

## EV TOZUNA DUYARLI BRONŞ ASTMALI HASTALARDA SPESİFİK IgE VE BAZOFİL DEGRANÜLASYON TESTİ

Zeynep Mısırlıgil\*

Lütfü Gürbüz\*\*

Hayati Bilgiç\*\*\*

Allerji hastalarında etkili tedavi yöntemi, hastalığa neden olan allergenlerin doğru olarak saptanması ile uygulanabilir. Bunun için de çeşitli tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Yöntemlerin büyük bir kısmı reaksiyon esnasında salınan histaminin biyolojik ve kimyasal yöntemlerle ölçümüne dayanır.

Klinik hikâye yanında deri testleri de önemli bilgiler verir. Pozitif olması klinik ile birlikte ise, değerlidir. Fakat klinik hikâye ile deri testleri her zaman birbirini tutmadığı gibi, anaflaktik şok yapabilmesi, yalancı pozitif ve negatif sonuçların görülebilmesi günümüzde allerjistleri in vitro allerji testlerini birlikte uygulamaya yöneltmiştir.

Kullanılan ve güvenilen tanı yöntemlerinden biri de bazofil degranülasyon testi ile antijene spesifik IgE analizleridir (2,3,4,7).

Bu çalışmadaki amacımız, ev tozuna duyarlılık tanımlıyan allerjik bronş astmalı hastalarda ev tozu antijeni ile deri testi, bazofil degranülasyon testinin tanıdaki yararını tartışmaktır.

### GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta grubumuz A.Ü. Tıp Fakültesi Göğüs Hast. ve Tbc. Anabilim dalı allerji bölümünde takip edilen, ev tozuna duyarlılık tanımlıyan 20 allerjik bronş astmalı hastayı içermektedir. Kontrol grubu atopik olmayan, sağlıklı ve hastalarımızla aynı yaş grubundan olan 10 kişiden oluşmuştur. Tablo I.

\* A.Ü.T.F. Göğüs Hast. ve Tbc. Anabilim Dalı Doçenti

\*\* A.Ü.T.F. Göğüs Hast. ve Tbc. Anabilim Dalı Profesörü.

\*\*\* Göğüs Hast. ve Tbc. uzmanı.



Tablo I : Olguların yaş ve cinsine göre dağılımı

Grup	Olgu Sayısı	Yaş Ortalaması	Yaş Sınırı
Hasta	20 (15 K, 5 E)	27.5 $\mp$ 1.7	18 - 38
Kontrol	10 ( 5 K, 5 E)	27.8 $\mp$ 1.5	20 - 35

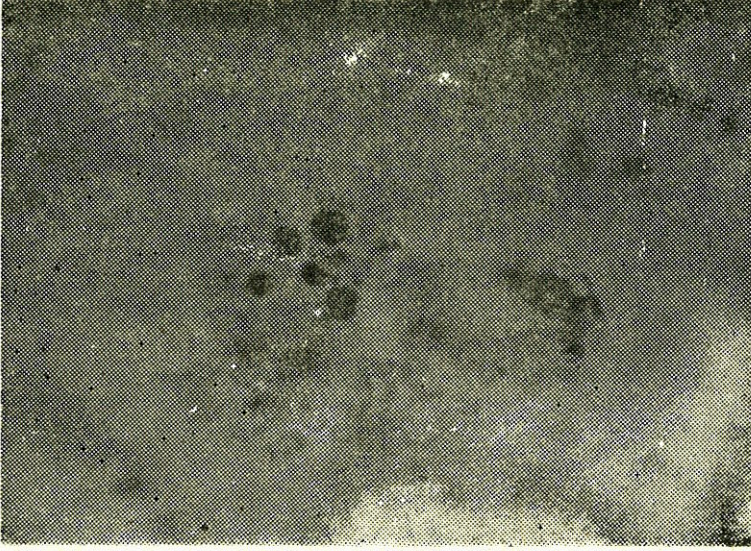
P &gt; 0.05

Ev tozu antijeni mite'dan zengin ev tozlarının harmanı ile, Ağırlık/Hacim (weight/volüm) standardizasyonuna göre, sulu ekstrakt olarak hazırlanmıştır. Hasta ve kontrol olgularına 1/1000'lik antijen sulandırımından deri içine uygulanarak 15 dakika sonunda zerk yerinde meydana gelen eritem ve ödem plağının büyüklüğü, kontrol testle (% 0.4 fenollü fizyolojik tuzlu su) karıştırılarak değerlendirilmiştir.

