

**Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu**

**Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i  
Alergologii we Wrocławiu**

**Lek. Anna Radlińska**

**Porównanie przydatności diagnostycznej  
ekspresji CD164 i CD63 na powierzchni bazofila  
w alergii na *Dermatophagoides farinae***

**Rozprawa doktorska**

**Promotor: Prof. dr hab. n. med. Wojciech Mędrala**

Wrocław, 2023

# Spis treści

<b>Wykaz najważniejszych skrótów.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Wstęp.....</b>	<b>6</b>
1.1. Choroby alergiczne.....	6
1.1.1. Patofizjologia i klasyfikacja chorób alergicznych.....	6
1.2. Alergiczny nieżyt nosa.....	8
1.3. Alergeny roztoczy kurzu domowego.....	9
1.4. Diagnostyka „in vivo” chorób alergicznych. Punktowe testy skórne.....	12
1.5. Diagnostyka „in vitro” chorób alergicznych. Oznaczenie asIgE.....	13
1.6. Test aktywacji bazofila.....	16
1.6.1. Cytometria przepływowa.....	16
1.6.2. Bazofile jako komórki efektorowe reakcji alergicznej.....	20
1.6.3. Protokół identyfikacji bazofilów.....	21
1.6.4. Markery aktywacji bazofilów.....	24
<b>2. Cel pracy.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Materiał i metody.....</b>	<b>28</b>
3.1. Metody.....	28
3.2. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej.....	28
3.3. Materiały i narzędzia badawcze.....	33
3.3.1. Autorski kwestionariusz.....	33
3.3.2. Sprzęt laboratoryjny i odczynniki.....	36
3.3.3. Punktowe testy skórne.....	39
3.3.4. asIgE.....	40
3.3.5. Test aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 oraz CD164.....	41
3.3.5.1. Technika wykonania testów aktywacji bazofila.....	41
3.3.5.2. Analiza cytometryczna.....	43
3.3.5.3. Analiza statystyczna.....	46
<b>4. Wyniki badań.....</b>	<b>47</b>
4.1. Wyniki kwestionariusza.....	47
4.1.1. Dane kliniczne.....	47
4.1.2. Wyniki punktowych testów skórnych.....	48
4.2. Wyniki asIgE uzyskane dla <i>Dermatophagoides farinae</i> .....	53

4.3. Testy aktywacji bazofilów.....	56
4.3.1. Określenie podstawowej puli bazofilów.....	56
4.3.2. Ocena aktywacji bazofilów.....	62
4.3.3. Ocena efektywności diagnostycznej testu aktywacji bazofila z zastosowaniem markera CD164. Czulość i specyficzność testów BAT .....	72
<b>5. Dyskusja.....</b>	<b>89</b>
5.1. Test aktywacji bazofilów. W poszukiwaniu biomarkera idealnego w diagnostyce chorób alergicznych .....	89
5.2. Metody diagnostyki chorób alergicznych „in vivo” kontra metody „in vitro”.	90
5.3. Znaczenie BAT w diagnostyce chorób alergicznych. ....	94
5.4. Markery aktywacji bazofilów.....	96
5.5. Testy aktywacji bazofilów. Identyfikacja populacji bazofilów.....	99
5.6. Kontrola jakości testu. Kontrola dodatnia i ujemna. Non-responders .....	100
5.7. Użyteczność CD164 w diagnostyce alergii na <i>D. farinae</i> . Porównanie czulości i swoistości BAT z CD63 oraz CD164. Łączne zastosowanie wszystkich metod „in vitro”.....	102
5.8. Podsumowanie.....	107
<b>6. Wnioski .....</b>	<b>109</b>
<b>7. Streszczenie.....</b>	<b>110</b>
<b>8. Summary.....</b>	<b>113</b>
<b>9. Spis Rycin .....</b>	<b>116</b>
<b>10. Spis Tabel.....</b>	<b>120</b>
<b>Piśmiennictwo.....</b>	<b>123</b>

## Wykaz najważniejszych skrótów

- AIT (allergen immunotherapy) – immunoterapia alergenowa
- ANN – alergiczny nieżyt nosa
- ARIA – Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma
- asIgE – alergenowo-swoiste IgE
- AUC (area under ROC curve) – pole pod krzywą ROC
- AZS – atopowe zapalenie skóry
- BAT (basophil activation test) – test aktywacji bazofila
- CD (cluster of differentiation) – antygen różnicowania komórkowego
- CRD (component resolved diagnostics) – diagnostyka komponentowa
- D. farinae – Dermatophagoides farinae
- D. pteronyssinus – Dermatophagoides pteronyssinus
- EAACI – European Academy of Allergology and Clinical Immunology
- EDTA – wersenian sodu
- FcεRI (Fc epsilon RI) – receptor o wysokim powinowactwie dla immunoglobuliny E
- FDEIA (Food-dependent exercise induced anaphylaxis) – anafilaksja zależna od pokarmu indukowana wysiłkiem
- FITC – izotiocyjanian fluoresceiny
- FSC (forward scatter) – rozproszenie światła w kierunku do przodu
- GA(2)LEN – Global Allergy and Asthma European Network
- HDM (house dust mite) – roztocze kurzu domowego
- IgE – immunoglobulina E
- IL – interleukina
- K – kurtoza
- LAR (local allergic rhinitis) – lokalny alergiczny nieżyt nosa
- M – średnia arytmetyczna
- Maks. – wartość maksymalna
- Me – mediana
- Min. – wartość minimalna
- OFC (oral food challenge) – doustna próba prowokacyjna
- PAF (platelet-activating factor) – czynnik aktywujący płytki
- PE – fikoerytryna
- POCHP – przewlekła obturacyjna choroba płuc
- PTS – punktowe testy skórne
- Q1 – kwartył pierwszy

Q3 – kwartył trzeci

ROC (Receiver Operating Characteristic) – krzywa ROC

S – współczynnik skośności

SD – odchylenie standardowe

SSC (side scatter) – rozproszenie światła w kierunku prostopadłym

WAO – World Allergy Organization

# 1. Wstęp

## 1.1. Choroby alergiczne

Choroby alergiczne stanowią globalny problem XXI wieku. Są chorobami cywilizacyjnymi o najwcześniejszym początku spośród wszystkich pozostałych schorzeń. Szacuje się, że około 30–40% światowej populacji jest dotknięta co najmniej jedną chorobą alergiczną, co wiąże się z ogromnymi kosztami społecznymi i ekonomicznymi [1].

Choroby alergiczne często są bagatelizowane, tymczasem ich następstwa mają wymiar wielonarządowy [2]. Zwykle dotyczą skóry i błony śluzowej nosa oraz oskrzeli, jednak w niektórych przypadkach reakcja nadwrażliwości może przyjmować charakter systemowy i potencjalnie zagrażać życiu. Choroby alergiczne to także utracone godziny pracy i nauki oraz niższa jakość życia. Aktualnie istnieje potrzeba precyzyjnej diagnostyki, która w każdym przypadku nie tylko pozwoli na ustalenie alergenu sprawczego, ale również umożliwi ocenę rokowania i ryzyka związanego z danym uczuleniem, a tym samym podjęcie odpowiedniej profilaktyki oraz zastosowanie spersonalizowanej terapii (np. immunoterapii alergenowej). Tymczasem, pomimo wdrożenia w ostatnich latach diagnostyki komponentowej (CRD-component resolved diagnostics), żadna z dostępnych metod nie oferuje 100% czułości i swoistości. Obecnie duże nadzieje budzi test aktywacji bazofila (BAT – basophil activation test), który nie tylko charakteryzuje się znacznym profilem bezpieczeństwa, zwłaszcza w porównaniu do metod „in vivo”, ale stosowany jest w przypadkach, które nie mogą być rozwiązane przy pomocy standardowej diagnostyki.

### 1.1.1. Patofizjologia i klasyfikacja chorób alergicznych

Termin „alergia” został wprowadzony po raz pierwszy w 1906 roku przez wiedeńskiego pediatrę Clemensa von Pirqueta. Powstał ze złożenia dwóch greckich słów: allos (inny) i ergos (reakcja). W tym kontekście alergia została zdefiniowana jako nadmierna, nieprawidłowa reakcja układu immunologicznego na zetknięcie z obcym antygenem, zazwyczaj nieszkodliwym dla osób zdrowych [3].

Pojęcie alergii należy rozróżnić od nadwrażliwości. Początkowo oba terminy były stosowane zamiennie. Zgodnie z obecną nomenklaturą, podkreśla się, że nadwrażliwość ma wymiar dużo szerszy (może być alergiczna i niealergiczna), a alergia jest tylko jednym z jej możliwych mechanizmów [2]. Nawiązując do klasycznego podziału reakcji

alergicznym dokonanej w 1968 roku przez Philipa Gella i Roberta Coombsa, alergię zasadniczo odpowiada nadwrażliwości typu I. Wspomniana klasyfikacja, choć obecnie ma już znaczenie historyczne, nadal jest stosowana. Charakterystykę wszystkich czterech typów nadwrażliwości przedstawiono poniżej:

- typ I – natychmiastowy. Objawy występują zwykle ok 15–20 min po ekspozycji na alergen sprawczy. Reakcja jest konsekwencją IgE-zależnej aktywacji i degranulacji komórek efektorowych – mastocytów i bazofilów oraz uwolnienia mediatorów, przede wszystkim histaminy. W późnej fazie reakcji alergicznej uczestniczą również eozynofile, które zapewniają rekrutację komórek nacieku zapalnego.
- typ II – cytotoksyczny. Mediatorami reakcji są przeciwciała IgM lub IgG, podstawowe znaczenie ma również układ dopełniacza. Objawy rozwijają się od kilku minut do kilku godzin. Antygen jest wewnątrzpochozny lub jest haptenem, który łącząc się z wielkocząsteczkowym białkiem nabywa cech antygenowych. W przebiegu reakcji dochodzi do opsonizacji i lizy komórek głównie w wyniku aktywacji dopełniacza.
- typ III – związany z powstawaniem kompleksów immunologicznych. Istotą reakcji jest powstawanie rozpuszczalnych kompleksów przeciwciał, głównie klasy IgG, z antygenami zewnątrz lub wewnątrzpochoznymi, które odkładają się w tkankach oraz aktywują układ dopełniacza i indukują proces zapalny. Objawy zwykle rozwijają się od 3 do 10 godzin od ekspozycji na antygen.
- typ IV – komórkowy (opóźniony). W przebiegu reakcji dochodzi do odpowiedzi komórkowej, w której kluczowe znaczenie odgrywają swoiste dla antygeny limfocyty T. Charakterystyczny naciek oraz uszkodzenie tkanek są efektem działania cytokin uwolnionych z makrofagów oraz monocytów oraz stymulacji limfocytów cytotoksycznych. Objawy mają maksymalne nasilenie po ok. 48 h [3].

W 2001 roku EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology) dokonała rewizji dotychczasowej nomenklatury i zaproponowała uproszczoną klasyfikację reakcji alergicznych z podziałem na alergię IgE-zależną oraz IgE-niezależną. Reakcje nie mediowane przez IgE podzielono na te, które są inicjowane przez mechanizm zależny od przeciwciał lub w których dominuje odpowiedź komórkowa. Immunoglobuliny, które uczestniczą w reakcjach IgE-niezależnych należą przede wszystkim do klasy IgG jak np. w chorobie posurowiczej (III typ reakcji wg podziału Gella i Coombsa). Przykładem reakcji, nie mediowanej poprzez IgE, w której odpowiedź

na antygen wynika z zaangażowania odpowiedzi komórkowej (limfocytów T) jest z kolei kontaktowe zapalenie skóry, odpowiadające IV typowi reakcji wg podziału Gella i Coombsa) [2].

## 1.2. Alergiczny nieżyt nosa

ANN (alergiczny nieżyt nosa) jest jedną z najczęściej występujących chorób na świecie. Szacunkowo dotyczy 10–40% populacji ogólnej, przy czym w samej Europie choruje 17–28,5% dorosłych [4]. Jak wskazują ostatnie doniesienia, częstość ANN niezmiennie rośnie, w tym także na obszarach gdzie dotychczas jego występowanie było niskie. ANN jako schorzenie często jest pomijany, gdyż nie wiąże się ze znaczną śmiertelnością, ani z ryzykiem hospitalizacji. Tymczasem nasilone objawy nieżytu nosa, nierzadko również z towarzyszącym zapaleniem spojówek, obniżają jakość życia, wpływają na funkcje poznawcze, zmniejszają produktywność w pracy, stanowiąc tym samym istotny problem zdrowotny. Ponadto ANN, zwłaszcza z towarzyszącym uczuleniem na alergeny całoroczne, wiąże się ze zwiększeniem ryzyka wystąpienia astmy oraz wpływa znacząco na jej kontrolę [4, 5, 6].

ANN jest objawową chorobą zapalną tego narządu, rozwijającą się na tle alergii IgE-zależnej. Objawy nieżytu nosa występują po ekspozycji na określony alergen, w stosunku do którego zostały wytworzone swoiste przeciwciała IgE [5]. Głównymi alergenami wziewnymi indukującymi ANN są pyłki roślin (w Polsce głównie traw, chwastów, zbóż uprawnych i drzew) roztocze kurzu domowego, stanowiące najczęstszą przyczynę przewlekłego nieżytu nosa, a także grzyby pleśniowe i białka zwierzęce [7].

Zgodnie z wytycznymi ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma), w zależności od czasu trwania objawów, ANN można podzielić na okresowy alergiczny nieżyt nosa (trwający poniżej 4 dni w tygodniu lub poniżej 4 tygodni w roku) i przewlekły (trwający powyżej 4 dni w tygodniu i powyżej 4 tygodni w roku). Z kolei ze względu na stopień nasilenia objawów wyróżniamy ANN łagodny i umiarkowany lub ciężki. Do głównych symptomów ANN należą: wyciek wodnistej wydzieliny z nosa, napadowe kichanie, niedrożność nosa (charakterystyczne dla przewlekłego ANN), świąd nosa, również często z towarzyszącym świądem spojówek [6].

Rozpoznanie opiera się na danych uzyskanych z wywiadu skonfrontowanych z badaniami dodatkowymi – przede wszystkim PTS (punktowe testy skórne), które stanowią tzw. „złoty standard” lub oznaczeniem stężenia asIgE (alergenowo-swoiste IgE)



w surowicy [5]. Aktualnie szeroko stosowane metody diagnostyczne nie zawsze jednak pozwalają na identyfikację alergenu sprawczego. Szacuje się, że nawet 47–62,5% pacjentów z ujemnymi wynikami PTS oraz nieobecnością asIgE w surowicy cierpi na tzw. lokalny ANN – LAR (local allergic rhinitis). Jest to związane z występowaniem asIgE wyłącznie w błonie śluzowej i wydzielinie z nosa i ich niemożnością wykrycia w surowicy oraz w obrębie skóry [8]. LAR jest jednym z wielu przykładów sytuacji klinicznych w dziedzinie alergologii, który generuje trudności diagnostyczne. Stanowi dowód, że nadal istnieje potrzeba aktywnego poszukiwania nowych rozwiązań i metod, które w każdym przypadku pozwolą na postawienie prawidłowego rozpoznania.

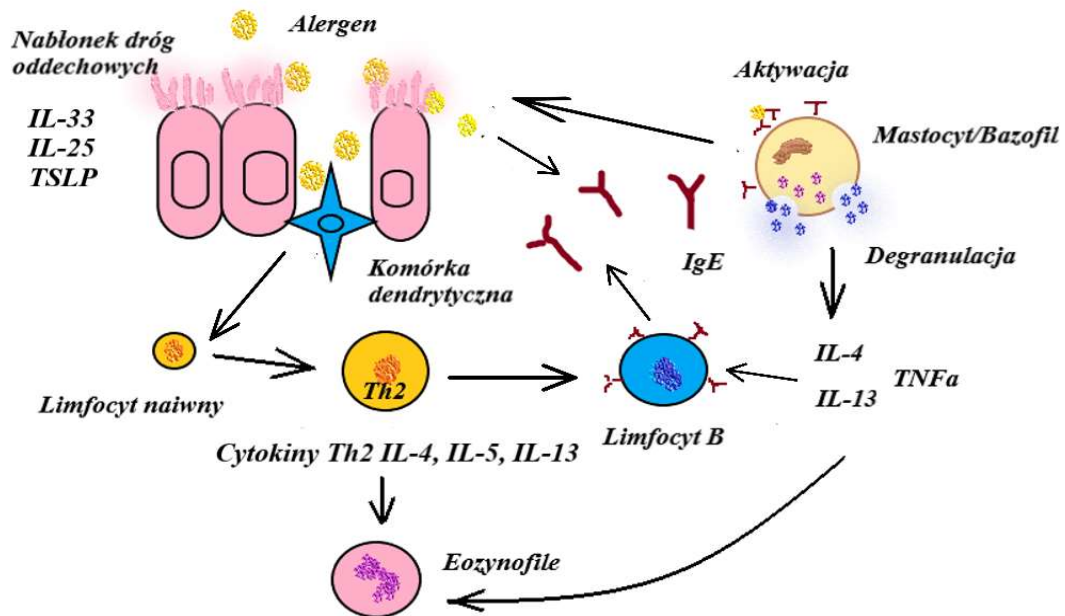
### **1.3. Alergeny roztoczy kurzu domowego**

Alergia na roztocze kurzu domowego (HDM – house dust mite) ma kluczowe znaczenie dla rozwoju przewlekłego ANN oraz astmy oskrzelowej o podłożu IgE-zależnym [4, 9, 10]. Oba schorzenia nierzadko współistnieją ze sobą. Częstość występowania alergii na roztocze szacuje się na około 50% wśród chorych na astmę oskrzelową, co odpowiada około 1–2% światowej populacji [11].

Jak wiadomo, przewlekłe alergiczne zapalenie dróg oddechowych w większości przypadków jest warunkowane zaburzeniem równowagi odpowiedzi immunologicznej w kierunku komórek Th2, które wytwarzają charakterystyczny profil cytokin czyli IL-4, IL-5 i IL-13 (interleukina 4, 5 i 13). Cytokiny zależne od limfocytów Th2 odpowiadają za proces przełączania klas przeciwciał w limfocytach B, co prowadzi do zwiększonej syntezy, swoistej w stosunku do alergenu, immunoglobuliny IgE oraz promocji zapalenia w drogach oddechowych [3].

