

Ocena ekspresji CD203c na powierzchni aktywowanych bazofilów w diagnostyce wybranych schorzeń alergicznych

Evaluation of expression of CD203c on the activated basophil surface in diagnosis of selected allergic disorders

dr n. med. Grzegorz Gogolewski, prof. nadzw. dr hab. n. med. Wojciech Mędrała
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i Alergologii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bernard Panaszek

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008–2009 jako projekt badawczy

Streszczenie: Wstęp: W związku z narastaniem występowania chorób o podłożu alergicznym niezwykle istotna staje się właściwa diagnostyka tych schorzeń. Obecnie stosowane metody wydają się w niektórych przypadkach niewystarczające, wiążą się z wieloma ograniczeniami, a niekiedy nie mogą być wykonywane ze względu na niemożność spełnienia warunków koniecznych do ich przeprowadzenia. Niekiedy wiążą się z wysokim ryzykiem wystąpienia groźnej dla życia reakcji anafilaktycznej.

Cel pracy: Celem pracy jest ocena przydatności ekspresji cząstki CD203c w diagnostyce alergii na wybrane aeroalergeny: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* i pyłek tymotki łąkowej, oraz zestawienie uzyskanych wyników z wynikiem IgE całkowitego oraz alergenowo swoistego.

Materiał i metody: Badanie przeprowadzono na grupie 40 osób chorych oraz grupie 29 osób zdrowych. W badanych populacjach wykonywano punktowe testy skórne z aeroalergenami, oznaczano stężenia IgE całkowitego, alergenowo swoistych oraz dokonywano pomiaru ekspresji cząstki CD203c przy użyciu cytometrii przepływowej z wykorzystaniem koktajlu przeciwciał (anty-CD3, anty-CRTH2, anty-CD203c) oraz jednego przeciwciała (anty-CD203c).

Wyniki: Czułość metody cytometrycznej była zróżnicowana i wynosiła w zależności od alergenu od 43,5% dla alergenu *Dermatophagoides pteronyssinus* do 72,4% dla alergenu pyłku tymotki łąkowej. Zestawienie testu cytometrycznego z wynikiem IgE alergenowo swoistego zwiększyło czułość oznaczeń do 78,3% dla alergenu *Dermatophagoides pteronyssinus* oraz do 89,7% dla alergenu pyłku tymotki łąkowej. W oznaczeniach tych swoistość metody cytometrycznej była stuprocentowa.

Wnioski: Oznaczanie ekspresji cząstki CD203c jest przydatne w diagnostyce alergii inhalacyjnej, zwłaszcza u osób, u których inne metody diagnostyczne są niemiarodajne lub obciążone wysokim ryzykiem działań niepożądanych.

Abstract: Introduction: Increased incidence of the allergic-related diseases shows the significance of proper diagnosis. The methods being employed nowadays seem to be ineffective in some cases and considerably restricted. These procedures happen not to be practiced because they either do not comply with the requirements or there is danger of high risk life threatening anaphylactic reaction.

Objective: The aim of this research is estimate of expression CD203c in diagnosis of allergy to selected allergens: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, Timothy pollen and comparison these results with total and specific IgE tests.

Material and methods: The studies was carried out in a group 40 patients and in 29 healthy control. Skin prick test was performed with aeroallergens and total and specific IgE concentration was measured. To analyse basophils marked with the one anty-CD203c or cocktail of three antibodies (anty-CRTH2, anty-CD3 and anty-CD203c) the cytometric method has been used in this research.

Results: Sensitivity of cytometric method was differentiated and depended on allergen (from 43.5% for *Dermatophagoides pteronyssinus* to 72.4% for Timothy pollen). Joined specific IgE with the cytometric method achieved findings enabled to increase the sensitivity to 78.3% for *Dermatophagoides pteronyssinus* and to 89.7% for Timothy pollen. In these assays specificity of cytometric method increases up to 100%.

