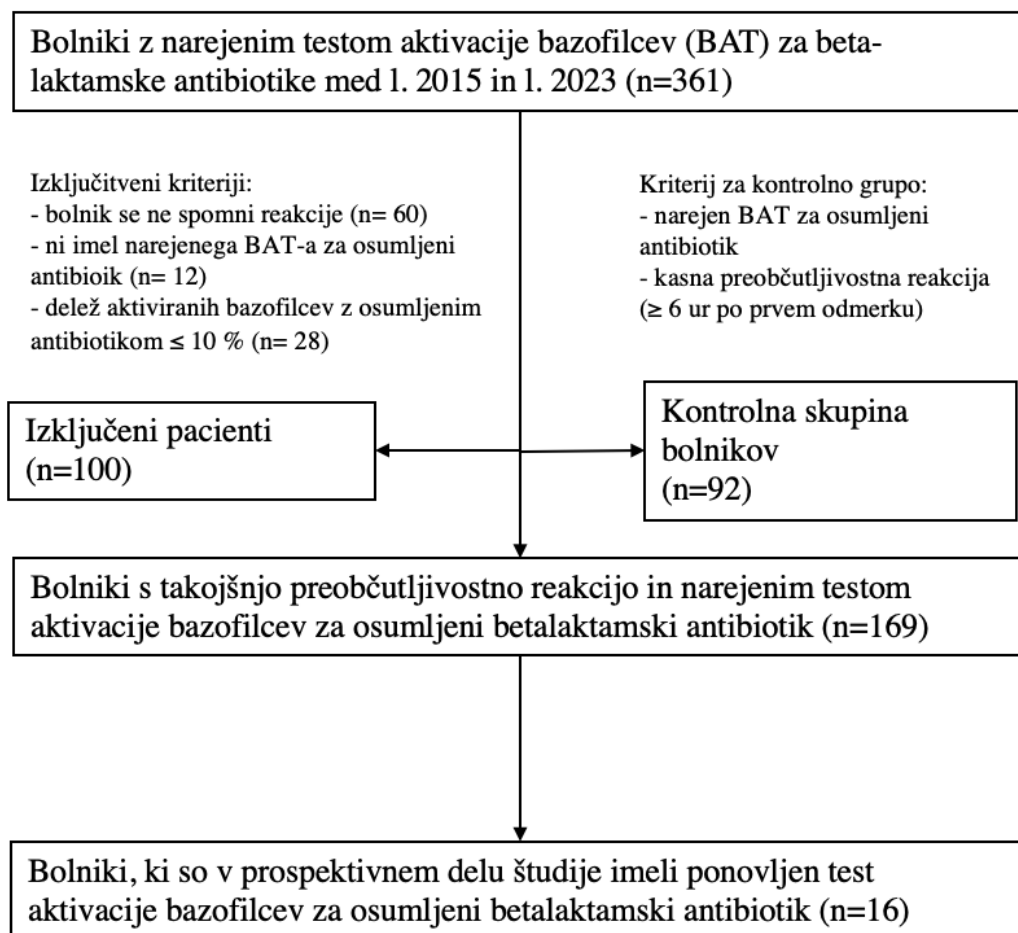
V skupino bolnikov z anamnezo, sumljivo za takojšnjo preobčutljivostno reakcijo, smo vključili bolnike, ki so izpolnjevali vse spodaj navedene kriterije:

- preobčutljivostna reakcija, ki se je zgodila v prvih 6 urah po zaužitju prve tablete osumljenega betalaktamskega antibiotika,

- narejen BAT za osumljeni antibiotik in narejeni kožni test ali/in provokacijski test za osumljeni antibiotik,
- starost nad 18 let ob testu BAT.

V skupino, ki so jo sestavljali bolniki, pri katerih je bila anamneza sumljiva za kasno preobčutljivostno reakcijo, smo vključili bolnike, ki so izpolnjevali vse spodaj navedene kriterije:

- preobčutljivostna reakcija, ki se je zgodila kasneje kot v prvih 6 urah po zaužitju prve tablete osumljenega betalaktamskega antibiotika,
- narejen BAT za osumljeni antibiotik in narejeni kožni test ali/in provokacijski test za osumljeni antibiotik,
- starost nad 18 let ob testu BAT.



**Slika 1:** Diagram poteka vključitve preiskovancev v raziskavo.

Podatke smo zbrali v tabeli, kamor smo vpisovali šifre bolnikov, njihov spol, starost ob narejenem testu BAT, anamnestični opis preobčutljivostnih reakcij, čas, ki je potekel od prvega

odmerka do reakcije, čas, ki je potekel od reakcije do narejenega testa BAT, rezultate kožnih testov, rezultate oralnih provokacijskih testov ter rezultate testa BAT.

### **8.1.2 Prospektivna raziskava bolnikov**

Vsem bolnikom, ki so imeli pozitiven rezultat BAT narejen manj kot 12 mesecev po reakciji in je od BAT minilo manj kot 12 mesecev, smo po pošti poslali dopis, v katerem smo jih seznanili z našo raziskavo in prosili, če bi prišli na kontrolni alergološki pregled in odvzem krvi za ponovno izvedbo BAT za osumljeni antibiotik. Bolnike smo nato poklicali po telefonu in jih povabili na pregled.

## **8.2 KOŽNI TESTI**

Kožne vbodne teste (KVT) smo izvajali s komercialno dostopnimi intravenskimi raztopinami: penicilinom G (10.000 IU/ml) (Fagron, Belgija), amoksicilinom (20 mg/ml) (Lek, Slovenija), amoksicilinom in klavulansko kislino (20 mg/ml) (Lek, Slovenija), ceftazidimom (1 mg/ml) (ACS Dobfar, Italija), ceftriaksonom (1 mg/ml) (Lek, Slovenija) ter cefuroksimom (1 mg/ml) (Lek, Slovenija). Pozitivno kontrolo smo delali s histaminom, za negativno kontrolo smo pa uporabili fiziološko raztopino. V primeru negativnega KVT smo izvedli intradermalne teste (IDT) z isto snovjo z razredčino 1:10 in nerazredčenim antibiotikom. Če so bili negativni, so bili testi odčitani 2 ali 3 dni pozneje zaradi morebitne pozne reakcije. Vbodni testi so veljali za pozitivne, če je bil premer urtike po 20 minutah vsaj polovica premera histamina, intradermalni pa, če se je premer urtike povečal za vsaj 3 mm in je bil obdan z eritemom.

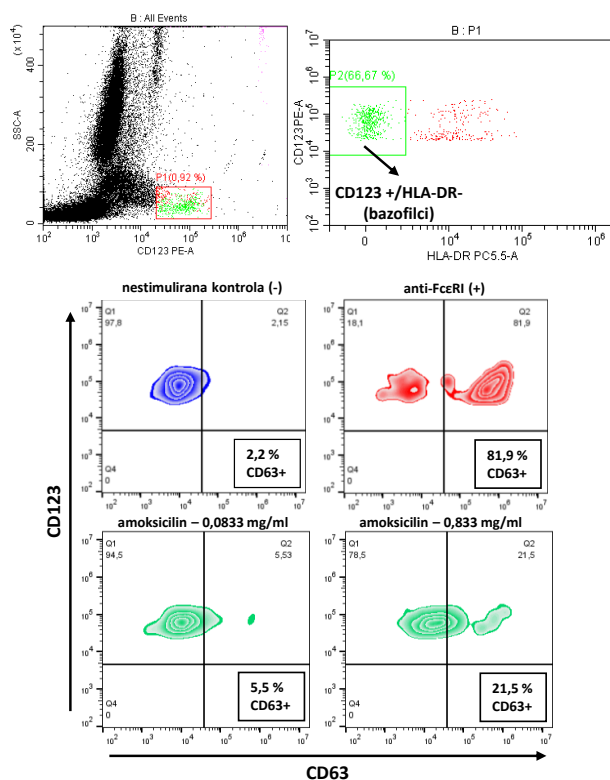
## **8.3 ORALNI PROVOKACIJSKI TESTI**

Če so bili IDT negativni, smo naredili peroralni provokacijski test. V 1-urnih intervalih smo dajali naraščajočo količino zdravila. Odmerki fenoksimetilpenicilina (Ospen 1000, Lek, Slovenija) so bili 5mg, 50 mg, 150 mg, 300 mg in 500 mg (kumulativni odmerek 1.000 mg). Odmerki amoksicilina (Hiconcil 500, Krka, Slovenija) so bili 5 mg, 50 mg, 250 mg in 500 mg (kumulativni odmerek 805 mg). Če je bila takojšen OPT negativen, so bolniki nadaljevali z jemanjem 2 x 1000 mg antibiotika 3 dni, razen če se je reakcija pojavila prej. Bolnike je uposobljeno medicinsko osebje opazovalo zaradi možnih zapoznelih reakcij.

#### 8.4 TEST AKTIVACIJE BAZOFILCEV

Heparinizirano kri smo spodbujali z različnimi koncentracijami komercialnih pripravkov antibiotikov (Bühlmann Laboratories, Basel, Švica). Uporabili smo tribarvno tehniko anti-CD123/anti-HLA DR/anti-CD63, kjer so bazofilci označeni kot CD123+/HLA DR– celice, medtem ko so aktivirani bazofilci dodatno označeni kot CD63+.

Vzorci heparinizirane krvi smo inkubirali 15 min pri 37 °C s stimulacijskim pufrom, ki vsebuje IL-3 in različnimi koncentracijami antibiotika (končne koncentracije penicilina V in G 1,33 mg/mL in 0,133 mg/mL; amoksicilina ter cefalosporinov 0,833 mg/mL in 0,0833 mg/mL), 0,55 µg/ml monoklonskimi protitelesi anti-FcεRI (Bühlmann Laboratories), 2 µM fMLP (Sigma, St. Louis, Missouri, ZDA) ali samo s stimulacijskim pufrom. Dodali smo s FITC označena monoklonska protitelesa anti-CD63, s PE-označena protitelesa anti-CD123 in s PerCP-označena protitelesa anti-HLA-DR (BD Biosciences, San Jose, Kalifornija, ZDA) ter vzorce inkubirali 20 minut v hladni kopeli pri 4 °C. V vzorcih smo nato lizirali eritrocite z dodatkom reagenta BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences), jih sprali z reagentom CellWASH (BD Biosciences) in resuspendirali v fiksacijskem pufu (BD Biosciences) ter analizirali s pretočnim citometrom FACSCanto II (BD Biosciences). Določili smo delež aktiviranih oz. degranuliranih bazofilcev (CD63+) ter stimulacijski indeks (SI) kot razmerje med deležem aktiviranih bazofilcev pri najvišji koncentraciji antibiotika in deležem aktiviranih bazofilcev samo s stimulacijskim pufrom.