W przypadku alergii na roztocze mamy do czynienia z dodatkowym wzmocnieniem odpowiedzi immunologicznej typu Th2. Alergeny roztoczy, mając właściwości proteolityczne, z łatwością przenikają do nabłonka dróg oddechowych niszcząc białka ścisłych połączeń międzykomórkowych i wtórnie torują drogę przez przerwana barierę nabłonkową innym alergenom. Proteazy stymulują uwalnianie IL-6, IL-8 oraz czynnika stymulującego wzrost granulocytów i makrofagów (GM-CSF), które działają prozapalnie oraz hamują odpowiedź Th1. Udowodniono również, że proteazy Der p1 (alergen główny roztoczy gatunku *Dermatophagoides pteronyssinus*) mają zdolność rozszczepiania białek SP-A i SP-D, które tworzą ochronny surfaktant płuc. Surfaktant płucny bierze głównie udział w opsonizacji patogenów, ale wykazano, że jest również zdolny do wiązania

alergenów, zakłócając tym samym ich konsolidację z IgE [11, 12]. Szczegółowy mechanizm odpowiedzi immunologicznej w stosunku do alergenów roztoczy przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Wpływ alergenów HDM na wzmocnienie odpowiedzi alergicznej Th2 z uwzględnieniem fazy wczesnej i późnej reakcji alergicznej

1. Interakcja alergenów z nabłonkiem oddechowym prowadzi do uwolnienia alarmin: IL-33, IL-25 oraz TSLP (limfopoetyna zrębu grasicy), które wpływają na różnicowanie naiwnych limfocytów T w kierunku komórek Th2 oraz aktywują wydzielanie cytokin IL-4, IL-5 i IL-13.
2. Inhalowane alergeny HDM dzięki posiadanej aktywności proteolitycznej, degradują szczelne połączenia międzykomórkowe i przenikają do nabłonka dróg oddechowych. Następnie są wychwytywane przez komórki dendrytyczne i prezentowane naiwnym limfocytom T.
3. Dochodzi do polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku limfocytów Th2 i wydzielania cytokin IL-4, IL-5 i IL-13. Cytokiny indukują zjawisko przelączania klas na rzecz syntezy przez limfocyty B immunoglobuliny IgE.
4. Alergenowo swoiste IgE są wiązane na powierzchni mastocytów i bazofików. Związanie alergenu z dwoma cząsteczkami IgE, które są zakotwiczone w błonie komórkowej poprzez FcεRI prowadzi do degranulacji komórek z uwolnieniem mediatorów reakcji alergicznej. Proteazy HDM dodatkowo wzmacniają efekt degranulacji poprzez oddziaływanie na komórki mięśni gładkich (wzmagają ich kurczliwość).
5. Stała ekspozycja na alergeny HDM podtrzymuje ciągłą produkcję przeciwciał IgE oraz utrzymuje proces zapalny w drogach oddechowych. Dodatkowo IL-5 wydzielana przez limfocyty Th2 aktywuje oraz mobilizuje ze szpiku kostnego eozynofile. Eozynofile uwalniają prozapalne mediatory przyczyniające się do rozwoju przewlekłego zapalenia dróg oddechowych oraz remodelingu oskrzeli.
6. Proteazy HDM indukują proces dojrzewania fibroblastów, proliferacji mięśni gładkich, dodatkowo pogłębiając proces przebudowy dróg oddechowych [3, 12].

Przytoczone zjawiska immunologiczne przekładają się na określone konsekwencje kliniczne. Jak wskazują badania, w przypadku występowania astmy ciężkiej, dużo częściej stwierdza się współistniejącą alergię na roztocze kurzu domowego w porównaniu z astmą poddającą się kontroli [9]. Wiadomo również, że oprócz czynników genetycznych, uczulenie na roztocze kurzu domowego we wczesnym dzieciństwie (poniżej 5 roku życia), jest jednym z silnych predyktorów wystąpienia astmy oskrzelowej w przyszłości [13].

Obecnie znanych jest kilkadziesiąt gatunków roztoczy, jednak najczęściej spotykanymi są *Dermatophagoides pteronyssinus* oraz *Dermatophagoides farinae*. W dalszej kolejności należy wymienić *Euroglyphus maynei*, *Blomia tropicalis*, *Chortoglyphus arcuatus* i *Lepidoglyphus destructor*, które jednak wykazują znaczne zróżnicowanie co do występowania w zależności od warunków środowiskowych i klimatycznych, przy czym wilgotność ma tutaj zasadnicze znaczenie [11].

Alergeny roztoczy kurzu domowego (dotychczas zidentyfikowano aż 38) kwalifikuje się wedle profilu molekularnego do poszczególnych rodzin białek [11, 14]. Grupę pierwszą stanowią proteazy cysteinylowe, w skład których wchodzi główne alergeny roztoczy (czyli takie, na które reaguje większość pacjentów z alergią na HDM) – Der p 1 i Der f 1. Ich wpływ na układ immunologiczny omówiono powyżej. Grupę drugą tworzą białka należące do rodziny MD-2-like lipid-binding proteins (białka wiążące lipidy), zawierające molekuly, będące również głównymi alergenami roztoczy – Der p 2 i Der f 2. Podobnie jak grupa pierwsza, indukują odpowiedź Th2 zależną, ponadto mają zdolność aktywacji receptorów TLR 2 i TLR 4 (Toll-like receptors) w obrębie komórek dendrytycznych i wpływają na uwalnianie TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), który również jest związany z przewlekłym procesem zapalnym. W ponad 90% alergii na roztocze kurzu domowego dotyczy proteaz cysteinowych Der p 1, Der f 1 oraz rodziny białek wiążących lipidy i molekuł Der p 2, Der f 2. Oprócz tego, największe klinicznie znaczenie mają następujące alergeny: Der p 23 należący do grupy białek wiążących chitynę, Der p 7 z grupy profilin, wykrywany nawet u 50% pacjentów z jawną klinicznie alergią na roztocze oraz Der p 10 – panalergen z grupy tropomiozyn, wykazujący reaktywność krzyżową z innymi bezkręgowcami (znaczna homologia z krewetką – Pen a 1) i stwarzający ryzyko wystąpienia reakcji systemowej [11, 12]. Warto też wspomnieć, że oprócz rodziny proteaz cysteinylowych, potencjał proteolityczny wykazują również inne alergeny roztoczy kurzu domowego, głównie te, należące do proteaz serynowych (w ich skład wchodzi proteazy trypsynopodobne, chymotrypsynopodobne i kolagenolityczne)

[12]. Tak znaczna ilość alergenów, która posiada właściwości enzymatyczne, ponadto promocja i wzmocnienie odpowiedzi limfocytów Th2, przekłada się na niezwykle wysoki potencjał alergizujący HDM, czyniąc alergię na roztocze ogromnym ciężarem dla systemu opieki zdrowotnej.

## 1.4. Diagnostyka „in vivo” chorób alergicznych. Punktowe testy skórne

Punktowe testy skórne są obecnie „złotym standardem” w diagnostyce chorób alergicznych. Ich zaletą jest wysoka czułość i swoistość, szybkość wykonania oraz niskie koszty [15]. Metodę po raz pierwszy opracował w 1865 roku Charles Blackley, uzyskując odczyn alergiczny na skórze poprzez jej kontakt z pyłkami traw, po wcześniejszym nakłuciu naskórka lancetem [16].

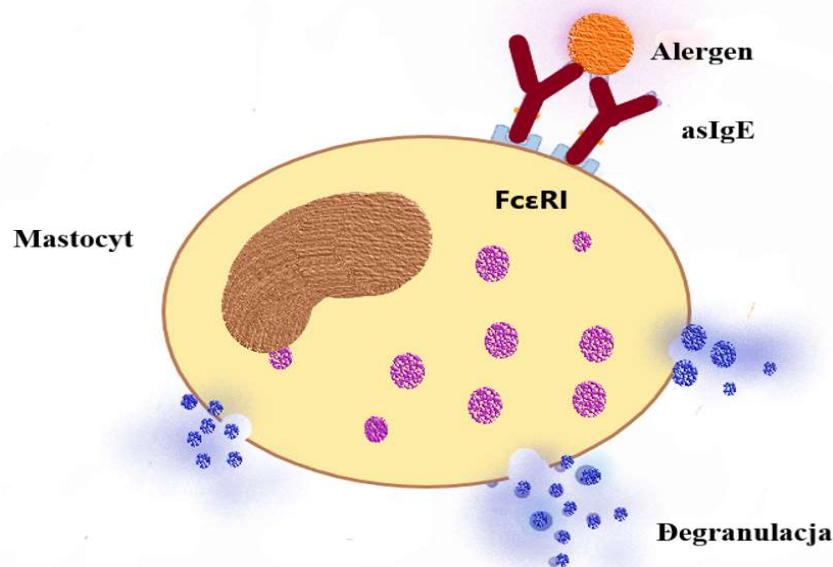
Podstawą do wykonania PTS jest podejrzenie nadwrażliwości typu I (natychmiastowej). Należy jednak pamiętać, że nawet do 30% populacji ma dodatnie testy skórne, przy czym nie zawsze zgłasza objawy choroby alergicznej. W związku z tym, istotą zarówno planowania jak i interpretacji wyników PTS powinien być szczegółowy wywiad. Poniżej w tabeli 1. przedstawiono sytuacje kliniczne, które stanowią wskazanie do przeprowadzenia PTS [15].

Tabela 1. Ogólne wskazania do przeprowadzenia PTS [15]

Podstawowe wskazania do wykonania punktowych testów skórnych
Astma oskrzelowa
Nieżyt nosa/ nieżyt nosa i spojówek
Podejrzenie alergii pokarmowej
Podejrzenie alergii na leki
Podejrzenie choroby zawodowej
Atopowe zapalenie skóry (alergeny powietrzno pochodne)
Ostra pokrzywka i obrzęk naczynioruchowy

Zasada PTS opiera się na wprowadzeniu alergenu tuż pod błonę podstawną naskórka i aktywacji występujących w skórze mastocytów. Na powierzchni komórek tucznych znajdują się receptory o wysokim powinowactwie dla immunoglobuliny E, FcεRI. Interakcja z prowokującym alergenem, prowadzi do mostkowania dwóch cząsteczek IgE oraz w efekcie do degranulacji mastocytów z uwolnieniem mediatorów reakcji

alergiczej, przede wszystkim histaminy, ale również leukotrienów, prostaglandyn oraz cytokin prozapalnych (rycina 2) [3]. Klinikną manifestacją aktywacji komórek tucznych jest powstanie bąbla, który następnie podlega weryfikacji i pomiarom [15].



Rycina 2. Degranulacja komórki tucznej

Oprócz niewątpliwych zalet, PTS mają również swoje wady i ograniczenia. Jednym z najbardziej istotnych problemów jest konieczność odstawienia przed badaniem leków mogących działać supresyjnie na odpowiedź natychmiastową w obrębie skóry (np. leków antyhistaminowych, trójpierścieniowych leków antydepresyjnych, inhibitorów kalcyneuryny). Ponadto, w niektórych przypadkach jak np. w alergii pokarmowej, alergii na leki, czy LAR, czułość PTS może nie być wystarczająca do postawienia jednoznacznej, prawidłowej diagnozy [8, 15]. W takich sytuacjach i przy silnym podejrzeniu IgE-zależnego mechanizmu zgłaszanych dolegliwości, konieczne jest zastosowanie innych metod diagnostycznych.

## 1.5. Diagnostyka „in vitro” chorób alergicznych. Oznaczenie asIgE

W ostatnich latach rośnie znaczenie diagnostyki chorób alergicznych opartej na metodach „in vitro”. Dynamiczny rozwój tej dziedziny zapewniła w szczególności możliwość definiowania komponent alergenowych. W porównaniu z diagnostyką „in

vivo”, niewątpliwymi zaletami metod laboratoryjnych są ograniczenie ekspozycji na alergeny, brak konieczności odstawiania leków, które potencjalnie mogłyby wpłynąć na wyniki, możliwość wykonania testów nawet u małych dzieci [15].

Początki diagnostyki „in vitro” sięgają drugiej połowy XX wieku, kiedy japońscy naukowcy – małżeństwo Teruko i Kimshige Ishizaka opisali przeciwciało – tzw. reaginę (później nazwane przeciwciałem  $\gamma$ E), odpowiedzialne za zjawisko biernego przeniesienia alergii typu I (test Prausnitza-Küstnera – PK) [17–19]. Równolegle, szwedzcy naukowcy, Johansson i wsp. odkryli nowe atypowe białko szpiczaka, którego nie można było wówczas zidentyfikować jako żadnej ze znanych klas immunoglobulin: tj. jako IgG, IgM, IgA lub IgD [20]. Ostatecznie jako efekt działań obu grup badawczych ustalono tożsamość reaginy jako nowego izotypu przeciwciała i nazwano je immunoglobuliną IgE [21].

Początkowo oznaczenie całkowitego IgE wydawało się najprostszą metodą do identyfikacji osób z nadwrażliwością IgE-zależną. Podwyższone stężenie IgE w surowicy może jednak występować w wielu schorzeniach, co przedstawiono w tabeli 2. Istotny problem stanowi również niezwykle krótki okres półtrwania (ok. 2 dni) IgE oraz znacząca dysproporcja pomiędzy tkankową depozycją immunoglobuliny IgE, która wiąże się z receptorami Fc $\epsilon$ RI na powierzchni mastocytów i bazofilów, a jej stężeniem w postaci wolnej [22, 23].

Tabela 2. Przyczyny podwyższonego IgE całkowitego w surowicy [15, 22]

<b>Przyczyny podwyższonego IgE w surowicy</b>
Choroby alergiczne
Choroby pasożytnicze
Choroby skóry: pęcherzyca, łuszczyca, łysienie plackowate
Pierwotne niedobory odporności: zespół Wiskotta-Aldricha, zespół Hioba, zespół Omenna, zespół DiGeorge'a, zespół IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked), zespół Comèla-Nethertona
Nowotwory: chłoniak Hodgkina, szpiczak IgE
Infekcje bakteryjne i wirusowe: mononukleozą zakaźną, gruźlica
Alkoholowa marskość wątroby
Zespół nerczycowy
Alergiczna aspergiloza oskrzelowo-płucna
AIDS
Śródmiąższowe zapalenie nerek

W 1967 roku Wide i współautorzy po raz pierwszy opisali metodę pozwalającą na oznaczenie stężenia immunoglobuliny IgE przeciw konkretnym alergenom czyli alergenowo swoistych IgE [23, 24]. Jest to obecnie obok PTS podstawowy test diagnostyczny pozwalający na określenie występowania nadwrażliwości IgE-zależnej. Obecność przeciwciała IgE swoistego dla testowanego alergenu w surowicy identyfikuje uczulone osoby, przy czym rozpoznanie alergii może być postawione tylko wówczas, kiedy dodatni wynik jest zgodny z obserwowanymi objawami klinicznymi [15]. Początkowo oznaczenie asIgE było wykonywane techniką radioimmunoadsorpcji (RAST). Obecnie odbywa się to z zastosowaniem metod radioimmunologicznych lub immunoenzymatycznych. Ogólna idea testu opiera się na reakcji, występującego w formie ciekłej lub związanego z określonym podłożem, alergenu, z obecnymi w surowicy pacjenta asIgE, a następnie przyłączeniem do powstałego kompleksu wyznakowanych przeciwciał anti-IgE. Intensywność fluorescencji lub natężenie zabarwienia wyznacza określone stężenie asIgE.

Stężenie asIgE można oznaczyć dla jednego ekstraktu alergenowego, ewentualnie dla pojedynczej molekuly alergenowej, wykorzystując testy jednoparametrowe (singleplex) lub przy pomocy testów wieloparametrowych (multiplex), które dają możliwość jednoczasowego oznaczenia stężenia asIgE wobec więcej niż 100 alergenów w trakcie jednej analizy [23]. Tym samym uległa odwróceniu kolejność poszczególnych etapów w diagnostyce alergologicznej z „bottom up” na rzecz strategii „top down” [23, 24]. Koncepcja ta zakłada wykonanie już na samym początku postępowania z chorym, jak najszerszego screeningu wobec potencjalnych alergenów sprawczych. Jest to szczególnie uzasadnione w sytuacji, kiedy konieczna jest stratyfikacja ryzyka związanego z danym uczuleniem i szybkie podjęcie określonej profilaktyki. Niemniej jednak, interpretacja wyniku uzyskanego drogą diagnostyki molekularnej powinna również uwzględniać wyniki pozostałych, opartych na ekstraktach metodach diagnostycznych, zwłaszcza w przypadku niezgodności wyników z wywiadem. Należy również pamiętać, że w chwili obecnej, CRD nie daje możliwości oznaczenia wszystkich molekuł które mają znaczenie kliniczne, stąd nadal istnieje konieczność łączenia różnych testów oraz poszukiwania jeszcze bardziej doskonałych metod diagnostycznych [23].

## 1.6. Test aktywacji bazofila

Test aktywacji bazofila jest nowoczesną metodą diagnostyczną, zyskującą w ostatnich latach coraz większe znaczenie. Jest stosowany w szczególności w przypadkach niejednoznacznych, gdy zostały wyczerpane pozostałe metody diagnostyczne lub w sytuacji wysokiego ryzyka reakcji systemowej w trakcie potencjalnej próby prowokacji [15]. Należy jednak podkreślić, że użyteczność BAT w diagnostyce alergologicznej znacznie wykracza poza te ramy, a powołana przez EAACI grupa zadaniowa ekspertów, nie ustaje w wysiłkach w celu ujednoczenia i standaryzacji metodyki testu [25].

Pierwsze wzmianki na temat BAT sięgają lat 90 XX wieku, kiedy to zespół Knol i wsp. opisał możliwość ilościowego określenia aktywacji bazofili poprzez obserwację ekspresji markera powierzchniowego CD63 pod wpływem stymulacji przeciwciałem anti-IgE [26]. Prekursorem zastosowania w BAT metody cytometrii przepływowej był z kolei Sainte-Laudy [27].

Test aktywacji bazofila w odróżnieniu od innych metod diagnostycznych jest testem funkcjonalnym. Ocenie podlegają komórki efektorowe reakcji alergicznej – bazofile, które pod wpływem stymulacji alergenem ulegają degranulacji, co ma bezpośrednie przełożenie na wzrost ekspresji markerów aktywacji bazofilów. Identyfikacja poszczególnych komórek oraz ocena ekspresji białek powierzchniowych odbywa się przy zastosowaniu cytometrii przepływowej [28].

Poniżej przedstawiono najistotniejsze techniczne aspekty BAT z uwzględnieniem mechanizmów immunologicznych aktywacji bazofilów.