Conclusions: Evaluation of CD203c expression is useful in aeroallergens allergy testing especially at person for whom another diagnostic methods do not comply with the requirements or there is danger of high risk life threatening anaphylactic reaction.

Słowa kluczowe: alergia, bazofil, cytometria przepływową, CD203c

Key words: allergy, basophil, flow cytometry, CD203c

Wstęp

Złotym standardem w identyfikacji aeroalergenów odpowiedzialnych za wystąpienie alergii są testy skórne [1, 2]. Jednak w niektórych przypadkach przeprowadzenie diagnostyki in vivo nie jest możliwe do wykonania. Okoliczności te są powodem poszukiwania miarodajnej metody diagnostyki in vitro. Oznaczenie IgE alergenowo swoistego znajduje zastosowanie w diagnostyce alergii od wielu lat, jednak pełni funkcję badania pomocniczego [2].

Nadzieję na opracowanie miarodajnych sposobów przyniosły wyniki prac wykorzystujących cytometrię przepływową [3]. W metodzie tej dzięki użyciu rozmaitych przeciwciał można identyfikować poszczególne komórki biorące udział w reakcjach alergicznych, w tym także bazofile [4, 5]. Testy te zwane są *testami aktywacji bazofila* (BAT) [6–9]. Jednym ze stosowanych markerów aktywacji bazofila jest CD203c, jednak ocena jego przydatności diagnostycznej była przedmiotem niewielu publikacji [10]. Marker ten występuje na bazoofilach spoczynkowych i znacznie wzrasta zarówno po stymulacji IgE-zależnej, jak i po stymulacji IgE-niezależnej [11, 12].

Cel pracy

W pracy poddano ocenie wartość diagnostyczną ekspresji cząstki CD203c na powierzchni bazoofilów stymulowanych swoistym alergenem u osób z objawami chorób alergicznych górnych dróg oddechowych na tle uczulenia na roztocza (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*) i/lub pyłek tymotki łąkowej oraz zestawiono ją z wywiadem, wynikiem testów skórnych, stężeniem IgE całkowitego oraz IgE alergenowo swoistego. Ocenę ekspresji CD203c przeprowadzono z użyciem koktajlu przeciwciał (anty-CRTH2, anty-CD3, anty-CD203c) i porównano z metodą bazującą na zastosowaniu pojedynczego przeciwciała (anty-CD203c).

Materiał i metody

Grupa osób chorych (I)

W badaniu uczestniczyło 40 osób w wieku 18–46 lat z objawami alergicznego, całorocznego lub sezonowego, nieżytu nosa i/lub astmy alergicznej na tle uczulenia na roztocza *Dermatophagoides pteronyssinus* i/lub *Dermatophagoides farinae*, i/lub pyłek tymotki łąkowej. Badane osoby miały dodatni wywiad w kierunku uczulenia na badane alergeny oraz dodatni wynik testu skórniego (Allergopharma® Joachim Ganzer KG, Reinbek, Niemcy).

Grupa kontrolna (II)

Grupę tę stanowiło 29 osób w wieku 21–55 lat bez objawów klinicznych choroby atopowej oraz z ujemnymi wynikami testów skórnych na powszechnie występujące aeroalergeny (II).

Testy skórne

Testy skórne typu *prick* wykonywano według obowiązujących zaleceń, z powszechnie występującymi alergenami wziewnymi, wśród których były alergeny *Dermatophagoides pteronyssinus* (D1), *Dermatophagoides farinae* (D2) oraz pyłku tymotki łąkowej (G6).