Olgulardan alınan serum örneklerinde Shelley ve ark. nın yapmış olduğu antijen ve antikor etkisi altında bazofil hücrelerindeki granülasyon esasına dayanan test (10) esas alınarak, Kimura ve ark. nın yöntemi (9) modifiye edilerek bazofil degranülasyon testi uygulanmıştır. Bu testde antijen olarak, ön çalışmada en iyi degranülasyon yapan ve spontan salınımının az olduğu ev tozu antijenininin 1/30 (W/V) yoğunluğu kullanılmıştır.

Mikrotitrasyon plaklarında 20  $\mu$  lt'lik otomatik pipetle ev tozu antijeni, antikor olarak olguların serumu ve deney günü tavşandan 10 cc heparinli alınmış olan kandan Rodey ve ark.nın (15) yöntemine göre ayrılmış olan tavşan bazofil lökositlerinden aynı miktarlarda konularak, karışımı sağlanmıştır. 37 C° benmaride 15 dakika bekletildikten sonra, standard lökosit pipeti ile 1/10 oranında bazofil boya solusyonu ile (% 0.8 toluidin mavisi % 5 Al<sub>2</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> çözeltisi içinde hazırlanır ve bu boya solusyonundan 20 ml, 25 ml distile su ile sulandırılır) dilüsyon yapılarak Thomas Zeiss kamarasında ışık mikroskopunda 400 büyütme ile 100 bazofil sayılarak normal ve degranülasyon gösteren bazofiller yüzde (%) olarak değerlendirilmiştir (Resim I). Sayım 5 dakika - 2 saat içinde yapılmıştır. Her deney kontrollü yapılarak, spontan salınım değerleri çıkarılarak degranülasyon oranları belirlenmiştir. Çalışmada enkubasyon öncesi ve sonrası lökositlerin





Resim 1 : Ortada normal tavşan bazofil hücresi etrafında degranüle tavşan bazofil hücreleri (x 400, 24 kez büyütülmeli)

parçalanma derecesi % 0.4 tripan mavisi ile kontrol edilmiştir (13). Her deneyde yaklaşık ölü hücre % 5 den az olarak saptanmıştır.

Bazofil degranülasyonu şu kriterlere göre saptanmıştır (10,14) :

- Hücre çapının büyümesi,
- Sitoplazmanın daha soluk boyanması ve granüllerin şişmiş olması,
- Granüllerin hücre dışına çıkması,
- Normal bazofillerin yuvarlak şekillerinin büzülerek armut biçimini almaları.

Olguların serum örneklerinde Engvall ve Perlmann'ın (5) tanıttığı ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi ile total IgE ve ev tozuna spesifik IgE analizleri yapılmıştır. Total IgE için Behringwerke enzygnost kiti kullanılmıştır. Bütün serum örnekleri aynı gün çalışılarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler A.Ü.T.F. Biyoistatistik bilim dalında yapılmıştır. Ortalamalar arası fark t testi ile değerlendirilmiştir.



## BULGULAR

Hasta grubu, ev tozu antijeni ile deri testinde cevap verenler ve vermeyenler olarak iki ayrı grupta değerlendirildi. Olgulara ait klinik bulgular ve deri testleri, bazofil degranülasyon, total ve spesifik IgE sonuçları tablo II de verilmiştir.

En yüksek bazofil degranülasyonu, deri testi pozitif olan hasta grubunda bulundu ( $p < 0.001$ ). Deri testi negatif olan hasta grubu ile kontrol grubu arasında da anlamlı bir fark saptandı ( $p < 0.01$ ).

