

Utilizzo del test di attivazione dei basofili (BAT) per la diagnosi di reazione allergica a piperacillina in ambito professionale: descrizione di un caso clinico

P. MARRACCINI, G. DIGIESI*, PATRIZIA PIGNATTI**, L. BORDINI***, M. PREVIDI

U.O.S Allergologia Ambientale e Occupazionale, Clinica del Lavoro L. Devoto, Fondazione IRCCS, Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

* Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Milano.

** Laboratorio di Immunologia, Servizio Autonomo di Allergologia e Immunologia Clinica, Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Pavia

*** UOC Protezione e Promozione Salute Lavoratori, Clinica del Lavoro L. Devoto; Fondazione IRCCS, Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

KEY WORDS

Piperacilline; BAT; occupational allergy

PAROLE CHIAVE

Piperacillina; test di attivazione dei basofili; allergia occupazionale

SUMMARY

«A clinical case of occupational allergy to piperacillin. A novel diagnostic method: Basophil Activation Test (BAT)». Background: Piperacillin, unlike other antibiotics, rarely causes immediate allergic reactions. Only two cases related to occupational exposure are reported in the literature. Objectives: Adoption of new methods for diagnosis of occupational allergy to drugs. Methods: An atopic nurse, aged 30 years, was referred to our hospital for an allergic work-related reaction to piperacillin. The patient had suffered two successive episodes with immediate cutaneous reaction, angioedema and dyspnoea after preparing piperacillin. Almost four years previously she had suffered from similar symptoms after taking amoxicillin. She was submitted to a clinical examination and a routine allergic test, performing also specific IgE (Phadia Pharmacia ImmunoCap) and BAT (Basophil Activation Test) for Beta-lactam antibiotics. Results: A positive response to piperacillin was observed in our case using BAT, a new non-invasive and safe method, that proved useful for diagnosis of allergy. Moreover, we observed a change from an allergic reaction for therapeutic use of amoxicillin to a work-related adverse reaction to another beta-lactam, piperacillin. Conclusions: In previous clinical cases cutaneous and specific challenge tests were performed for diagnosis. At present, availability of an in vitro test, such as BAT, may provide new diagnostic opportunities, and a useful tool for studying clinical cases other than, in perspective, monitoring exposed workers. Preventive measures were taken in the workplace to lower the risk of sensitization and allergic response. The nurse was transferred to a well controlled job.

RIASSUNTO

Introduzione: La piperacillina, a differenza di altri antibiotici, raramente induce reazioni allergiche di tipo immediato. **Obiettivi:** Adozione in ambito occupazionale di nuovi criteri diagnostici che si utilizzano per le farmaci

Pervenuto il 5.6.2013 - Revisione pervenuta il 11.7.2013 - Accettato il 3.9.2013

Corrispondenza: Paolo Marraccini Fondazione IRCCS, Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, via San Barnaba 8, 20122 Milano - Tel 02.55032692 - E-mail: paolo.marraccini@policlinico.mi.it

*allergie. **Metodi:** Viene riportato il caso clinico di un'infermiera professionale, atopica, giunta alla nostra attenzione per due episodi, occorsi a breve distanza, caratterizzati da manifestazioni cutanee pomfoidi, angioedema e difficoltà respiratoria dopo la preparazione in ambito lavorativo di un antibiotico, la piperacillina. In precedenza la paziente aveva lamentato manifestazioni analoghe dopo assunzione di amoxicillina per via orale a scopo terapeutico. La valutazione delle IgE specifiche per beta-lattamici ha dato esito negativo. E' stato eseguito il BAT (Test di Attivazione dei Basofili), non invasivo, oggi ampiamente utilizzato per la diagnosi di forme IgE mediate, fra cui quelle da farmaci, che ha dato esito positivo per la piperacillina. **Risultati:** Il BAT ha confermato il suo ruolo crescente nella diagnosi non invasiva delle reazioni avverse a farmaci. **Conclusioni:** La particolarità del caso sta nel fatto che da una reazione tradizionale terapeutica ad antibiotici si è avuta l'evoluzione in una forma professionale, e che è stata adottata una nuova e promettente metodica diagnostica, che evita le possibili reazioni in vivo con gli strumenti diagnostici tradizionali. Alla diagnosi hanno fatto seguito misure di prevenzione e protezione sul luogo di lavoro finalizzate a ridurre il rischio di sensibilizzazione e di reazioni allergiche.*

INTRODUZIONE

La piperacillina è un antibiotico battericida molto efficace appartenente alla classe delle ureidopenicilline, spesso utilizzata in associazione al tazobactam, un inibitore della beta-lattamasi. Questa associazione, ad ampio spettro, è attiva nei confronti di molti batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi, in particolare dello *Pseudomonas aeruginosa*.

