

Paolo Marraccini, Patrizia Pignatti¹, Cosimo Cafforio², Marco Emilio Prini³

Utilizzo del test di attivazione dei basofili (BAT) nella sorveglianza sanitaria di lavoratori esposti a Beta - lattamici e ad intermedi di produzione

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

¹ Laboratorio di Immunologia, Servizio Autonomo di Allergologia e Immunologia Clinica, Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Pavia

² Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Milano

³ Medico Competente

RIASSUNTO. *Introduzione.* Nell'allergia a beta lattamici, dove il meccanismo è IgE-mediato, per la diagnosi si utilizzano test cutanei ed il dosaggio delle IgE specifiche, anche se il gold standard rimane il challenge con la somministrazione orale di dosi terapeutiche. *Obiettivi.* A differenza dei casi di reazione in corso di terapia, nei lavoratori esposti ad antibiotici l'approccio diagnostico rimane più critico, non essendoci un consenso generale sugli indicatori migliori da utilizzare per valutare la natura delle reazioni che i lavoratori possono manifestare. Il test di attivazione basofila (BAT) è un nuovo e promettente esame di laboratorio, che risulta particolarmente utile nel caso non siano eseguibili test in vitro ed in vivo con intermedi del ciclo di produzione. Nel presente articolo è discussa la nostra esperienza di utilizzo del BAT nella sorveglianza sanitaria di lavoratori esposti a beta lattamici e intermedi di produzione (7-ZACA) in una ditta farmaceutica. *Metodi.* Abbiamo valutato 15 dipendenti che sono stati divisi in 3 gruppi: 5 esposti sintomatici (gruppo A), 5 esposti asintomatici (gruppo B) e 5 non esposti (gruppo C). *Risultati.* Il test è risultato positivo in tre soggetti del gruppo A, in un soggetto del gruppo B ed uno del gruppo C, permettendo di evidenziare la natura allergica dei sintomi, la condizione di sensibilizzazione, e discriminando bene tra forme irritative ed allergiche. *Conclusioni.* Semplificando la procedura diagnostica, il BAT è risultato un utile e pratico strumento per la formulazione del giudizio di idoneità lavorativa e le misure di prevenzione e la ricollocazione del lavoratore.

Parole chiave: allergia a farmaci, penicilline, test di attivazione dei basofili, allergia occupazionale.

ABSTRACT. *BASOPHIL ACTIVATION TEST (BAT) AS A NOVEL METHOD FOR MONITORING OCCUPATIONAL EXPOSURE TO BETA - LACTAMS AND INTERMEDIATES OF PRODUCTION.* **Background.** *Cutaneous tests and specific IgE are used in the diagnosis of allergy due to beta - lactams, although drug administration at therapeutic dosage is considered gold standard in drug allergy.* **Objectives.** *The diagnostic approach in symptomatic workers is more critical when they are exposed because of work, unlike reactions to drug in case of therapy. There is not a general consensus about markers in workers occupationally exposed to drugs. Indeed, basophil activation test (BAT) is a new and promising laboratory tool, particularly useful to test intermediate molecules involved in the production. In this article we show our experience on the health surveillance of workers exposed to beta lactams and intermediate molecule (7-ZACA) in a pharmaceutical industry.* **Methods.** *We studied 15 workers divided into 3 groups: 5 exposed and symptomatic (group A), 5 exposed and asymptomatic (group B), 5 non exposed and asymptomatic (group C).* **Results.** *BAT was positive for 7-ZACA in three subjects of group A, and in one subject of group B and one of group C. There was concordance between clinical history, respiratory symptoms, and results of tests. It was possible to determine allergic nature of symptoms and sensitization in a preclinical phase, correctly discriminating symptoms related to irritants from the allergic ones.* **Conclusions.** *BAT, a simple and quick diagnostic procedure if compared to challenge, can be used as a useful and practical tool by occupational doctors for prevention measures, evaluation of ability to a specific job and reallocation of workers.*

Key words: drug allergy, penicillins, BAT, occupational allergy.