**Slika 2.** Primer analize testa aktivacije bazofilcev in prikaz stimulacije z nestimulirano kontrolo (samo stimulacijski pufer), pozitivno kontrolo anti-FcεRI in dvema koncentracijama amoksicilina. SI za najvišjo koncentracijo amoksicilina (0,833 mg/ml) je 9,77.

## 8.5 STATISTIČNE METODE

Statistično analizo smo opravili s programi Microsoft Excel in GraphPad (GraphPad Prism 10, GraphPad software). Za ugotavljanje statističnih razlik smo za kategorične spremembe uporabili test hi-kvadrat ali Fisherjev natančni test. Pri zveznih spremenljivkah smo najprej preverili normalnost porazdelitve vrednosti po skupinah z uporabo Shapiro – Wilkovega in Kolmogorov – Smirnov testa. Nato smo za ugotovitev statistično značilnih razdelitev zveznih spremenljivk med skupinami v primeru normalne porazdelitve določali s Studentovim t testom za odvisne vzorce, v primeru, da porazdelitev ni bila normalna, smo uporabili Mann-Whitney U test. Morebitne korelacije smo ugotavljali s Spearmanovo analizo.

Za oceno optimalne mejne vrednosti (stimulacijski indeks) pozitivnega rezultata BAT smo uporabili krivulje ROC (angl. *receiver operating characteristic curve*). Analizo s krivuljo ROC smo izvedli za betalaktamske antibiotike, ki so bili testirani s KT in BAT pri vsaj 20 pacientih s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo, ne glede na anamnezo osumljenega antibiotika.

Krivulja ROC je graf, ki prikazuje občutljivost testa (na y-osi) v primerjavi z njegovo stopnjo lažno pozitivnih rezultatov (LP) (tj. 1-specifičnost, narisana na x-osi) za različne mejne vrednosti pri določitvi pozitivnih in negativnih rezultatov.

Občutljivost in specifičnost smo opredelili na naslednji način:

- Resnično pozitiven (RP) rezultat: bolnik s pozitivnim kožnim testom in pozitivnim BAT.
- Lažno pozitiven (LP) rezultat: bolnik z negativnim kožnim testom in pozitivnim BAT.
- Resnično negativen (RN) rezultat: bolnik z negativnim kožnim testom in negativnim BAT.
- Lažno negativen (LN) rezultat: bolnik s pozitivnim kožnim testom in negativnim BAT.

Statistično pomembne rezultate smo opredelili s  $p < 0,05$ .

## 8.6 STATISTIČNA ANALIZA

Demografske in klinične podatke bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo in bolnikov s kasno preobčutljivostno reakcijo smo predstavili v tabeli 2. Za vsako spremenljivko smo preverili, ali se statistično razlikuje med obema skupinama bolnikov, tako kot je opisano v poglavju 8.5. Rezultate diagnostičnih testov bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo smo predstavili v tabeli 3, medtem ko so rezultati diagnostičnih testov bolnikov s kasno preobčutljivostno reakcijo predstavljeni v tabeli 4.

Hipotezo 1 smo preverili s pomočjo krivulj ROC, kot je opisano v poglavju 8.5, pri čemer smo rezultate analize prikazali v tabeli 5. V tabeli 6 smo prikazali občutljivost, specifičnost, pozitivno napovedno vrednost in negativno napovedno vrednost BAT v primerjavi s KT za antibiotike, ki smo jih analizirali s krivuljami ROC. Ujemanje rezultatov KT in BAT za osumljene antibiotike smo predstavili v tabeli 7.

Hipotezo 2 smo preverili z analizo s Spearmanovo analizo korelacije. Poleg tega smo analizirali, ali se skupina bolnikov, ki so opravili BAT znotraj prvih 12 mesecev po preobčutljivostni reakciji, razlikuje od skupine bolnikov, ki so opravili BAT po prvih 12 mesecih, v deležu pozitivnih rezultatov BAT (hi kvadrat s Yatesovo korekcijo) in v vrednosti stimulacijskih indeksov BAT (Mann Whitneyev U test). Občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost BAT v primerjavi s KT v obeh skupinah bolnikov smo analizirali s Fisherjevim natančnim testom.

Pri bolnikih, ki so v prospektivnem delu raziskave ponovno opravili BAT, smo s Studentovim t testom za odvisne vzorce preverili, ali se stimulacijski indeksi BAT in deleži aktiviranih bazofilcev razlikujejo med prvim in drugim opravljenim BAT.



Hipotezo 3 smo preverili z analizo, ali se skupina bolnikov s klinično sliko anafilaksije razlikuje od skupine bolnikov s klinično sliko generalizirane urtikarije v deležu pozitivnih rezultatov BAT (hi kvadrat z Yatesovo korekcijo) in v vrednosti stimulacijskih indeksov (Mann Whitneyev U test).

Hipotezo 4 smo preverili z analizo, ali se skupina bolnikov z negativnimi KT za osumljeni penicilinski antibiotik razlikuje od skupine bolnikov z negativnimi BAT za osumljeni penicilinski antibiotik v deležu pozitivnih rezultatov OPT s cefuroksimom.

## 9 REZULTATI

### 9.1 Klinične značilnosti bolnikov

Na podlagi anamneze smo v skupino bolnikov, ki so imeli takojšnjo preobčutljivostno reakcijo, uvrstili 169 od 361 bolnikov. Iz raziskave smo izključili 28 bolnikov, ki so imeli neodzivne bazofilce, 12 bolnikov, ki niso imeli opravljen BAT z osumljenim antibiotikom ter 60 bolnikov, ki se niso spomnili preobčutljivostne reakcije.

Demografski in klinični podatki bolnikov vključenih v raziskavo so prikazani v tabeli 2. Med skupinama ni bilo statistično pomembnih razlik v spolu in starosti.

**Tabela 2:** Demografski in klinični podatki bolnikov vključenih v raziskavo

	Bolniki s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo (n=169)	Bolniki s kasno preobčutljivostno reakcijo (n=92)	p
Starost ob narejenem testu BAT (mediana, IQR, leta)	42,5 (34 – 59)	41,5 (33 – 54)	0,1947
Spol (N, % žensk)	116 (68,5)	66 (71,7)	0,6736
Simptomi preobčutljivostne reakcije (N, %)			
Anafilaksija	86 (50,9)	0	<0,0001
Urtikarija	55 (32,5)	71 (77,2)	<0,0001
Makulopapulozni izpuščaj	0	8 (8,7)	0,0002
Ostalo*	28 (16,6)	13 (14,1)	0,7224
Osumljeni antibiotik (N, %)			
Fenoksimetilpenicilin ali penicilin G	45 (26,6)	41 (44,6)	0,0024
Amoksicilin	32 (18,9)	15 (16,3)	0,7362
Amoksicilin s klavulansko kislino	64 (37,9)	27 (29,3)	0,1384
Cefalosporinski antibiotiki	21 (12,4)	1 (1,1)	0,0008
Dva antibiotika**	7 (4,1)	8 (8,7)	0,1638
Časovni zamik med prvim odmerkom zdravila in začetkom reakcije (mediana, IQR, ure)	0,42 (0,2 – 1)	61 (24 – 150)	<0,0001
Časovni zamik med reakcijo in izvedbo BAT (mediana, IQR, meseci)	9 (4 – 36)	9,5 (4,75 – 62,5)	0,2606

*Legenda:* BAT – test aktivacije bazofilcev; IQR – interkvartilni razmik; \* V skupini bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo: 13 je imelo izolirano kožno prizadetost (5 angioedem brez urtikarije in 8 pruritus), 10 je imelo izolirano dihalno prizadetost (7 dispnejo in 1 poslabšanje astme), 2 sta imela izolirano srčno – žilno prizadetost (1 je doživel sinkopo in 1 je imel palpitacije) in 3 bolniki so imeli prizadeta prebavila (2 sta bruhala in 1 je imel trebušne krče); \*\*V skupini bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo: pri 2 fenoksimetilpenicilin in amoksicilin, pri 3 fenoksimetilpenicilin ter amoksicilin s klavulansko kislino, pri 1 kloksacilin ter amoksicilin s klavulansko kislino, ter pri 1 fenoksimetilpenicilin in cefaklor.

## 9.2 Rezultati kožnih testov in oralnih provokacijskih testov

Pri 166 bolnikih s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo, pri katerih sta bila narejena tako kožni test kot test aktivacije bazofilcev je bilo narejeno 496 kožnih testov (povprečno 2,9 na bolnika), od tega jih je bilo pozitivnih 95, od tega so bili pri 4 kasno pozitivni, ki pa jih v analizi nismo upoštevali, ker smo preučevali samo takojšnje preobčutljivostne reakcije.

Pri 59 (35,5 %) bolnikih s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo je bil KT pozitiven z osumljenim antibiotikom: pri 19 amoksicilin, pri 32 amoksicilin s klavulansko kislino, pri 3 fenoksimetilpenicilin ter 5 cefalosporinskih antibiotikov (Tabela 3).

OPT je bil narejen za 184 antibiotikov (povprečno 1,1 na bolnika). Pri 48 bolnikih s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo je bil OPT narejen z osumljenim antibiotikom, pozitivnih je bilo 11 (22,9%) bolnikov.

**Tabela 3:** Rezultati narejenih diagnostičnih testov z osumljenim antibiotikom pri bolnikih z anamnezo takojšnje preobčutljivosti

Osumljeni antibiotik* (število bolnikov)	KT (pozitivni / narejeni)**	BAT (pozitivni / narejeni)***	OPT (pozitivni / narejeni)**
Amoksicilin (34)	19/34	4/34	1/4
Amoksicilin s klavulansko kislino (68)	32/67	26/68	2/13
Fenoksimetilpenicilin ali penicilin G (51)	3/49	7/51	7/22
Cefalosporinski antibiotiki (22)	5/22	6/22	1/9
Vsi osumljeni antibiotiki (169)	59/172	43/175	11/48

*Legenda:* BAT – test aktivacije bazofilcev, KT – kožni testi, OPT – oralni provokacijski test; \*Prišteti tudi bolniki z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije za več antibiotikov. \*\* Samo takojšnji pozitivni rezultati. \*\*\* Stimulacijski indeks večji kot 2.