La piperacillina, a differenza di altri antibiotici, raramente induce reazioni allergiche di tipo immediato quali asma bronchiale, rinite, orticaria, anafilassi (6, 12, 14, 15). In uno studio pubblicato da Moss, sei pazienti hanno presentato una storia di reazione immediata e generalizzata da ipersensibilità alla piperacillina (13).

In letteratura sono riportati solo due casi di reazione immediata per esposizione occupazionale a piperacillina: un caso di asma, rinite ed orticaria occorso in un lavoratore nell'industria farmaceutica (12) ed un caso di anafilassi in un'infermiera addetta alla preparazione della terapia (6).

CASO CLINICO

Il soggetto giunto alla nostra osservazione è una donna di 30 anni, infermiera in reparto ospedaliero pediatrico. La lavoratrice presentava una storia anamnestica dubbia per oculo-rinite e manifesta-

zioni respiratorie (occasionalmente tosse e difficoltà respiratoria) a seguito di ingestione di arachidi, nocciole e cacao. La dipendente risultava affetta da eczema atopico con periodiche riacutizzazioni, ed era nota la sensibilizzazione a nichel solfato (++) . Circa 4 anni prima, dopo assunzione di amoxicillina, la paziente aveva presentato una reazione allergica immediata caratterizzata da orticaria ed angioedema. Successivamente, a distanza di pochi mesi, la paziente aveva nuovamente assunto amoxicillina con reazione di tipo cutaneo immediata. Dopo tali eventi la paziente non aveva più assunto alcuna terapia antibiotica. A distanza, dunque, di tre anni e mezzo dall'ultima reazione con amoxicillina, il soggetto ha presentato in ambito lavorativo una manifestazione cutanea immediata a 15 minuti dal contatto con Piperacillina e Tazobactam Kabi® (piperacillina + tazobactam, 2 g + 250 mg), presentando pomfi diffusi alle mani. Il contatto era avvenuto tramite l'uso di una tovaglia che la lavoratrice aveva preso in reparto per asciugarsi le mani. La tovaglia era stata precedentemente utilizzata da altri colleghi per rimuovere la piperacillina versata su una superficie durante la preparazione. I sintomi erano regrediti spontaneamente nel corso di un paio di ore. A distanza di alcune settimane l'infermiera è venuta a contatto per via cutanea ed inalatoria con lo stesso antibiotico durante la fase di preparazione: in questo caso vi era stata una dispersione del liquido nell'ambiente lavorativo per scorrette manovre durante la fase di preparazione

della terapia. Ciò ha determinato immediate manifestazioni cutanee pomfoidi ed angioedema con difficoltà respiratoria; per tale motivo è stata prontamente trattata con steroidi ed antiistaminici. Dopo tale evento la dipendente, attraverso il medico competente dell'ospedale, è pervenuta alla nostra osservazione. Ha eseguito Skin Prick Test per i comuni inalanti ambientali e per gli alimenti imputati delle pregresse reazioni con positività per i soli acari (*Dermatophagoides Pteronyssinus* e *Farinae* ++). Ha inoltre effettuato SPT con tre estratti di lattice come pratichiamo nel nostro ambulatorio (Latex Lofarma, Stallergenes ed Alk) con esito negativo.

Le IgE sieriche totali risultavano nei range di normalità (90 kUA/l; v.n < 100 kUA/l), mentre la Proteina Cationica Eosinofila sierica (ECP) presentava una concentrazione superiore alla norma (18,2 vs 15 ug/l). Le IgE specifiche (sIgE) per acari, lattice, arachidi, nocciola, noce brasiliana, semi di soia, cacao, castagna, noce, finocchio e pistacchio erano negative (<0,10 kUA/l).