Introduzione

Le reazioni avverse ai farmaci (RAF) sono definite dall'OMS come "qualsiasi risposta non desiderata od inattesa ad un farmaco che sopravvenga alle dosi comunemente utilizzate nell'uomo a scopo di profilassi, diagnosi e terapia" (1, 4). In particolare l'allergia alla penicillina è la più comune nella categoria dei beta-lattamici, ed interessa circa l'8% dei pazienti che ricorrono a cure mediche negli USA (6). In Italia, essendo molto diffuso l'uso di amoxicillina, è principalmente tale beta - lattamico responsabile delle manifestazioni allergiche. La reazione può essere correttamente definita allergica quando è dimostrabile un meccanismo immunologico IgE mediato (reazione di tipo I secondo Gell e Coombs) (9). Per la diagnosi si usano test cutanei ed il dosaggio delle IgE specifiche, ma il gold standard rimane sempre il challenge con somministrazione orale di dosi terapeutiche (2). Questo rende sempre molto indagine e complessa la diagnostica, da attuarsi in centri specializzati ed in ambito protetto. A fronte di un problema terapeutico rilevante vi è, comunque, la segnalazione di reazioni a farmaci in lavoratori esposti professionalmente. In letteratura sono riportati non pochi casi, complessivamente 40, di cui 30 legati a penicilline e cefalosporine, ed ulteriori 2 casi da piperacillina e imipenem sono stati descritti nell'ultimo decennio (3, 7, 8). Diversamente dai casi di reazioni avverse in corso di terapia, l'approccio diagnostico in ambito professionale risulta più critico, ed al momento non esiste un consenso generale riguardo gli indicatori migliori da utilizzare per valutare le reazioni (5), tuttavia il test di attivazione dei basofili (BAT) risulta oggi una metodica non invasiva molto promettente che potrebbe essere utile nelle indagini di medicina del lavoro (8). In un recente studio clinico sono state 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) (11). Dunque tale metodica di laboratorio può risultare vantaggiosa, rapida e di utilità clinica nell'approccio al dipendente con problemi di reazione a farmaci durante l'esposizione lavorativa. Nel presente articolo è presentata la nostra esperienza di utilizzo del BAT nella sorveglianza sanitaria di lavoratori esposti a beta lattamici (amoxicillina ed acido clavulanico) ed intermedi di produ-

zione (7-ZACA) in una ditta farmaceutica. Tale prodotto si caratterizza sia per essere un irritante sia come agente sensibilizzante che può dare allergia nei lavoratori esposti.

Materiali e Metodi

Nella fase di produzione degli antibiotici e nella manipolazione degli intermedi di produzione (nel nostro caso il 7-ZACA) spesso si presentano anamnesi e sintomi con criticità nella formulazione del giudizio di idoneità lavorativa, e necessità di definire la collocazione lavorativa nei termini di mantenimento o di cambiamento di mansione. Si è quindi introdotto tale esame non solo come accertamento diagnostico da utilizzare per una pronta risposta ad esigenze di col-

locazione del lavoratore, ma si è cercato anche di saggiare l'utilità del test BAT per l'intermedio di produzione 7-ZACA ed amoxicillina ed acido clavulanico, valutando, oltre ai lavoratori sintomatici (n. 5 soggetti afferenti al gruppo A), per cui era necessaria la formulazione di un giudizio di idoneità, anche altri 10 dipendenti che sono stati divisi in: esposti asintomatici (gruppo B) e non direttamente esposti asintomatici (gruppo C). La sorveglianza sanitaria di questi lavoratori secondo il piano sanitario del medico competente aveva previsto l'effettuazione, in fase preassuntiva, di test allergici cutanei per i comuni inalanti ambientali e del determinante maggiore delle penicilline (PPL), prove di funzionalità respiratoria e test di provocazione bronchiale aspecifico con metacolina (Mchpre), e prove di funzionalità respiratoria e test di provocazione bronchiale aspecifica con metacolina (TPBA) (Tabella I).

Tabella I. Dati clinici relativi ai 3 gruppi (A esposti con sintomi respiratori, B esposti asintomatici e C non esposti) riscontrati all'assunzione: patologie allergiche, test cutanei per inalati ambientali (SPT), test cutanei per il determinante maggiore delle penicilline (PPL), prove di funzionalità respiratoria e test di provocazione bronchiale aspecifico con metacolina (Mchpre). È riportata l'anzianità lavorativa e la ripetizione della metacolina (Mch post) e dei test cutanei (SPT post) dopo l'insorgenza dei sintomi nei lavoratori esposti a 7-ZACA, intermedio reattivo dei Beta lattamici (Gruppo A)