Devedeset od 92 bolnikov s kasno preobčutljivostno reakcijo je opravilo KT z osumljenim antibiotikom, pozitivnih je bilo 13 (14,4 %) bolnikov: 6 bolnikov je bilo s takojšnjim pozitivnim rezultatom ter 7 bolnikov s kasnim pozitivnim rezultatom (Tabela 4).

OPT z osumljenim antibiotikom je opravilo 50 bolnikov s kasno preobčutljivostno reakcijo, pozitivno je bilo 16 (32 %) bolnikov: 9 bolnikov je bilo s takojšnjim pozitivnim rezultatom ter 7 bolnikov s kasnim pozitivnim rezultatom.

**Tabela 4:** Rezultati narejenih diagnostičnih testov z osumljenim antibiotikom pri bolnikih z anamnezo kasne preobčutljivosti (92)

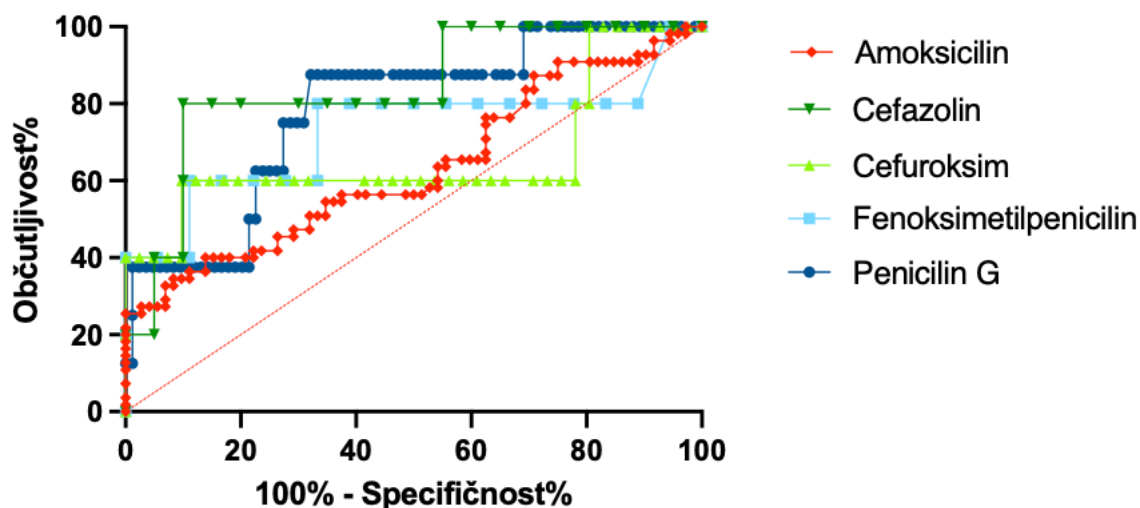
<b>Osumljeni antibiotik* (število bolnikov)</b>	<b>KT (takoj pozitivni; kasno pozitivni / narejeni)</b>	<b>BAT (pozitivni / narejeni)**</b>	<b>OPT (takoj pozitivni; kasno pozitivni / narejeni)</b>
Amoksicilin (n=20)	1;1/18	2/20	1;0/12
Amoksicilin s klavulansko kislino (n=30)	4;6/30	3/30	1;1/10
Fenoksimetilpenicilin ali penicilin G (48)	1;0/48	3/48	7;6/28
Cefalosporinski antibiotiki (2)	0;0/2	0/2	0;0/0
Vsi osumljeni antibiotiki (100)	6;7/98	8/100	9;7/50

*Legenda:* BAT – test aktivacije bazofilcev, KT – kožni testi, OPT – oralni provokacijski test;  
\*Prišteti tudi bolniki z anamnezo kasne preobčutljivostne reakcije za več antibiotikov. \*\*  
Stimulacijski indeks večji kot 2.

### **9.3 Določanje optimalne mejne vrednosti testa aktivacije bazofilcev v primerjavi z rezultati kožnih testov in analiza občutljivosti in specifičnosti**

BAT je bil narejen za 453 antibiotikov pri vseh 169 bolnikih s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo (povprečno 2,7 na bolnika). Po kriteriju, da je mejna vrednost BAT SI večji kot 2, je bil BAT z osumljenim antibiotikom pozitiven pri 43 bolnikih (25,4 %) s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo, in sicer pri 4 amoksicilin, pri 26 amoksicilin s klavulansko kislino, pri 7 fenoksimetilpenicilin ter pri 6 cefalosporinski antibiotik (tabela 3). V skupini 92 bolnikov z anamnezo kasne preobčutljivostne reakcije je 7 (8,7 %) bolnikov imelo pozitiven rezultat BAT (Tabela 4).

Od 453 narejenih BAT v skupini bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo, smo analize s krivuljo ROC naredili za posamezne antibiotike, ki so pri vsaj 20 bolnikih bili testirani tako z BAT kot s KT za isti antibiotik. To so penicilin G, fenoksimetilpenicilin, amoksicilin, cefuroksim in cefazolin. Primerjali smo rezultate BAT z KT kot standardom potrditve senzibilizacije za isti antibiotik. Rezultati analiz so prikazani na sliki 2 in v tabeli 5.



**Slika 2:** Krivulje ROC (angl. *reciever operating characteristic curve*) za fenoksimetilpenicilin (svetlo modra krivulja), penicilin G (temno modra krivulja), amoksicilin (rdeča krivulja), cefuroksim (svetlo zelena krivulja) in cefazolin (temno zelena krivulja).

**Tabela 5:** Prikaz rezultatov analize s krivuljama ROC za fenoksimetilpenicilin, penicilin G, amoksicilin in cefuroksim v primerjavi s KT.

Površina pod krivuljo ROC (AUC)	Fenoksimetilpenicilin	Penicilin G	Amoksicilin	Cefuroksim	Cefazoln
Površina	0,73	0,78	0,69	0,66	0,84
Standardna napaka	0,16	0,08	0,05	0,17	0,10
95 % IZ	0,41 - 1,00	0,62 - 0,94	0,59 to 0,78	0,33 - 0,997	0,64 to 1,00
p	0,13	0,009	0,0003	0,24	0,02
Mejna vrednost*	1,9	1,2	2,4	1,3	1,5
Podatki o bolnikih					
Kontrole (KT neg)	18	84	73	41	20
Pacienti (KT poz)	5	8	54	5	5

*Legenda:* AUC - angl. *area under the ROC curve*; IZ – interval zaupanja; KT – kožni test; neg – negativen rezultat; poz – pozitiven rezultat; ROC - angl. *reciever operating characteristic curve*); \*Določili smo s pomočjo vrednosti Youdenovega indexa J.

S pomočjo Youdenovega indeksa smo za vsako krivuljo določili optimalno mejno vrednost (angl. *cut off point*) za vsak analizirani antibiotik, kar je prikazano v tabeli 5. Po analizi so optimalne mejne vrednosti za vse antibiotike razen amoksicilina bile krepko manjše od območja mejne vrednosti  $SI > 2$ .

Ujemanje KT in BAT pri 166 bolnikih, ki so opravili tako KT kot BAT za 172 osumljenih antibiotikov za posamezne osumljene antibiotike kot tudi vse osumljene antibiotike je prikazano v tabeli 6.

**Tabela 6:** Prikaz ujemanja rezultatov KT in BAT za posamezne osumljene antibiotike v skupini bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo.

Osumljeni antibiotik (Število bolnikov*)	pozitiven rezultat obeh testov (%)**	negativen rezultat obeh testov (%)	Pozitiven rezultat le pri BAT (%)*	Pozitiven rezultat le pri KT (%)**
Amoksicilin (34)	12 (35,3)	2 (5,9)	1 (2,9)	19 (55,9)
Amoksicilin s klavulansko kislino (68)	7 (10,3)	45 (66,2)	5 (7,4)	11 (23,5)
Cefalosporinski antibiotiki (20)	6 (27,3)	10 (45,6)	3 (13,6)	1 (4,5)
Fenoksimetilpenicilin ali penicilin G (50)	6 (12)	37 (74)	3 (6)	4 (8)
Vsi osumljeni antibiotiki (172)	31 (18)	94 (54,6)	12 (7)	35 (20,4)

*Legenda:* BAT – test aktivacije bazofilcev; KT – kožni test; \*Prišteti tudi bolniki z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije za več antibiotikov. \*\* Samo takojšnji pozitivni rezultati.

Preverili smo občutljivost, specifičnost in napovedne vrednosti BAT v primerjavi s KT pri posameznih in vseh osumljenih antibiotikih. Rezultati so prikazani v tabeli 7. Pri amoksicilinu s klavulansko kislino, fenoksimetilpenicilinu in cefalosporinskih antibiotikih smo ugotovili, da se razporeditev pozitivnih in negativnih rezultatov KT statistično pomembno razlikuje od razporeditev pozitivnih in negativnih rezultatov BAT (Fischerjev natančni test).

**Tabela 7:** Prikaz občutljivosti, specifičnosti, pozitivne in negativne napovedne vrednosti za BAT v primerjavi s KT pri mejni vrednosti  $SI > 2$  za osumljene antibiotike v skupini bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo.

Osumljeni antibiotik	Občutljivost % (95 % IZ)	Specifičnost % (95 % IZ)	PNV % (95 % IZ)	NNV % (95 % IZ)	p*
Amoksicilin	38,7 (23,7 – 56,2)	66,67 (11,9 – 98,3)	92,3 (66,7 – 99,6)	9,5 (1,7 – 28,9)	>0,9999
Amoksicilin s klavulansko kislino	30,4 (15,6 – 50,9)	90 (78,6 – 95,7)	58,3 (32 – 80,7)	73,8 (61,6 – 83,2)	0,042
Cefalosporinski antibiotiki	85,7 (48,7 – 99,3)	76,9 (49,7 – 91,8)	66,7 (35,4 – 87,9)	90,9 (62,3 – 99,5)	0,017
Fenoksimetilpenicilin ali penicilin G	60 (31,3 – 83,2)	92,5 (80,1 – 97,4)	66,7 (35,4 – 87,9)	90,2 (77,5 – 96,1)	0,0009
Vsi osumljeni antibiotiki	47 (35,4 – 58,8)	88,7 (81,3 – 93,4)	72,1 (57,3 – 83,3)	72,9 (64,6 – 79,8)	<0,0001

*Legenda:* IZ – interval zaupanja, NNV – negativna napovedna vrednost, PNV – pozitivna napovedna vrednost, \*Fisherjev natančni test.