Quale primo approccio per la diagnosi di allergia a farmaci si è effettuata la determinazione di IgE specifiche per penicilline (Penicilloyl G, Penicilloyl V, Amoxicillina, Ampicillina e Cefaclor) mediante metodica ImmunoCap Pharmacia Sweden, che ha dato esito negativo (sIgE < 0,10 kUA/l). Si è poi

eseguito un secondo test in vitro, il test di attivazione dei basofili (BAT), che è risultato negativo per amoxicillina ed acido clavulanico, ampicillina, benzylpenicillina, lidocaina (questa testata in quanto presente nel diluente del farmaco), ma positivo per piperacillina (CD63 = 12,7% ed indice di stimolazione = 4,9; il cut off è rispettivamente < 5% con indice di stimolazione < 2) (figura 1). Il BAT è un test in vitro funzionale di quarto livello validato per la diagnosi di forme IgE mediate, incluse allergie a farmaci, alimenti, pollini, e veleno di imenotteri (8,10). I basofili sono facilmente identificabili nel sangue periferico e per testare differenti farmaci è sufficiente una quantità esigua di sangue (9). Il test è stato eseguito utilizzando 50 µl di sangue con anticoagulante (Li-eparina) per ogni condizione. I basofili nel sangue sono stati prima pre-attivati con IL-3 per 10 minuti a 37°C e poi incubati per 20 minuti a 37°C con diverse concentrazioni di farmaco (amoxicillina e piperacillina 1 mg/ml e 100 µg/ml), con tampone di lavaggio come controllo negativo o con anti IgE (Pharmingen, Becton Dickinson) come controllo positivo. La reazione è stata bloccata in ghiaccio e ad ogni provetta è stata aggiunta una miscela di anti IgE coniugato con ficoeritrina (PE) e CD63 coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) (Orpegen Pharma, Heidel-

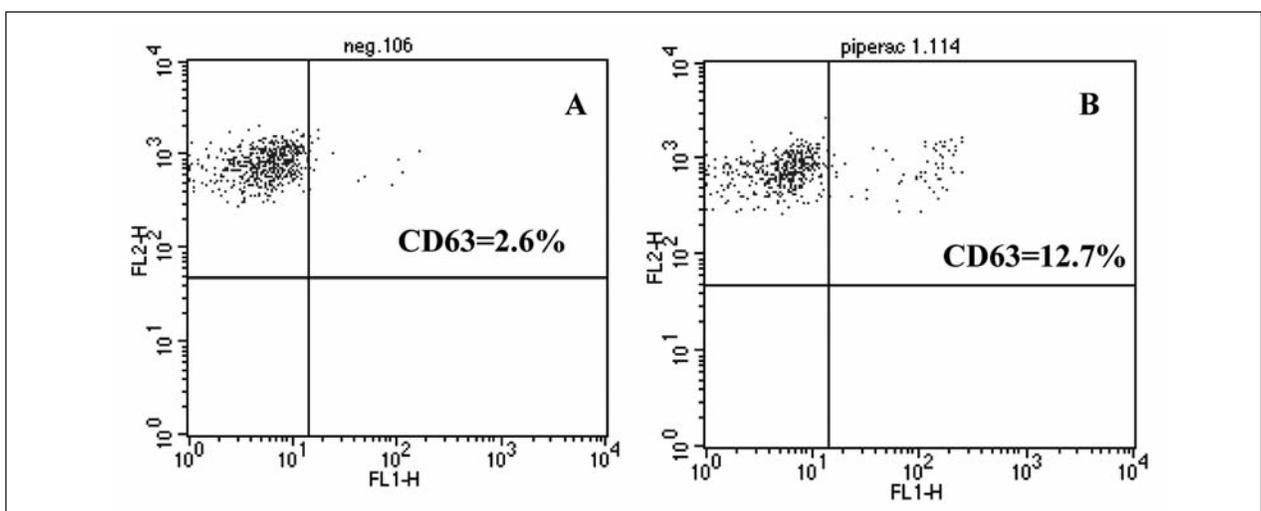


Figura 1 - Test di attivazione dei basofili con tampone: controllo negativo (A) e piperacillina (B). I Dot plot mostrano l'espressione del marker di attivazione CD63 sui basofili.