Her iki hasta grubunda IgE yüksek değerlerde idi (tablo II).

Tablo II : Olguların Klinik ve Test Bulguları

A) Deri Testi Pozitif Hastalar				B) Deri Testi Negatif Hastalar				C) Kontrol			
Olgu No. (Yaş, Cins)	BDT* %	Sp. IgE*	T. IgE*	Olgu No. (Yaş, Cins)	BDT %	Sp. IgE PRU/ml	T. IgE IU/ml	Olgu No. (Yaş, Cins)	BDT %	Sp. IgE PRU/ml	T. IgE IU/ml
1. (Y.K, 30, K)	29	2.80	950	1. (A.İ, 26, K)	6	—	260	1. (G.E, 20, K)	4	—	100
2. (F.Ö, 37, K)	13	3.90	950	2. (B.Y, 25, K)	20	1.05	800	2. (A.D, 25, K)	3	—	25
3. (N.İ, 25, K)	25	—	500	3. (A.S, 34, K)	14	—	300	3. (S.S, 23, K)	5	—	100
4. (M.T, 32, E)	27	5.75	400	4. (O.Z, 28, K)	4	—	220	4. (H.O, 30, E)	1	—	36
5. (H.İ, 28, E)	27	0.52	300	5. Ö.S, 25, E)	3	—	100	5. (N.N, 29, E)	5	—	38
6 (N.K, 18, K)	30	0.35	320	6. E.Ö, 22, K)	12	—	600	6. (G.E, 23, E)	2	—	100
7. (B.E, 33, K)	25	0.65	310	7. (S.A, 30, K)	6	—	750	7. (Y.D, 29, E)	4	—	70
8. (B.Ç, 25, E)	19	0.52	290	8. A.B, 34, K)	10	—	95	8. H.B, (30, E)	0	—	110
9. (N.Y, 24, K)	36	1	320	9. (S.H, 21, K)	11	—	300	9. (Z.M, 34, K)	1	—	10
10. (H.Y, 38, E)	38	—	109	10. (G.İ, 23, K)	8	—	40	10. (M.Ç, 35, K)	2	—	16
$\bar{X}$	26.9	1.9	446.9		9.4	346.5			2.7	60.5	
Sx	7.3	0.7	89.3		1.6	86.8			0.6	12.5	

B D T : Bazofil degranülasyon testi  
S p : Spesifik  
T : Total

Gruplar arası P : B D T :

A - B P < 0.001

A - C P < 0.001

B - C P < 0.01

T. IgE : A - B P > 0.05

A - C P < 0.001

B - C P < 0.01

Ev tozu antijenine spesifik IgE kontrol grubunda ve bir olgu dışında, deri testi negatif olan bronş astmalı hasta grubunda negatif olarak bulundu. Deri testine negatif cevap alınan ve spesifik IgE 1.05 PRU/ml olarak bulunan hastada ev tozu antijeni ile bazofil degranü-



lasyonu % 20 olarak saptandı. Deney farklı zamanlarda tekrarlandığında degranülasyon oranının yaklaşık olarak yüksek olduğu gözlemlendi. Bu hastada in vitro sonuçların pozitif bulunması üzerine, deri testi tekrarlandığında tekrar cevap alınamadı.

Bazofil degranülasyon sonuçlarına göre Phadezym RAST'ın pozitiflik derecesinin olgulardaki dağılımı tablo III'de verildi. Vaka sayısı az olduğu için iki yöntem arasında istatistiksel değerlendirme yapılamadı fakat tablodan da görüldüğü gibi % 10 dan az bazofil degranülasyon gösteren olgularda spesifik IgE de bulunamamıştır ve deri testi negatif olarak saptanmıştır.

Tablo III : Bazofil degranülasyon sonuçlarına göre Phadezym RAST'ın pozitiflik derecesi ve deri testi cevabının olgulardaki dağılımı.

