

**Olga Potapińska, Urszula Demkow, Maria Wąsik**

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
 Kierownik: prof. dr hab. med. M. Wąsik

## Cytometryczna ocena aktywacji bazofilów w diagnostyce chorób alergicznych

Flow cytometric basophils activation test as a method of allergy diagnosis

### Abstract

For several years the incidences of allergic diseases and anaphylactic reactions have been increasing dramatically. Classical method of allergy diagnosis — skin prick test in some situations can provoke life-threatening reactions. Detection of allergen-induced basophil activation by flow cytometry has been shown to be a useful tool for allergy diagnosis in those patients. CD 63 and CD203c have recently been demonstrated as a specific activation markers of basophils that are rapidly up-regulated after allergen challenge in sensitized patients. Although flow-cytometry methods are quite sophisticated and expensive, it could be a good alternative in patients at risk of severe anaphylactic reactions or with contradictory test results.

**Key words:** flow cytometry, basophils, CD63, CD203c, allergy

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 152–158**

### Streszczenie

W ciągu ostatnich lat znacznie wzrosła zapadalność na choroby alergiczne. „Złotym standardem” w diagnostyce tych chorób są testy skórne, jednak podczas ich wykonywania zdarzają się przypadki zagrażających życiu odczynów anafilaktycznych. W niektórych więc sytuacjach alternatywą dla badań tradycyjnych są metody diagnostyki alergii *in vitro*, w tym cytometria przepływową. U osoby z atopią po kontakcie z alergenem dochodzi do aktywacji bazofilów i wzrostu ekspresji na ich powierzchni antygenów CD63 i CD203c. Markery te można oznaczać metodą cytometrii przepływową za pomocą skierowanych przeciwko nim przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z fluorochromami po stymulacji *in vitro* komórek krwi obwodowej. Choć metoda ta jest kosztowna i wymaga użycia specjalistycznego sprzętu, to jest jednak dobrym narzędziem diagnostycznym w przypadku tych chorych, u których wykonanie testów skórnych wiąże się z dużym ryzykiem wystąpienia powikłań.

**Słowa kluczowe:** cytometria przepływową, bazofile, CD63, CD203c, alergia

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 152–158**

W ciągu ostatnich kilkunastu lat częstość występowania reakcji alergicznych i ich najgroźniejszych form — reakcji anafilaktycznych znacząco wzrosła. Tendencję tę zaobserwowano zarówno w populacji Europy Zachodniej, jak i Ameryki Północnej oraz Australii [1]. Szacuje się, że około 20–30% populacji krajów rozwiniętych cierpi z powodu reakcji IgE-zależnych w odpowiedzi na po-

wszechnie alergeny. Choroby wywoływane przez te reakcje to astma, katar sienny, alergiczne zapalenie spojówek i atopowe zapalenie skóry [2]. Reakcja anafilaktyczna polega na natychmiastowej IgE-zależnej odpowiedzi na alergen. Połączenie się IgE z receptorem FcεRI (receptor o wysokim powinowactwie dla immunoglobuliny E) na powierzchni bazofila lub mastocyta i związanie krzyżowe aler-

**Adres do korespondencji:** mgr Olga Potapińska, ul. Marszałkowska 24, 00–576 Warszawa, tel./faks: (022) 629 65 17, e-mail: olga.potapinska@wum.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 26.06.2008 r.  
 Copyright © 2009 Via Medica  
 ISSN 0867–7077

geny przez fragmenty Fab tych przeciwciał prowadzi do degranulacji komórek i uwolnienia z ich ziarnistości mediatorów reakcji alergicznej, takich jak histamina, sulfidoleukotrieny (LTs) i liczne cytokiny [1, 2]. Uwalniane czynniki mogą wywoływać reakcje anafilaktyczne prowadzące do wstrząsu. Do alergenów, które najczęściej je wywołują, należą między innymi: jad owadów błonkoskrzydłych (pszczoły, osy, szerszenie), orzechy, ryby, leki i lateks [1]. Kliniczne reakcje wywołane przez jad owadów błonkoskrzydłych są przyczyną śmierci 0,09–0,45 osób na milion ogólnej światowej populacji. Znacznie częściej po użądleniach obserwuje się reakcje miejscowe (2–19% populacji) lub systemowe (0,8–3,9%) [3].