Figure 1 - Basophil activation test with buffer: negative control (A) and piperacilline (B). Dot plots show CD63, marker of basophil activation

berg). Dopo 30 minuti in ghiaccio al buio, i globuli rossi sono stati lisati con una soluzione di cloruro di ammonio e i leucociti sono state acquisiti al citofluorimetro. Una volta selezionati i basofili con l'anti IgE, si è valutata l'espressione del CD63 che aumenta sulla membrana dei basofili a seguito della loro attivazione (16).

La paziente dopo tali test in vitro ha effettuato test dose con antibiotici alternativi, un macrolide ed un chinolonico, per poter disporre di un antibiotico, non beta-lattamico, in caso di necessità terapeutiche. Gli antibiotici testati secondo le modalità della letteratura sono stati ben tollerati (2).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La particolarità del caso da noi descritto è che le manifestazioni occorse in ambito lavorativo sono insorte a distanza di alcuni anni dalle manifestazioni correlate all'assunzione terapeutica di beta-lattamici (due reazioni immediate dopo assunzione di amoxicillina), implicando un altro antibiotico della stessa classe farmacologica, la piperacillina che, come si vede dalla figura 2, presenta omologie strutturali con l'amoxicillina. Nei due episodi riferiti dalla lavoratrice la modalità di contatto è sempre stata diretta, seppure con lievi differenze. Nel primo episodio il contatto diretto con il farmaco si è avuto tramite un tovagliolo con tracce di farmaco, nel secondo episodio si è verificata una fuoriuscita del farmaco dal flaconcino durante la preparazione dello stesso con schizzi di liquido, che hanno investito le mani ed il collo della dipendente. Esistono diverse modalità di esposizione non terapeutica agli antibiotici, ivi inclusi i beta-lattamici (1). Le modalità più comuni sono rappresentate, infatti, dal contatto diretto con il farmaco versato e dall'inhalazione di polvere o schiuma durante la preparazione del farmaco. Il dato anamnestico ed il riscontro delle reazioni in ambito ospedaliero hanno indotto a focalizzare il problema sull'esposizione al beta-lattamico. Al momento non esiste un consenso generale riguardo i marker di attivazione migliori da utilizzare per valutare le reazioni a farmaci (5); il BAT risulta oggi una metodica non invasiva molto promettente. In un recente studio clinico sono state

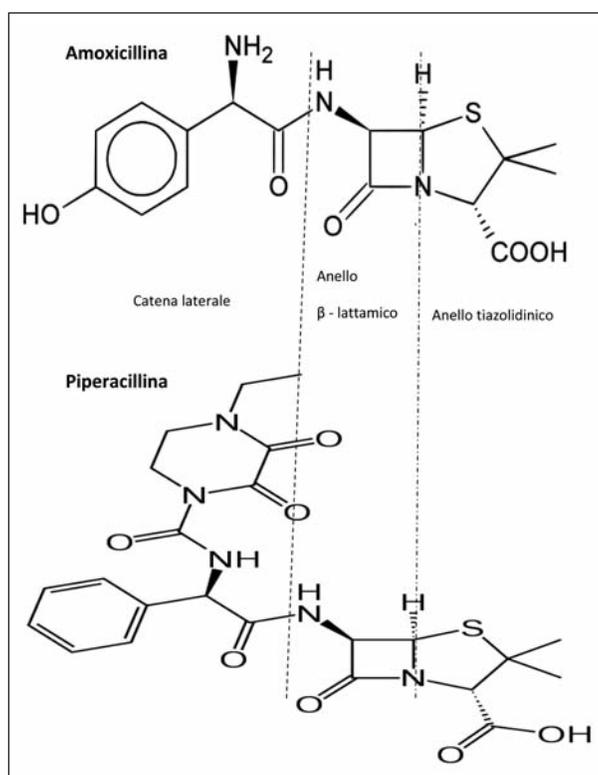


Figura 2 - Le molecole amoxicillina e piperacillina presentano la comune struttura di base costituita dall'acido 6-amino penicillanico, che comprende un anello tetratomico (beta-lattamico) ed un anello pentatomico tiazolidinico. Le catene laterali sono legate al gruppo amminico dell'anello beta-lattamico