Oznaczanie stężenia IgE całkowitego oraz IgE alergenowo swoistego

Do oznaczania IgE całkowitego oraz alergenowo swoistego przeciwko alergenom D1, D2 oraz G6 wykorzystano odczynniki oraz zautomatyzowaną aparaturę firmy Phadia (UniCAP100), a badania przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

Ocena ekspresji cząstki CD203c

Oznaczenie przeprowadzono według opracowanych wcześniej procedur [13, 14]. Od osoby badanej pobierano krew z żyły łokciowej do pro-

bówki z heparyną litową (Saerstedt AG & Co., Nümbrecht, Niemcy), a następnie delikatnie wymieszano. Stymulację komórek przeprowadzono natychmiast po pobraniu krwi w probówkach do cytometru przepływowego (Becton Dickinson Falcon®, San Diego, USA). U każdego badanego wykonano test, wykorzystując następujący szereg próbek: próba niestymulowana (*patient background* – Pb), kontrola pozytywna z 0,5 µl anty-FcεRI (Pc1) (BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Szwajcaria), oraz alergeny D1, D2 oraz G6 w stężeniach końcowych 10 ng/ml i 1 ng/ml (Allergopharma Joachim Ganzer KG, Reinbek, Niemcy).

Stymulacja komórek oraz barwienie

Do probówek dodano po 50 µl odpowiednich odczynników: do próbki Pb – RPMI-1640, do Pc1 – RPMI-1640 z anty-FcεRI, do próbek z alergenami – odpowiednie stężenia alergenów rozpuszczonych w medium RPMI-1640. W kolejnym etapie do tak przygotowanego szeregu próbek dodano po 100 µl krwi pełnej oraz delikatnie mieszano. Następnie próbki inkubowano w atmosferze wzbogaconej w 5% CO₂, w temperaturze 37°C przez 15 minut.

Reakcję przerwano, dodając po 10 µl wersenianu dwusodowego (EDTA) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), po czym próbki odwirowano, usunięto supernatant oraz dodano po 100 µl PBS (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław, Polska) z 1-proc. albuminą bydlęcą (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Do tak przygotowanych próbek dodano po 10 µl przeciwciał: anty-CD203c (IMMUNOTECH S.A.S., Marsylia, Francja), anty-CRTH2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA), anty-CD3 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) oraz inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Liza komórek oraz pomiar cytometryczny

Do próbek dodano po 2 mililitry płynu do lizy komórek (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) i po 10-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej próbki odwirowano w celu usunięcia supernatantu. W kolejnym etapie do każdej z nich dodano po 3 mililitry PBS i ponownie wirowano. Komórki utrwalono przez dodanie po 200 µl PBS z 1,5% paraformaldehydu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Przy użyciu cytometru przepływowego FACScan (Becton Dickinson, San Diego, USA) z badanej próbki zbierano po 100 tys. komórek.

Analizę zgromadzonych danych wykonano przy użyciu oprogramowania CellQuest (Becton Dic-

kinson), zgodnie z zaleceniami producenta. Przeprowadzono ją dwiema metodami. W pierwszej z nich bramkowano komórki o wysokiej ekspresji CRTH2 oraz niskiej ziarnistości (SSC^{low}). W kolejnym etapie z zabramkowanej puli wyodrębniono komórki różniące się ekspresją cząstki CD3. Populacja bazofilów cechowała się wysoką ekspresją CRTH2, przy niskiej ekspresji antygeny CD3. Wśród komórek o niskiej ekspresji CD3 wyróżniono dwie subpopulacje różniące się stopniem ekspresji CD203c. Komórki o niskiej ekspresji CD203c były to bazofile nieaktywne, a o wysokiej ekspresji – komórki aktywne.

W kolejnym sposobie analizy zliczano procent bazofilów aktywnych w stosunku do całkowitej puli bramkowanych bazofilów. Wyniki zaprezentowano w procentach jako różnicę między odsetkiem aktywnych komórek w próbie stymulowanej i w próbie niestymulowanej.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy wykorzystaniu programu statystycznego „Statistica 8.0 PL” (StatSoft Kraków, Polska). Obliczano mediany, minima oraz maksima. Rozkład zmiennych sprawdzano, stosując test W-Shapiro-Wilka. W związku z brakiem rozkładu normalnego w analizach wykorzystywano nieparametryczny test ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Do porównania dwóch prób zależnych użyto nieparametrycznego testu kolejności par Wilcoxon. Do porównania metod diagnostycznych wykorzystano nieparametryczny test Chi-kwadrat McNemary. Za wartość statystycznie istotną przyjęto $p < 0,05$. Czułość i swoistość testów opracowano metodą Receiver Operating Curves analysis (ROC) [15].