Liczne badania pozwoliły ustalić strukturę wielu alergenów. Przeważnie są one glikoproteinami. Wiele z nich zostało opisanych, sklonowanych i wyprodukowanych w rekombinowanej formie. Takie rekombinowane alergeny mogą być wykorzystane w diagnostyce alergii. Zaobserwowano, że siła reakcji zależy od stanu glikozylacji alergenu i jego struktury, dlatego podjęto próby analizy reakcji IgE-zależnych na konkretne alergeny w określonych typach alergii [2].

Diagnostyka alergii jest głównie oparta na wywiadzie klinicznym (powiązanie objawów z bodźcem je wywołującym), pozytywnym wyniku testów skórnych, które ciągle stanowią „złoty standard”, oraz wykrywaniu swoistych IgE w surowicy pacjenta. U większości pacjentów te badania pozwalają wykryć czynnik uczulający, jednak w nielicznych przypadkach niezbędne są dodatkowe czynnościowe badania *in vitro* [1, 4].

Wykonanie testów skórnych czy prowokacji donosowej nie zawsze jest możliwe, gdyż w niektórych przypadkach może wywoływać niebezpieczną dla życia reakcję anafilaktyczną. Dlatego poszukuje się testów *in vitro*, wiarygodnie potwierdzających diagnozę alergii [5].

### **Bazofile i mastocyty — komórki odpowiedzialne za objawy alergii**

Komórki odpowiedzialne za reakcje alergiczne to bazofile i mastocyty. Ponieważ mastocyty występują w tkankach, ich analiza jest trudna. Bazofile znajdujące się we krwi obwodowej są głównymi komórkami efektorowymi w reakcjach alergicznych, które można badać *in vitro* [6]. Granulocyty zasadochłonne (bazofile) wywodzą się ze szpikowej linii mieloidalnej, a ich pierwotnymi prekursorami są komórki CD34+. We krwi obwodowej bazofile stanowią 0,2–1% granulocytów. Na ich powierzchni występuje receptor FcεRI, które-

go pobudzenie jest głównym sposobem aktywacji tych komórek [7]. Podjednostka  $\alpha$  tego receptora wiąże wolne IgE, podczas gdy łańcuchy  $\beta$  i  $\gamma$  są zaangażowane w przekazywanie sygnałów do komórki dzięki domenom aktywacyjnym z kinazą tyrozynową [8].

„Mostkowanie” FcεRI wywołane związaniem alergenu przez IgE powierzchniowe powoduje degranulację bazofilów i uwolnienie z ziarnistości takich mediatorów, jak: histamina, cysteinylowe leukotrieny C4 (LTC4), LTD4, LTE4 i cytokiny, w tym głównie IL-4 i IL-13 [7].

Badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazały, że aktywacja bazofilów może przebiegać dwiema drogami: degranulacją anafilaktyczną, charakteryzującą się szybkimi morfologicznymi zmianami, egzocytozą wewnątrzkomórkowych ziarnistości i uwalnianiem mediatorów reakcji, oraz degranulacją stopniową — charakteryzującą się niewielkimi zmianami morfologicznymi bez egzocytoty ziarnistości [9].

Na początku lat 90. udoskonalono technikę izolacji i oczyszczania bazofilów z krwi obwodowej. Opierała się ona na immunomagnetycznym rozdzielaniu leukocytów za pomocą opiłków żelaza opłaszczonych przeciwciałami przeciwko antygenom występującym na powierzchni bazofilów. Opracowano również testy, które pozwoliły na oznaczanie stężeń mediatorów wydzielanych przez bazofile podczas degranulacji, na przykład *Enzyme Linked Immunosorbent Assay Test* (ELISA) do oceny stężeń histaminy i cytokin [7].

Podobnie jak w przypadku mastocytów, aktywacja bazofilów może być mierzona stopniem zmian morfologicznych lub pomiarem stężeń substancji przez nie uwolnionych [10].

### **Testy *in vitro***

Zasada testów czynnościowych *in vitro* polega na ocenie zmian stężeń mediatorów reakcji alergicznych uwalnianych z ziarnistości bazofilów pod wpływem swoistych alergenów wywołujących degranulację. Pierwszym tego typu testem był test uwalniania histaminy (HRT, *histamine release test*), jednak jego czułość i swoistość jest niezadowalająca [6].