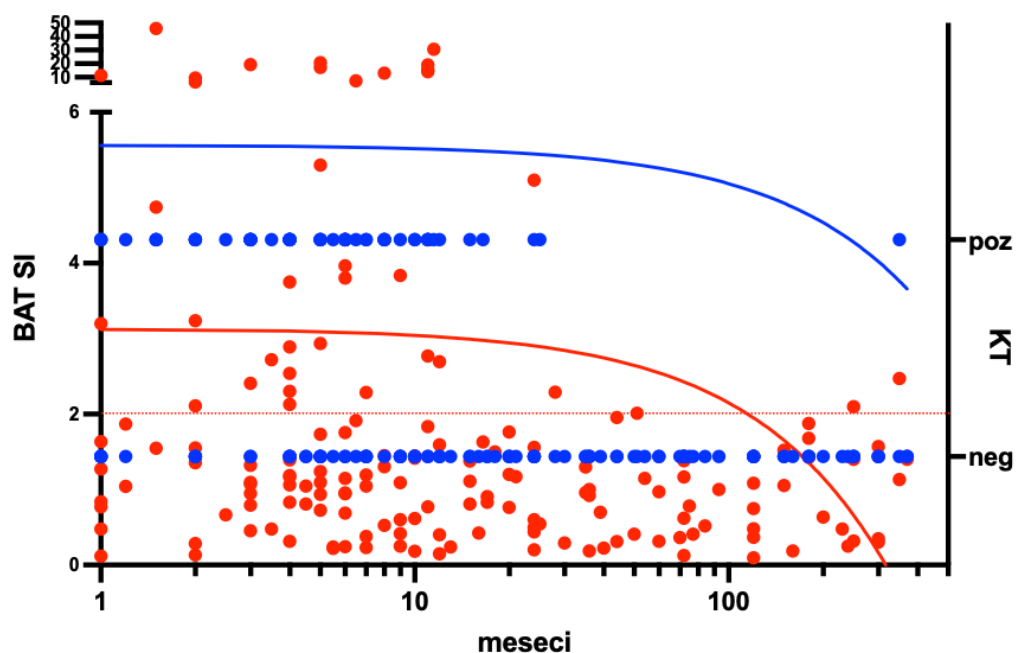
V skupini 90 (54 %) bolnikov od 166 s takojšnjo preočutljivostno reakcijo in opravljenimi tako BAT kot KT, ki so imeli negativne rezultate tako BAT kot KT za osumljeni antibiotik, je 38 bolnikov opravilo še OPT z osumljenim antibiotikom in je bilo med njimi 9 (23,7 %) pozitivnih. V skupini bolnikov, ki so imeli tako KT kot BAT pozitiven je en bolnik opravil še OPT z osumljenim antibiotikom in je bil negativen. V skupini bolnikov s pozitivnim KT in negativnim BAT ni bilo OPT. V skupini 11 bolnikov z negativnim KT in pozitivnim BAT so štiri bolniki opravili še OPT in je 1 (25 %) imel pozitiven rezultat. KT in BAT se ne razlikujeta v specifičnosti ( $p > 0,9999$ , Fisherjev natančni test) v primerjavi z OPT za osumljeni antibiotik.

V skupini 92 bolnikov z anamnezo kasne preočutljivostne reakcije sta bila pri 2 bolnikih ujemanja rezultatov KT in BAT bolnikih. Pri obeh je bil osumljen amoksicilin, pozitivna tako KT kot BAT, pri čemer je pri obeh KT pokazal kasne pozitivne rezultate.

Pri 2 bolnikih, pri katerih je bil osumljen fenoksimetilpenicilin, sta bila pozitivna tako BAT kot OPT, pri obeh primerih je bil takojšnji pozitiven rezultat OPT. Pri enem bolniku, kjer je bil osumljeni antibiotik amoksicilin in je bil BAT pozitiven za amoksicilin, je bil pri OPT s fenoksimetilpenicilinom opažen takojšnji pozitiven rezultat. Pri treh bolnikih s pozitivnim BAT ne KT ne OPT niso bili pozitivni.

#### 9.4 Časovna korelacija rezultatov testa aktivacije bazofilcev

Pri bolnikih s takojšnjo preobčutljivostjo obstaja statistično značilna korelacija med časom preteklim od preobčutljivostne reakcije do narejenega testa BAT za osumljeni antibiotik ter rezultatom testa, in sicer s časom upada povprečna vrednost stimulacijskega indeksa in s tem občutljivost testa ( $r = -0,26$ , 95 % IZ  $-0,4 - -0,1$ ,  $p = 0,0007$ , Spearmanova korelacija). Časovno korelacijo je videti tudi pri kožnih testih za osumljeni antibiotik ( $r = -0,45$ , 95 % IZ  $-0,57 - 0,32$ ,  $p < 0,0001$ , Spearmanova korelacija).



**Slika 3:** Korelacija med časom preteklim od preobčutljivostne reakcije do izvedbe BAT (rdeča linija) in KT (modra linija), logaritamska skala na X osi, BAT SI – vrednost stimulacijskega indeksa testa aktivacije bazofilcev, KT – kožni testi, neg – negativen, poz – pozitiven.

Od vseh 169 bolnikov s takojšnjo preobčutljivostjo je bil BAT pri 101 izveden znotraj prvih 12 mesecev po preobčutljivostni reakciji. Od teh 101 bolnikov je 35 (35 %) bolnikov imelo pozitiven BAT za osumljeni antibiotik, medtem ko je bil pozitiven le pri 8 (12 %) od 67 bolnikov, ki so imeli narejen BAT po 12 mesecih ( $p = 0,0015$ ; test hi-kvadrat z Yatesovo korekcijo) (Slika 1). Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost BAT v primerjavi s KTV skupinah pacientov z anafilaksijo in urtikarijo prikazana je v tabeli 8. Pri obeh skupinah bolnikov smo ugotovili, da se razporeditev pozitivnih in negativnih rezultatov KT pomembno ne razlikuje od razporeditev pozitivnih in negativnih rezultatov BAT (Fischerjev natančni test).



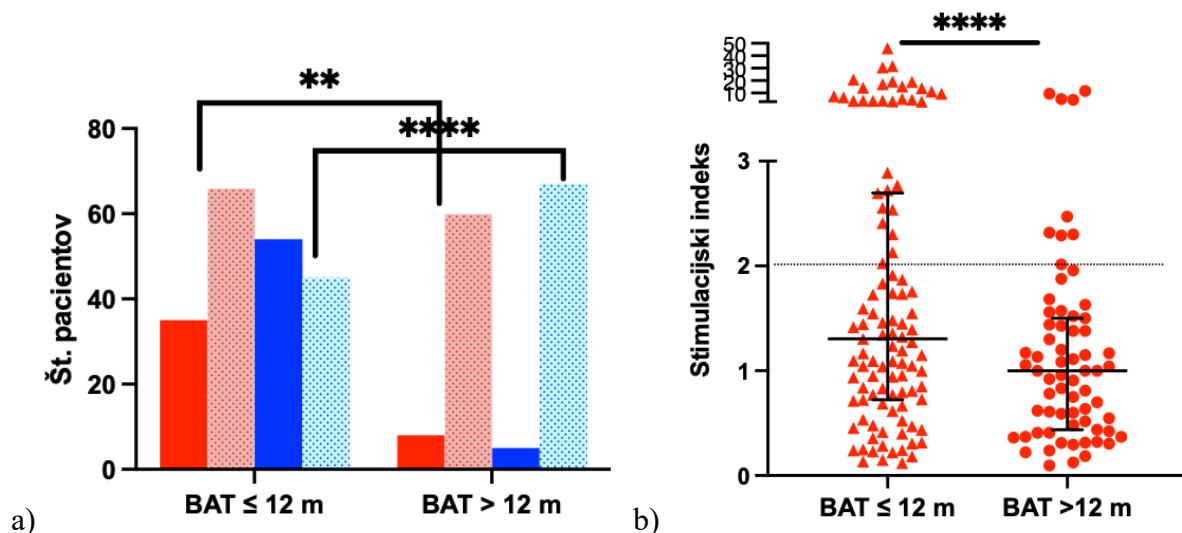
**Tabela 8:** Prikaz občutljivosti, specifičnosti, pozitivne in negativne napovedne vrednosti BAT v primerjavi s KT pri bolnikih ki so imeli narejene KT in BAT znotraj prvih 12 mesecev po preobčutljivostni reakciji ter po prvih 12 mesecih.

	Občutljivost % (95 %)	Specifičnost % (95 %)	PNV % (95 %)	NNV % (95 %)	p
Znotraj prvih 12 mesecev (n=99)	42,6 (30,3 – 55,8)	74,5 (60,5 – 84,8)	65,7 (49,2 – 79,2)	53 (41,2 – 64,6)	0,09
Po prvih 12 mesecev (n=67)	25 (4,4 – 59,1)	94,9 (86,1 – 98,6)	40 (7,1 – 76,9)	90,3 (80,5 – 95,5)	0,1

*Legenda:* NNV – negativna napovedna vrednost, PNV – pozitivna napovedna vrednost, \* Fisherjev natančni test.

Pri kožnih testih je v skupini 99 bolnikov, ki so jih imeli opravljene v prvih 12. mesecih po reakciji bilo 54 (54 %) pozitivnih, medtem, ko je v skupini 67 bolnikov, ki so opravili KT po prvih 12 mesecih, bilo 5 (7,5 %) pozitivnih. ( $p < 0,0001$ ; test hi-kvadrat z Yatesovo korekcijo). Na podlagi anamnestičnega podatka o kronologiji preobčutljivostne reakcije so KT bolj občutljivi od BAT za diagnozo senzibilizacije za osumljeni antibiotik v skupini bolnikov z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije znotraj 12 pred izvedbo diagnostičnih testov ( $p = 0,0067$ , test hi-kvadrat z Yatesovo korekcijo). Za potrditev senzibilizacije v skupini bolnikov, ki so imeli opravljenje diagnostične teste po več kot 12 mesecih od takojšnje preobčutljivostne reakcije se občutljivost BAT in KT statistično ne razlikuje ( $p = 0,56$ , test hi-kvadrat z Yatesovo korekcijo).

Mediana vrednost SI je v skupini do 12 mesecev znašala 1,3 (IQR 0,78 – 2,7) v skupini po 12 mesecih 0,9 (IQR 0,4 – 1,4) in se s statistično značilno razlikujeta ( $p < 0,0001$ , Mann – Whitney U test).