Wyniki

Testy skórne

Test skórny z alergenami u pacjentów uczulonych był pozytywny u wszystkich. Wszystkie osoby z grupy II cechowały się ujemnym wynikiem testu skórniego z badanymi alergenami.

IgE całkowite

W grupie osób chorych stężenie IgE całkowitego wahało się w zakresie od 20,4 kU/l do 2417 kU/l (Me=87,45 kU/l) i było podwyższone u 45%. W grupie II wartości stężenia kształtowały się od 2,37 kU/l do 90,3 kU/l (Me=27,2 kU/l) i w żadnym przypadku nie przekraczały punktu odcięcia dla wyniku prawidłowego. Zaobserwowano statystycznie istotnie wyższe stężenia IgE całkowitego w grupie I niż w grupie II ($p < 0,05$).

IgE alergenowo swoiste

Tabela 1. Czulość i swoistość oznaczenia IgE alergenowo swoistego dla poszczególnych alergenów.

	Oznaczenie alergenu		
	D1	D2	G6
Czulość metody	77,78%	82,61%	86,21%
Swoistość metody	100%	100%	89,66%

Ekspresja cząstki CD203c

Liczba bazoofilów w próbie niestymulowanej. W badanej populacji (n=79) w analizie z wykorzystaniem koktajlu przeciwciał uzyskano od 142 do 1450 komórek (Me=567 komórek) oraz od 94 do 1434 komórek (Me=522 komórki) w analizie z wykorzystaniem jednego przeciwciała.

Wyniki kontroli dodatniej

U wszystkich badanych osób po stymulacji anty-FcεRI (Pc1) uzyskano wzrost aktywności bazoofilów powyżej punktu odcięcia dla wyniku dodatniego.

Ekspresja cząstki CD203c po stymulacji alergenowej

Punkt odcięcia dla wyniku dodatniego określano na podstawie krzywych ROC. W grupie osób chorych stwierdzono istotny statystycznie wzrost ekspresji cząstki CD203c po stymulacji alergenowej ($p < 0,05$). W grupie osób zdrowych różnica między ekspresją cząstki CD203c przed stymulacją alergenową a ekspresją po stymulacji była nieistotna statystycznie. Dane przedstawiono w tabeli 2 i na rycinie 1.