Test uwalniania histaminy daje pośredni obraz degranulacji bazofilów opłaszczonych swoistymi IgE w odpowiedzi na alergen. Uwalnianie histaminy indukowane alergenem jest reakcją zależną od dawki alergenu. Wydzielanie histaminy zachodzi w 37°C i tylko w obecności wapnia zewnątrzkomórkowego. Zdolność bazofilów do uwalniania histaminy zależy od kilku czynników, mię-

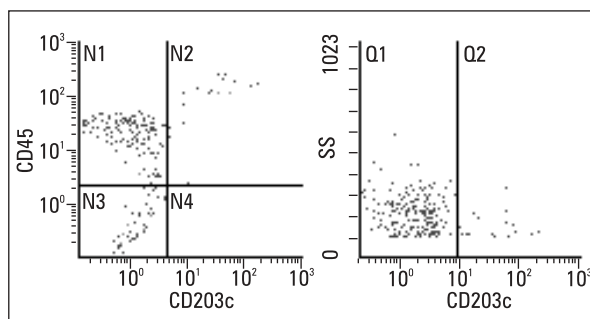
dzy innymi: natury choroby (w ostrych chorobach atopowych obserwuje się spontaniczne uwalnianie dużych stężeń histaminy); leków, które pacjent wcześniej przyjmował; obecności cytokin i hormonów lub procesu wcześniejszego odczulania. Należy również zaznaczyć, że około 5% populacji to „niewydzielacze” — osoby, których bazofile nie reagują uwalnianiem histaminy na kontakt z uczulającym je alergenem. Test uwalniania histaminy przeprowadza się na bazofilach wyizolowanych z krwi pobranej do probówki zawierającej heparynę. Stężenie alergenu wywołujące degranulację musi być dobrane eksperymentalnie. Pomiaru stężeń uwolnionej histaminy dokonuje się za pomocą testów ELISA, RIA (*Radio Immuno Assai*) lub fluorometrycznie. Przy ocenie wyników należy wziąć pod uwagę tak zwane samoistne uwalnianie histaminy (ok. 5%) i ustalić odpowiedni próg odcięcia [2].

Kolejnym testem używanym do diagnostyki czynnościowej był test komórkowego stymulowania alergenami (CAST, *cellular antigen-stimulation test*), w którym mierzono stężenie sulfidoleukotrienów (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) uwalnianych pod wpływem stymulacji alergenowej z wyizolowanych wcześniej bazofilów. Test CAST nie pozwala jednak na odróżnienie alergenów wywołujących reakcje miejscowe od wywołujących reakcje systemowe [5].

Ocenę stężeń uwalnianych leukotrienów LTC<sub>4</sub> przeprowadza się w supernatancie po stymulacji bazofilów. Odczyt wyników jest wykonywany metodą ELISA z użyciem przeciwciała krzyżowo reagującego z LTD<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub> [3].

### Identyfikacja bazofilów przy użyciu przeciwciał monoklonalnych

Cytometria przepływowa jest doskonałym narzędziem do identyfikacji określonych typów komórek, nawet jeżeli stanowią one bardzo małą populację. W tym badaniu wykorzystuje się ekspresję antygenów charakterystycznych dla określonych komórek. Identyfikację bazofilów zapoczątkowano poprzez zastosowanie przeciwciał przeciwko powszechnemu dla leukocytów antygenowi CD45 oraz przeciw IgE, które występują na powierzchni komórek w połączeniu z ich receptorem FcεRI [11]. W tak wyodrębnionej populacji zidentyfikowano komórki CD63 dodatnie. Jak wykazano, antygen CD63 jest zakotwiczony w błonie ziarnistości bazofilów i ulega ekspresji powierzchniowej dopiero po degranulacji komórki. Z kolei stale na powierzchni granulocyta zasadochłonnego występuje antygen CD203c, którego ekspresja ulega zwiększeniu po degranulacji komórki. Antygen ten



**Rycina 1.** Identyfikacja bazofilów na podstawie reakcji przeciwciał z antygenami CD45, CD203c i rozkładu SS (*Side Scatter*, analiza rozproszenia światła na ziarnistościach komórki). Bazofile wykazują silną ekspresję CD45 i niewielką CD203c. Na osi SS są wykrywane jako komórki o niewielkiej granulatości. Znaleźć je można w bramkach N2 i Q2

**Figure 1.** The identification of basophils based on reaction of monoclonal antibodies with CD45, CD203c markers and Side Scatter parameter. Basophils are characterized by high expression of CD45 and low expression of CD203c as well as low granularity at Side Scatter (see gates N2 and Q2)