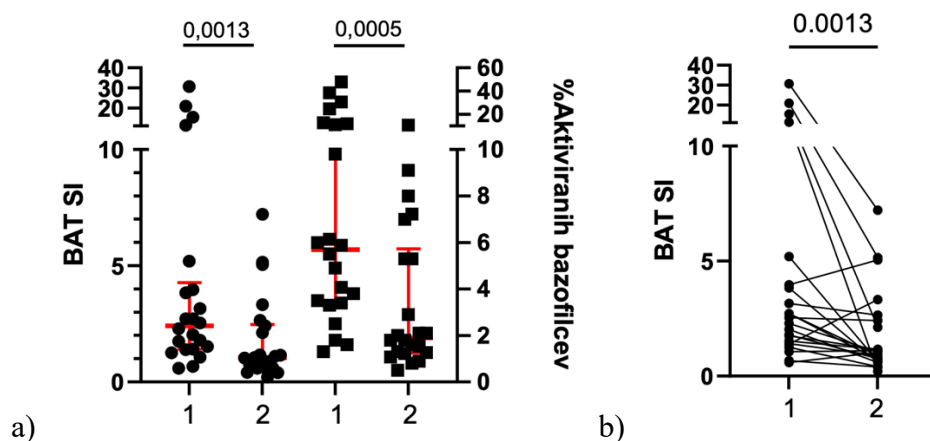


**Slika 4:** a) število bolnikov s pozitivnim (temno-rdeča stolpca) in negativnim (svetlo-rdeča stolpca) rezultatom BAT ter pozitivnim (temno-modra stolpca) in negativnim (svetlo-modra stolpca) rezultatom KT znotraj 12 mesecev in po več kot 12 mesecev po reakciji; b) vrednosti stimulacijskih indeksov BAT-a za osumljeni antibiotik znotraj 12 mesecev (trikotniki) in po več kot 12 mesecev po reakciji (krogi).

## 9.5 Analiza ponovljenih testov aktivacije bazofilcev

Izbranim bolnikom, ki so imeli anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije znotraj 12 mesecev pred izvedbo BAT, smo v prospektivnem delu raziskave ponovno izvedli BAT za analizo ponovljivosti BAT skozi čas.

Mediana stimulacijskih indeksov pri BAT-u z osumljenim antibiotikom v skupini bolnikov (n=17), ki so imeli BAT narejen v 12 mesecih (0,1 – 11,5 mesecev) po preobčutljivostni reakciji, je znašala 2,7 (IQR 1,6-8,3), medtem ko je pri ponovni izvedbi v prospektivnem delu raziskave znašala 1 (IQR 0,6-3). Med izvedbama je pretekla mediana 12 (IQR 8,5 – 31,5) mesecev. Tako vrednost stimulacijskega indeksa ( $p=0,0013$ ) kot delež bazofilcev, aktiviranih po spodbujanju z osumljenim antibiotikom ( $p=0,0005$ ) sta bila pri ponovljenem testiranju statistično pomembno nižja (Studentov t test za odvisne vzorce) (Slika 5).

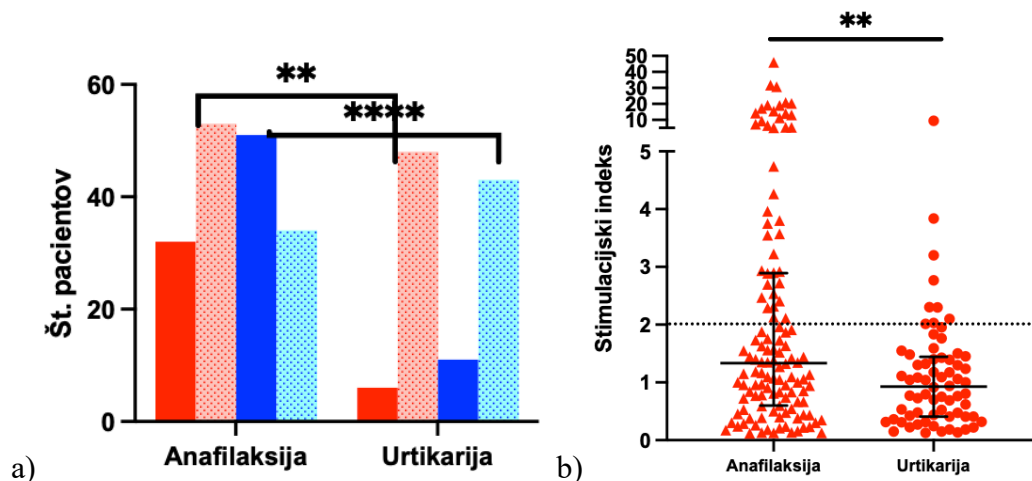


**Slika 5:** a) Rezultat testa aktivacije bazofilcev pri bolnikih ki ga imeli prvič (1) narejenega v prvih 12. mesecih po reakciji ter ponovljenega (2) pri tem: a) vrednosti stimulacijskih indeksov (BAT SI, krogi) in delež aktiviranih bazofilcev (kvadratki); b) Trendi stimulacijskih indeksov (BAT SI) pri prvem in drugem testu.

Ko pogledamo SI le tistih, ki so imeli pozitiven prvi BAT (n=10), jih je bilo le 5 (50 %) pozitivnih pri drugi izvedbi BAT, mediana SI se je 4,6 (IQR 3,1-16,8) zmanjšala na 2,3 (IQR 0,6-5,1), v povprečju za 7,3 (95 % IZ 1,4-13,2), kar je statistično značilno (p=0,0202, Studentov t test za odvisna vzorca). Časovni razmik med dvema izvedbama testa je bil mediano 20,5 (IQR 10-40) mesecev.

## 9.6 Korelacija testa aktivacije bazofilcev z težo klinične slike

Glede na anamnezo klinične slike je bil BAT pozitiven pri 32 (37,7 %) od 85 bolnikov z anafilaksijo ter pri 6 (11 %) od 54 bolnikov z generalizirano urtikarijo (p= 0,001, hi kvadrat z Yatesovo korekcijo) medtem ko so bili KT pozitivni pri 51 (60 %) od 85 bolnikov z anafilaksijo ter pri 11 (20,4 %) od 54 bolnikov z generalizirano urtikarijo. (p <0,0001, hi kvadrat z Yatesovo korekcijo).



**Slika 6:** a) število bolnikov s pozitivnim (temno-rdeča stolpca) in negativnim (svetlo-rdeča stolpca) rezultatom BAT ter pozitivnim (temno-modra stolpca) in negativnim (svetlo-modra stolpca) rezultatom KT pri anafilaksiji in generalizirani urtikariji; b) vrednosti stimulacijskih indeksov BAT-a za osumljeni antibiotik pri anafilaksiji (trikotniki) in pri generalizirani urtikariji (krogi).

V tabeli 9 so prikazani rezultati občutljivosti, specifičnosti ter napovednih vrednosti BAT za osumljeni antibiotik v skupinah bolnikov, ki imajo anamnezo klinične slike anafilaksije in generalizirane urtikarije v primerjavi s KT. Pri obeh kliničnih fenotipih takojšnje preobčutljivosti smo ugotovili, da se razporeditev pozitivnih in negativnih rezultatov KT statistično pomembno razlikuje od razporeditev pozitivnih in negativnih rezultatov BAT (hi kvadrat z Yatesovo korekcijo). KT so v primerjavi z BAT bolj občutljivi za potrditev senzibilizacije za osumljeni antibiotik v skupini bolnikov z anamnezo anafilaksije ( $p=0,01$ , hi kvadrat z Yatesovo korekcijo), medtem ko v skupini bolnikov z anamnezo generalizirane urtikarije, med KT in BAT ni statistično značilne razlike v občutljivosti potrditve senzibilizacije za antibiotik, ki je povzročil akutno urtikarijo ( $p=0,2905$ , hi kvadrat z Yatesovo korekcijo).

Mediana vrednost stimulacijskih indeksov v skupini bolnikov z anafilaksijo znaša 1,3 (IQR 0,6 – 2,9) v skupini z generalizirano urtikarijo 0,9 (IQR 0,4 – 1,4), ter se statistično pomembno razlikujeta ( $p=0,003$ , Mann Whineyev U test).

**Tabela 9:** Prikaz občutljivosti, specifičnosti, pozitivne in negativne napovedne vrednosti BAT v primerjavi s KT pri bolnikih z anamnezo anafilaksije in urtikarije

	Občutljivost % (95 %)	Specifičnost % (95 %)	PNV % (95 %)	NNV % (95 %)	p*
Anafilaksija (n=85)	48,2 (35,4 – 61,2)	80,7 (63,7 – 90,8)	81,3 (64,7 – 91,1)	47,2 (34,4 – 60,3)	0,016
Generalizirana urtikarija (n=54)	36,4 (15,2 – 64,6)	90,7 (78,4 – 96,3)	50 (21,5 – 78,5)	84,8 (71,8 – 92,4)	0,08

*Legenda:* NNV – negativna napovedna vrednost, PNV – pozitivna napovedna vrednost, \* Fisherjev natančni test.

### 9.7 Korelacija testa aktivacije bazofilcev z navzkrižno reaktivnostjo med penicilinskimi in cefalosporinskimi antibiotiki

Pri 56 bolnikih z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije po zaužitju penicilinskega antibiotika (fenoksimetilpenicilin, amoksicilin, amoksicilin s klavulansko kislino) ter negativnimi BAT za vse penicilinske antibiotike je bil narejen OPT z cefuroksimom in je bil pozitiven pri 1 bolniku.

Pri 54 bolnikih z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije po zaužitju penicilinskega antibiotika (fenoksimetilpenicilin, amoksicilin, amoksicilin s klavulansko kislino) ter negativnimi KT za vse penicilinske antibiotike je bil narejen OPT z cefuroksimom in pri nobenemu ni bil pozitiven. Negativni rezultati obeh testov so primerljivo dobro zanesljivi pri negativni napovedi navzkrižne reaktivnosti za cefuroksim pri bolnikih s takojšnjo preobčutljivostjo za penicilinske antibiotike ( $p > 0,9999$ , Fisherjev eksaktni test).

## 10 RAZPRAVLJANJE

S protitelesi IgE posredovana preobčutljivost za betalaktamske antibiotike je v splošni populaciji redka, dokumentirano anafilaksijo je doživelo 520 na 100.000 prebivalcev po podatkih iz ZDA (11,12). Tudi med bolniki, ki v anamnezi navajajo preobčutljivost za peniciline, s standardnimi diagnostični testi preobčutljivost dokažemo pri manj kot 30 %, večinoma z uporabo kožnih testov (64). Zaradi omejene občutljivosti kožnih testov in merjenja specifičnih IgE smo v tej raziskavi ovrednotili test aktivacije bazofilcev kot diagnostično metodo za potrditev senzibilizacije za betalaktamske antibiotike.