Figure 2 - Amoxicillin and piperacillin have a similar structure with 6-aminopenicillanic acid consisting of a tetratomic ring (Beta-lactam) and a pentatomic thiazolidine ring. The lateral chain is connected to the amminic group of the Beta-lactam ring

confrontate le IgE specifiche e l'espressione del marker CD63 dei basofili in 58 pazienti con allergia a beta-lattamici: la sensibilità e specificità dei due test sono stati a favore del BAT (38% vs 50% di sensibilità e 87% vs 94% di specificità) (17). Per altro, il valore diagnostico del BAT potrebbe in parte migliorare con l'utilizzo del marker CD203c combinato ai marker intracellulari p38MAPK e CD300a, e con una migliore comprensione dell'associazione tra espressione di CD63 e CD203c e rilascio di mediatori quali l'istamina (8).

La negatività del BAT per l'amoxicillina, nonostante la storia clinica di reazione a tale farmaco, conferma quanto indicato da diversi studi, ovvero

una riduzione della sensibilità del BAT all'aumentare dell'intervallo temporale tra reazione al farmaco ed esecuzione del test da effettuarsi nell'intervallo di 6-12 mesi dalla reazione (3, 4, 11, 18). Inoltre, come noto, l'assenza di esposizione all'allergene riduce la concentrazione delle IgE specifiche e, dunque, non sorprende la negatività per le varie penicilline, ed in particolare l'amoxicillina, in quanto trascorso un certo numero di anni dall'evento di farmaco allergia.

Nella diagnostica da noi approntata la dipendente non è stata sottoposta ai test cutanei in vivo con penicilline, tra cui anche la piperacillina, sia perché ha rifiutato tale tipologia di accertamento sia per il consistente rischio di anafilassi riportato dalla letteratura (19) alla luce anche dell'anamnesi e della reattività marcata del soggetto. Non si può escludere una possibile negatività ai test cutanei per le varie penicilline, come spesso accade in tali casi, in relazione anche al tempo trascorso dalla reazione. La risposta osservata, per altro, può essere presumibilmente imputata alle catene laterali della molecola. In passato, non essendo ancora disponibile il BAT, la diagnostica per reazioni allergiche a piperacillina si era avvalsa dei test cutanei e dei test di provocazione (7, 12, 15).

La possibilità di disporre di un test in vitro, quale il BAT, fornisce nuove possibilità diagnostiche e, in prospettiva, permette di monitorare le popolazioni esposte occupazionalmente attraverso una metodica puntuale, non invasiva, che non richiede lunghe sedute, indaginose e reiterate nel tempo, peraltro non scevre di rischio, come quelle che si attuano nei casi di farmaco allergia.

Misure di prevenzione e reinserimento lavorativo

Nel settembre 2012, successivamente al verificarsi del secondo episodio di reazione avversa a piperacillina, il medico competente aveva effettuato un sopralluogo presso la chirurgia ed ortopedia pediatrica del presidio ospedaliero, rilevando che gli antibiotici venivano preparati in reparto e somministrati dallo stesso operatore con una rotazione quotidiana nel personale infermieristico (la Piperacillina e Tazobactam Kabi® erano tra i più utilizzati fino a 15 somministrazioni giornaliere). Il prodotto