### 1.6.1. Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa jest techniką diagnostyczną, pozwalającą na wielowymiarową analizę cech fizycznych i chemicznych badanych komórek, w oparciu o ich zdolność do rozproszenia światła oraz intensywność fluorescencji. Początki cytometrii datuje się na 1934 rok, kiedy po raz pierwszy opisano urządzenie służące do automatycznego liczenia erytrocytów z wbudowanym detektorem fotoelektrycznym [29]. Obecnie, szerokie zastosowanie cytometrii przepływowej w immunologii oraz hematologii jest związane z wprowadzeniem technologii produkcji przeciwciał monoklonalnych, znakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, takimi jak: izotiocyanian fluoresceiny (FITC), fikoerytryna (PE) oraz peridininochlorofil (PerCP), co pozwoliło na immunofenotypowanie komórek [30, 31]. Opis antygenowych cech komórki, odpowiednich dla jej linii rozwojowej,

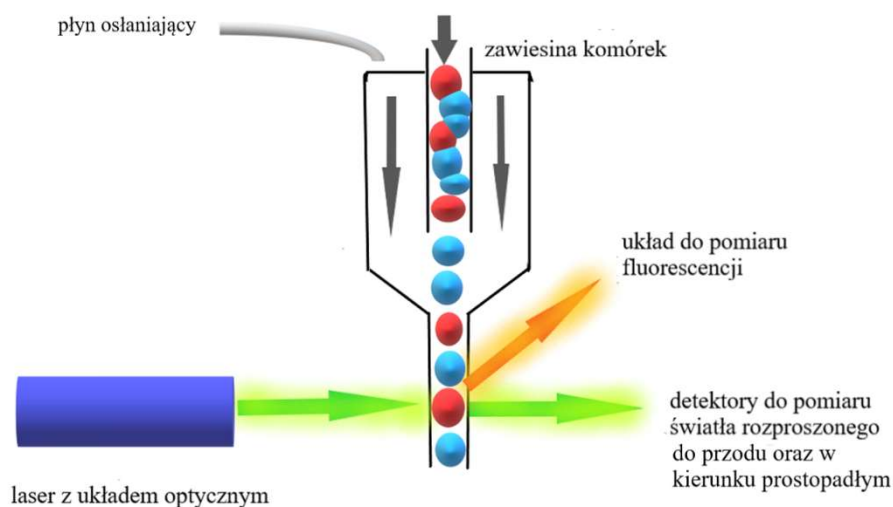


stopnia dojrzałości i aktywności biologicznej umożliwia powszechnie wykorzystywany system CD (cluster of differentiation). Oprócz identyfikacji białek wewnątrzkomórkowych, cytometria przepływowa umożliwia również określanie funkcji poszczególnych komórek, czego doskonałym przykładem może być ocena stopnia aktywacji bazofilów w teście BAT [31].

Cytometr przepływowy składa się z 3 układów:

- hydrodynamicznego, który jest odpowiedzialny za generowanie podciśnienia napędzającego strumień cieczy i zawieszono w nim komórki,
- optycznego, w którego skład m.in. wchodzi laser emitujący światło oraz układ ogniskujący wiązkę laserową, który również filtruje pożądane długości fal,
- elektronicznego, który ma za zadanie przekształcenie sygnału świetlnego na sygnał cyfrowy wraz z możliwościami jego dalszego zapisu w formie plików i ich wszechstronnej analizy.

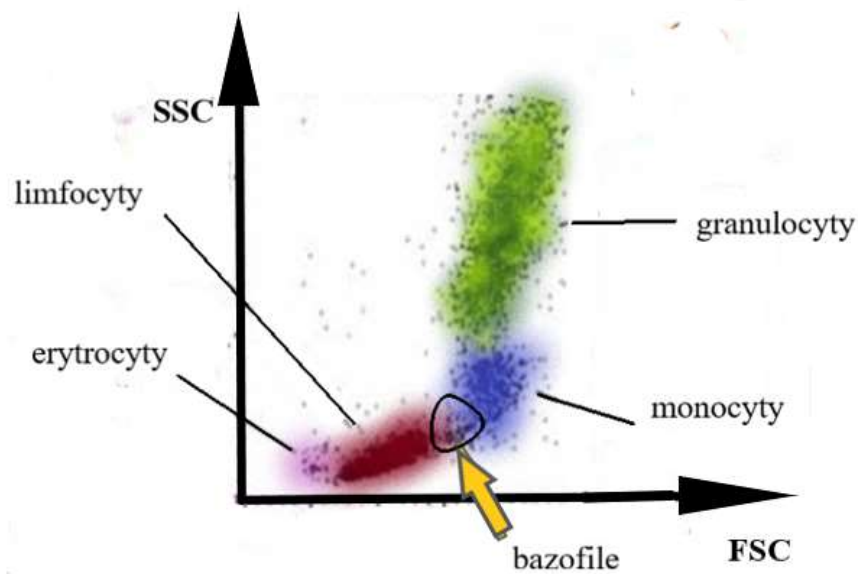
Schemat budowy cytometru przepływowego przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Schemat budowy cytometru przepływowego

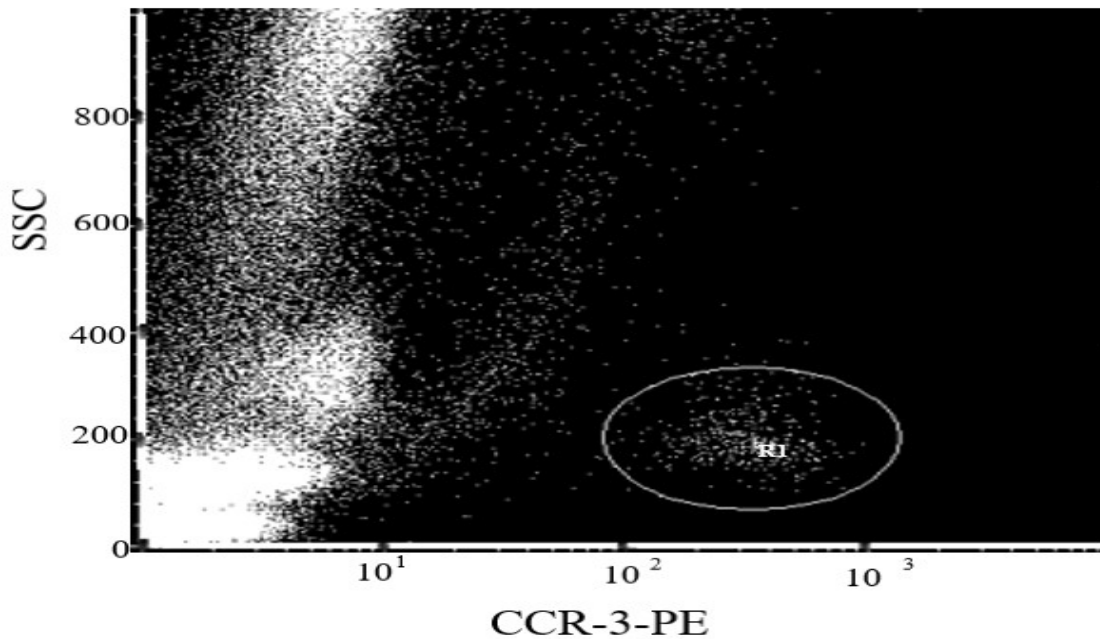
Zawiesina komórek formowana jest w strumień cieczy, który przemieszcza się przez komorę przepływową z określoną prędkością i wzdłuż określonego toru. Na każdą pojedynczą komórkę pada wiązka światła lasera. Światło ulega rozproszeniu w kierunku prostopadłym (SSC, side scatter), co daje informacje o ziarnistościach cytoplazmy oraz strukturach wewnętrznych, lub do przodu (FSC, forward scatter), umożliwiając określenie wielkości i kształtu komórki. W tym samym czasie ma miejsce emisja promieniowania na drodze fluorescencji przez wzbudzone fluorochromy przyłączone do

komórek za pośrednictwem przeciwciał monoklonalnych (każdy z zastosowanych barwników emituje charakterystyczne dla siebie promieniowanie o określonej długości fali). Powstałe impulsy są skupiane i wychwytywane przez zestaw detektorów, a następnie po przekształceniu na sygnał cyfrowy, wysyłane do komputera, analizowane i przedstawiane w formie graficznej [32]. Schemat typowego wykresu kropkowego przedstawiający obraz rozkładu populacji leukocytów w zależności od wielkości komórki i ziarnistości przedstawiono na rycinie 4.

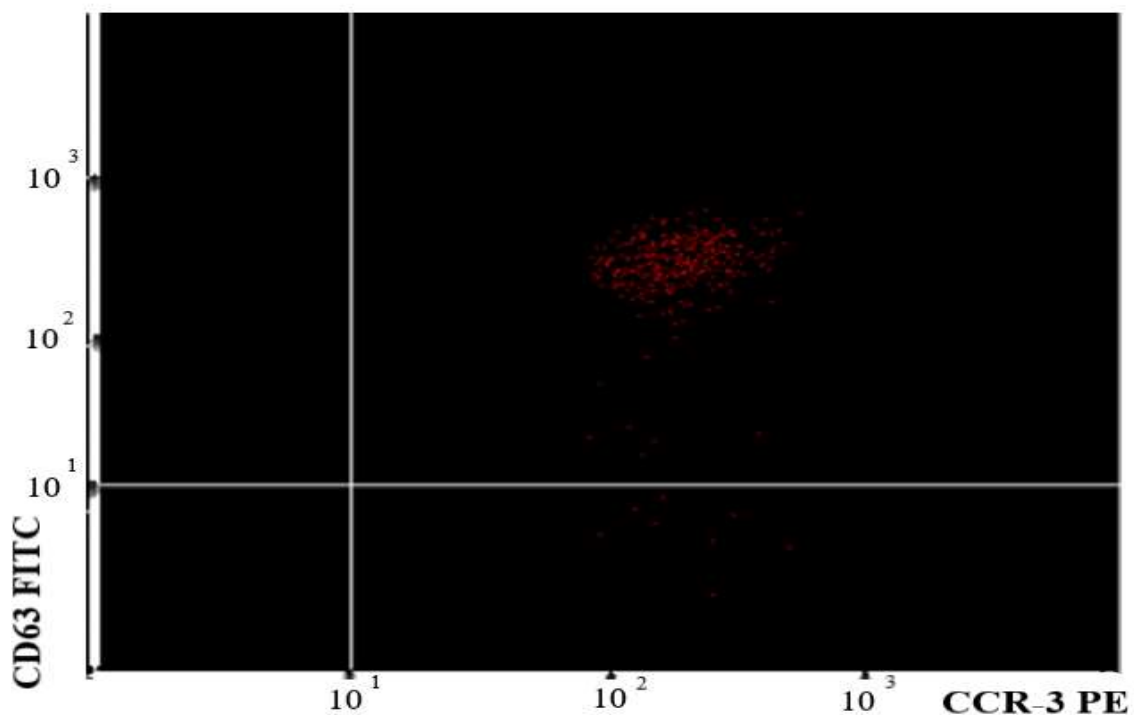


Rycina 4. Schemat rozkładu populacji leukocytów w cytometrze przepływowym w zależności od wielkości komórki i ziarnistości

Powyższy sposób prezentacji wyników zarezerwowany jest jednak do zaledwie dwóch parametrów, pomiędzy którymi przedstawia się wzajemną korelację. W celu wizualizacji danych wieloparametrowych przyjmuje się strategię „bramkowania”. Bramkę stanowi obrysowany kształt, który obejmuje populację komórkową która nas interesuje. Po zobrazowaniu wybranego regionu, możliwa jest dalsza analiza pozostałych zmiennych. Przykładowy sposób przedstawiania danych zaprezentowano na poniższych rycinach (rycina 5 i 6).



Rycina 5. Przykładowy sposób przedstawiania danych uzyskanych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej – strategia bramkowania bazofili – komórki  $CCR3^{positive} / SSC^{low}$



Rycina 6. Przykładowy sposób przedstawiania danych uzyskanych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej: komórki w prawym górnym rogu wykresu – pozytywne dla obu parametrów –  $CCR3^{positive}$  oraz wykazujące wzrost ekspresji CD63 po stymulacji alergenem

Obecnie obserwuje się znaczący rozwój techniki cytometrii przepływowej. Coraz częściej praktykowane jest zastosowanie od kilku do kilkunastu fluorochromów

jednocześnie [33]. Co prawda zwiększa to znacząco poziom skomplikowania badania (konieczne jest precyzyjne odseparowanie wszystkich pasm emisyjnych), z drugiej jednak strony daje bogate możliwości analizy różnorodnych parametrów klinicznych.

### **1.6.2. Bazofile jako komórki efektorowe reakcji alergicznej**

Bazofile jako odrębna linia komórkowa po raz pierwszy została opisana w 1879 roku przez Paula Ehrlicha. Początkowo utożsamiano granulocyty zasadochłonne z mastocytami, uważając, że tylko czasowo rezydują w surowicy, a następnie migrują do tkanek obwodowych. Późniejsze badania wykazały jednak, że bazofile mają unikalne dla siebie cechy i tworzą oddzielną populację komórkową [34].

Bazofile, obok mastocytów, są podstawowymi komórkami efektorowymi reakcji natychmiastowej. Pełnią szczególnie istotną rolę w indukcji odpowiedzi Th2 zależnej oraz stanowią główne źródło IL-4 [3]. Ich znaczenie jednak istotnie wykracza poza udział w patomechanizmie chorób alergicznych. Co prawda granulocyty zasadochłonne występują niemal wyłącznie w surowicy, ale ze względu na obecność receptorów dla integryn (CD11b i CD18) i chemokin mogą brać udział w infiltracji tkanek objętych procesem zapalnym. Zaangażowanie bazofilów w przewlekły proces zapalny udowodniono m.in. w AZS (atopowe zapalenie skóry), astmie eozynofilowej, nefropatii toczniowej, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (POCHP), procesie odrzucenia przeszczepu allogenicznego, a także w patogenezie przewlekłej pokrzywki [34]. Prawdopodobnie ich rola polega również na zapobieganiu infestacji pasożytniczej [35].

Bazofile są najmniej liczną subpopulacją leukocytów stanowiąc zaledwie do 1% wszystkich białych krwinek [36]. Powstają z komórek progenitorowych CD34<sup>+</sup> oraz dojrzewają w szpiku kostnym [22]. Ich różnicowanie oraz proces dojrzewania podlega regulacji poprzez wpływ IL-3. Posiadają charakterystyczne, dwupłatowe jądro oraz podobnie jak komórki tuczne, ziarnistości, które jednak są większe i mniej liczne. Na powierzchni bazofilów znajdują się receptory FcεRI, mające postać tetramerów (αβγ2) [22, 34]. Związanie alergenu z dwoma cząsteczkami IgE, które są zakotwiczone w błonie komórkowej poprzez FcεRI, skutkuje aktywacją bazofilów oraz uwolnieniem ziarnistości mediatorów reakcji alergicznej (charakterystykę poszczególnych mediatorów przedstawiono w tabeli 3) [3, 37]. Towarzyszy temu zwiększenie ekspresji lub też pojawienie się de novo na powierzchni komórek, antygenów typowych dla stanu aktywacji bazofilów – CD63, CD203c, CD107a, CD13, a także CD164 [37].

Tabela 3. Charakterystyka głównych grup mediatorów reakcji alergicznej uwalnianych z ziarnistości bazofilów [3, 37]

Główne grupy mediatorów	Rodzaj mediatora	Działanie
Preformowane (magazynowane w ziarnistościach)	Aminy biogenne: histamina	Zwiększa przepuszczalność naczyń, powoduje skurcz mięśni gładkich, nasila wydzielanie pozostałych mediatorów, działa chemotaktycznie w stosunku do eozynofili
Lipidowe	czynnik aktywujący płytki (platelet-activating factor-PAF)	Zwiększa przepuszczalność naczyń, działa chemotaktycznie w stosunku do neutrofilów i monocytów
	Leukotrieny cysteinylowe: (LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub> )	Powodują skurcz mięśni gładkich oraz wzmożenie wydzielania śluzu, zwiększają przepuszczalność naczyń i produkcję prostaglandyn
Cytokiny i chemokiny	IL-4, IL-13, chemokiny: CCL2 (MCP-1, monocyte chemoattractant protein), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ , macrophage inflammatory protein), CCL5 (RANTES, regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– chemokina RANTES i CCL2 – wpływają na chemotaksję neutrofilów i monocytów</li> <li>– chemokina CCL3 – aktywuje monocyty i eozynofile</li> <li>– IL-4 stymuluje różnicowanie i proliferację limfocytów B, indukuje proces przełączania klas w kierunku immunoglobuliny IgE, rekrutuje eozynofile w obrębie tkanek objętych stanem zapalnym, indukuje różnicowanie naiwnych limfocytów T w kierunku limfocytów Th2, które wytwarzają kolejne partie IL-4.</li> </ul>

W związku z możliwością identyfikacji populacji bazofilów przy zastosowaniu metody cytometrii przepływowej, opisane powyżej zjawiska immunologiczne stały się przedmiotem badań oraz zostały zaangażowane w testy diagnostyczne „in vitro”, co jest przedmiotem dalszej części pracy.

### 1.6.3. Protokół identyfikacji bazofilów

Precyzyjna identyfikacja bazofilów stanowi warunek konieczny dla poprawnej interpretacji wyników testu aktywacji bazofila. W tym celu istnieje potrzeba zastosowania selektywnego, dedykowanego głównie bazofilom markera powierzchniowego, którego ekspresja nie ulega zmianom podczas aktywacji komórek. Początkowo w celu określenia podstawowej puli bazofilów stosowano znakowane fluorescencyjne poliklonalne przeciwciała anti-IgE [38]. Selekcjonowanie bazofilów oparte jedynie na immunofenotypie IgE<sup>positive</sup>, okazało się być jednak mało wydajne, ze względu na to, że receptory Fc $\epsilon$ RI obecne są również na monocytach i eozynofilach [39].

Ponadto, ekspresja receptorów FcεRI na powierzchni komórek jest zróżnicowana osobniczo (dysproporcje zaobserwowano nawet wśród bazofilów tej samej osoby) oraz koreluje ze stężeniem IgE w surowicy (możliwy problem z bramkowaniem bazofilów u osób z niskim stężeniem tej immunoglobuliny) [38, 40].

Obecnie w większości badań, strategia identyfikacji bazofilów opiera się na charakterystyce rozproszenia, odzwierciedlającej wielkość i ziarnistość komórek, w połączeniu z zastosowaniem określonych markerów powierzchniowych takich jak IgE, CCR3, CD203c, CD123, CRTH2 (ich ogólną charakterystykę przedstawiono w tabeli 4). Różne kombinacje pomiędzy markerami tworzą określony protokół identyfikacji bazofilów [23].

Tabela 4. Charakterystyka głównych markerów identyfikacji bazofilów [23]

Marker identyfikacji	Występowanie	Charakterystyka
CCR3	Bazofile, eozynofile, aktywowane limfocyty Th2	Duża stabilność, choć obserwowano w niektórych przypadkach dyskretny spadek ekspresji po stymulacji alergenem; nie jest swoisty dla bazofilów.
IgE	Bazofile, komórki dendrytyczne, monocyty	Duża zmienność populacyjna, konieczność różnicowania z pozostałymi komórkami wykazującymi ekspresję FcεRI. Spadek ekspresji po stymulacji swoistej (alergen) i nieswoistej (anty-IgE, fLMP).
CD203c	Bazofile, mastocyty, komórki progenitorowe CD34 <sup>+</sup>	Jest jednocześnie markerem identyfikującym bazofile jak i markerem aktywacji; CD203c wykazuje niską ekspresję na bazofilach w fazie spoczynku.
CD123	Bazofile, plazmacytoidalne komórki dendrytyczne	Konieczność różnicowania z komórkami dendrytycznymi, możliwy spadek ekspresji przy aktywacji bazofilów.
CRTH2	Bazofile, eozynofile, limfocyty Th2	Konieczność różnicowania z eozynofilami i limfocytami, nieliczne badania z zastosowaniem CRTH2 (alergia na roztocze, lateks).