BDT %	Sayı	Phadezym RAST (spIgE)*				Deri Testi	
		0	1	2	3	Pozitif	Negatif
0-10	15	15					15
10-20	6	4	1		1	2	4
20-30	7	1	4	1	1	6	1
30	2	1		1		2	

\* Ev tozuna spesifik IgE Phadezym RAST'ın pozitiflik derecesi.

0 : negatif veya ölçülemeyecek değerde

1 : 0.35 — 1.5 PRU/ml (düşük derecede pozitif)

2 : 1.5 — 3.5 PRU/ml (orta derecede pozitif)

3 : 3.5 — 17.5 PRU/ml (yüksek derecede pozitif)

## TARTIŞMA

İmmunolojik olaylarda günümüzde en çok kabul edilen IgE ile oluşan tip I aşırı duyarlılık olaylarıdır. Allerjik bronş astmalı hastalarda serumda IgE yükselmiştir (18,19).

Serum IgE düzeyinin normal okul çağı çocuklarda en yüksek düzeyde olduğu ve yaşla azalma gösterdiği bildirilmiştir. (8,20) Çalışmamızda aynı yaş grubundan seçilmiş hasta ve kontrol grubunda, IgE analizinde hassas ve duyarlı bir test olan ELISA (6) ile, serum IgE düzeyini değerlendirdiğimizde astmalı hasta grubunda artmış olduğunu saptadık.



Kagamimori ve ark., okul çağı çocuklarda total IgE'nin erkek çocuklarda kızlara göre 2.1:1 oranında daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. (8) Bizim kontrol grubumuzda sex dağılımı eşit olmasına karşın, hasta grubumuzda erkek hasta sayısının az oluşunun bulunduğu değerlerde bir fark yaratmadığını söyleyebiliriz.

Bazofil degranülasyon testi pratik ve güvenilir bir testtir (1,2,4). Bu test, antijen antikor etkisi altında bazofil hücrelerindeki morfolojik değişiklikler esasına dayanır. Atopik hastalarda allergenlerin belirlenmesi amacı ile pek çok çalışmada kullanılmıştır (1,4,9,12,17).

Benveniste ve ark. erken hipersensibilite reaksiyonlarında bazofil degranülasyon testinin allergenlerin belirlenmesinde önemli bir test olduğunu vurgulamışlar ve deri testi, RAST ve histamin salınım testleri ile bazofil degranülasyon arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir (1).

Dry ve ark. ev tozu allerjisini bazofil degranülasyon testi ile araştırmışlar ve deri testi pozitif 30 olgunun 27'sinde pozitif bazofil degranülasyonu görmüşler. Deri testi ile % 95'e varan bir uyumluluk gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (4).

Schwarzenbach ve ark. bazofil degranülasyon testi ile deri testi arasında bir korelasyon olmadığını göstermişlerdir. Bunu tam açıklayamamışlar fakat antijenin uyarısına mast hücresi ile bazofil hücrenin farklı cevap verşi ile veya in vivo yada in vitro hücre süspanسیونuna bağlı bir farkdan olabileceği şeklinde açıklamışlardır (16).

Çalışmamızda ev tozu antijeni ile deri testi pozitif olan allerjik bronş astmalı hastaların tümünde ev tozun antijeni ile bazofil degranülasyonunun yüksek değerlerde olduğu görülmüştür. Deri testi negatif olan astmalı hasta grubunda bazofil degranülasyonu % 9.4  $\mp$  1.6, kontrol grubunda % 2.7  $\mp$  0.6 olarak bulundu. Aradaki fark anlamlı idi ( $p < 0.01$ ). Bu açıdan deri testi negatif bulunan hastalarda ev tozu antijeni ile % 10 ve üstünde bazofil degranülasyonu görüldüğü durumlarda, ev tozuna duyarlılık açısından şüpheli olgu olarak ele alınması ve birlikte spesifik IgE analizi ile olgunun değerlendirilmesi uygun olur kanısındayız. Deri testi negatif olan hasta grubumuzdan sadece bir hastada yüksek bazofil degranülasyonu (% 20) görüldü. Bu hastada spesifik IgE'de pozitif olarak saptandı. Bu iki invitro yöntem arasında sıkı bir ilginin olduğu gözlemlendi. Birçok çalışmada bazofil degranülasyon testi, RAST ve histamin salınım testlerinin aynı paralellikde olduğu gösterilmiştir (1,4).