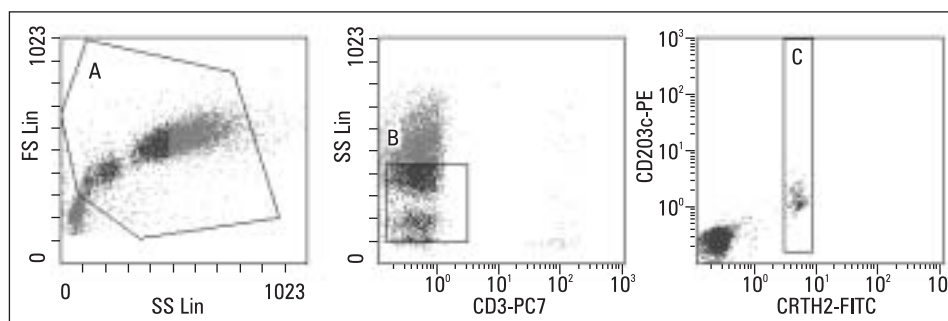
służył do wstępnej identyfikacji granulocytów zasadochłonnnych, jednak niska ekspresja w formach spoczynkowych uniemożliwiła wiarygodną analizę (ryc. 1).

Na błonie komórkowej bazofila wykazano także ekspresję cząstki CRTH2, występującej również na eozynofilach i limfocytach Th2. Wyseparowanie bazofilów na podstawie ekspresji CRTH2 odbywa się przez wykluczenie eozynofilów za pomocą analizy SS (ocena rozproszenia światła lasera na ziarnistościach wewnątrzkomórkowych — *Side Scatter*) i limfocytów T przez znakowanie przeciwciałem anti-CD3 [6] (ryc. 2).

Innym protokołem, pierwotnie przeznaczonym głównie do identyfikacji komórek dendrytycznych (populacja CD123+HLA-DR+), jest protokół z użyciem przeciwciał anti-CD123 i HLA-DR. Bazofile mają na swojej powierzchni antygen CD123 i nie wykazują ekspresji HLA-DR. CD123 jest podjednostką  $\alpha$  receptora dla IL-3. Poziom ekspresji tego antygeny na bazofilach nie zależy od stopnia ich aktywacji i jest stosunkowo stała [6].

### CD63 jako marker aktywacji bazofilów

Antygen CD63 (gp53) zwany jest inaczej białkiem błonowym związanym z lizozymem (LAMP-3, *lysosome-associated membrane protein*). Należy do nadrodziny białek transbłonowych (tetraspanin — białek z 4 domenami transbłonowymi [1, 14]) i pojawia się na różnych typach komórek: bazofilach, mastocytach, makrofagach i na płytkach krwi [12]. W stanie spoczynku białko to jest zakotwicz-



**Rycina 2.** Wyseparowanie (bramkowanie) bazofilów w protokole CD3/CD203c/CRTH2. W rozkładzie FS/SS bazofile układają się między limfocytami i monocytami. Nie wykazują ekspresji antygenu CD3; można je rozpoznać przez bramkowanie populacji CRTH2+CD203c+ po wykluczeniu z analizy limfocytów Th2 i eozynofiliów (bramka C)

**Figure 2.** Basophil gating using CD45/CD203c/CRTH2 protocol. In FS/SS cytogram basophils can be found between lymphocytes and monocytes. Basophils have phenotype CD3-/CRTH2+/CD203c+

ne w błonie wewnątrzcytoplazmatycznych ziarnistości. Funkcja CD63 pozostaje jeszcze nieznana, jednak wykazano, że przeciwciała anti-CD63 mogą hamować adhezję mastocytów do białek macierzy pozakomórkowej, fibronektyny i witronektyny, oraz mogą hamować IgE-zależną aktywację adherentnych mastocytów [9].

CD63 jest antygenem, który podczas aktywacji bazofila ulega ekspresji *de novo* na powierzchni badanych komórek. Podczas aktywacji z granulocytów zasadochłonnych uwalniane są mediatory, a CD63 — po fuzji błon ziarnistości z błoną komórkową — pojawia się na powierzchni komórki. Dzięki swoistym przeciwciałom sprzężonym z fluorochromem ekspresja tych cząstek może być analizowana cytometrycznie (ryc. 3).