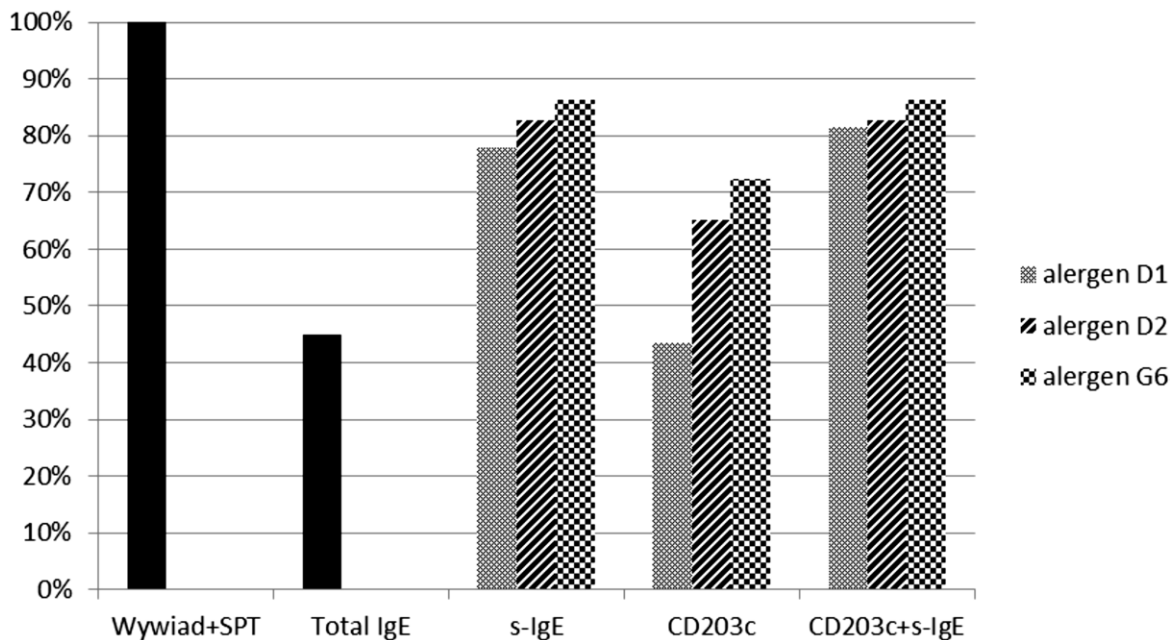
Omówienie

Metodą umożliwiającą identyfikację alergenu odpowiedzialnego za objawy schorzenia o podłożu atopowym jest oznaczanie IgE alergenowo swoistego. Niższą czulość w porównaniu z testem skórnym potwierdzono w niniejszym opracowaniu, w którym czulość oznaczania IgE alergenowo swoistego wahała się od 77,8% przeciwko alergenowi D1 do 86,21% przeciwko alergenowi G6. Ponadto obecność swoistych przeciwciał przeciwko alergenowi pyłku tymotki łąkowej stwierdzono u ponad 10% osób zdrowych.

Tabela 2. Czulość i swoistość poszczególnych oznaczeń w zależności od liczby użytych przeciwciał oraz alergenów.

Alergen	Alergenowo swoiste anty-IgE		Metoda wykorzystująca koktajl 3 przeciwciał (anty-CRTH2, CD3 i CD203c)		Metoda wykorzystująca koktajl 3 przeciwciał (anty-CRTH2, CD3 i CD203c) oraz alergenowo swoiste anty-IgE		Metoda wykorzystująca jedno przeciwciało (anty-CD203c)		Metoda wykorzystująca jedno przeciwciało (anty-CD203c) oraz alergenowo swoiste anty-IgE	
	Czulość	Swoistość	Czulość	Swoistość	Czulość	Swoistość	Czulość	Swoistość	Czulość	Swoistość
Alergen D1 10 ng/ml	77,8	100	40,7	100	81,5	100	40,7	100	81,5	100
Alergen D1 1 ng/ml		100	43,5	100	78,3	100	43,5	100	78,3	100
Alergen D2 10 ng/ml	82,6	100	65,2	100	87,0	100	65,2	100	87,0	100
Alergen D2 1 ng/ml		100	63,2	100	84,2	100	57,9	100	78,9	100
Alergen G6 10 ng/ml	89,3	89,7	72,4	100	86,2	89,7	72,4	100	89,7	89,7
Alergen G6 1 ng/ml		85,7	25,0	100	89,3	85,7	53,6	100	89,3	85,7

Rycina 1. Zestawienie czułości oznaczeń w zależności od metody oraz alergenu.



Metody cytometryczne stały się nową nadzieją na skuteczną diagnostykę in vitro, pozbawioną ryzyka oraz cechującą się dużą czułością oraz swoistością [14].

Grupy naukowców starały się wykorzystywać markery takie jak CD203c oraz porównać metody z zastosowaniem CD63 i CD203c [16–18]. Ocmant i wsp. przeprowadzali doświadczenia, porównując ekspresję CD203c i CD63 u chorych uczulonych na sierść kota. W badaniach zaobserwowali, iż u połowy badanych osób ekspresja CD203c na bazofilach spoczynkowych była słabo wyrażona i ich selekcja sprawiała trudności. Wzrost ekspresji CD203c po stymulacji alergenem był mniej wyraźny niż cząstki CD63 [19]. Atutem markera CD203c była jednak większa swoistość dla badanej komórki [20]. Czułość metody zarówno z użyciem jednego, jak i drugiego markera była stuprocentowa, a swoistość wynosiła 95% [14].