è composto da due flaconcini: uno contenente il principio attivo in polvere, l'altro la soluzione diluente. Durante la fase di preparazione il diluente viene prelevato con una siringa e iniettato nel flacone contenente il preparato in polvere. Tale processo determina un aumento della pressione interna nel contenitore in cui viene iniettato il diluente. Occorre prestare attenzione a far fuoriuscire l'aria dal flacone per evitare la rottura della membrana posta a protezione del flaconcino. Nel caso della dipendente, durante la fase di prelievo del farmaco per la somministrazione, si è verificata la mancata tenuta della membrana con fuoriuscita del farmaco. Al momento della preparazione e somministrazione del farmaco la dipendente non indossava, per altro, guanti protettivi. Il medico competente ha lavorato sulle procedure organizzative per ovviare il ripetersi di eventi simili, e sono state fornite protezioni da indossare nella preparazione e somministrazione di tutti i farmaci antibiotici in diluizione. La dipendente è stata reinserita con particolari attenzioni nelle attività che possano comportare la manipolazione di prodotti a base di piperacillina e tazobactam. È stato indicato in apposite procedure l'utilizzo scrupoloso dei DPI quali visiera paraschizzi, sovracamice, guanti, mascherina e si è operato, attraverso la coordinatrice infermieristica, individuata come preposto, all'informazione e formazione degli operatori che eseguono la preparazione e somministrazione di antibiotici, stressando le misure da adottare nella preparazione dei farmaci: svuotamento aria, modalità di inserimento dell'ago e prelievo del farmaco, possibilità che si verifichino schizzi con i residui del farmaco. Con tali misure si è cercato di rafforzare il concetto della necessità di procedure attente di controllo ambientale e di protezione individuale, finalizzate a ridurre il rischio di sensibilizzazione e/o di reazioni allergiche.

NO POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST RELEVANT TO THIS ARTICLE WAS REPORTED

BIBLIOGRAFIA

1. Blanca M, Garcia J, Verga JM, et al: Anaphylaxis to penicillins after non-therapeutic exposure: an immunological investigation. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 335-340

2. Bonifazi F, Senna G, Billò MB: *Reazioni allergiche e pseudo allergiche da farmaci*. Milano: Update International Congress Edizioni, 2004
3. Fernández TD, Torres MJ, Blanca-Lopez N, et al: Allergy. Negativization rates of IgE radioimmunoassay and basophil activation test in immediate reactions to penicillins. *Allergy* 2009; *64*: 242-248
4. Gómez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, et al: Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients. *Clin Exp Allergy* 2009; *39*: 1217-1224
5. Hausmann OV, Gentinetta T, Bridts CH, Ebo DG: The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; *29*: 555-566
6. Kim JE, Kim SH, JH Kim, et al: A case of piperacillin-induced occupational anaphylaxis: detection of serum IgE to piperacillin-HSA conjugate. *J Korean Med Sci* 2011; *26*: 682-685
7. Leger RM, Arndt PA, Garratty G: Serological studies of piperacillin antibodies. *Transfusion* 2008; *48*: 2429-2434
8. Leysen J, Sabato V, Verweij MM, et al: The basophil activation test in the diagnosis of immediate drug hypersensitivity. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011; *7*: 349-355
9. Lorenz I, Schneider EM, Stolz P, et al: Sensitive flow cytometric method to test basophil activation influenced by homeopathic histamine dilutions. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2003; *10*: 316-324
10. McGowan EC, Saini S: Update on the performance and application of basophil activation tests. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; *13*: 101-109
11. Monneret G, Benoit Y, Debard AL, et al: Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol*. 2002; *102*: 192-199
12. Moscato G, Galdi E, Scibilia A, et al: Occupational asthma, rhinitis and urticaria due to piperacillin sodium in a pharmaceutical worker. *Eur Respir J* 1995; *8*: 467-469
13. Moss RB: Sensitization to aztreonam and cross-reactivity with other beta-lactam antibiotics in high-risk patients with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 1991; *87*: 78-88
14. Rank MA, Park MA: Anaphylaxis to piperacillin-tazobactam despite a negative penicillin skin test. *Allergy*. 2007; *62*: 964-965
15. Romano A, Di Fonso M, Viola M, et al: Selective hypersensitivity to piperacillin. *Allergy* 2000; *55*: 787.
16. Sabato V, Verweij MM, Bridts CH, et al: CD300a is expressed on human basophils and seems to inhibit IgE/FcεRI-dependent anaphylactic degranulation. *Cytometry B Clin Cytom* 2012; *82*: 132-138
17. Sanz ML, Gamboa PM; Mayorga C: Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to beta-lactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002; *32*: 277-286
18. Sanz ML, Gamboa PM; Mayorga C, et al: Basophil activation tests in the evaluation of immediate drug hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; *9*: 298-304.
19. Weber-Mani U, Pichler WJ: Anaphylactic shock after intradermal testing with betalactam antibiotics. *Allergy* 2008; *63*: 785