Ekspresja CD63 silnie koreluje z degranulacją komórki, czyniąc ten antygen doskonałym narzędziem do oceny reakcji bazofilów na alergen. W badaniach nad alergią na roztocza kurzu domowego test z użyciem przeciwciał monoklonalnych anti-CD63 wykazywał 91% czułości i 100% swoistości [5]. Przy zastosowaniu testu oceniającego ekspresję CD63 należy pamiętać, że ten antygen można znaleźć również na trombocytach. Dlatego przydatnym byłoby znakowanie dodatkowo markera swoistego dla płytek krwi (np. CD41) w celu wykluczenia z analizy leukocytów nimi oplaszczonych [5]. Ekspresja CD63 na powierzchni bazofilów wzrasta nie tylko pod wpływem alergenów, ale również takich czynników, jak fMLP (formylometionyl-leucynofenyloalanina) czy jonomycyna [13].

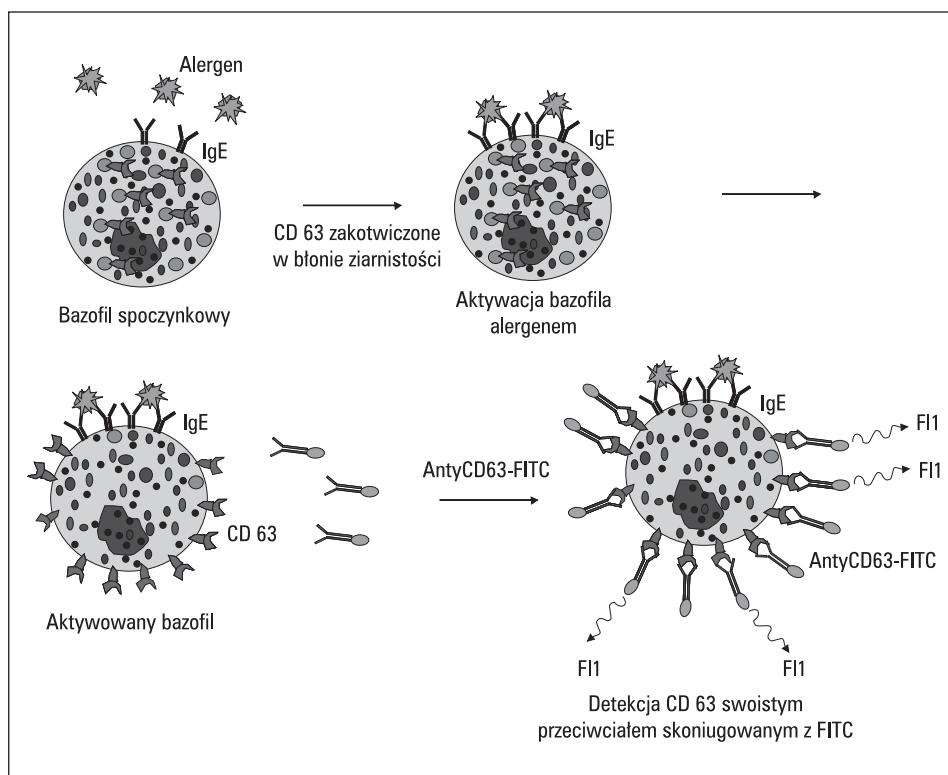
Czułość testu z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciw antygenowi CD63 w diagnostyce alergii na jad owadów wyniosła 100% [4], osiągając wartość o około 15–20% wyższą niż czułość testu uwalniania histaminy czy czułość testów skórnych. Swoistość testu również wyniosła 100%.

Nie wykazano korelacji między stężeniem krążących swoistych IgE a testem aktywacji bazofila, co przemawia za faktem, że nie ma związku między siłą degranulacji bazofilów (liczbą bazofili, które ulegają degranulacji) a stężeniem IgE w surowicy [3]. W badaniach alergii na sierść kota wykazano 100-procentową czułość i 95-procentową swoistość testu z przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD63 [16]. Z kolei w badaniach nad opiatami i lekami rozluźniającymi mięśnie wykazano czułość tego samego testu na poziomie 79% [13].