	Patologie allergiche	IgE tot (kU/l)	SPT assunzione	PPL	PFR	Mchpre	Anzianità lavorativa (anni)	Mch post	SPT post	test arresto ripresa
Gruppo A										
Caso n. 1	negativa	115,9	negativo	negativo	negativo	Negativo	4	Negativo	negativo	Positivo
Caso n. 2	rinite stagionale da alberi	10	negativo	negativo	negativo	Negativo	10	Negativo	Alberi	Positivo
Caso n. 3	negativa		negativo			Negativo	14	non eseguibile per ostruzione	negativo	Positivo
Caso n. 4	negativa		negativo		Ai limiti inf. Norma		14	Negativo	negativo	Positivo
Caso n. 5	asma pollini infanzia	1957	derivati dermici animali, acari, graminacee	negativo	negativo	Negativo	9	Negativo	Derivati dermici animali, acari, graminacee	Positivo
Gruppo B										
Caso n. 6	negativa	95	negativo		negativo		13			Negativo
Caso n. 7	negativa	6	negativo	negativo	negativo	Negativo	11			Negativo
Caso n. 8	negativa	10	negativo	negativo	lieve ostruzione	Negativo	9			Negativo
Caso n. 9	negativa	12	negativo		negativo		13			Negativo
Caso n. 10	negativa	36,9	negativo	negativo	lieve restrizione	Negativo	8			Negativo
Gruppo C			negativo							
Caso n. 11	negativa	42	negativo	negativo	negativo	Negativo	5			Negativo
Caso n. 11	rinite stagionale lieve	142	graminacee, parietaria	negativo	negativo		13			Negativo
Caso n. 13	negativa	927	acari, graminacee, alternaria	negativo	negativo	Negativo	4			Negativo
Caso n. 14	negativa	4,5	negativo	negativo	negativo	Negativo	6			Negativo
Caso n. 15	rinite stagionale lieve	22,5	acari, graminacee, alternaria	negativo	negativo	Negativo	1			Negativo

Nel gruppo dei 5 lavoratori esposti (gruppo A) con sintomi respiratori (oculo-rinite, tosse e dispnea), che presentavano un test arresto ripresa positivo, si sono eseguiti nuovamente accertamenti con TPBA, quando eseguibile, e ripetizione delle prove cutanee per i comuni inalanti. Non essendo eseguibile un test cutaneo ed altri test immunologici per l'intermedio 7-ZACA, composto altamente reattivo e quindi scarsamente utilizzabile per test cutanei in vivo e per i test in vitro, è stato messo a punto un test funzionale in vitro (BAT) alle concentrazioni più idonee. Nella nostra casistica la metodica utilizzata consiste nella quantificazione, tramite citometria a flusso, dell'espressione di uno specifico marker di attivazione presente sulla membrana (CD63) dei basofili quando attivati, che può essere identificato e quantificato a partire da una singola cellula utilizzando anticorpi monoclonali specifici marcati con fluorocromi (10). I valori di riferimento della metodica sono espressi in termini di significatività con CD63 > 5% ed indice di stimolazione (IS) > 2 (rapporto tra CD63 espresso in presenza del farmaco e CD63 espresso in presenza di solo tampone). L'analisi statistica è stata condotta tra i gruppi per i valori di amoxicillina e di 7-ZACA mediante test non parametrico di Kruskal Wallis.

Risultati e conclusioni

L'espressione media del CD63 sui basofili incubati con l'intermedio 7-ZACA sono risultati pari a $28,2 \pm 34,2$ nel gruppo A; $4,9 \pm 1,9$ nel gruppo B; $5,2 \pm 1,6$ nel gruppo C. Relativamente all'amoxicillina ed acido clavulanico i valori medi riscontrati sono risultati di $3,3 \pm 0,7$ nel gruppo A, $3,7 \pm 1,2$ nel gruppo B e $3,4 \pm 0,8$ nel gruppo C (Tabella II). Non vi sono differenze statisticamente significative per quanto riguarda i dati relativi all'amoxicillina, mentre per il 7-ZACA statisticamente vi è una differenza significativa, identificando quindi come maggiormente critico il gruppo dei lavoratori esposti con sintomi respiratori ($p < 0,01$). L'idea di introdurre il BAT nella sorveglianza sanitaria nasceva dall'esigenza di indagare la natura allergica della sintomatologia insorta in un lavoratore (soggetto n. 1, Tabella I) assunto nel 2010 come addetto alle analisi di laboratorio e per questo esposto a beta-lattamici (amoxicillina) e 7-ZACA, che riferiva i sintomi respiratori e cutanei essenzialmente nel contatto con l'intermedio di produzione 7-ZACA. Gli esami effettuati in fase pre assuntiva in questo lavoratore

Tabella II. Risultati dell'esecuzione del BAT per 7-ZACA, amoxicillina + acido clavulanico e claritromicina nei tre gruppi (A esposti con sintomi respiratori, B esposti asintomatici e C non esposti). I valori, indicati come positivi o negativi sono espressi sia in termini di espressione percentuale del CD63 sia come Indice di Stimolazione (IS). Nell'ultima tabella sono riportate le conclusioni e le misure adottate