Jednym z powszechnie stosowanych protokołów identyfikacji bazofilów jest CD123<sup>positive</sup> i HLA-DR<sup>negative</sup> [41]. CD123 czyli podjednostka alfa receptora interleukiny-3 (IL-3Ra – interleukin-3 receptor subunit alpha) charakteryzuje się wysoką ekspresją w obrębie bazofilów oraz plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych (mniejszą w zakresie monocytów, eozynofilów i mieloidalnych komórek dendrytycznych) [39]. Tym samym, w celu wyłonienia odpowiednio „czystej” populacji

bazofilów, obok antygeny CD123, konieczne jest zastosowanie dodatkowego markera powierzchniowego. Barwienie HLA-DR pozwala na rozróżnienie bazofilów które są HLA-DR ujemne, od komórek dendrytycznych i monocytów HLA-DR dodatnich. Przytoczony protokół identyfikacji bazofilów jak dotąd uważany jest za jeden z najbardziej precyzyjnych. Ostatnio pojawiły się jednak doniesienia, choć ostatecznie nie ma w tej kwestii zgodności [42], że ekspresja CD123 może ulegać zmianie (zmniejszeniu) w trakcie aktywacji bazofilów [41]. W związku z tym, na tym etapie może dochodzić do pewnej „straty” komórek, co prowadzi do niedoszacowania stopnia aktywacji bazofilów. Co więcej, wykazano że również ekspresja HLA-DR może ulegać zmianie przy współistnieniu stanu zapalnego [36, 40]. Santos i wsp. wskazują, że większą stabilność w tym względzie można osiągnąć poprzez dodatkowe zastosowanie CD203c czyli wykorzystując protokół:  $SSC^{low}/CD203c^{positive}/CD123^{positive}/HLA-DR^{negative}$  [41]. Rzeczywiście, zaangażowanie wielu markerów identyfikacyjnych pozwala z reguły na wyodrębnienie odpowiednio „czystej” populacji bazofilów, jednak kosztem wydłużenia procedury oraz znaczących konsekwencji finansowych. CD203c, który występuje na bazofilach krwi, komórkach tucznych i komórkach progenitorowych  $CD34^{+}$ , jest również stosowany jako samodzielny marker identyfikacyjny bazofilów [25]. Istotną niedoskonałością tej strategii bramkowania jest występowanie niskiej ekspresji tego antygeny na bazofilach spoczynkowych. Opracowany przez Boumiza i wsp. protokół identyfikacji oparty na immunofenotypie  $SSC^{low}/CRTH2^{positive}/CD3^{negative}/CD203c^{positive}$  pozwala na rozwiązanie tej kwestii [43]. Komórkami, które wykazują ekspresję CRTH2 są bazofile, eozynofile oraz limfocyty Th2. Wykluczenia eozynofili dokonuje się na podstawie analizy rozproszenia bocznego na ziarnistościach wewnątrzkomórkowych, natomiast limfocytów poprzez znakowanie przeciwciałem anti-CD3. W ten sposób wyłoniona populacja bazofilów charakteryzuje się dużą „czystością”, jednakże należy podkreślić, że procedura wymaga zastosowania aż trzech barwników. Ponadto dotychczas metoda była stosowana jedynie w badaniach nad pacjentami z alergią na roztocze kurzu domowego i lateks, dlatego konieczne są dalsze prace nad tą techniką [37].

Kolejną strategią identyfikacji bazofilów jest zastosowanie protokołu  $SSC^{low}/CCR3^{positive}$ . Co ważne, zwłaszcza w kontekście poprzednich metod, udowodniono, że CCR3 jest markerem o dużej stabilności, pozwalającym na wysoce selektywne wyłonienie populacji bazofilów bez konieczności stosowania dodatkowych markerów i znaczników fluorescencyjnych [40]. Co prawda, w niektórych badaniach zaobserwowano pewne zmniejszenie ekspresji CCR3 na powierzchni

bazofilów po stymulacji alergenem, jednak wydaje się że uzyskana w ten sposób „strata” komórek jest niewielka i nie wpływa ostatecznie na uzyskane wyniki [40, 41, 44]. Ze względu na obecność receptora dla CCR3 również na monocytach, komórkach dendrytycznych oraz aktywowanych limfocytach Th2 istnieje możliwość „zanieczyszczenia” populacji bazofilów przez te grupy komórek, co dodatkowo nie może zostać skorygowane poprzez pomiar ich wielkości oraz analizę rozproszenia bocznego na ziarnistościach wewnątrzkomórkowych [39]. Jak wskazują badania, jest to odsetek na ogół na poziomie około 1% [40]. Podsumowując, można stwierdzić, że protokół identyfikacji bazofilów z zastosowaniem przeciwciała anti-CCR3 jest optymalny. Charakteryzuje się dużą „czystością” wyłonionej populacji bazofili, stabilnością oraz nie wymaga zastosowania dodatkowych markerów identyfikacyjnych.

#### **1.6.4. Markery aktywacji bazofilów**

Ocena ekspresji antygenów typowych dla stanu aktywacji bazofilów, po stymulacji alergenowej stanowi kluczowy element BAT. Obecnie najpowszechniej stosowanymi markerami są CD63 oraz CD203c. W dalszej kolejności wymieniane są również CD107a, CD13, a także CD164 [45].

CD63 jest białkiem powierzchniowym o masie cząsteczkowej 53 kD należącym do rodziny tetraspanin. Oprócz bazofilów występuje również na płytkach krwi, monocytach, makrofagach i komórkach tucznych. Liczne badania wykazały, że ekspresja CD63 na powierzchni bazofilów jest silnie skorelowana z uwalnianiem histaminy z ziarnistości wewnątrzkomórkowych, co sprawia, że BAT z wykorzystaniem CD63 jest uważany za wiarygodną metodę diagnostyczną nadwrażliwości IgE-zależnej [37, 46].

Drugim, najczęściej stosowanym markerem aktywacji bazofilów jest CD203c, należący do rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz. CD203c jest ektoenzymem, który występuje konstytutywnie na powierzchni spoczynkowych bazofilów, tym samym stając się częścią protokołów identyfikacji tej populacji komórkowej. Pod wpływem stymulacji alergenem ekspresja CD203c wzrasta, co pozwala na jego wykorzystanie również jako markera aktywacji [37].

Jak dotąd, istnieją sprzeczne doniesienia który z antygenów wykazuje większą użyteczność w diagnostyce chorób alergicznych. Jest to zagadnienie niezwykle złożone, ponieważ dokładność testu BAT wykazuje różnice nie tylko w zależności od zastosowanego antygeny, ale również od rodzaju alergenu, czy przyjętej techniki oznaczenia [46]. Dodatkowym problemem jest niewielka ilość badań porównujących



pozostałe markery aktywacji, dlatego też w większości sytuacji test aktywacji bazofila opiera się na tych najlepiej poznanych, czyli CD63 i CD203c. Należy więc uznać, że kwestia poszukiwania markera aktywacji bazofilów, cechującego się jeszcze większą dokładnością diagnostyczną niż obecnie stosowane, nadal pozostaje otwarta.

## 2. Cel pracy

W ciągu ostatnich dekad można zaobserwować stały, sukcesywny wzrost zapadalności na choroby alergiczne. Aktualnie istnieje potrzeba podjęcia szerokich działań mających na celu rozwiązanie tego problemu, a przede wszystkim wdrożenia precyzyjnej diagnostyki o jak największej czułości i swoistości, której celem jest możliwość podjęcia w każdym przypadku, odpowiedniej profilaktyki oraz zastosowania spersonalizowanej terapii. Obecnie podstawą diagnostyki nadwrażliwości IgE-zależnej nadal pozostają punktowe testy skórne, które jednak mają swoje wady i ograniczenia (m.in. konieczność odstawienia leków mogących działać supresyjnie na odpowiedź natychmiastową w obrębie skóry, potencjalne ryzyko wystąpienia reakcji uogólnionej). Ważną i bezpieczną alternatywę dla testów „in vivo”, stanowią metody „in vitro” – przede wszystkim oznaczenie asIgE, ale również test aktywacji bazofila, który doskonale wpisuje się w zamysł medycyny profilowanej molekularnie. BAT spełnia wiele cech idealnego biomarkera: jest wysoce powtarzalny, daje możliwość oznaczenia w mało inwazyjny sposób, jest dobrym narzędziem do monitorowania efektów leczenia terapii immunomodulacyjnych, może prowadzić do zmniejszenia odsetka wykonywanych prób prowokacyjnych. Od wielu lat, najczęściej wykorzystywanymi w BAT markerami aktywacji są CD63 oraz w mniejszym stopniu CD203c. Ze względu na niewielką ilość badań porównawczych, istnieją sprzeczne doniesienia, który z antygenów wykazuje większą użyteczność w diagnostyce chorób alergicznych. Ponadto, żaden z nich nie osiąga absolutnej swoistości i czułości, nawet w przypadku alergii na alergeny wziewne. Alternatywą wartą uwagi, o prawdopodobnie porównywalnej dokładności diagnostycznej co CD63 wydaje się być antygen CD164. Badania dotyczące znaczenia CD164 w diagnostyce chorób alergicznych jak dotąd mają jednak ograniczony zasięg i wymagają kontynuacji.

Jedną z najczęściej występujących chorób na świecie (dotyczy nawet 17–28,5% dorosłej populacji Europy), rozwijającą się na tle nadwrażliwości IgE-zależnej, jest alergiczny nieżyt nosa. Objawy ANN obniżają jakość życia, wpływają na funkcje poznawcze, zmniejszają produktywność w pracy, stanowiąc tym samym istotny ciężar dla systemu opieki zdrowotnej. Kluczowe znaczenie dla rozwoju przewlekłego ANN mają alergeny roztoczy kurzu domowego. Uczulenie na HDM wiąże się również ze zwiększeniem ryzyka wystąpienia astmy oraz wpływa znacząco na jej kontrolę

(m.in. ze względu na właściwości proteolityczne alergenów roztoczy oraz ich zdolność do promocji i intensyfikacji odpowiedzi limfocytów Th2). Ze względu na tak wysoki potencjał alergizujący HDM oraz ich wiodące znaczenie w patogenezie chorób alergicznych zdecydowano o wykorzystaniu alergenu *D. farinae* w niniejszym badaniu.

Celem pracy jest:

1. Określenie przydatności testu aktywacji bazofilów z oceną ekspresji markera powierzchniowego CD164 w diagnostyce alergii na *Dermatophagoides farinae* poprzez porównanie uzyskanych wyników z punktowymi testami skórnymi oraz oznaczeniem stężenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE i oceną ekspresji CD63.
2. Wykazanie w jakim stopniu łączna ocena zastosowanych testów podnosi możliwości laboratoryjnych metod diagnostycznych w badaniu alergii na *Dermatophagoides farinae*.

## **3. Materiał i metody**

### **3.1. Metody**

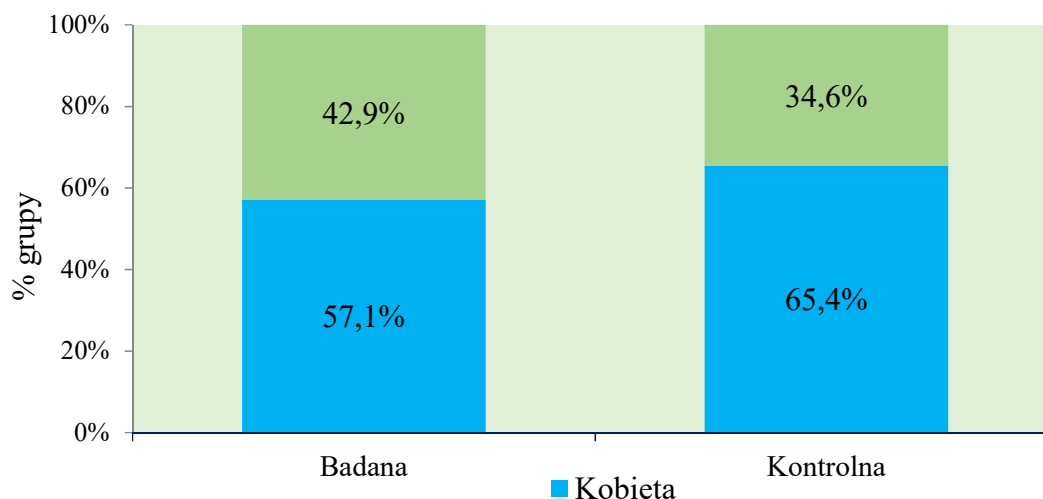
Badanie było prowadzone w okresie od marca do czerwca 2021 roku w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii we Wrocławiu. Przed rozpoczęciem projektu uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (zgoda nr 255/2019). Projekt prowadzono zgodnie ze standardami zawartymi w Deklaracji Helsińskiej oraz wytycznymi Dobrej Praktyki Klinicznej. Wszyscy uczestnicy badania zostali szczegółowo poinformowani o jego charakterze i wyrazili pisemną zgodę. Badanie każdej osoby odbywało się indywidualnie. Każda z osób była zobligowana do odstawienia przyjmowanych leków antyhistaminowych (jeśli je stosowała) na co najmniej 7 dni przed zgłoszeniem się do Kliniki. W dniu badania zbierano od uczestników szczegółowy wywiad połączony z wypełnieniem kwestionariusza, następnie wykonywano punktowe testy skórne z zestawem alergenów wziewnych oraz pobierano krew (krew pełna, żylna). Niezwłocznie po uzyskaniu materiału, miała miejsce diagnostyka laboratoryjna, tj. ilościowe oznaczenie ekspresji markerów aktywacji (CD63, CD164) na powierzchni bazoofilów, po stymulacji alergenem, metodą cytometrii przepływową (test aktywacji bazofila). W końcowym etapie oznaczano alergenowo specyficzne przeciwciała IgE kierunku *Dermatophagoides farinae*, a pozyskane dane analizowano oraz formułowano wnioski.

### **3.2. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej**

W badaniu łącznie uczestniczyło 54 osób w wieku 21–65 lat. Do grupy badanej zakwalifikowano 28 osób z objawami przewlekłego alergicznego nieżytu nosa na podłożu uczulenia na roztocze kurzu domowego (*Dermatophagoides farinae*). Byli to pacjenci Poradni Przyklinicznej Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Grupę kontrolną stanowiło 26 osób zdrowych, z ujemnymi wynikami punktowych testów skórnych z alergenami wziewnymi (zestaw alergenów zastosowanych w badaniu przedstawiono w rozdziale 3.3.1.).

Grupę badaną i kontrolną starano się dobrać w sposób reprezentatywny, tak aby obie grupy były statystycznie porównywalne pod względem płci, wieku, wagi i wzrostu. Poniżej przedstawiono ich szczegółową charakterystykę.

W grupie badanej kobiety stanowiły 57,1%, a mężczyźni 42,9%. W grupie kontrolnej, proporcje były podobne, odsetek kobiet wynosił 65,4%, natomiast mężczyzn 34,6%. Strukturę poszczególnych grup pod względem płci przedstawiono w poniższych zestawieniach (Rycina 7, Tabela 5).



Rycina 7. Procentowy rozkład płci w grupie badanej i kontrolnej

Tabela 5. Struktura grupy badanej i kontrolnej według płci

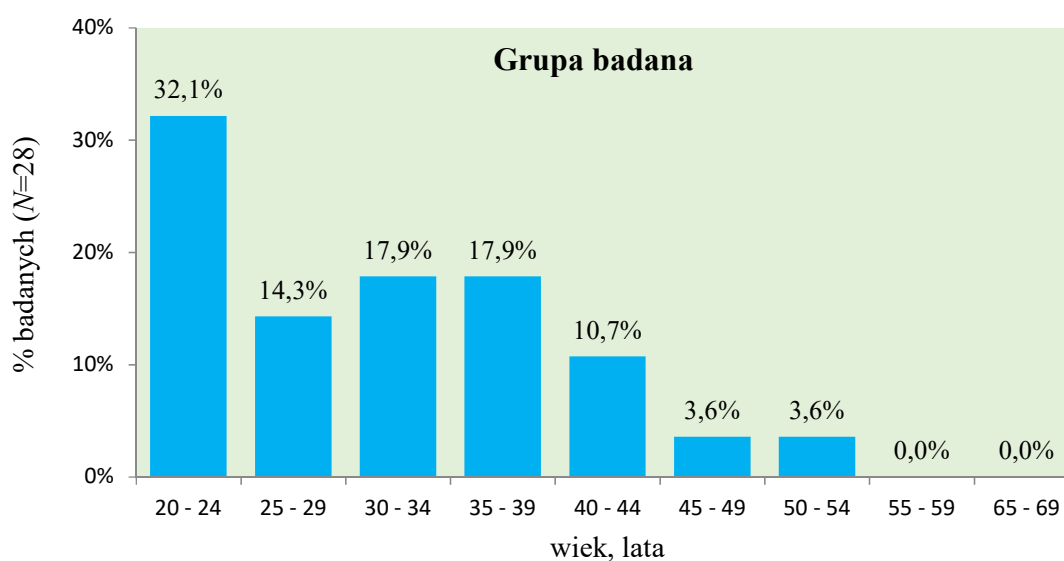
Zmienna	Grupa badana (N = 28)	Grupa kontrolna (N = 26)	Statystyka testowa	P
<b>Płeć, n (%)</b>				
<b>K</b>	16 (57,1)	17 (65,4)	$\chi^2 = 0,12$ $df = 1$	0,733
<b>M</b>	12 (42,9)	9 (34,6)		

$\chi^2$  – wartość statystyki testu Chi-kwadrat Pearsona,  $df$  – stopnie swobody.