Allergene spesifik IgE analizleri bugün geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Fakat tanıdaki yararı yanında antijene karşı klinik duyarlılığı da her zaman yansıtamamaktadır (7,21).

Deri testleri allerjide başlıca tanı yöntemi olarak günümüze dek gelmiştir. Yapılması kolay ve duyarlı olan bu yöntem tanıya ışık tutmaktadır. Fakat deri testlerinin klinik hikaye ile birbirini tutmadığı zaman, *in vitro* allerji testlerinin de birlikte yapılarak değerlendirilmesi uygun olur kanısındayız.

Yurdumuzda bugün için dışarıya bağımlı olarak yapabildiğimiz antijene spesifik IgE analizlerinin pahalı bir yöntem oluşu, lökosit his-tamin salınım testinin çok titiz çalışmayı gerektiren ve zaman isteyen bir yöntem oluşu (11) göz önüne alınacak olursa, pratik ve ucuz bir yöntem oluşu yanında sonuçların güvenilirliği nedeni ile, *invitro* allerjenerlere duyarlılığın araştırılmasında, bazofil degranülasyon testinin öncelikle tercih edilmesi gerektiği görüşündeyiz. Şüpheli sonuçlarda spesifik IgE'nin yapılarak klinik, deri testi, degranülasyon sonuçları ile birlikte değerlendirilmenin tanıda yararı olacağı kanısındayız. Ayrıca deri testlerinin yapılması tehlikeli olabilen örneğin penisilin, endüstriyel maddeler gibi yüksek allergen etkisi olan antijenlerin uygulanması gereken durumlarda, ekzematı, dermografizimli hastalarda yaşlılarda, küçük çocuklarda allergenlerin saptanmasında önem kazanaacağı görüşündeyiz.

## ÖZET

Ev tozuna duyarlılık tanımlıyan allerjik bronş astmalı 20 hasta ve atopik olmayan, sağlıklı 10 kişide ev tozu antijeni ile deri testi, modifiye Shelley testi ile bazofil degranülasyon testi, ELISA yöntemi ile total ve evtozuna spesifik IgE araştırıldı. Deri testi pozitif olan 10 astmalı hastanın hepsinde bazofil degranülasyonu pozitif, 8'inde spesifik IgE bulundu. Deri testi negatif bir hastada, bazofil degranülasyonu ve spesifik IgE pozitif olarak bulundu.

Astmalı hasta grubunda total IgE yüksek değerlerde saptandı.

Allergenlerin saptanmasında bazofil degranülasyon testinin *invitro*, basit, güvenilir ve pratik bir yöntem olması açısından uygulanabilirliği tartışıldı.



## SUMMARY

### House dust specific IgE and basophil degranulation test in house dust sensitive bronchial asthma patients

Skin and basophil degranulation test to house dust by modified Shelley test and total and house dust specific IgE by ELISA were determined in 20 patients with allergic bronchial asthma complained from house dust and nonatopic healthy controls. Raised IgE levels were found in asthma patients studied. Out of 10 patients with a positive skin test with house dust, 10 had a positive basophil degranulation test, 8 had specific IgE antibodies in the sera. Positive basophil degranulation and specific IgE was identified in only one patients showed negative skin test to house dust allergen. It was discussed that basophil degranulation test can be used because of a simple, reliable and practical invitro technique for studying reaginic allergies.

## TEŞEKKÜR

Çalışmada teknik yardımları olan Nahide Akar'a ve Yılmaz Yeter'e istatistiksel değerlendirmede emeği geçen Doç. Dr. Ersöz Tüccar'a teşekkürü bir borç biliriz.