V skupini 169 klinično dobro opredeljenih bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo smo primerjali rezultate BAT in standardnih KT. Analizirali smo občutljivost in specifičnost BAT v primerjavi s KT, preverili časovno korelacijo med rezultati BAT in časom, ki je pretekel od reakcije do izvedbe testa, ocenili korelacijo med rezultati BAT in klinično sliko takojšnje preobčutljivostne reakcije ter analizirali diagnostično vrednost BAT za napoved navzkrižne reaktivnosti s cefalosporinskimi antibiotiki pri bolnikih z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije s penicilinskimi antibiotiki. Ugotovili smo, da je bila občutljivost BAT v primerjavi z rezultati standardnih KT za osumljene antibiotike v skupini bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo primerljiva z rezultati drugih študij, diagnostična vrednost testa je glede na njegovo občutljivost ugodna le v obdobju nekaj mesecev po preobčutljivostni reakciji in zgolj pri bolnikih z anafilaksijo.

### 10.1 Klinične značilnosti bolnikov

V študijo smo vključili 261 polnoletnih bolnikov, pri katerih smo v obdobju 8 let naredili BAT z osumljenimi betalaktamskimi antibiotiki, med njimi 169 bolnikov z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije ter 92 bolnikov z anamnezo kasne preobčutljivostne reakcije kot kontrolno skupino, kar našo raziskavo uvršča med najobsežnejše (tabela 10) (46-61).

**Tabela 10:** Prikaz narejenih evropskih študij na temo validacije testa aktivacije bazofilcev pri diagnozi takojšnje preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike

Študija	Osumljeno zdravilo	Referečni test	Mejna vrednost	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)	Št.bolnikov *
Sanz 2002 (46)	betalaktam	A + KT	SI $\geq$ 2	50,0	93,3	58/30

Erdmann 2005 (47)	betalaktam	A + KT	$\geq 10\%$	35	NP	20/0
Eberlein 2010 (48)	betalaktam	A + KT	SI $\geq 2$ in $\geq 5\%$	53–55	80	24/15
Gamboa PM 2004 (49)	betalaktam	A +/- IgE +/- OPT	SI $\geq 2$	39,1	93,3	23/30
De Weck 2009 (50)	betalaktam	A +/-KT +/- OPT	SI $> 2$ in $\geq 5\%$	48,3	88,9	178/81
Torres MJ 2004 (51)	betalaktam	A +/-KT +/- IgE +/- OPT	SI $\geq 2$	48,6	93	70/40
Abuaf N 2008 (52)	amoksicilin	A +/- KT	2 SD (6 %)	63	79	27/40
Torres MJ 2010 (53,54)	amoksicilin	A +/- KT	SI $\geq 2$	52,7	90	55/30
Uyttebroek 2016 (55)	cefazolin	A + KT	$\geq 5\%$	33; 67 **	94; 94 **	16/17
Thinnes 2018 (56)	različni antibiotiki	A +/-KT +/- OPT	SI $\geq 3$	50	97	48/34****
Salas 2018 (57)	amoksicilin s klavulansko kislino	A +/- KT +/- IgE +/- OPT	SI $\geq 1,5$ in $\geq 5\%$	55	89	57/58
Leecyous 2020 (58)	betalaktam	A + KT	SI $\geq 2$ in $\geq 5\%$	8	100	25/25
Céspedes 2022 (59)	amoksicilin s klavulansko kislino	A +/-KT +/- OPT	SI $\geq 1,2$ in $\geq 2,5$ %	47	95	105/74
Heremans 2022 (60)	amoksicilin	A	$\geq 9\%$	13 – 23	98 – 100	66/70
Bogas 2021 (61)	cefazolin	A +/- OPT	SI $> 2$ , neg. kontrola $> 2,5\%$	43,5; 50**	100	23/20

*Legenda:* A – anamneza takojšnje preobčutljivostne reakcije za osumljeni antibiotik, KT – kožni testi, NP – ni podatka, OPT – oralni provokacijski test, IgE – merjenje specifičnih IgE v serumu. \*Bolniki / kontrole (glede na referenčni test za potrditev občutljivosti). \*\* CD63+; CD203+ označevalci, \*\*\* osumljeni antibiotiki (62 betalaktamski antibiotiki).

Med bolniki s takojšnjo preobčuljvotno reakcijo je večina (50,9 %) imela klinično sliko anafilaksije, kar so poročale tudi druge študije (50). Urtikarija je pa bila najpogostejša klinična manifestacija (77,2 %) bolnikov s kasno preobčutljivostno reakcijo, medtem, ko je bil makulopapulozni izpuščaj v tej skupini relativno redek (8,7 %).

Med bolniki s takojšnjo preobčuljvotno reakcijo je bil najpogosteje osumljen antibiotik amoksicilin s klavulansko kislino (37,9 %), medtem ko je bil v skupini s kasno preobčutljivostno reakcijo najpogosteje osumljen fenoksimetilpenicilin (44,6 %). Druge študije poročajo o večjih deležih amoksicilina in amoksicilina s klavulansko kislino v primerjavi z našo študijo, kar je skladno s podatki o različni porabi posameznih betalaktamskih antibiotikov v posameznih državah (46,50).

## **10.2 Rezultati kožnih testov in oralnih provokacijskih testov**

V našem vzorcu so bili kožni testi pozitivni za 34,3 % osumljenih antibiotikov pri bolnikih s takojšnjo preobčutljivostjo, kar je nekoliko manj v primerjavi z italijansko 20-letno opazovalno študijo (63 %). V omenejeni študiji so bili diagnostični testi izvedeni prej (mediana 5 mesecev), poleg nativnih antibiotikov pa so uporabili še standardizirane reagente benzilpeniciloil-oktalizin (BP-OL), benzilpeniloat (PO) in klavulansko kislino (64). Višji delež pozitivnih KT beležimo v primerjavi s 6-letno opazovalno študijo Salasove in sod. (20 %), kjer so pri KT uporabili le standardizirane reagente BP-OL, PO, amoksicilin in klavulansko kislino (56). V naši kohorti so bolniki, pri katerih je domnevni povzročitelj preobčutljivostne reakcije amoksicilin ali amoksicilin s klavulansko kislino, pogosteje imeli pozitivne KT v primerjavi z bolniki, ki so imeli preobčutljivostno reakcijo z naravnimi penicilini. To potrjuje, da je večina bolnikov v evropskih državah selektivno preobčutljivih za aminopeniciline, kar je v nasprotju z ZDA (11). KT so rezultirali z urtikarijsko reakcijo pri 13 od 92 bolnikov z anamnezo kasne preobčutljivostne reakcije: 7 jih je imelo takojšnji pozitiven rezultat KT in 6 kasni pozitiven rezultat. Poleg tega je bilo 9 od 16 bolnikov, ki so bili pozitivni pri oralnih provokacijskih testih (OPT) in so imeli anamnezo kasne preobčutljivostne reakcije, pozitivnih z rezultati takojšnjega OPT. To kaže, da skupina bolnikov z domnevno kasno preobčutljivostno reakcijo vsebuje tiste, ki imajo preobčutljivost, posredovano s protitelesi IgE. To je skladno z ugotovitvami Romana in sod., ki so poročali, da je bilo v skupinah bolnikov, ki so imeli anamnezo preobčutljivostne reakcije s penicilini v roku ene ure po nadaljnjih odmerkih (ne prvem) ali po več kot eni uri in manj kot šestih urah po nadaljnjih odmerkih, 26,1 % ter 2,5 % takoj pozitivnih pri kožnem testiranju (64).



### 10.3 Določanje optimalne mejne vrednosti testa aktivacije bazofilcev v primerjavi z rezultati kožnih testov in analiza občutljivosti in specifičnosti

Občutljivost BAT je odvisna od mejne vrednosti za pozitiven rezultat. Prva študija, ki je leta 2002 ocenila BAT za betalaktamskih antibiotikih, je na podlagi analize krivulje ROC določila mejno vrednost, kjer je bilo razmerje med odstotkom bazofilcev, aktiviranih z antigenom, in odstotkom spontano aktiviranih bazofilcev enako ali večje od dvakratnika. Če je bil odstotek spontano aktiviranih bazofilcev manjši od 2,5 %, je moral biti odstotek bazofilcev, aktiviranih z antigenom, vsaj 5 % (46). Ta mejna vrednost je bila sprejeta, vendar je bilo malo raziskav, ki bi jo potrdile z lastno analizo občutljivosti in specifičnosti (48,50,57,60). Do zdaj še ni bila objavljena nobena analiza občutljivosti in specifičnosti BAT, ki bi primerjala rezultate BAT in OPT. Najobsežnejša med študijami analize občutljivosti in specifičnosti je bila multicentrična študija De Wecka in sod. iz leta 2009, kjer so s krivuljo ROC ugotovili, da je optimalna mejna vrednost deleža aktiviranih bazofilcev med  $> 5\%$  in  $> 8\%$ , medtem ko se je SI gibal med 1,2 in 3. Odločili so se za mejno vrednost  $SI > 2$  (50). Naš pristop k analizi je bil podoben: za vsak antibiotik smo analizirali rezultate BAT in KT (za ta antibiotik) pri bolnikih, ter nato z analizo krivulje ROC določili ustrezno mejno vrednost za vsak antibiotik, kjer je bilo testiranih vsaj 20 bolnikov.

Ker so bile optimalne mejne vrednosti, pridobljene s to analizo, precej drugačne od mejne vrednosti  $SI > 2$ , ki jo trenutno uporablja diagnostični laboratorij, smo se odločili, da s to mejno vrednosto opravimo analizo občutljivosti in specifičnosti po posameznih osumljenih antibiotikih in za vse osumljene antibiotike (tabela 7). Prav tako smo se odločili, da bi bilo primerno v prospektivni študiji raziskati, ali imajo nižje mejne vrednosti boljše diagnostično vrednost kot trenutna. Salasova in sod. ter Cespedes in sod. so v svojih raziskavah ugotovili, da je nižja mejna vrednost ( $SI > 1,5$  oziroma  $> 1,2$ ) bolj ustrezna kot  $SI > 2$ , saj so dosegli nekoliko boljše občutljivost (55 % oziroma 48,6 %). Poleg tega so so zaključili, da bi z BAT zmanjšali potrebo po OPT za dve tretjini (56,58). Obe študiji poudarjata, da zmanjšanje mejne vrednosti ni negativno vplivalo na specifičnost testa, ki je znašala 89 % v študiji Salasove in sod. ter 81,1 % v študiji Cespedesa in sod. (57,59).