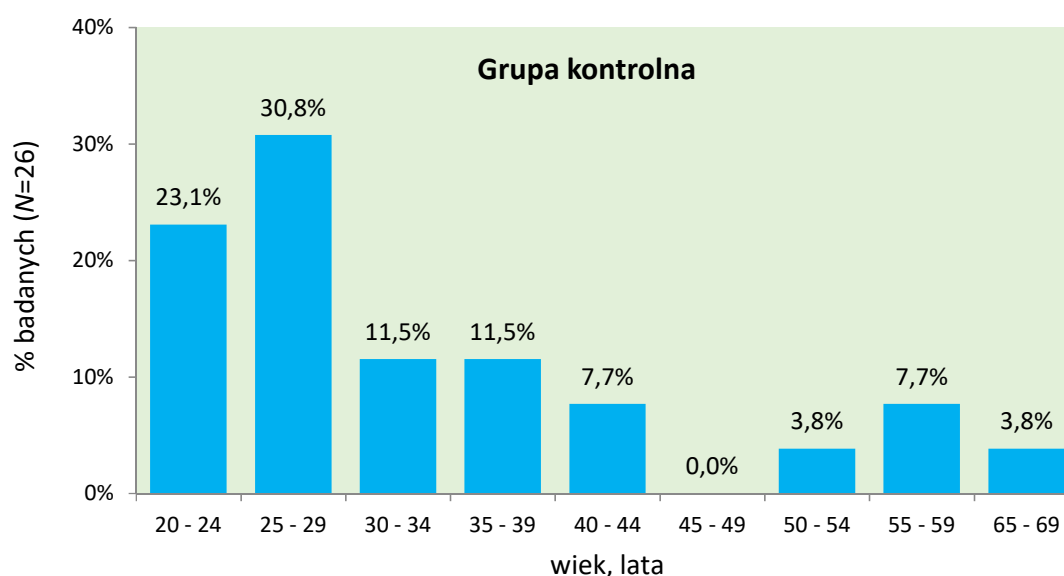
Jak wynika z przedstawionych danych, zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej przeważały kobiety, co jest spójne z danymi demograficznymi dotyczącymi struktury płci w Polsce, gdzie również występuje nadwyżka liczby kobiet nad liczbą mężczyzn (51,66% kobiet vs 48,34% mężczyzn) [47]. W wykonanej analizie statystycznej z zastosowaniem testu Chi-kwadrat Pearsona wykazano, że różnica w strukturze płci pomiędzy grupą kontrolną i badaną jest nieistotna statystycznie ( $p = 0,733$ ). Tym samym, uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, iż nie ma podstaw do odrzucenia założenia o równości grup pod względem płci.

W dalszym etapie przeanalizowano strukturę wieku w obu grupach. Średni wiek w grupie badanej wynosił 31,04, z odchyleniem standardowym  $\pm 8,61$  lat i wahał się między 21 a 50 lat. Rozpiętość wieku w grupie kontrolnej wynosiła 21–65 lat, natomiast

średnia  $33,35 \pm 12,43$  lat. Poniżej przedstawiono histogramy obrazujące procentowy rozkład wieku w poszczególnych grupach (Ryciny 8 i 9).



Rycina 8. Histogram struktury wieku w grupie badanej

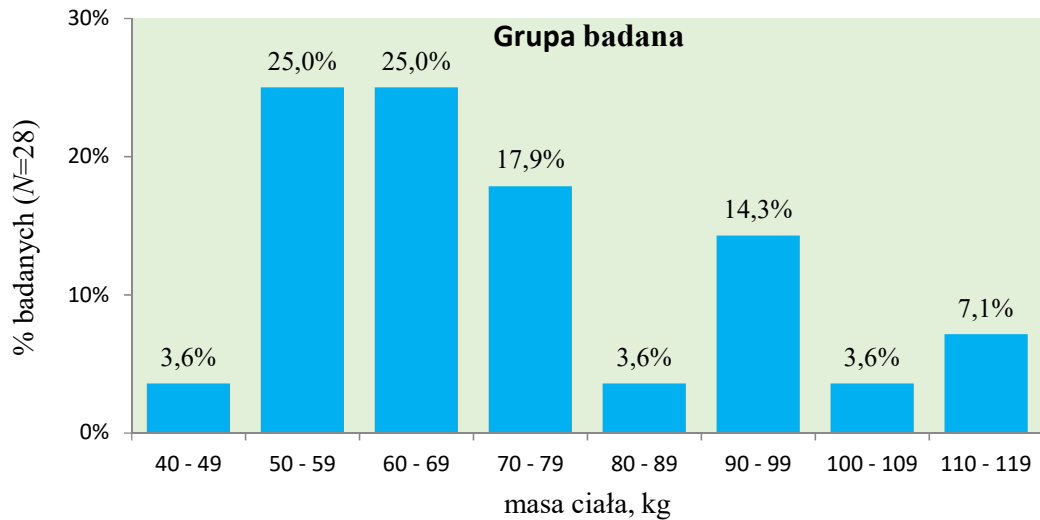


Rycina 9. Histogram struktury wieku w grupie kontrolnej

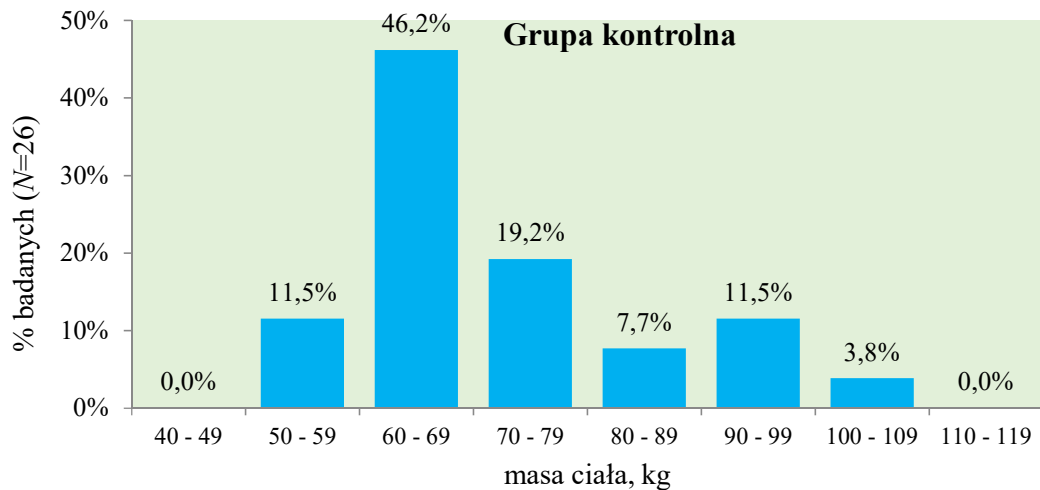
W obu grupach, większość uczestników stanowiły osoby młode, w wieku 20–30 lat. W grupie badanej największy odsetek stanowili pacjenci w przedziale wiekowym 20–24 lata. Taka struktura wieku stanowi odzwierciedlenie występowania alergicznego nieżytu nosa w populacji ogólnej. Choć ANN może być rozpoznany w każdym wieku, najliczniejszą część grupy chorych stanowią jednak dzieci i osoby młode [7]. W dalszym etapie wykonano analizę

statystyczną. W ocenie zależności pomiędzy grupami zastosowano test U Manna-Whitneya; różnica wieku okazała się być statystycznie nieistotna ( $p = 0,709$ ).

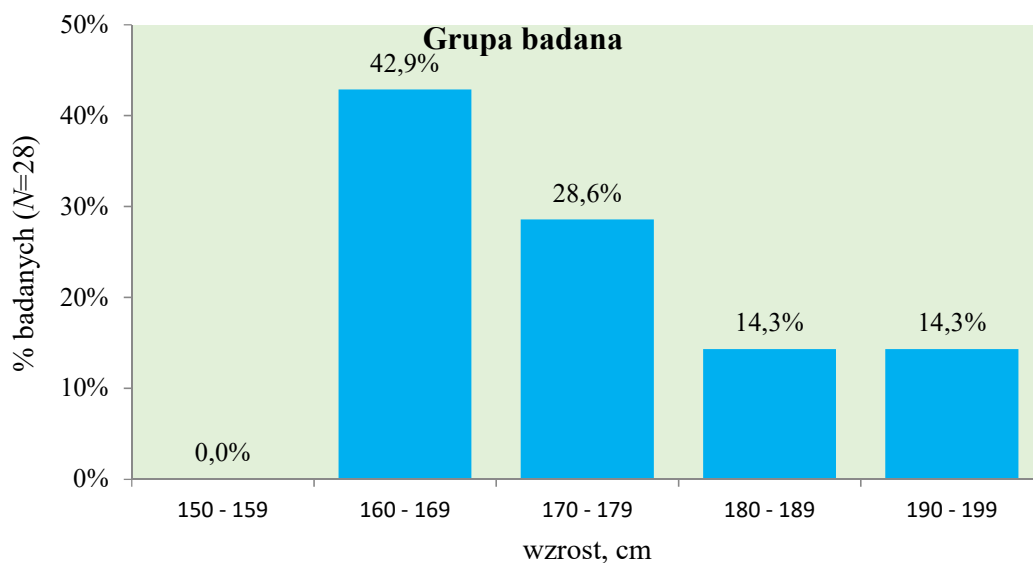
Kolejnymi analizowanymi zmiennymi numerycznymi były wzrost oraz masa ciała. Poniżej przedstawiono histogramy obrazujące rozkład masy ciała i wzrostu w grupie kontrolnej oraz badanej (ryciny 10–13).



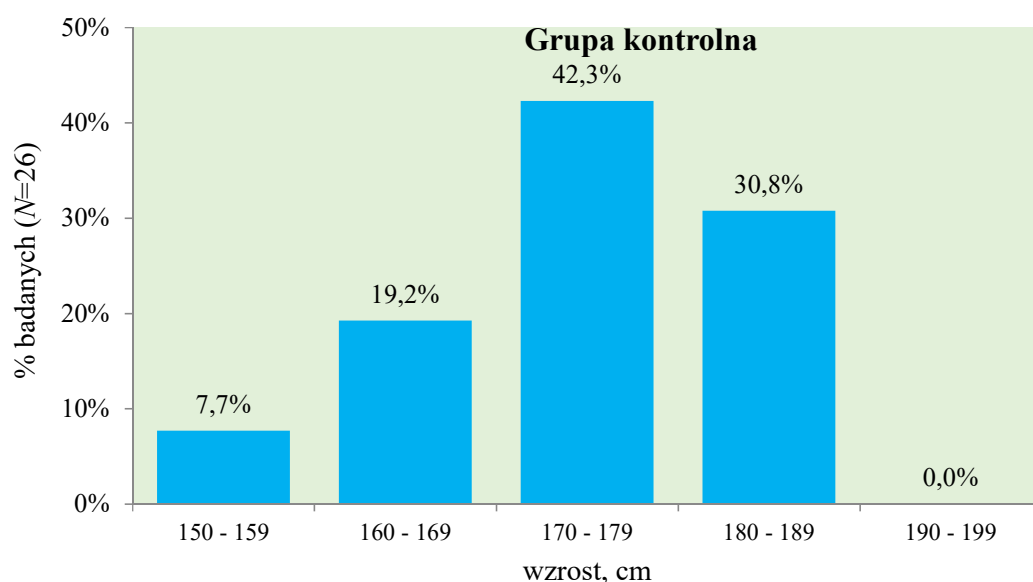
Rycina 10. Histogram rozkładu masy ciała w grupie badanej



Rycina 11. Histogram rozkładu masy ciała w grupie kontrolnej



Rycina 12. Histogram rozkładu wzrostu w grupie badanej



Rycina 13. Histogram rozkładu wzrostu w grupie kontrolnej

Masa ciała w grupie badanej wyniosła średnio (średnia arytmetyczna)  $72,25 \pm 18,70$  kg, średni wzrost  $173,61 \pm 10,78$  cm. Osoby z grupy kontrolnej mierzyły średnio  $172,85 \pm 7,91$ , średnia waga wyniosła  $70,35 \pm 13,51$  kg. Zarówno masa ciała jak i wzrost nie różnicowały grup w statystycznie istotny sposób ( $p = 0,668$ ;  $p = 0,768$ ). W tabeli 6 zestawiono podstawowe parametry statystyczne wszystkich zmiennych numerycznych (wiek, masa ciała, wzrost) oraz wyniki analizy statystycznej. W przypadku parametrów wzrostu oraz masy ciała, zbadany przy pomocy testu Shapiro-Wilka rozkład zmiennych, potwierdził rozkład normalny jedynie dla wzrostu w grupie



kontrolnej, ale współczynnik skośności oraz kurtoza spełniały warunki zbieżności z rozkładem normalnym, stąd zdecydowano o zastosowaniu w tych przypadkach testu t dla prób niezależnych.

Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej pod względem wieku, masy ciała i wzrostu

Zmienna	Grupa badana (N = 28)							Grupa kontrolna (N = 26)							MD (95% CI)	Statystyka testowa	p
	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.			
Wiek, lata	31,04	8,61	30,50	23,75	36,00	21,00	50,00	33,35	12,43	29,00	25,00	38,50	21,00	65,00	1,50 (-4,00; 5,00)	W = 342,00	0,709
Masa ciała, kg	71,25	18,70	65,50	57,75	86,25	48,00	110,00	70,35	13,51	66,00	61,00	77,00	52,00	105,00	1,90 (-6,97; 10,78)	t = 0,43 df = 49	0,668
Wzrost, cm	173,61	10,78	170,00	164,75	180,50	160,00	196,00	172,85	7,91	173,00	169,25	180,00	158,00	187,00	0,76 (-4,38; 5,90)	t = 0,30 df = 49	0,768

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Q1 – kwartyl pierwszy, Q3 – kwartyl trzeci, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna, MD – różnica średnich (grupa badana vs. grupa kontrolna) z 95% przedziałem ufności (CI), W – wartość statystyki testu U Manna-Whitneya, t – wartość statystyki testu t dla prób niezależnych, df – liczba stopni swobody.

Podsumowując, na podstawie powyżej przytoczonych analiz można wywnioskować, że obie grupy – badana i kontrolna były do siebie podobne w statystycznie istotny sposób pod względem płci, wieku, masy ciała i wzrostu.

### 3.3. Materiały i narzędzia badawcze

#### 3.3.1. Autorski kwestionariusz

W początkowym etapie badania uczestnicy mieli za zadanie wypełnienie kwestionariusza. Jego treść można podzielić na 3 części:

1. Część A: dane osobowe oraz dane ogólne – wiek, masa ciała, wzrost, płeć.
2. Część B: dane kliniczne – objawy przewlekłego alergicznego nieżytu nosa oraz określenie stopnia jego nasilenia (łagodny, umiarkowany/ciężki), obecność chorób laryngologicznych, współistnienie innych chorób o podłożu atopowym, wcześniejsza diagnostyka w kierunku występowania chorób alergicznych, stosowanie immunoterapii alergenowej, czas jej trwania, dane dotyczące stosowanych leków antyhistaminowych oraz czas ich odstawienia przed badaniem.
3. Część C: wyniki testów skórnych.

Poniżej przedstawiono pełną treść kwestionariusza.

Data badania

.....

### Kwestionariusz badania

GRUPA B / K

#### A: Informacje ogólne

1. Imię i nazwisko, adres, telefon kontaktowy/adres e-mail
2. Data urodzenia
3. Wiek
4. Waga
5. Wzrost

#### B: Dane kliniczne

1. Czy u Pana/ i występują następujące objawy:

Niedrożność nosa  Kichanie  Świąd nosa  Wodnisty wyciek z nosa

2. Czy tym problemom zwykle towarzyszy swędzenie/ łzawienie oczu?

TAK                      NIE

3. Czy wymienione objawy występują przez większą część dni w tygodniu (> 4) oraz > 4 tygodnie w roku?

TAK                      NIE

4. Jak długo trwają powyższe dolegliwości?

Ilość lat

5. Czy wymienione wyżej objawy:

obniżają jakość snu  wpływają na codzienną aktywność, sport  zaburzają funkcjonowanie w pracy/szkole

6. Czy kiedykolwiek Pan/i był leczony z powodu polipów nosa/przewlekłego zapalenia zatok?

TAK                      NIE

7. Czy kiedykolwiek wykonano u Pana/i punktowe testy skórne lub oznaczano sIgE w surowicy z alergenami wziewnymi?

TAK                      NIE

WYNIK       DODATNI       UJEMNY

Proszę wymienić alergen/y dla których wynik wypadł dodatnio.....

8. Czy kiedykolwiek rozpoznano u Pana/i astmę lub inne choroby alergiczne?

TAK                      NIE              Jakie?.....

9. Czy kiedykolwiek u Pana/i podejmowano leczenie immunoterapią alergenową?

TAK                      NIE

Jak długo stosowano

Nazwa preparatu

10. Czy Pan/Pani stosuje leki antyhistaminowe? Kiedy Pan/Pani przyjął/a ostatnią dawkę leku?

Lek	Dawka	Data odstawienia
1.		
2.		
3.		

11. Na jakie inne choroby przewlekłe Pan/i choruje?

.....  
.....  
.....

### C: Wyniki testów skórnych

Kontrola dodatnia.....

Kontrola ujemna.....

Dermatophagoides farinae.....

Dermatophagoides pteronyssinus.....

Alternaria alternata.....

Trawy.....

Żyto zwyczajne.....	
Bylica pospolita.....	
Brzoza brodawkowata.....	
Leszczyna pospolita.....	
Olcha.....	
Sierść kota.....	
Sierść psa.....	

### **3.3.2. Sprzęt laboratoryjny i odczynniki**

Badania laboratoryjne przeprowadzono w Laboratorium Naukowym Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Poniżej sporządzono szczegółową listę aparatury oraz wykorzystanych do analizy odczynników z uwzględnieniem podziału na poszczególne techniki badania.

#### Test aktywacji bazofila

##### *Stała aparatura:*

- Cytometr przepływowy Becton-Dickinson, FACS Calibur, San Diego, Stany Zjednoczone.
- Wirówka laboratoryjna z chłodzeniem MPW-352 R, MPW Med. instruments, Warszawa, Polska.
- Wyrząsarka Vortex V-3, Elui Ltd., Ryga, Łotwa.
- Inkubator CO2 Galaxy 48S, Model: CO048-S230, New Brunswick, Wielka Brytania.

##### *Próbówki i systemy do pobierania krwi:*

- Probówki do cytometrii przepływowej, BD Falcon, Becton Dickinson, San Diego, Stany Zjednoczone.
- Jednorazowe zamknięte systemy aspiracyjno-próżniowe BD Vacutainer o objętości 4 ml z dodatkiem EDTA, Becton Dickinson, San Diego, Stany Zjednoczone.

##### *Odczynniki:*

- Alergen roztoczy kurzu domowego (*Dermatophagoides farinae*), Bühlmann Laboratories A.G., Schönenbuch, Szwajcaria.

- Polyclonal Rabbit anti-Human IgE antibody, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dania.
- Human CCR3 Phycoerythrin mAb (clone 61828), R&D Systems, Minneapolis, Stany Zjednoczone.
- Flow Cast Basophil Activation Test kit, Bühlmann Laboratories A.G., Schönenbuch, Szwajcaria:
  - Staining Reagent Mix (Basophil Detection and Activation Markers: Mix of anti-CD63-FITC and anti-CCR3-PE mAb).
  - Stimulation Buffer (zawierający wapń, heparynę i IL3).
  - Lysing Solution.
- FITC Mouse Anti-Human CD 164, BD Biosciences, San Diego, Stany Zjednoczone.
- Bufor do płukania cytometru, BD FACSTFlow Sheath Fluid, BD Biosciences, San Diego, Stany Zjednoczone.