### CD203c jako marker aktywacji bazofilów

Antygen CD203c (neuronalny powierzchniowy antygen różnicowania neuronów, E-NPP3, PD-I $\beta$ , B10, gp130<sup>RB13-6</sup>) należy do wielogenowej rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz. Te transbłonowe metaloenzymy typu II wykazują szerokie spektrum substratowe i katalizują pękanie wiązań fosfodiesterowych i fosfosiarczanowych w licznych cząsteczkach składających się z deoksynukleotydów i cukrów nukleotydowych [9]. Dodatkowo, E-NPP3 zawiera domenę somatyno B-podobną i komórkowy motyw adherentny, ale jego potencjalna funkcja w odniesieniu do fizjologii bazofila pozostaje nieznana [14]. Jak dotąd nie wykazano ekspresji tego antygenu na żadnych innych komórkach poza bazofilami i mastocytami, wywodzącymi się z tej samej komórki prekursorowej. Jego ekspresja wzrasta natychmiast po stymulacji alergenem powodującym degranulację lub po aktywacji przeciwciałami anti-IgE. Sugeruje to, że aktywacja CD203c ujawnia się po aktywacji receptorów dla fragmentu Fc immunoglobuliny IgE [6] (ryc. 4).

W formie spoczynkowej bazofile wykazują bardzo słabą ekspresję cząsteczki CD203c, co powoduje, że nie może być ona ich markerem rozpo-



**Rycina 3.** Ocena aktywacji bazočila z użyciem przeciwciała rozpoznającego antygen CD63. Po połączeniu się alergenu z fragmentem Fab IgE na powierzchni bazočila dochodzi do degranulacji i ujawnienia ekspresji CD63 na powierzchni komórki. Antygen ten może być wykrywany cytometrycznie przez przeciwciała sprzężone z fluorochromem

**Figure 3.** Basophil activation scheme using CD63 antigen as activation marker. Secondary to IgE binding to its receptor, can be observed basophil degranulation and increased CD63 antigen expression. This antigen is detectable using specific monoclonal antibody conjugated with fluorescent dye

znającym. W badaniach nad alergią na lateks wykazano, że test aktywacji bazočilów z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciw antygenowi CD203c ma o 50% wyższą czułość niż test oceniający ekspresję CD63 [15]. Nadekspersja CD203c jest wynikiem krzyżowej aktywacji receptorów FcεRI i działania na komórkę chemoatraktantów, takich jak fMLP, działających na drodze receptorowej. Nagły wzrost ekspresji CD203c na powierzchni błony w kilka minut po aktywacji wskazuje na to, że w cytoplazmie komórki muszą się znajdować rezerwy tego białka. W konsekwencji można założyć, że antygen CD203c odgrywa zasadniczą rolę w IgE-zależnej aktywacji bazočila [1].

Zarówno naturalne, jak i rekombinowane alergeny mogą promować wzrost ekspresji CD203c na powierzchni granulocytów zasadochłonnych [2] (ryc. 5).

Spoczynkowa ekspresja CD203c może się różnić, co zależy od właściwości osobniczych. Na wzrost ekspresji CD203c może wpływać IL-3, dlatego u osób, u których toczą się procesy zapalne, podstawowy poziom CD203c może być znacznie podwyższony. Wydaje się, że antygen CD203c jest najbardziej czułym markerem aktywacji bazočilów na drodze IgE-zależnej [2].

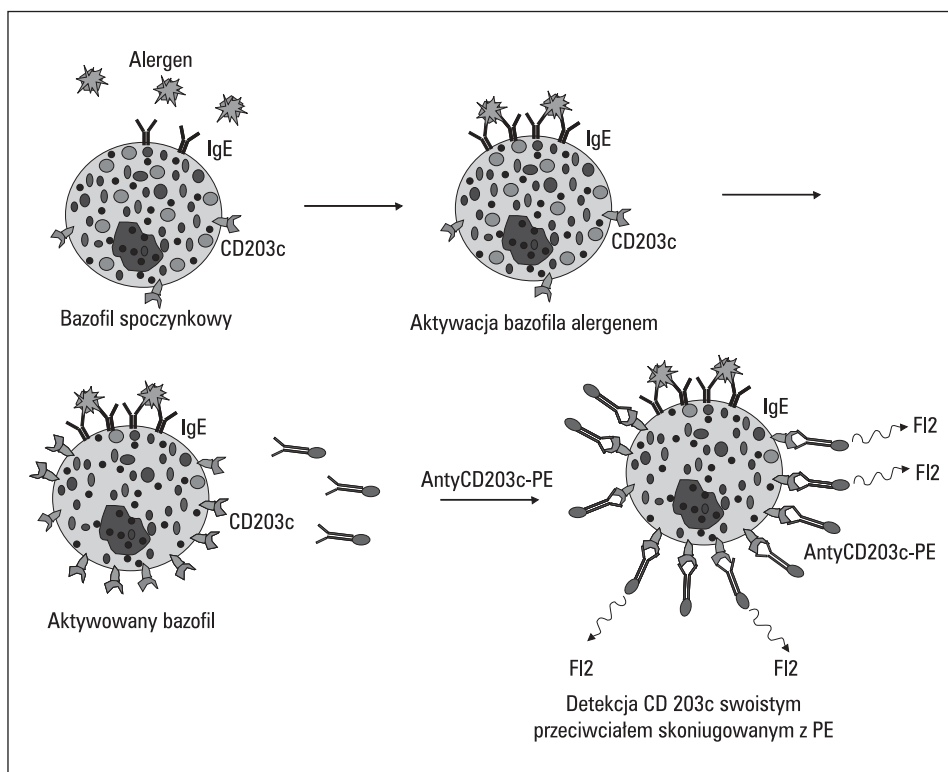
Wstępne badania z zastosowaniem tego antygeny do diagnozowania alergii wskazują na większą czułość niż cząsteczki CD63 [13].