Zgodnie z poprzednimi pracami stwierdzono, iż w próbie niestymulowanej ekspresja cząstki CD203c jest niska, a znacząco wzrasta po stymulacji nieswoistej (anty-FcεRI). W przypadku użycia przeciwciała anty-FcεRI u wszystkich osób uzyskano statystycznie istotny wzrost ekspresji CD203c [16, 21].

Po stymulacji bazofila alergenami D1, D2 oraz G6 jedynie u osób uczulonych na dany alergen dochodzi do aktywacji bazofila, jej efektem jest wzrost ekspresji cząstki CD203c.

Zestawiwszy wyniki IgE alergenowo swoistego i metod cytometrycznych, stwierdzono, iż metody cytometryczne cechują się identyczną lub niższą czułością

niż IgE alergenowo swoiste. Maksymalna czułość metody cytometrycznej dla alergenu G6 wynosiła 72,4% w porównaniu z 86,2% dla IgE alergenowo swoistego. Podobnie przedstawiały się wyniki dla pozostałych alergenów: dla alergenu D1 (43,5% v. 77,8%), dla alergenu D2 (65,2% v. 82,6%). Różnice między czułością metody cytometrycznej z wykorzystaniem jednego przeciwciała a czułością metody z wykorzystaniem trzech przeciwciał były statystycznie nieistotne, z wyjątkiem alergenu G6 w niższym stężeniu. W tym przypadku dowiedziono statystycznie istotnej przewagi metody z wykorzystaniem jednego przeciwciała. Poza alergenem D1 czułość metody cytometrycznej była wyższa dla wyższych stężeń alergenów.

Swoistość obu metod (cytometrycznej oraz s-IgE) dla D1 i D2 w obu stężeniach była 100-proc. W przypadku alergenu G6 swoistość metody cytometrycznej była wyższa niż s-IgE (100% v. 89,7%).

Łączne zastosowanie obu metod (cytometrycznej oraz s-IgE) cechowało się wyższą czułością niż każda z metod zastosowana oddzielnie w przypadku alergenów D1 i D2, a identyczną czułością i swoistością jak oznaczenie IgE alergenowo swoistego dla alergenu G6. Czułość zestawienia obu metod wynosiła maksymalnie 81,5% dla alergenu D1 oraz 87% dla alergenu D2.

Podsumowując – analiza wykazała, iż najlepszym sposobem interpretacji wyników jest w kolejności: zebranie wywiadu oraz wykonanie badania IgE alergenowo swoistego. U pacjentów z dodatnim wywiadem, a ujemnym oznaczeniem IgE alergenowo

swoistego dodanie testu cytometrycznego pozwoliło na podwyższenie czułości oznaczeń, przy zachowaniu stuprocentowej swoistości. I tak: u pacjentów uczulonych na alergeny D1 i D2 z ujemnym oznaczeniem IgE alergenowo swoistego dodanie testu z wykorzystaniem trzech przeciwciał spowodowało wzrost czułości testu z 77,8% do wartości 81,5% dla alergenu D1 oraz z 82,6% do 87% dla alergenu D2. Dodanie oznaczenia dla alergenu G6 nie zmieniło czułości testu. W przypadku dodania u pacjentów uczulonych na którykolwiek z alergenów testu cytometrycznego z zastosowaniem jednego przeciwciała spowodowało ono wzrost czułości wynoszący odpowiednio: dla D1 z 77,8% do 81,5%, dla D2 z 82,6% do 87%, dla G6 z 89,3% do 89,7%.