#### Punktowe testy skórne:

- Lancety, Allergopharma-Nexter, Reinbek, Republika Federalna Niemiec.
- HAL Allergy Prick Test, roztwór do punktowych testów skórnych, HAL Allergy, Leiden, Holandia:
  - Wyciągi alergenowe – roztocze kurzu domowego:
    - Dermatophagoides pteronyssinus 10.000 AU/ml (Allergy Units/ml).
    - Dermatophagoides farinae 10.000 AU/ml.
  - Wyciągi alergenowe grzybów/ pleśnie:
    - Alternaria alternata 5.000 AU/ml.
  - Mieszanki wyciągów alergenowych/mieszanka traw:
    - Kłósówka wełnista, Kostrzewa czerwona, Kupkówka pospolita, Mietlica rozłogowa, Rajgras wyniosły, Tomka wonna, Tymotka łąkowa, Wiechlina łąkowa, Życica trwała, Żyto zwyczajne 10.000 AU/ml.
  - Alergeny pochodzenia roślinnego/zboża:
    - Żyto zwyczajne 10.000 AU/ml.
  - Alergeny pochodzenia roślinnego/chwasty:
    - Bylica pospolita 10.000 AU/ml.
  - Alergeny pochodzenia roślinnego/drzewa:
    - Brzoza brodawkowata 10.000 AU/ml.

- Leszczyna pospolita 10.000 AU/ml.
- Olsza 10.000 AU/ml.
- Alergeny pochodzenia zwierzęcego:
  - Pies 10.000 AU/ml.
  - Kot 10.000 AU/ml.
- Kontrola dodatnia:
  - dichlorowodorek histaminy 10 mg/ml, chlorek sodu, wodorowęglan sodu, glicerol, fenol, woda do wstrzykiwań.
- Kontrola ujemna:
  - fosforan disodu dwuwodny, diwodorofosforan sodu dwuwodny, kwas aminokapronowy, albumina ludzka, glicerol, fenol, woda do wstrzykiwań.

IgE alergenowo swoiste:

*Stała aparatura:*

- Analizator ImmunoCAP: Phadia UniCAP100, Thermo Fisher Scientific Inc., Uppsala, Szwecja.
- Zamrażarka Polar 340V, Angelantoni Industrie, Massa Martana, Włochy.

*Odczynniki:*

- Zestaw odczynników do oznaczania swoistego IgE dla Dermatophagoides farinae, Thermo Fisher Scientific Inc., Uppsala, Szwecja.
- Kalibrator dla specyficznego IgE (specific IgE calibrator 0–100).

*Próbówki i systemy do pobierania krwi:*

- Jednorazowe zamknięte zestawy aspiracyjno-próżniowe BD Vacutainer do analizy surowicy z dodatkiem aktywatora wykrzepiania CAT (Clot activator tube) o objętości 4 ml, Becton Dickinson, San Diego, Stany Zjednoczone.
- Probówki polipropylenowe Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg, Republika Federalna Niemiec.

Dodatkowy sprzęt laboratoryjny:

- Pipety automatyczne o pojemności 10, 100, 200, 1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Republika Federalna Niemiec.

- Końcówki do pipet automatycznych, Eppendorf AG, Hamburg, Republika Federalna Niemiec.
- Probówki polipropylenowe, Equimed Spółka Jawna, Kraków, Polska.
- Pipety polietylenowe typu Pasteura, Equimed Spółka Jawna, Kraków, Polska.

### 3.3.3. Punktowe testy skórne

Przed kwalifikacją do badania prowadzono szczegółowy wywiad dotyczący występowania ewentualnych przeciwwskazań do przeprowadzenia testów, tj.:

- wystąpienia w przeszłości reakcji anafilaktycznej po kontakcie z testowanym alergenem,
- braku możliwości efektywnego zastosowania leków stosowanych w leczeniu anafilaksji (np. z powodu interakcji z innymi lekami).

Zwracano również uwagę na ewentualne ograniczenia w ich wykonaniu (występowanie dermografizmu, nasilonych zmian skórnych), a w szczególności na kwestie stosowania leków wpływających na wynik PTS – przede wszystkim doustnych leków przeciwhistaminowych, ale również leków sedatywnych, przeciwdepresyjnych, miejscowych steroidów czy inhibitorów kalcyneuryny. Wszyscy uczestnicy badania deklarowali odstawienie przyjmowanych antyhistaminików na co najmniej 7 dni planowanymi testami oraz negowali stosowanie wyżej wymienionych leków mogących zakłócić wyniki PTS.

PTS przeprowadzono zgodnie z obowiązującymi wytycznymi [15]. Stosowano standaryzowane wyciągi alergenowe oraz roztwory kontrolne (HAL Allergy, Leiden, Holandia). Stężenie poszczególnych roztworów alergenowych było wyrażone w jednostkach alergenu AU/ml – szczegółową listę wszystkich alergenów oraz skład roztworów kontrolnych wymieniono w rozdziale 3.3.2. Ocenę wyniku testu z histaminą (kontrola dodatnia) oraz roztworem kontroli ujemnej przeprowadzano odpowiednio po 10 min, natomiast z poszczególnymi wyciągami alergenowymi po 15 min, poprzez pomiar najdłuższej średnicy bąbla (1) i mierzonego w połowie jego długości wymiaru prostopadłego (2) oraz wyliczając średnią średnicę:  $(1+2)/2$ . Analizie podlegała wielkość bąbla, nie rozpatrywano średnicy rumienia wokół odczynu. Za kryterium dodatniego odczynu przyjęto średnią średnicę bąbla równą lub wyższą niż 3 mm, zgodnie z konsensusem zawartym w wytycznych GA(2)LEN (Global Allergy and Asthma European Network), ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) oraz WAO (World Allergy Organization) [6, 23].

### 3.3.4. asIgE

W celu ilościowego oznaczenia asIgE dla *D. farinae* (*Dermatophagoides farinae*) wykorzystano metodę ImmunoCap firmy Phadia (metoda fluoroenzymatyczna). Po uzyskaniu od uczestników badania 4 ml krwi pełnej każdorazowo materiał odwirowano, a uzyskaną w ten sposób surowicę mrożono w temperaturze -80 stopni C. Jak wielokrotnie wykazano w badaniach, ze względu na znaczną stabilność IgE, przechowywanie surowicy w niskiej temperaturze nie wpływa na jakość późniejszych wyników [48].

W dniu oznaczenia, zgromadzony materiał rozmrażano i nanoszono próbki na podłoże ze związanym alergenem *D. farinae*. W przypadku obecności asIgE w surowicy pacjenta w stosunku do badanego alergenu, dochodzi wówczas do utworzenia kompleksu antygen – asIgE. W celu usunięcia niezwiązanego, „nieswoistego” IgE stosowano roztwór płuczący. Następnie dodawano znakowane enzymatycznie przeciwciało anti- IgE, oczekując jego przyłączenia się do powstałego wcześniej kompleksu. Po odpłukaniu, całość inkubowano z substratem dla enzymu, a w następnym etapie mierzono intensywność fluorescencji, która koresponduje ze stężeniem asIgE. W celu kontroli jakości badania, w tym samym czasie i w tych samych warunkach (temperatura, ciśnienie), dokonywano kalibracji przy zastosowaniu materiału referencyjnego, zgodnego z dokumentem WHO 75/502 „International Reference Preparation for Human IgE, 75/502” [48]. Zakres kalibratora wynosił 0–100 kU/l.

Wyniki wyrażono w jednostkach kU/l, które stanowią ekwiwalent jednostek międzynarodowych IU/ml. Jedna jednostka IU to 2,4 ng asIgE [15].

Za wynik dodatni, zgodnie z obowiązującymi standardami, przyjęto stężenie asIgE od 0,35 kU/l. Wyniki przedstawiono również w sposób półilościowy. Poszczególnym przedziałom stężeń przyporządkowuje się wówczas odpowiednie stopnie skali, od 0 do 6, które wyznaczają klasy swoistego IgE (tabela 7).



Tabela 7. Klasy asIgE i odpowiadające im przedziały stężeń [15]

Stężenie asIgE kU/l	Klasa asIgE	Interpretacja wyniku
<0,35	0	Wynik negatywny
0,35–0,7	1	Stężenie niskie
0,7–3,5	2	Stężenie umiarkowane
3,5–17,5	3	Stężenie wysokie
17,5–50	4	Stężenie bardzo wysokie
50–100	5	Stężenie bardzo wysokie
100 i powyżej	6	Stężenie bardzo wysokie

### 3.3.5. Test aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 oraz CD164

Testy aktywacji bazofila przeprowadzono przy użyciu zestawu Flow CAST (Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Szwajcaria); test posiada europejski certyfikat CE-IVD (CE-marked in vitro diagnostic medical devices) oraz pozostałych odczynników wymienionych w podrozdziale 3.3.2, zgodnie z zaleceniami producentów. Oceny aktywacji bazofilów dokonywano metodą cytometrii przepływowej po stymulacji in vitro komórek krwi obwodowej alergenem w trzech różnych stężeniach. Aktywacja bazofilów była określana jako wzrost ekspresji markerów powierzchniowych – odpowiednio w zależności od rodzaju testu, CD63 lub CD164. Markery oznaczano poprzez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych – anty-CD63 lub anty-CD164 sprzężonych z fluorochromami. Wyniki porównywano z kontrolą dodatnią i ujemną. Kontrolę dodatnią stanowiło przeciwciało poliklonalne anty-IgE (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgE, Dako A/S, Glostrup, Dania w stężeniu 10 µg/ml), natomiast kontrolę ujemną bufor stosowany przy rozcieńczaniu alergenów (Stimulation Buffer zawierający wapń, heparynę i interleukinę 3).

#### 3.3.5.1. Technika wykonania testów aktywacji bazofila

Procedurę badania przeprowadzono w kilku etapach:

##### *Pobranie krwi obwodowej od uczestników badania, przygotowanie próbek do badania*

Krew pobierano w godzinach porannych, 4 ml na wersenian sodu (EDTA). Każda z próbek była napełniana powyżej 50% objętości (niedostateczne wypełnienie próbek krwią może być przyczyną fałszywie ujemnych wyników z powodu wysokiego stężenia EDTA). Test aktywacji bazofila był przeprowadzany maksymalnie do dwóch godzin po uzyskaniu materiału do badań.

Próbki do badania przygotowano wg poniżej przedstawionego schematu (nazewnictwo utrzymano w dalszej części pracy), oddzielnie dla każdego z testów:

- Pb – kontrola ujemna, stanowiąca tło, środowisko badania.
- Pc – kontrola dodatnia, zawierająca przeciwciało anti-IgE.
- AI – Alergen D. farinae 225 ng/ml (stężenie 1 : 1).
- AII – Alergen D. farinae 22,5 ng/ml (stężenie 1 : 10).
- AIII – Alergen D. farinae 2,25 ng/ml (stężenie 1 : 100).

#### *Stymulacja komórkowa i barwienie*

Do próbek zawierających 100 µl buforu stymulacyjnego dodano 50 µl roztworu alergenowego D. farinae w przypisanym danej próbce rozcieńczeniu (próbki AI-AIII) lub 50 µl anti-IgE (próbka Pc) oraz 50 µl krwi pełnej. Dodanie alergenu miało na celu odtworzenie przebiegu reakcji alergicznej w warunkach in vitro (stymulacja swoista). Stymulacja przeciwciałem anti-IgE również skutkuje aktywacją bazofilów oraz wzrostem ekspresji markerów CD63 i CD164, stanowiąc tym samym kontrolę dodatnią (stymulacja nieswoista). Kontrolę negatywną otrzymano poprzez dodanie do 150 µl buforu stymulacyjnego 50 µl krwi pełnej.

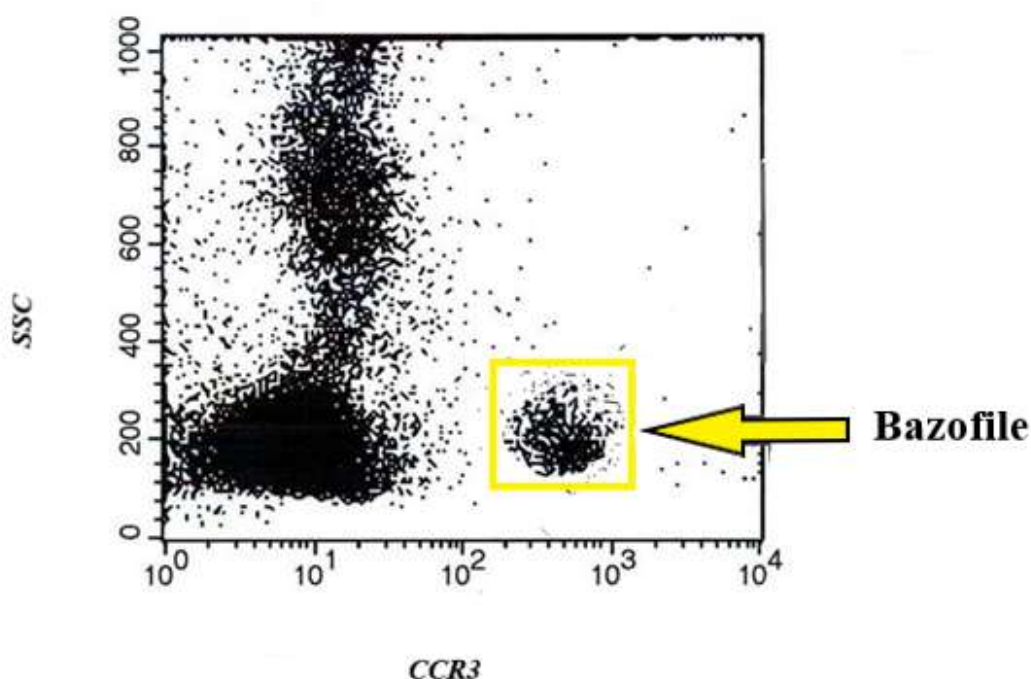
Równolegle do stymulacji komórkowej do każdej próbki dodano 20 µl Staining Reagent, który stanowi mieszanę przeciwciał sprzężonych z fluorochromami. W zależności od rodzaju testu skład roztworu był inny. W teście aktywacji bazofila z CD63 mieszanę przeciwciał stanowiły anti-CD63-FITC (izotiocyjanian fluoresceiny) oraz anti-CCR3-PE (sprzężone z fikoerytryną), natomiast w BAT z CD164 anti-CD164-FITC i CCR3-PE. Po wymieszaniu, próbki inkubowano w temp 37 stopni C przez okres 15 min w inkubatorze CO2 Galaxy 48S.

#### *Zatrzymanie reakcji i liza erytrocytów*

W celu zatrzymania reakcji i usunięcia erytrocytów, do próbek dodawano 2 ml roztworu lizującego. Próbki inkubowano w temperaturze pokojowej, aż do uzyskania przezroczystego roztworu (10 min), a następnie wirowano (8 min 1600 obrotów). W celu utrwalenia, zlewano supernatant oraz przemywano roztworem płuczającym.

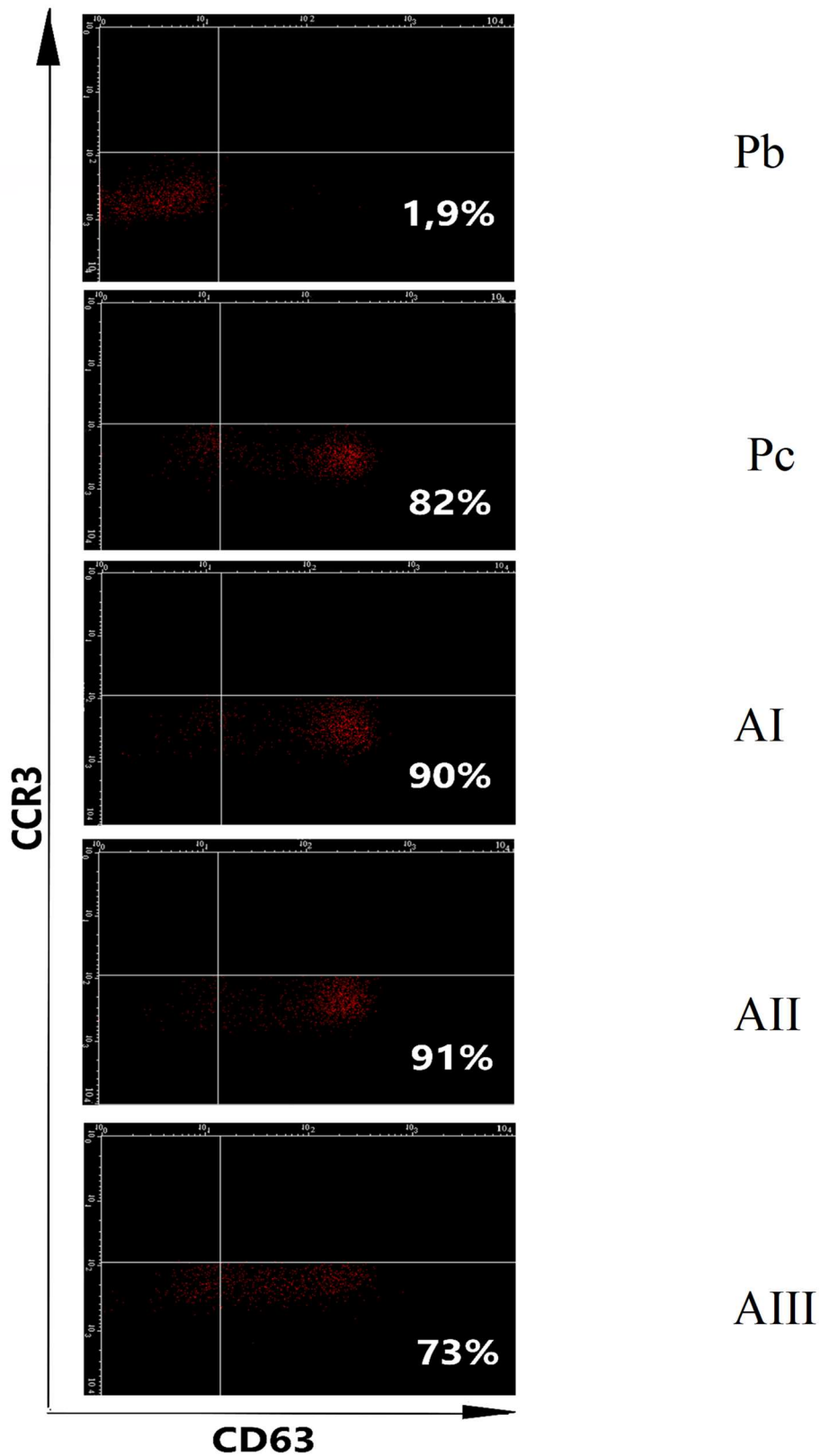
### 3.3.5.2. Analiza cytometryczna

Analizę danych prowadzono przy zastosowaniu oprogramowania producenta cytometru przepływowego FACSCalibur (BD Biosciences, Stany Zjednoczone), zgodnie z instrukcją użytkownika. Odczyt z cytometru kończono po zebraniu 100,000 zdarzeń w każdej z próbek. W badaniu posługiwano się protokołem identyfikacji bazofilów  $CCR3^{\text{positive}}/SSC^{\text{low}}$ . Metoda ta wykorzystuje fakt, że na powierzchni bazofilów, eozynofiliów oraz aktywowanych limfocytach Th2 obecny jest receptor CCR. Wykluczenia eozynofiliów dokonywano poprzez obserwacje rozprożeń światła na ziarnistościach wewnątrzkomórkowych – eozynofile to komórki  $CCR3^{\text{positive}}/SSC^{\text{high}}$  (Rycina 14).