Ko si ogledamo ROC krivulje za različne antibiotike (tabela 5), opazimo, da se površina pod posameznimi krivuljami (angl. *AUC*) giblje med 0,66 in 0,84 ter. Le pri BAT s penicilinom G in cefazolinom površina približa 0,80, kar kaže, da BAT le pri teh dveh antibiotikih doseže dobro diagnostično uspešnost v primerjavi s kožnimi testi (65).

V primerjavi s študijo Salasove in sod. je bila pri nas AUC za amoksicilin bil nekoliko nižja, medtem ko za klavulansko kislino sploh nismo izvajali analize občutljivosti in specifičnosti. Kljub temu je bila AUC za amoksicilin primerljiva z AUC (s CD 63 označevalci) v študiji Cespedesa in sod (57,59). Razlog nekoliko nižjo AUC za amoksicilin je v tem, da sta pri KT in BAT pogosto uporabljena različna alergena: BAT se je izvajal samo z amoksicilinom, medtem ko je pri KT uporabljen amoksicilinom s klavulansko kislino. Zato smo v analizo ROC vključili samo bolnike, pri katerih so bili tako KT kot BAT izvedeni z amoksicilinom. Pomembno je poudariti, da bi bilo optimalno pri KT testirati tako amoksicilin kot tudi amoksiklav ter BAT izvajati z obema alergenoma.

Rezultati BAT in KT so se ujemali pri 72,6 % bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo, kar je več kot v študiji De Wecka in sod. (56,3 %) (50). BAT je bil pozitiven pri 31 (48 %) od 64 bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo in pozitivnim KT za osumljeni antibiotik, kar je skladno z ugotovitvami drugih študij (50,54,56). Poleg tega je bil BAT pozitiven pri 12 (11 %) od 106 bolnikov z negativnimi kožnimi testi, kar je manj kot v študiji De Wecka in sod., kjer je bilo pozitivnih 16 (37 %) od 45 bolnikov, ter manj kot v študiji Thinesove in sod., kjer je bil BAT pozitiven pri 9 od 12 bolnikov z negativnimi rezultati KT (50,56).

Pri bolnikih z anamnezo kasne preobčutljivostne reakcije je bil BAT pozitiven pri 8 od 100 osumljenih antibiotikov, od tega so trije imeli še pozitivne OPT s fenoksimetilpenicilinom, preostalih 5 pa so imeli bodisi kasno pozitivne KT (2) bodisi negativne KT in OPT. Iz tega lahko sklepamo, da je bil pri 5 od 100 osumljenih antibiotikov pri bolnikih s kasno preobčutljivostno reakcijo BAT lažno pozitiven.

Videti je, da se je občutljivost BAT pri posameznih osumljenih antibiotikih v skupini bolnikov s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo močno razlikovala, pri amoksicilinu s klavulasko kislino je ta bila najnižja z 30,4 %. Razlog za to bi lahko bil v tem, da je le manjšina od 68 bolnikov, pri katerih je bil osumljeni antibiotik amoksicilin s klavulansko kislino, imelo opravljen BAT s klavulansko kislino, ostali so opravili BAT le z amoksicilinom. Klavulanska kislina je v različnih študijah dokazana kot povzročitelj preobčutljivostne reakcije pri 15 do 35 % posameznikov z anamnezo urtikarije ali anafilaksije z amoksicilinom ali amoksicilinom s klavulansko kislino (67-70).

Občutljivost v primerjavi s KT za osumljene antibiotike v našem vzorcu bolnikov z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije je primerljiva z drugimi študijami, kjer so izvedli analizo

v primerjavi s KT (tabela 10). Videti pa je, da je bila specifičnost v primerjavi z drugimi študijami, v našem vzorcu nekoliko nižja (46-61). Pri analizi občutljivosti in specifičnosti BAT je pomembno upoštevati, da primerjava BAT s KT ne zagotavlja popolnoma natančne slike diagnostične vrednosti BAT, saj KT sam po sebi ni zlati standard za diagnozo preobčutljivosti na betalaktamske antibiotike. Kljub temu novejši podatki iz literature kažejo, da je bilo pri 80 % bolnikov z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije z betalaktami, pri katerih je bil KT pozitiven, bil pozitiven tudi OPT z istim antibiotikom (31). To nakazuje na relativno visoko pozitivno napovedno vrednost kožnih testov zato smo mnenja da je ta validacija kakovostno izvedena.

Boljši vpogled v učinkovitost BAT pri diagnostiki preobčutljivosti imamo pri bolnikih, ki so opravili še OPT za osumljeni antibiotik, in sicer so to bili bolniki, ki so imeli negativne rezultate KT ali obeh diagnostičnih testov (KT in BAT). Zato je validacija bolnikov z negativnim KT bolj zanesljiva. V skupini bolnikov, ki so imeli negativne rezultate tako KT kot BAT, je 38 od 90 bolnikov opravilo OPT z osumljenim antibiotikom in med njimi je bilo 9 (četrtnina) pozitivnih, kar govori v prid tega, da tako BAT kot KT v primerjavi z OPT nimata absolutne specifičnosti. Ob tem smo imeli le za štiri bolnike z negativnimi KT in pozitivnim BAT opravljen še OPT z osumljenim antibiotikom, in le pri enem bolniku (25 %) je bil OPT pozitiven. Ta delež je manjši kot v študiji De Wecka in sod., kjer so poročali, da je bilo 14 bolnikov z negativnim KT in pozitivnim BAT, ki so opravili še OPT z osumljenim antibiotikom in so vsi (100 %) bili pozitivni. Prav tako je manjši kot v prospektivni študiji bolnikov z anafilaksijo po cefazolinu, kjer opisujejo, da je bil pri 6 od 8 bolnikov z negativnimi kožnimi testi in pozitivnim OPT BAT bil tudi pozitiven (61). Težko pa sklapamo o občutljivosti BAT pri bolnikih z negativnim KT v primerjavi z OPT, ker je v našem vzorcu število takšnih bolnikov (s pozitivnim BAT in negativnim KT z osumljenim antibiotikom) relativno majhno, in le majhen delež teh je opravil OPT.

#### **10.4 Časovna korelacija rezultatov testa aktivacije bazofilcev in analiza ponovljenih testov aktivacije bazofilcev**

Nato smo analizirali, katere skupine bolnikov bi najbolje profitirale z vključitvijo BAT v diagnostični postopek– pri tem smo pogledali korelacijo s časom in s klinično sliko. Znano je, da preobčutljivost, posredovana s protitelesi IgE, sčasoma izzveni, kar je že bilo dokazano s pozitivnostjo kožnih testov (23). Smernice EAACI priporočajo izvedbo BAT za zdravila v enem letu po preobčutljivostni reakciji (71), kar temelji na študiji Fernandez in sod., ki je

pokazala, da je po enem letu le 12 od 41 bolnikov, ki so bili sprva pozitivni, ostalo pozitivnih, po štirih letih pa je bil pozitiven le še en bolnik (72). V naši študiji je bilo največ pozitivnih BAT v prvih mesecih po reakciji; od vseh 43 pozitivnih BAT rezultatov z osumljenimi antibiotiki jih je bilo 35 v skupini bolnikov, ki so BAT opravili v prvem letu. Poleg tega se je v primerjavi s KT po prvem letu pozitivna napovedna vrednost BAT za KT zmanjšala s 65 % na 40 %. To pomeni, da je zanesljivost BAT po prvem letu skoraj za polovico manjša in, da pozitivnem rezultatu BAT po tem času ne gre več zaupati. Prav tako smo ugotovili, da tako pozitivnost KT kot BAT sčasoma upada, pri čemer prej upadne pozitivnost BAT (slika 3). To je skladno z zaključkom študije Thinnesove in sod., ki poroča, da je bil mediani interval do diagnostične obravnave pri bolnikih s pozitivnim BAT 6 mesecev, kar je za polovico krajše kot pri bolnikih s pozitivnim KT (56). Salas in sod. so pokazali, da čas negativizacije BAT korelira s klinično sliko takojšnje preobčutljivosti, in sicer se BAT hitreje negativizira pri bolnikih z blažjo simptomatiko (urtikarija, angioedem) kot pri tistih z anafilaksijo ali anafilaktičnim šokom (57). Take analize nismo izvedli, saj bi preseгла obseg te raziskave.

Pogledali smo tudi ponovljivost BAT V skupini bolnikov, ki so BAT opravili znotraj prvih 12 mesecev po preobčutljivostni reakciji, smo test ponovili in ugotovili, da je le polovica obdržala pozitiven rezultat BAT. Iz tega lahko sklepamo, da je ponovljivost testa relativno majhna ter, da z odlašanjem testa »izgubimo« pomemben delež pozitivnih rezultatov, tudi pri bolnikih z anafilaksijo, kar lahko vodi do napačnega izključevanja senzibilizacije, ki se pri pacientu lahko kaže zelo dramatično.

### **10.5 Korelacija rezultatov testa aktivacije bazofilcev z resnotjo klinične slike takojšnje preobčutljivostne reakcije**

Opredelili smo povezavo med težo klinične slike in rezultati BAT. V literaturi je mogoče najti različne podatke o tej povezavi. Nekateri avtorji menijo, da je občutljivost testa povezana z resnotjo klinične slike, zato ta test smatrajo kot posebej uporaben pri tistih, ki so najbolj ogroženi za neželene dogodke pri provokacijskem testiranju (73). Druge študije so pa ugotovile, da med bolniki z različnimi stopnjami resnosti klinične slike takojšnje preobčutljivostne reakcije (urtikarija, anafilaksija in anafilaktični šok) ni bilo pomembnih razlik (46,57,59).

Dobra specifičnost BAT v primerjavi s KT v skupini bolnikov z urtikarijo nakazuje, da bi BAT lahko uporabili za potrditev odsotnosti alergije za betalaktamske antibiotike pri teh bolnikih.