Wnioski

Całokształt przeanalizowanych badań wskazuje na umiarkowaną czułość metody cytometrycznej w diagnostyce alergii na aeroalergeny. Jednakże łączne zastosowanie metody cytometrycznej z metodą oznaczenia IgE alergenowo swoistego pozwala na zwiększenie czułości oznaczeń, a przez to wyodrębnienie grupy pacjentów z objawami klinicznymi choroby alergicznej, u których nie można wykonać testów skórnych, a metoda oznaczenia IgE alergenowo swoistego jest niewystarczająca. Bühring i wsp. w swoich badaniach opisali brak korelacji między wynikiem testu skórniego i IgE alergenowo swoistego przeciwko danemu alergenowi a wzrostem ekspresji CD203c w teście cytometrycznym. Test ten nie zawsze jest dodatni mimo ewidentnego rozpoznania choroby alergicznej, a w niektórych przypadkach jego wynik jest niejednoznaczny. Mniejsza czułość oznaczeń IgE alergenowo swoistych oraz metod cytometrycznych w porównaniu z testami skórnymi wskazuje na niemożność ich zastąpienia.

Piśmiennictwo:

- Douglass J., O'Hehir R.: *Diagnosis, treatment and prevention of allergic disease: the basics*. *Med. J. Aust.* 2006, 185: 228-233.
- Bernstein I., Li J., Bernstein D. et al.: *Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter*. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2008, 100(Suppl. 3): 1-148.
- Ebo D., Hagendorens M., Bridts C. et al.: *Hymenoptera venom allergy: taking the sting out of difficult cases*. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2007, 17: 357-360.
- Ebo D., Sainte-Laudy J., Bridts C. et al.: *Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives*. *Allergy* 2006, 61: 1028-1039.
- Sanz M., Sánchez G., Gamboa P. et al.: *Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus and Lolium perenne*. *Clin. Exp. Allergy.* 2001, 31: 1007-1013.
- Erdmann S., Sachs B., Kwieciën R. et al.: *The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy*. *Allergy* 2004, 59: 1102-1109.
- Saporta M., Kamei S., Persi L. et al.: *Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens*. *Allergy* 2001, 56: 442-445.
- Drug Hypersensitivity*. Pichler W. (red.). Karger; Basel 2007.
- Erdmann S., Heussen N., Moll-Slodowy S. et al.: *CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity*. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33: 607-614.
- Monneret G., Boumiza R., Gravel S. et al.: *Effects of prostaglandin D(2) and 5-lipoxygenase products on the expression of CD203c and CD11b by basophils*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 312(2): 627-634.
- Hauswirth A., Natter S., Ghannadan M. et al.: *Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002, 110: 102-109.
- Saito H., Tsukidate T., Nakajima T. et al.: *Gene expression profiles of human mast cells and basophils*. *Clin. Exp. Allergy* 2006; 6: 85-90.
- Kahlert H., Cromwell O., Fiebig H.: *Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c*. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33: 1266-1272.
- Boumiza R., Debard A., Monneret G.: *The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives*. *Clin. Mol. Allergy* 2005, 30: 3-9.
- González-Muñoz M., Villota J., Moneo I.: *Analysis of basophil activation by flow cytometry in pediatric house dust mite allergy*. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2008, 19: 342-347.
- Hennersdorf F., Florian S., Jakob A. et al.: *Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation*. *Cell. Res.* 2005, 15: 325-335.
- Ebo D., Lechkar B., Schuerwegh A. et al.: *Validation of a two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy*. *Allergy* 2002, 57: 706-712.
- Bühring H., Streble A., Valent P.: *The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2004, 133(4): 317-329.

19. Ocmant A., Peignois Y., Mulier S. et al.: Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J. Immunol. Methods* 2007, 320: 40-48.
20. Kleine-Tebbe J., Erdmann S., Knol E. et al.: Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2006, 141: 79-90.
21. Yasnowsky K., Dreskin S., Efav B. et al.: Chronic urticaria sera increase basophil CD203c expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117: 1430-1434.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Grzegorz Gogolewski

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i Alergologii

Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

50-417 Wrocław, ul. Traugutta 57/59

tel.: (71) 733-24-16

e-mail: grzegorz_g@tlen.pl