### Inne markery aktywacji bazočila

Obecnie zidentyfikowano jeszcze inne markery aktywacji bazočilów. Należą do nich: CD13, CD164 (zachowujący się podobnie do CD203c) i CD107a (odpowiada ekspresji CD63). Ich potencjalne zastosowanie w diagnostyce chorób alergicznych wymaga jednak dalszych badań [6, 8].

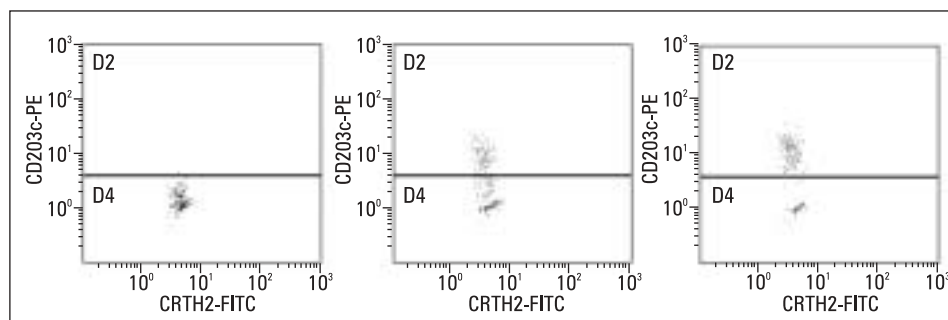
### Podsumowanie

Niewątpliwą zaletą cytometrii przepływowej w badaniach czynności bazočilów jest możliwość identyfikowania i analizowania niewielkiej populacji komórek (stanowiącej ok. 1% próbki) oraz kilku parametrów (tzn. antygenów powierzchniowych) jednocześnie [7]. Zastosowanie testu aktywacji bazočilów *in vitro* pozwala uniknąć powikłań podczas badań diagnostycznych, takich jak reakcja anafilaktyczna czy pseudoanafilaktyczna po podaniu alergenu. Test ten może być szczególnie



**Rycina 4.** Schemat oceny aktywacji bazofilów na podstawie oceny ekspresji antygenu CD203c. Po połączeniu się alergenu z fragmentem Fab IgE na powierzchni bazofila dochodzi do degranulacji i wzrostu ekspresji CD203c na powierzchni komórki. Antygen ten może być wykrywany cytometrycznie przez przeciwciało sprzężone z fluorochromem

**Figure 4.** Basophil activation scheme using CD203c antigen as activation marker. Secondary to IgE binding to its receptor, can be observed basophil degranulation and increased CD203c antigen expression. This antigen is detectable using specific monoclonal antibody conjugated with fluorescent dye



**Rycina 5.** Aktywacja bazofilów pod wpływem pyłków traw u osoby uczulonej. Bramkowanie wykonano, stosując protokół CD3/CRTH2/CD203c. Pierwszy cytogram przedstawia bazofile spoczynkowe, drugi — bazofile aktywowane przeciwciałami anti-IgE, trzeci zaś przedstawia aktywację bazofilów po inkubacji z antygenami pyłków traw