	7-ZACA	CD63	IS	amoxicillina + ac.clav.	CD63	IS	Claritromicina	CD63	IS	Conclusioni/interventi
Gruppo A										
Caso n. 1	Negativo	2,9	1,1	Negativo	2,9	1,1	Negativo	3	3	Forma irritativa. DPI e sempre stesso reparto
Caso n. 2	Positivo	11,5	7,4	Negativo	2,5	1,6	Negativo	3,3	2,1	Allergopatia cambio mansione, rimosso dall'esposizione
Caso n. 3	Positivo	82,4	30,5	Negativo	4,1	1,5	Negativo	4,4	1,6	Allergopatia cambio mansione, rimosso dall'esposizione
Caso n. 4	Negativo	2,7	1	Negativo	4,1	1,5	Negativo	4,5	1,6	Forma irritativa. DPI e sempre stesso reparto
Caso n. 5	Positivo	41,5	14,8	Negativo	2,8	1	Negativo	2,8	1	Allergopatia cambio mansione, rimosso dall'esposizione.
Gruppo B							Negativo			
Caso n. 6	Negativo	2,9	1,5	Positivo	5,3	2,7	Negativo	2,5	1,3	Invariato. Sensibilizzato ad amoxicillina
Caso n. 7	Negativo	4,3	2,4	Negativo	4,4	2,4	Negativo	3,2	1,8	Invariato.
Caso n. 8	Negativo	4,8	1,6	Negativo	2,8	1	Negativo	4	1,4	Invariato.
Caso n. 9	Negativo	4,8	1,6	Negativo	3,7	1,2	Negativo	4	1,3	Invariato.
Caso n. 10	Positivo	8,1	2,9	Negativo	2,3	0,8	Negativo	1,7	0,6	Invariato. Sensibilizzato
Gruppo C							Negativo			
Caso n. 11	Negativo	4,2	1,6	Negativo	3,5	1,3	Negativo	4,1	1,6	Invariato, Amministrativo
Caso n. 11	Negativo	5,6	1,3	Negativo	2,8	0,7	Negativo	3,4	0,8	Invariato Amministrativo
Caso n. 13	Negativo	4,1	2,2	Negativo	2,9	1	Negativo	2,1	1,1	Invariato. Amministrativo
Caso n. 14	Negativo	4,4	1,1	Negativo	4,9	1,5	Negativo	3,1	1	Invariato. Amministrativo
Caso n. 15	Positivo	8	3,3	Negativo	3	1,3	Negativo	3,2	1,3	Invariato. Amministrativo. Possibile pregressa esposizione

erano risultati negativi ad eccezione delle IgE totali che erano poco al di sopra dei valori della norma (115,9 KuA/l). Il lavoratore non presentava sintomi respiratori stagionali o aperiodici. Dopo un anno di lavoro il dipendente riferiva sintomatologia aspecifica delle prime vie aeree per cui veniva sospeso da tale attività con beneficio sui disturbi accusati (test arresto ripresa positivo), sottoposto a test BAT per beta-lattamici e 7-ZACA risultati negativi, e quindi ricollocato come operatore chimico di sintesi senza ricomparsa della sintomatologia. Ai successivi controlli persisteva un quadro di normalità delle PFR. Analogamente il quarto caso della Tabella I ha presentato esami sierologici negativi ed è stato ricollocato identificando la forma come una semplice risposta irritativa all'intermedio 7-ZACA (Tabella II). In questi casi le misure preventive hanno permesso una ricollocazione, avendo escluso una patologia di natura allergica. Gli altri tre casi hanno invece richiesto una ricollocazione presentando persistenza dei sintomi con l'esposizione nonostante le misure di prevenzione adottate, una positività del BAT concordante con il dato clinico ed in un caso anche ostruzione bronchiale persistente (caso n. 3). Per quanto riguarda invece il gruppo B sono emersi due casi di sensibilizzazione ad antibiotici (caso n. 6 per amoxicillina e caso n. 10 per 7-ZACA) (Tabella I e II). I lavoratori sono asintomatici e saranno monitorati nel tempo. Infine il gruppo di controllo di soggetti della stessa ditta ma non esposti direttamente ai composti, ha presentato solo un caso di sensibilizzazione al 7-ZACA (caso n. 15). I dati dello studio sono riportati sinteticamente nelle Tabelle I e II.