## KAYNAKLAR

1. Benveniste J : The human basophil degranulation test as an invitro method for diagnosis of allergies, Clin Allergy 11 : 1 - 11, 1981.
2. Benveniste J, Egido J, Millet G and Camussi G : Detection of immediate hypersensitivity in rabbit by direct basophil degranulation, J Allergy Clin Immunol 59 : 271-279, 1977.
3. Brown WG, Halonen MJ, Kaltenborn WT and Barbee RA : The relationship of respiratory allergy, skin test reactivity and serum IgE in a community population sample, J Allergy Clin Immunol 63 : 328-335, 1979.
4. Dry J, Leynadier F, Lucc H : Human basophil degranulation in Dermatophagoides allergies : 93 cases, Ann Allergy 44 : 308-312, 1980.
5. Engvall E, Perlmann P : Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) J Immunol 109 : 129, 1972.



6. Hoffman DR : Estimation of serum IgE by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), *J Allergy Clin Immunol* 51 : 303-307, 1973.
7. Homburger HA, Jacob GL : Analytic accuracy of specific immunoglobulin E antibody results determined by a blind proficiency survey, *J Allergy Clin Immunol* 70 : 474-480, 1982.
8. Kagamimori S, Naruse Y, Watanabe S et al : A epidemiological study on total and specific IgE levels in Japanese schoolchildren, *Clin Allergy* 12 : 561-568, 1982.
9. Kimura I, Tanizaki Y, Goda Y et al : New invitro method for detecting asthma allergen, *Clin Allergy* 13 : 99-105, 1983.
10. Mackiewicz S, Kabza R : Degranulierung der blutbasophilen inder diagnose medikamentenlöser allergie zustände. Ref : Klinsorge H : Fortschritte der klinischen immunologie 1966, 193-201.
11. Mısırlıgil, Z, Doğan P, Saraçlar Y et al : Allerjik bronş astmalı hastalarda ev tozu allerjisinin lökosit histamin salınım testi ile araştırılması, *Tüb Toraks* 29 : 61-67, 1981.
12. Mumcuoğlu Y, Wortmann F : Modified basophil degranulation test in diagnosis of bee and wasp sting allergies, *Allergy* 35 : 335-340, 1980.
13. Nakagawa T, Stadler BB, DeWeck AI : Determination of rat mast cells by flow-cytometry, *J Immunol Methods* 33 : 87, 1980.
14. Özyardımcı N : Tüberkülostatik ilaçlara allerjik vakalarda allergen ilacın tesbitinde intracutan cilt testlerinin ve modiye Shelley testinin yeri ve değeri, Asistanlık tezi, A.Ü. Tıp Fak, 1969.
15. Rodey GE, Ford DK, Gray BH et al : Defective bactericidal activity of peripheral blood leucocytes in lizochrome histiocytosis, *Am J Medicine* 49 : 322, 1970
16. Schwarzenbach HR, Nakagawa T, Conray MC et al : Skin reactivity bisophil degranulation and IgE levels in ageing, *Clin Allergy* 12 : 465-473, 1982.
17. Soifer MM, Hirsch RS : The direct basophil degranulation test and the intracutaneous test : A comparison using food extracts, *J Allergy Clin Immunol* 56 : 127-132, 1975.
18. Srivastova N, Srivastova LM, Gupta SP : Studies on serum complement and EgE in bronchial asthma, *Clin Allergy* 12 : 569-576, 1982.



19. Torlo SM, Broder I, Davies GM et al : Serum immunoglobulin E in astmatic adults, *J Alergy Clin Immunol* 63 : 201, 1979.
20. Wittig HJ, Belloit J, De Filippi T et al : Age related serum immunoglobulin E levels in healthy subjects and in patients with allergic disease, *J Allergy Clin Immunol* 66 : 305-313, 1980.
21. Yunginger JW, Jones RT, Leiferman KM et al : Immunological and biochemical studies in beekeepers and their family members, *J Allergy Clin Immunol* 61 : 93, 1978.