**Figure 5.** Basophil activation after grass pollen stimulation in atopic patient. Gating was set with the use of CD3/CRTH2/CD203c protocol. At the first cytogram unstimulated basophils, at the second — basophils stimulated with anti-IgE and at the third — basophils stimulated with grass pollen antigens are presented

przydatny w takich sytuacjach klinicznych, jak diagnostyka alergii na jady owadów błonkoskrzydłych czy alergii pokarmowych. W tym ostatnim przypadku testy skórne mają niewielką wartość, więc diagnostyka *in vitro* byłaby jak najbardziej wskazana. Jak każda metoda, tak i ten test ma pewne ograniczenia. Przede wszystkim jest stosunkowo drogi

i wymaga zastosowania sprzętu niedostępnego w większości laboratoriów. Poza tym w przypadku każdego badanego alergenu określać optymalne stężenie wywołujące aktywację komórek. Niezbędne jest również określenie poziomu odcięcia, to znaczy takiego wzrostu ekspresji badanych cząstek, powyżej którego rozpoznamy aktywację [6].

Technika ta została opracowana dla wielu alergenów, między innymi alergenów inhalacyjnych, lateksu, jądów owadów błonkoskrzydłych czy leków, wywołujących IgE-zależną reakcję alergiczną [9].

Badania wykazują, że testy cytometryczne są użytecznym dodatkowym narzędziem w diagnostyce alergii. Uważa się, a chyba niesłusznie, że ich koszty i wymagania aparaturowe wykluczają możliwość stosowania w rutynowej diagnostyce. Takie testy mogą być użyteczne w badaniach eksperymentalnych i szczególnie w takich sytuacjach, kiedy badania *in vivo* mogą wywołać silną zagrażającą życiu reakcję u pacjenta [16].

### Piśmiennictwo

1. Boumiza R., Monneret G., Forissier M.-F., Savoye J., Gutowski M.-C., Powell W.S. i wsp. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33: 259–265.
2. Valent P., Hauswirth A.W., Natter S., Sperr W.R., Buehring H.J., Valenta R. Assay for measuring *in vitro* basophil activation induced by recombinant allergens. *Methods* 2004; 32: 265–270.
3. Sainte-Laudy J., Sabbah A., Drouet M., Lauret M.G., Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin. Mol. Allergy* 2000; 30: 1166–1171.
4. Eberlein-Konig B., Schmidt-Leidescher C., Rakoski J., Behrendt H., Ring J. *In vitro* basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 2006; 16: 5–10.
5. Crockard A.D., Ennis M. Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow? *Clin. Exp. Allergy* 2001; 31: 975–977.
6. Boumiza R., Debard A.-L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin. Mol. Allergy* 2005; 3: 9.
7. Triggiani M., Marone G. Basophil's secrets revealed by flow cytometry. *Allergy* 2006; 61: 1025–1027.
8. Michova A., Abugalia M., Ivanova T., Nikolov G., Taskov H., Petrunov B. Comparison of two-flow cytometry methods for basophil degranulation in patients sensitized to grass pollen. *Allergy* 2006; 61: 1078–1083.
9. Ebo D.G., Sainte-Laudy J., Bridts C.H., Merten C.H., Hagendorens M.M., Schuerwegh A.J. i wsp. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; 61: 1028–1039.
10. Lambert C., Guilloux L., Dzvinga C., Gourgaud-Massias C., Genin C. Flow cytometry versus histamine release analysis of *in vitro* basophil degranulation in allergy to hymenoptera venom. *Cytometry* 2003; 52B: 13–19.
11. Dubois A.E.J., van der Hiede S. Basophil-activation tests in Hymenoptera Allergy. *Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.* 2007; 7: 346–349.
12. Eberlein-Konig B., Rakoski J., Behrendt H., Ring J. Use of CD63 expression as marker of *in vitro* basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 2004; 14: 10–16.
13. Sudheer P.S., Hall J.E., Read G.F., Rowbottom A.W., Williams P.E. Flow cytometric investigation of per-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia* 2005; 60: 251–256.
14. Eberlein-Konig B., Varga R., Mempel M., Darsow U., Behrendt H., Ring J. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy* 2006; 61: 1084–1085.
15. Hemery M.-L., Arnoux B., Dhivert-Donnadieu H., Rongier M., Barbotte E., Vardier i wsp. Confirmation of the Diagnosis of Natural Rubber Latex Allergy by the Basotest Method. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2005; 136: 53–57.
16. Ocmant A., Peignois Y., Mulier S., Hanssens L., Michilis A., Schandene L. 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.