Riassumendo, nel gruppo A il BAT è positivo in 3 soggetti su 5 (in questi casi ha permesso la formulazione di una diagnosi con concordanza tra dato clinico e positività del BAT). Negli altri 2 lavoratori sintomatici il BAT è negativo: questi lavoratori sono rimasti addetti alla produzione con rivalutazione delle procedure di lavoro e utilizzo di DPI, che hanno portato a considerare la forma come irritativa. Negli altri 2 gruppi, in particolare nel gruppo B in 1 soggetto e nel gruppo C, sempre in 1 soggetto su 5, il test in vitro è risultato positivo per il 7-ZACA. Un altro dipendente, caso n. 6, invece risulta sensibilizzato ad amoxicillina ed acido clavulanico. La positività del test evidenzia l'avvenuta sensibilizzazione in lavoratori esposti, ma asintomatici, che dovranno essere monitorati nel tempo. In particolare il lavoratore n. 15, atipico, pur rientrando nel gruppo dei non esposti direttamente, può essersi sensibilizzato nello svolgimento di attività di addetto alla sicurezza con accesso ai reparti di produzione. Tali condizioni di sensibilizzazione, in particolare nei soggetti esposti, suggeriscono un più attento monitoraggio, identificando i lavoratori come più suscettibili, indipendentemente dalla pregressa condizione di atopia o di iperreattività bronchiale, che non possono essere assunti come predittivi. La nuova diagnostica, oltre che semplificare enormemente le procedure evitando test cutanei e challenge, per altro non sempre approntabili, ha permesso di discriminare forme meramente irritative da quelle allergiche: per queste ultime si è resa necessaria la ricollocazione.

In conclusione la nostra esperienza suggerisce il possibile uso del test BAT nella sorveglianza sanitaria di lavoratori esposti a beta-lattamici ed in particolare per gli intermedi di produzione (7-ZACA) al fine di indagare l'eventuale natura allergica della sintomatologia. L'esecuzione nell'indagine di un altro antibiotico, la claritromicina, non in produzione e appartenente alla classe dei macrolidi, è da intendersi quale controllo negativo a conferma della validità del test. La negatività riscontrata conferma, oltre alla non esposizione, l'assenza di reazioni avverse a macrolidi in corso di terapie farmacologiche. La metodica sembra permettere di individuare sia una condizione di sensibilizzazione, sia quei casi per i quali è ingiustificata la limitazione dell'impiego del lavoratore nel reparto di produzione, fornendo altresì indicazioni più precise anche sull'uso degli antibiotici da parte degli stessi lavoratori a scopi terapeutici. In conclusione, a fronte di difficoltà nella gestione di lavoratori esposti a sostanze sensibilizzanti ed allergeniche, l'utilizzo di una metodica immediata e con una buona sensibilità e specificità, come desunto dalla letteratura (11), fa sì che il medico competente possa rapidamente effettuare una valutazione dei casi riducendo da una parte i costi degli accertamenti diagnostici, non sempre praticabili ed agevoli, e dall'altra monitorare in modo ottimale la popolazione lavorativa identificando i lavoratori sensibilizzati che richiedono un controllo sanitario più attento e con differente periodicità.

Bibliografia

- 1) Anca M, Chiriac, Demoly P. Drug Allergy Diagnosis. *Immunol Allergy Clin N Am* 2014; 34: 461-471.
- 2) Bousquet PJ, Pipet A, Bousquet-Rouanet L, et al. Oral challenges are needed in the diagnosis of β -lactam hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 185-190.
- 3) Díaz Angulo S, Szram J, Welch J, et al. Occupational Asthma in Antibiotic Manufacturing Workers: Case Reports and Systematic Review. *Journal of Allergy*, vol. 2011, Article ID 365683, 9 pages, 2011. doi: 10.1155/2011/365683.
- 4) Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* 2000; 356: 1255-1259.
- 5) Lorenz I, Schneider EM, Stolz P, et al. Sensitive flowcytometric method to test basophil activation influenced by homeopathic histamine dilutions. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2003; 10: 316-324
- 6) Macy E. Penicillin and Beta-Lactam Allergy: Epidemiology and Diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014; 14: 476.
- 7) Marraccini P, Salimbeni R, Lodola L, et al. Occupational rhinitis and bronchospastic reaction in a worker exposed to imipenem. *J of Occup Health* 2000; 42: 338-340.
- 8) Marraccini P, Digiesi G, Pignatti P, et al. Utilizzo del test di attivazione dei basofili (BAT) per la diagnosi di reazione allergica a piperacillina in ambito professionale: descrizione di un caso clinico. *Med Lav* 2013; 104 (6): 434-439.
- 9) Romano A, Warrington R. Antibiotic Allergy. *Immunol Allergy Clin N Am* 2014; 34: 489-506.
- 10) 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.
- 11) Sanz ML, Gamboa PM, Mayorga C. Basophilactivationtests in the evaluation of immediate drug hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9(4): 298-304.