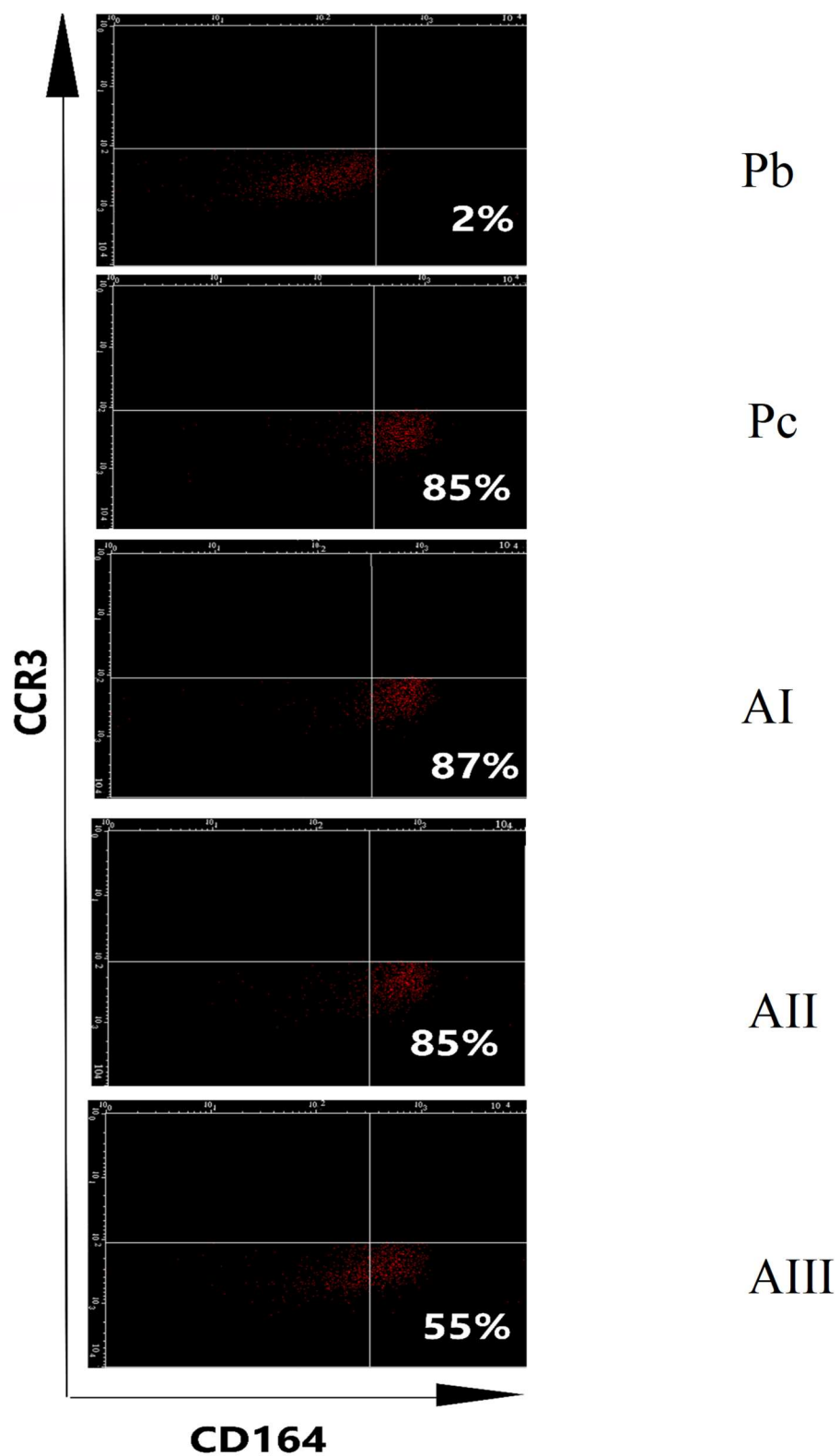


Rycina 14. Zależność rozproszenia światła na ziarnistościach wewnątrzkomórkowych (SSC) od natężenia fluorescencji markera identyfikacji bazofilów – CCR3

Indukowaną alergenem aktywację bazofilów rozpoznawano poprzez wzrost ekspresji markera powierzchniowego CD63 lub CD164 (w zależności od rodzaju testu) na powierzchni bazofilów. Określano kolejno spontaniczną aktywację bazofilów, odpowiedź na stymulację anty-IgE oraz stymulację swoistą alergenem w różnych stężeniach. Przykład przebiegu analizy u modelowego pacjenta w przypadku obu testów BAT zaprezentowano na poniższych rycinach:



Rycina 15. Zmiana ekspresji markera aktywacji bazofilów – CD63 w odpowiedzi na stymulację anti-IgE oraz stymulację alergenem w poszczególnych stężeniach



Rycina 16. Zmiana ekspresji markera aktywacji bazofilów – CD164 w odpowiedzi na stymulację anty-IgE oraz stymulację alergenem w poszczególnych stężeniach

Procent aktywowanych bazofilów (wartości netto) obliczano odejmując wartość spontanicznej aktywacji od danych uzyskanych przy stymulacji alergenem lub anty-IgE (wartości „brutto”).

### 3.3.5.3. *Analiza statystyczna*

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego R (oprogramowanie na warunkach Fundacji Wolnego Oprogramowania GNU General Public License) w wersji R 4.1.2. oraz oprogramowania STATISTICA (wersja 13.3, StatSoft, Kraków, Polska).

Analiza skupiła się na zmiennych numerycznych opisujących liczbę komórek zidentyfikowanych jako bazofile oraz stopień aktywacji bazofili, w podziale na grupy badaną i kontrolną oraz na poszczególne markery powierzchniowe – CD63 lub CD164. Zmienne zostały opisane za pomocą podstawowych parametrów statystyki opisowej, a do wizualnej prezentacji ich rozkładów wykorzystano histogramy oraz tzw. wykresy pudełkowe. Normalność parametrów została zweryfikowana testem Shapiro-Wilka oraz analizą współczynnika skośności i kurtozy. Porównania międzygrupowe zostały wykonane przy pomocy testów t dla grup niezależnych oraz testu U Manna-Whitneya (w zależności od spełnienia założeń o homogeniczności wariancji oraz normalności rozkładów). W analizach, wartości prawdopodobieństwa  $p < 0,05$  uznawano za istotne statystycznie.

Cut off point dla stymulacji nieswoistej określono jako suma średniej arytmetycznej aktywacji spontanicznej ustalonej dla wszystkich uczestników badania (Pb) oraz podwojonej wartości odchylenia standardowego. Osoby z ujemnym wynikiem stymulacji anty-IgE zostały wyłączone z dalszej analizy. Optymalny punkt odcięcia (% aktywowanych bazofilów) wyznaczający wynik dodatni testu, wyliczono w oparciu o analizę krzywej ROC, co w praktyce odpowiadało największej sumie wartości swoistości i czułości. Obliczenia wykonywano dla każdego ze stężeń alergenu (AI-AIII) i dla obu testów (BAT z zastosowaniem CD63 lub CD164). Następnie porównano czułość i swoistość obu testów BAT między sobą. Ostatnim etapem analizy było porównanie testów BAT z czułością i swoistością oznaczenia asIgE, odnosząc uzyskane wyniki do „złotego standardu” diagnostycznego jakim są PTS oraz zestawienie przy pomocy testu DeLonga poszczególnych krzywych ROC dla metod o największej efektywności diagnostycznej.

## 4. Wyniki badań

### 4.1. Wyniki kwestionariusza

#### 4.1.1. Dane kliniczne

Przeanalizowano dane kliniczne uzyskane z kwestionariusza. Pełną kartę badania przedstawiono w rozdziale 3.3.1.

Wszyscy uczestnicy grupy badanej mieli objawy przewlekłego alergicznego nieżyty nosa, w stopniu umiarkowanym lub ciężkim. Wśród dolegliwości dominowała niedrożność nosa (100,0%). Ponadto, większość badanych zgłaszała kichanie (78,6%), ponad połowa świąd oraz wodnisty wyciek z nosa (64,3%), z towarzyszącym swędzeniem i łzawieniem oczu (67,9%). Dolegliwości obserwowano średnio od 15,00 lat. U 53,6% osób występowało ich sezonowe zaostrzenie się w porze wiosenno-letniej, co wynikało z współistniejącej nadwrażliwości na inne alergeny.

Ponad połowa osób z grupy badanej miała jednocześnie inne choroby alergiczne (53,6%). Wśród nich najczęstsza była astma oskrzelowa (35,7% grupy badanej), ponadto, u 6 osób zdiagnozowano w przeszłości atopowe zapalenie skóry (AZS) oraz pokrzywkę (3 osoby). Przewlekłe zapalenie zatok (PZZ) występowało w przypadku 17,9% osób z grupy badanej, jednak u żadnego z uczestników badania nie rozpoznano PZZ ze współistniejącymi polipami nosa.

64,3% pacjentów (grupa badana) podało, że zakończyło lub jest w trakcie leczenia immunoterapią alergenową. Średni czas trwania leczenia wynosił  $3,07 \pm 2,15$  lata. Charakterystykę grupy badanej pod względem zgłaszanych objawów oraz chorób współistniejących przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka grupy badanej pod względem zgłaszanych objawów oraz chorób współistniejących

Zmienna	Grupa badana (N = 28)
Choroby alergiczne, n (%)*	15 (53,6)
Astma, n (%)	10 (35,7)
Inne choroby przewlekłe, n (%)	10 (35,7)
PZZ, n (%)	5 (17,9)
Przewlekły ANN, n (%)	27 (96,4)
Ciężki lub umiarkowany ANN, n (%)	28 (100,0)

Zmienna	Grupa badana (N = 28)
Odbyta immunoterapia, n (%)	18 (64,3)
Immunoterapia czas trwania, lata, średnia ± SD	3,07 ± 2,15
Leczenie polipów nosa lub PZZ, n (%)	0 (0,0)
PTS lub asIgE w przeszłości, n (%)	27 (96,4)
Dolegliwości, n (%)	
Niedrożność nosa	28 (100,0)
Kichanie	22 (78,6)
Świąd nosa	18 (64,3)
Wodnisty wyciek z nosa	18 (64,3)
Swędzenie i łzawienie oczu	19 (67,9)
Czas trwania dolegliwości, lata, mediana (Q1;Q3)	15,00 (10,00; 18,50)
Zaostrzenie wiosną i latem, n (%)	15 (53,6)

SD – odchylenie standardowe, Q1 – kwartył pierwszy, Q3 – kwartył trzeci.

\* włączając astmę.

#### 4.1.2. Wyniki punktowych testów skórnych

Punktowe testy skórne umożliwiają stwierdzenie IgE-zależnej reakcji w obrębie skóry w stosunku do zastosowanego alergenu. Stanowią tzw. „złoty standard” w diagnostyce chorób alergicznych, do którego w niniejszym badaniu odnoszono wyniki pozostałych metod – testów aktywacji bazofila oraz oznaczenia asIgE.

PTS są wystandaryzowanym badaniem, w którym stosuje się jednolite zasady interpretacji. Ocena wyników odbywa się w odniesieniu do kontroli dodatniej oraz ujemnej. Kontrolą dodatnią jest roztwór histaminy, kontrolą ujemną roztwór w którym rozcieńczono wyciągi alergeny (pełny skład wymieniono w rozdziale 3.3.2). Kontrola ujemna pozwala wykluczyć wyniki fałszywie dodatnie (dermografizm, drażniące działanie testowanego roztworu), kontrola dodatnia z kolei, umożliwia ocenę reaktywności skóry, a właściwie efekt stymulacji receptorów H1. Wynik kontroli dodatniej w przypadku każdego testowanego alergenu jest porównywany z bąblem alergenowym. Za wynik pozytywny, świadczący o uczuleniu na dany alergen, przyjmuje się wielkość bąbla o średnicy większej od kontroli ujemnej oraz wymiarze równym lub większym w stosunku do kontroli dodatniej, czyli co najmniej 3 mm [15, 23].

U wszystkich uczestników badania średnia średnica bąbla histaminowego była większa niż 3 mm, natomiast kontrola ujemna była równa 0 mm. W grupie badanej wyniki testu z histaminą wahały się między 4,0 a 7,5 mm (Me 5,5 mm), natomiast



w grupie kontrolnej, minimalna wartość wyniosła 3,5 mm, maksymalna 6,5 mm (Me 5,25 mm). Zestawienie podstawowych wartości statystycznych dla testu z histaminą dla obu grup przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Podstawowe parametry statystyki opisowej dla testu z histaminą oraz porównanie między grupami

Zmienna	Grupa badana (N = 28)							Grupa kontrolna (N = 26)						
	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.
KD (mm)	5,66	0,96	5,50	5,00	6,00	4,00	7,50	5,33	0,79	5,25	5,00	6,00	3,5	6,50

KD– Kontrola dodatnia, M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Q1 – kwartył pierwszy, Q3 – kwartył trzeci, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna

W grupie badanej, przeprowadzone testy skórne z alergenem roztoczy kurzu domowego – *D. farinae*, u każdego z pacjentów dały wynik dodatni. Uzyskano średnią wielkość odczynu 5,82 mm (Me 5,00 mm), przy czym jego rozpiętość wahała się między 4,00 a 11,00 mm (tabela 10).

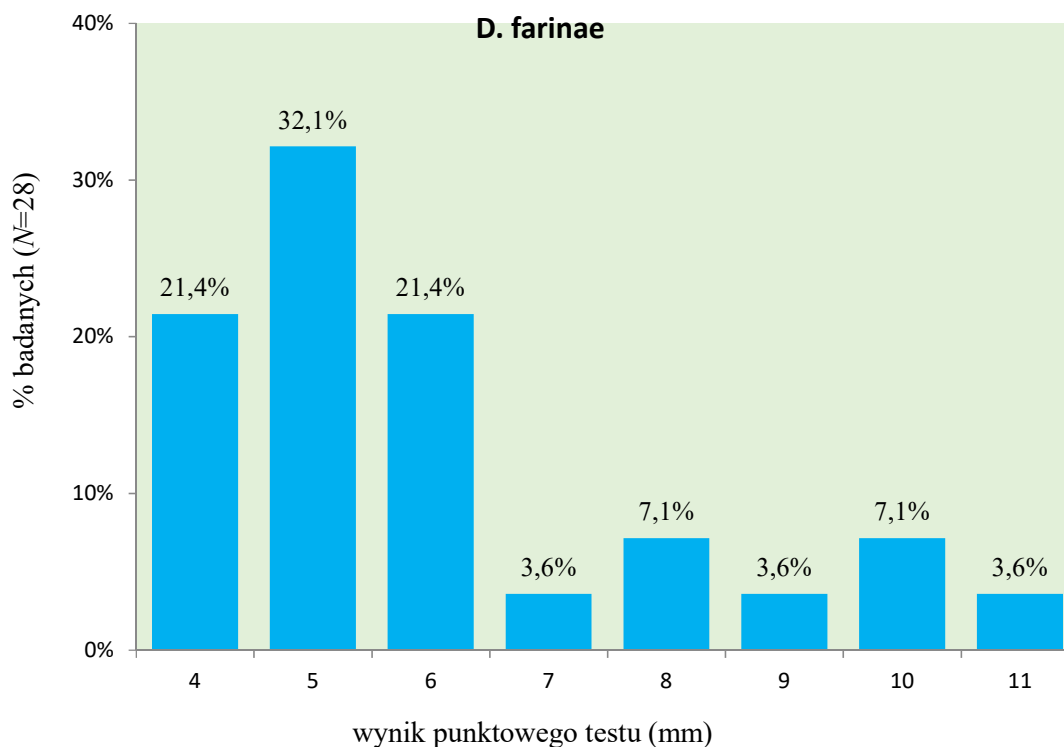
Tabela 10. Analiza wyniku testów skórnych dla alergenu *D. farinae* w grupie badanej i kontrolnej

Zmienna	Grupa badana (N = 28)							Grupa kontrolna (N = 26)							MD (95% CI)	Statystyka testowa	P
	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.			
<i>D. farinae</i> (mm)	5,82	1,97	5,00	4,50	6,25	4,00	11,00	0,15	0,54	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	5,00 (4,50; 5,50)	W = 728,00	< 0,001

W – wartość statystyki testu U Manna-Whitneya. M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Q1 – kwartył pierwszy, Q3 – kwartył trzeci, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna. MD – różnica średnich (grupa badana vs. grupa kontrolna) z 95% przedziałem ufności (CI).