Klinična slika akutne urtikarije ob prejetanju betalaktamov pri bolniku z gnojno angino je malo verjetno posledica s protitelesi IgE posredovane preobčutljivosti za zaužiti antibiotik, saj se urtikarija pogosto pojavi kot posledica okužbe. Ker je taka anamneza pogosta v splošni populaciji, bi z negativnim rezultatom BAT za osumljeni antibiotik lahko ovrgli diagnozo alergije brez potrebe po KT in OPT. To bi pomagalo preprečiti nepotrebno izogibanje betalaktamskim antibiotikom ter ohraniti možnosti zdravljenja za bolnike z okužbami. Pri bolnikih z anafilaksijo pa občutljivost BAT v primerjavi s KT ne presega 48 %, kar pomeni, da bi z izvajanjem le BAT (brez KT) zgrešili 52 % bolnikov, ki bi lahko doživeli življenjsko nevarne reakcije med OPT.

Z Mann - Whitneyevim testom smo dokazali statistično značilno razliko v vrednostih SI BAT med skupinama bolnikov z generalizirano urtikarijo (0,9) in anafilaksijo (1,3). To predstavlja dobro iztočnico za nadaljnje raziskovanje korelacije med resnostjo klinične slike takojšnje preobčutljivostne reakcije in rezultati BAT. BAT bi nato lahko validirali kot označevalec bolnikov z velikim tveganjem za življenjsko nevarne takojšnje preobčutljivostne reakcije, podobno kot se že uveljavlja pri preobčutljivosti za čebelji strup in alfa-gal (74,75). Tako bi z BAT pridobili dodatne informacije o varnosti izvedbe testov »in vivo« - KT in OPT in bi se izognili življenjsko ogrožajočim reakcijam.

## **10.6 Korelacija rezultatov testa aktivacije bazofilcev z navzkrižno reaktivnostjo med penicilinskimi in cefalosporinskimi antibiotiki**

Na koncu smo raziskali diagnostično vrednost BAT pri napovedi navzkrižne preobčutljivosti s cefalosporinom druge generacije, cefuroksimom, ki je bil najpogosteje testiran cefalosporinski antibiotik pri OPT. Ugotovili smo, da negativen rezultat BAT pri 97 % testiranih bolnikov z osumljenimi betalaktamskimi antibiotiki napove negativen OPT s cefuroksimom. To je posebej pomembno pri bolnikih z anamnezami hudih anafilaksij s penicilinskimi antibiotiki, pri katerih želimo potrditi odsotnost navzkrižne reaktivnosti s cefalosporini, saj BAT v takih primerih izboljša varnost alergološke obravnave (76). Študija Caimmijeve in sodelavcev je pokazala, da je bila navzkrižna reaktivnost med penicilinom in cefuroksimom, potrjena z OPT prisotna pri 9 od 135 bolnikov. Vendar pa so imeli vsi ti bolniki negativne rezultate KT s cefuroksimom, nato so pa reagirali ob provokacijskih testih (77), kar bi lahko potencialno zmanjšali z izvajanjem BAT. Pomembno je omeniti, da potrditev odsotnosti navzkrižne reaktivnosti s

cefuroksimom ne izključuje preobčutljivosti z drugimi cefalosporinskimi antibiotiki. To je posebej pomembno pri cefalosporinih, ki imajo enako stransko verigo kot aminopenicilini (amoksicilin ter ampicilin), saj je pri njih večja verjetnost za navzkrižno preobčutljivost, zato je treba diagnostiko razširiti (78).

## **10.7 Uporabnost raziskave**

S to raziskavo smo na velikem vzorcu dobro opredeljenih odraslih bolnikov v primerjavi z rezultati kožnih testov validirali laboratorijski test aktivacije bazofilcev pri bolnikih s takojšnjo preobčutljivostno reakcijo. Ugotovili smo, da je test pogosteje pozitiven pri bolnikih s težjo klinično sliko in v kratkem časovnem obdobju po reakciji. To prispeva k natančnejši opredelitvi bolnikov, ki bodo imeli opravljen test v prihodnosti, in k natančnejši učinkovitosti testa za potrditev prisotnosti ali odsotnosti preobčutljivosti ter navzkrižne preobčutljivosti. Nadaljne raziskave bi bile lahko usmerjene v povezavo med klinično sliko in rezultati BAT za uveljavitev BAT kot označevalca bolnikov v velikim tveganjem za hude klinične slike takojšnje preobčutljivostne reakcije, s čemer bi odkrili takšne paciente, preden jih izpostavimo kožnemu ali provokacijskemu testiranju.

## **10.8 Omejitve raziskave**

Študija je bila večinoma retrospektivno, zato ni bilo mogoče izvesti dodatne diagnostike v primerih neskladnosti rezultatov kožnih testov in testa aktivacije bazofilcev, kar bi nam omogočilo boljši vpogled v diagnostično vrednost tega testa. Kožni testi niso zlati standard za diagnozo takojšnje preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike, zato validacija s kožnimi testi ne zagotavlja popolnoma natančne ocene diagnostične vrednosti BAT. Kljub temu je validacija s kožnimi testi vsekakor boljša kot primerjava z bolniki, ki imajo podatek o preobčutljivosti, a nimajo opravljenih KT, kot je to primer v drugih študijah. Za optimalno izvedbo prospektivne raziskave bi bilo potrebno izvesti OPT pri bolniku in nato primerjava BAT in KT z rezultati OPT. Naša analiza je pokazala, da je optimalna mejna vrednost BAT izven okvira trenutno uporabljene mejne vrednosti, zato bi se bilo v prospektivni študiji potrebno opredeliti do teh mejnih vrednosti. Občutljivost BAT za amoksicilin s klavulansko kislino je bila nizka, kar je

lahko posledica nepopolnega testiranja z obema komponentama zdravila. Zato je treba rezultate za ta antibiotik obravnavati previdno in jih v prihodnosti dopolniti. Na pozitivno in negativno napovedno vrednost vpliva prevalenca takojšnje preobčutljivosti, ki je v populaciji manjša kot v analiziranem vzorcu, zato so prikazane vrednosti le približek. Določanje mejne vrednosti BAT smo naredili z vrednostmi stimulacijskega indeksa ne pa tudi z deleži z alergenom aktiviranih bazofilcev, kot to priporočajo smernice, kar je naloga za prihodne raziskave.

## 11 ZAKLJUČKI

Ugotovitve raziskave so naslednje:

1. Test aktivacije bazofilcev (BAT) ima v primerjavi s kožnimi testi (KT) slabšo občutljivost, vendar primerljivo specifičnost pri diagnosticiranju takojšnje preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike.
2. Diagnostična vrednost BAT za potrditev senzibilizacije je omejena na določeno časovno obdobje, in sicer nekaj mesecev po reakciji, ter je posebej uporaben pri bolnikih s hudimi kliničnimi slikami.
3. BAT ima dobro specifičnost predvsem pri bolnikih z blago klinično sliko takojšnje preobčutljivosti. Zato bi BAT lahko služil kot primeren začetni test pri diagnostični obravnavi teh bolnikov.
4. BAT se je izkazal kot učinkovit pri napovedovanju navzkrižne reaktivnosti med penicilinskimi in cefalosporinskimi antibiotiki.

Glede na naše ugotovitve in zastavljene hipoteze lahko zaključimo:

1. Zavrgli smo hipotezo, da sta občutljivost in specifičnost BAT pri bolnikih z anamnezo takojšnje preobčutljivostne reakcije za betalaktamske antibiotike primerljivi kot pri trenutnih diagnostičnih metodah, kot so kožni testi.
2. Potrdili smo hipotezo, da se občutljivost BAT zmanjšuje s časom preteklim od takojšnje preobčutljivostne reakcije do izvedbe testa.
3. Potrdili smo hipotezo, da je občutljivost BAT večja pri bolnikih s hudo klinično sliko takojšnje preobčutljivostne reakcije kot pri bolnikih z blago klinično sliko.
4. Potrdili smo hipotezo, da negativni rezultati BAT s penicilinskimi antibiotiki pri bolnikih z anamnezo preobčutljivostne reakcije s penicilinom potrjujejo odsotnost navzkrižne reaktivnosti s cefalosporinskimi antibiotiki



# PRILOGA 1: OCENA ETIČNOSTI RAZISKAVE



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE

Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko

Štefanova ulica 5, 1000 Ljubljana

T: 01 478 69 06, 01 478

F: 01 251 77 55

E: gp.mz@gov.si, kme.mz@gov.si

www.mz.gov.si

Podpisnik: Božidar Stefan Voljč  
Izdajatelj: Republika Slovenija  
Serijska številka: cc 52 7c 58 00 00 00 56 7d 87 44  
Veljavnost potrđila: 22.04.2026  
Datum podpisa: 12.10.06.06.2023  
Referenčna številka: 0120-195/2023/3

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik  
Češljarač Danilo, študent medicine UL MF

dc3370@student.uni-j.si

Številka: 0120-195/2023/3

Datum: 6. 6. 2023

**Zadeva: Ocena etičnosti predlagane raziskave**

Zveza: vaša vloga z dne 24. 4. 2023

Na Komisiji Republike Slovenije za medicinsko etiko (v nadaljnjem besedilu: KME RS) smo dne 24. 4. 2023 prejeli vlogo za oceno etičnosti raziskave z naslovom »Validacija testa aktivacije bazofilcev v diagnostiki preobčutljivosti za betalaktamske antibiotike«.

Gre za izdelavo Prešernove naloge, kjer bo mentor prof. dr. Mitja Košnik, dr. med., spec., somentor pa doc. dr. Matija Rijavec, univ. dipl. mikr. Raziskava bo retrospektivna in prospektivna ter bo potekala na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik, predvidoma od junija 2023 do septembra 2024.

Opredeleitev teme oz. problema: Optimalna mejna vrednost testa aktivacije bazofilcev v vašem laboratoriju še ni bila narejena. Zato želite primerjati vrednosti stimulacijskega indeksa tega testa z rezultati kožnih vbodnih ter intradermalnih testov in z rezultatom provokacijskega testa z zdravili. Validacija testa aktivacije bazofilcev, ki bi omogočila vpeljavo tega testa v vsakdanjo alergološko prakso obravnave pacientov s sumom na alergijsko reakcijo na betalaktamske antibiotike ter omogočila natančnejšo diagnostiko in pacientu bolj prijazno obravnavo.

KME RS je na seji 16. maja 2023 obravnavala vašo vlogo in ugotovila, da je vloga popolna in raziskava etično sprejemljiva. S tem vam za njeno izvedbo daje svoje soglasje.

Pri nadaljnjih dopisih v zvezi z raziskavo se obvezno sklicujte na številko tega dopisa.

S spoštovanjem,

dr. Božidar Voljč, dr. med.  
predsednik KME RS

Vročiti:

– naslovniku – po e-pošti