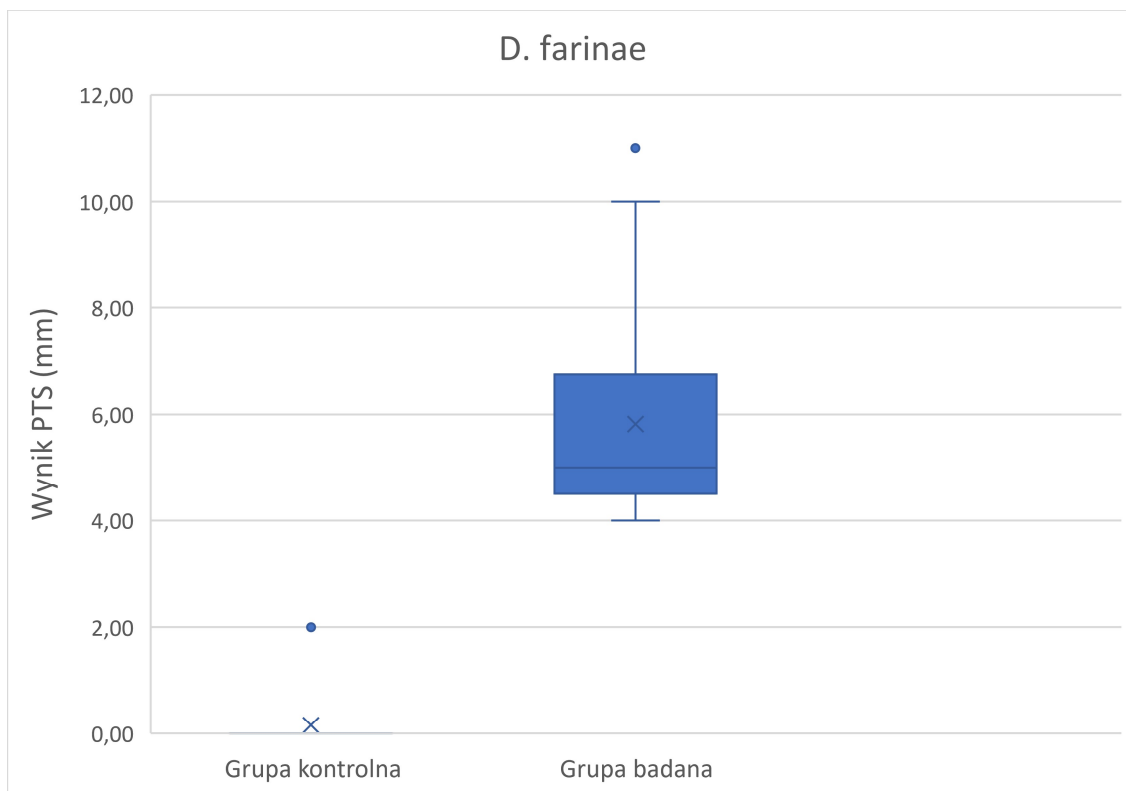
Rozkład tego wskaźnika w grupie badanej odbiegał od rozkładu normalnego, co zostało potwierdzone po przeprowadzeniu testu Shapiro-Wilka ( $p < 0,001$ ). Na brak normalności rozkładu wskazywał również współczynnik asymetrii, który wyniósł  $S = 1,23$  (rozkład prawoskośny) oraz wizualne zobrazowanie wyników w formie histogramu – rycina 17.

Na podstawie poniżej zamieszczonego wykresu można również zauważyć, że w przypadku większości obserwacji mamy do czynienia z wynikiem testu skórno dla *D. farinae* niższym niż 6,00 mm, czyli poniżej mediany.



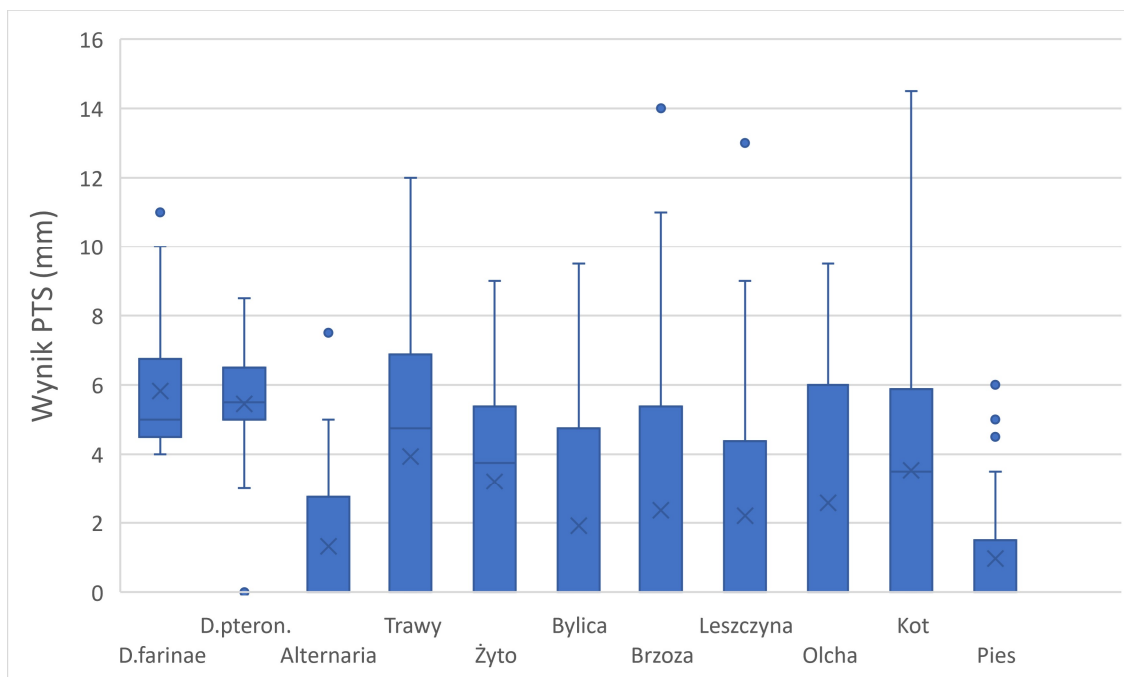
Rycina 17. Histogram przedstawiający rozkład wartości średnich wyników PTS dla alergenu *D. farinae* w grupie badanej

Dotatni wynik PTS wskazuje na wytwarzanie przez układ immunologiczny swoistych przeciwciał IgE w stosunku do uczulającego alergenu, ale nie jest tożsamy z rozpoznaniem choroby alergicznej. Dodatnie testy skórne obserwuje się u około 8–30% populacji, z czego u 50% bez współistnienia objawów alergicznych [15, 23]. W niniejszym badaniu u żadnej osoby z grupy kontrolnej nie zaobserwowano dodatnich wyników testów skórnych dla *D. farinae*. U dwóch uczestników zanotowano odczyn o średnicy 2 mm, co według ogólnie przyjętych kryteriów należy zinterpretować jako wynik ujemny. Dla porównania dokonano zestawienia wyników pacjentów uczulonych na *D. farinae* z grupą kontrolną (tabela 10, rycina 18). W przeprowadzonym porównaniu pomiędzy rozkładem wyników PTS dla *D. farinae* w grupie badanej oraz kontrolnej uzyskano wartość  $p < 0,001$ , co pozwala na stwierdzenie że obie grupy różnią się od siebie w sposób statystycznie istotny.



Rycina 18. Porównanie wyników testów skórnych dla *D. farinae* w grupie badanej i kontrolnej (różnica istotna statystycznie,  $p < 0,001$ )

U znacznej części uczestników grupy badanej badanych obok uczulenia na *D. farinae* współistniała nadwrażliwość na inne alergeny wziewne (ponad połowa chorych w wywiadzie zgłaszała dodatkowe zaostrzenie dolegliwości przewlekłego ANN w miesiącach wiosenno-letnich, spowodowane uczuleniem na pyłki traw oraz drzew). Średnia wielkość odczynu z zastosowaniem alergenu *D. farinae* była jednak największa spośród wszystkich uzyskanych przy wykorzystaniu pozostałych wyciągów alergenowych. Zestawienie wyników PTS dla wszystkich testowanych w grupie badanej alergenów przedstawiono na rycinie 19 oraz tabeli 11.



Rycina 19. Wykres pudełkowy przedstawiający wyniki punktowych testów skórnych dla wszystkich stosowanych w badaniu alergenów w grupie badanej

Tabela 11. Analiza wyników PTS dla wszystkich testowanych alergenów w grupie badanej

Zmienna	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.	S	K
D.farinae	5,82	1,97	5,00	4,50	6,25	4,00	11,00	1,23	3,51
D.pteron.	5,45	1,78	5,50	5,00	6,50	0,00	8,50	-0,65	4,65
Alternaria	1,32	2,28	0,00	0,00	2,25	0,00	7,50	1,35	3,34
Trawy	3,93	3,68	4,75	0,00	6,63	0,00	12,00	0,32	2,00
Żyto	3,20	2,99	3,75	0,00	5,13	0,00	9,00	0,30	1,91
Bylica	1,91	2,81	0,00	0,00	4,25	0,00	9,50	1,09	2,99
Brzoza	2,36	3,85	0,00	0,00	4,13	0,00	14,00	1,57	4,59
Leszczyna	2,20	3,55	0,00	0,00	4,13	0,00	13,00	1,53	4,45
Olcha	2,57	3,49	0,00	0,00	6,00	0,00	9,50	0,75	1,85
Sierść kota	3,54	3,84	3,50	0,00	5,63	0,00	14,50	0,89	3,35
Sierść psa	0,96	1,82	0,00	0,00	0,50	0,00	6,00	1,58	4,06

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Q1 – kwartyl pierwszy, Q3 – kwartyl trzeci, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna, S – współczynnik skośności, K – kurtoza.

## 4.2. Wyniki asIgE uzyskane dla *Dermatophagoides farinae*

Oznaczenie asIgE przeprowadzono u wszystkich uczestników badania, zarówno w grupie pacjentów jak i w grupie kontrolnej. Za punkt odcięcia przyjęto powszechnie obowiązującą wartość 0,35 kU/l. Zgodnie z tą definicją oraz podziałem na poszczególne klasy swoistego IgE (zasady interpretacji wyników omówiono w rozdziale 3.3.4) przeanalizowano uzyskane wyniki w obu grupach.

W grupie kontrolnej wszyscy uczestnicy badania osiągnęli stężenie asIgE poniżej 0,35 kU/l, czyli nie zanotowano żadnego wyniku fałszywie dodatniego.

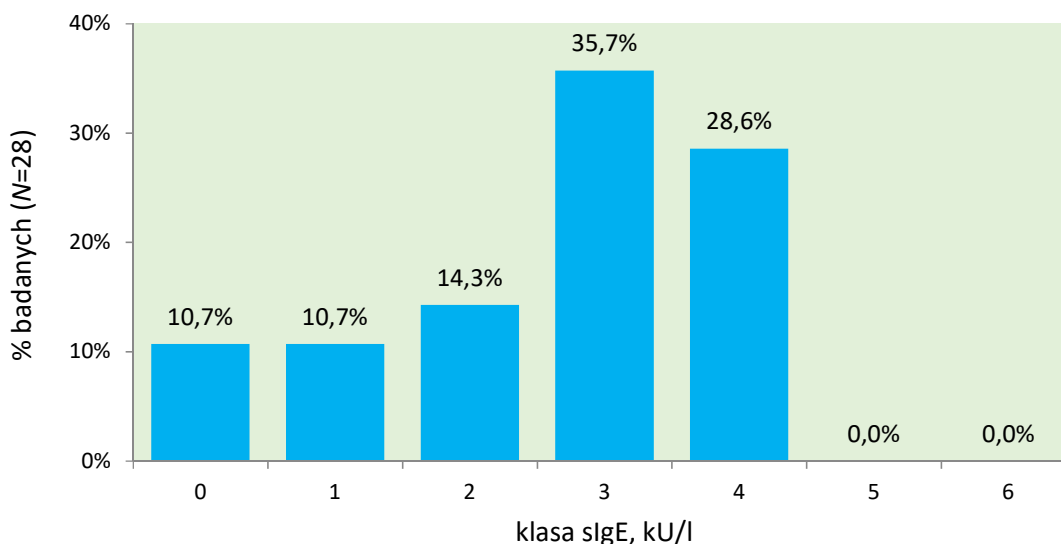
W grupie badanej, 35,7% pacjentów osiągnęło stężenie asIgE odpowiadające klasie 3, niewiele mniej zaliczało się do klasy 4 (28,6%). Kolejno, 14,3% grupy badanej stanowiły osoby, u których wynik asIgE został zakwalifikowany do klasy 2, 10,7% (3 osoby) do klasy 1. U 3 osób (10,7%) zanotowano stężenie asIgE poniżej 0,35 kU/l (klasa 0), co należy zinterpretować jako wyniki fałszywie ujemne.

Poniżej, w tabeli 12, przedstawiono zestawienie wszystkich oznaczeń, zarówno w grupie pacjentów jak i grupie kontrolnej, uwzględniając przedziały stężeń swoistego IgE oraz odpowiadające im poszczególne klasy.

Tabela 12. Zestawienie wyników asIgE dla grupy kontrolnej i badanej z uwzględnieniem udziału badanych w poszczególnych klasach swoistego IgE

Klasa sIgE	Zakres sIgE (kU/l)	n (%)	
		Grupa badana (N = 28)	Grupa kontrolna (N = 26)
0	0–0,35	3 (10,7)	26 (100,0)
1	0,35–0,70	3 (10,7)	0 (0,0)
2	0,70–3,50	4 (14,3)	0 (0,0)
3	3,50–17,5	10 (35,7)	0 (0,0)
4	17,5–50	8 (28,6)	0 (0,0)
5	50–100	0 (0,0)	0 (0,0)
6	> 100	0 (0,0)	0 (0,0)

Rozkład wyników w grupie badanej wg poszczególnych klas asIgE przedstawiono również w formie wizualnej (histogram – rycina 20).



Rycina 20. Rozkład wyników wg poszczególnych klas asIgE w grupie badanej

Porównując statystycznie obie grupy – badaną oraz kontrolną, wyraźnie większe stężenia asIgE uzyskano w grupie badanej ( $p < 0,001$ , różnica wyniosła  $MD = 5,02$ ,  $CI_{95}$  [3, 49; 12, 87]). Wyniki weryfikacji statystycznej przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Zestawienie porównawcze wyników analizy statystycznej grupy badanej i kontrolnej w zakresie oznaczenia asIgE

Zmienna	Grupa badana (N = 28)					Grupa kontrolna (N = 26)					MD (95% CI)	Statystyka testowa	p
	M	SD	Me	Min.	Maks.	M	SD	Me	Min.	Maks.			
sIgE, kU/l	11,64	13,20	5,04	0,22	44,80	0,05	0,06	0,02	0,01	0,22	5,02 (3,49; 12,87)	W = 727,50	< 0,001

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna. MD – różnica średnich (grupa badana vs. grupa kontrolna) z 95% przedziałem ufności (CI), W – wartość statystyki testu U Manna-Whitneya.

W kolejnym etapie, raz jeszcze przeanalizowano uzyskane w grupie badanej wyniki fałszywie ujemne, w kontekście ich porównania z rezultatami PTS. Jak się okazało, co prawda wielkość odczynów dla *D. farinae* u tych osób była powyżej 3 mm i wskazywała jednoznacznie na wynik dodatni, jednak średnia średnica bąbla w żadnym przypadku nie przekroczyła 4 mm. Tym samym, należy uznać, że przypadku prezentowanego badania, zasadne jest ustalenie punktu odcięcia dla asIgE, na niższym poziomie niż ogólnie przyjęty.

Ustalenie normy IgE swoistego na poziomie 0,35 kU/l zostało określone jeszcze kilka dekad temu. Odnosząc się do aktualnej literatury należy uznać, że wartość tzw. „cut off” dla asIgE jest dużo bardziej zróżnicowana. Wiele badań wskazuje na obniżenie punktu

odcienia, ustalając próg przy którym uznajemy wynik za dodatni, nawet przy stężeniu 0,12 kU/l [49, 50]. Z uwagi na tę nieustającą dyskusję oraz uzyskane fałszywie ujemne wyniki w grupie pacjentów, dokonano porównania skuteczności testów diagnostycznych opartych na założeniach różnych norm: powszechnie przyjętej 0,35 kU/l oraz 0,20 kU/l. W przypadku gdy za cut off uznano sIgE = 0,35 kU/l, czułość testu wynosiła 89%, a jego swoistość 100%. Natomiast jeśli za normę przyjęto sIgE = 0,20 kU/l, osiągnięto 100% czułości jednak swoistość była niższa niż przy alternatywnym założeniu i wynosiła 92% (tabela 14).

Tabela 14. Porównanie wyników oznaczenia stężenia asIgE przy różnych założeniach normy asIgE w analizowanej próbie pacjentów

	Norma sIgE < 0,35 kU/l			Norma sIgE < 0,20 kU/l		PPV/NPV
	Grupa badana (N = 28)	Grupa kontrolna (N = 26)	PPV / NPV	Grupa badana (N = 28)	Grupa kontrolna (N = 26)	
			100%/ 89%			92%/ 100%
Wynik dodatni	25	0		28	2	
Wynik ujemny	3	26		0	24	
<b>Czułość / swoistość</b>	89%	100%		100%	92%	

PPV (ang. positive predictive value) – dodatnia wartość predykcyjna, NPV (ang. negative predictive value) – ujemna wartość predykcyjna.

Jak widać na powyższym przykładzie, każda manipulacja w zakresie ustalonego progu asIgE, zarówno w dół jak i w górę ma konkretne konsekwencje. Gdy obniżamy cut off rośnie czułość testu oraz ujemna wartość predykcyjna (NPV), natomiast maleje swoistość oraz dodatnia wartość predykcyjna (PPV). Tym samym zwiększamy szanse na rozpoznanie choroby, kosztem jednak wygenerowania ewentualnych nadrozpoznań. Przy tradycyjnie przyjętej wartości 0,35 kU/l spada czułość testu, a więc szansa na prawidłową diagnozę.

Reasumując, powyższe wyniki jednoznacznie sugerują potrzebę poszukiwania bardziej doskonałych metod diagnostycznych, które pozwolą na uzyskanie jeszcze większej czułości i swoistości otrzymywanych wyników, zwłaszcza w obliczu wzrostu częstości występowania chorób alergicznych.

### 4.3. Testy aktywacji bazofilów

#### 4.3.1. Określenie podstawowej puli bazofilów

Ważnym elementem interpretacji wyników BAT, stanowiącym niejako kontrolę jakości testu, jest identyfikacja podstawowej puli bazofilów. Poniżej w tabelach 15–18 przedstawiono uzyskane średnie wartości liczby bazofilów w poszczególnych próbkach, kolejno dla grupy badanej i kontrolnej, z różnicowaniem na poszczególne testy aktywacji bazofila – z zastosowaniem CD63 lub CD164.

Tabela 15. Podstawowe parametry statystyki opisowej dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w grupie badanej dla BAT z zastosowaniem markera CD63

CD63	Grupa badana (N = 28)		
	M	SD	Me
Pb	447,54	305,26	362,00
Pc	422,00	299,82	371,50
AI	412,89	271,53	341,50
AII	454,43	304,17	379,00
AIII	431,39	282,02	367,50

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana.

Tabela 16. Podstawowe parametry statystyki opisowej dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w grupie kontrolnej dla BAT z zastosowaniem markera CD63

CD63	Grupa kontrolna (N = 26)		
	M	SD	Me
Pb	448,19	186,69	436,50
Pc	457,00	209,64	488,00
AI	493,27	163,85	472,50
AII	455,58	186,56	457,00
AIII	454,73	182,07	450,50

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana.



Tabela 17. Podstawowe parametry statystyki opisowej dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w grupie badanej dla BAT z zastosowaniem markera CD164

CD164	Grupa badana (N = 28)		
	M	SD	Me
Pb	486,18	278,25	422,00
Pc	472,96	271,19	400,50
AI	465,86	234,00	458,00
AII	464,57	285,05	395,00
AIII	443,18	250,79	394,50

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana.

Tabela 18. Podstawowe parametry statystyki opisowej dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w grupie kontrolnej dla BAT z zastosowaniem markera CD164

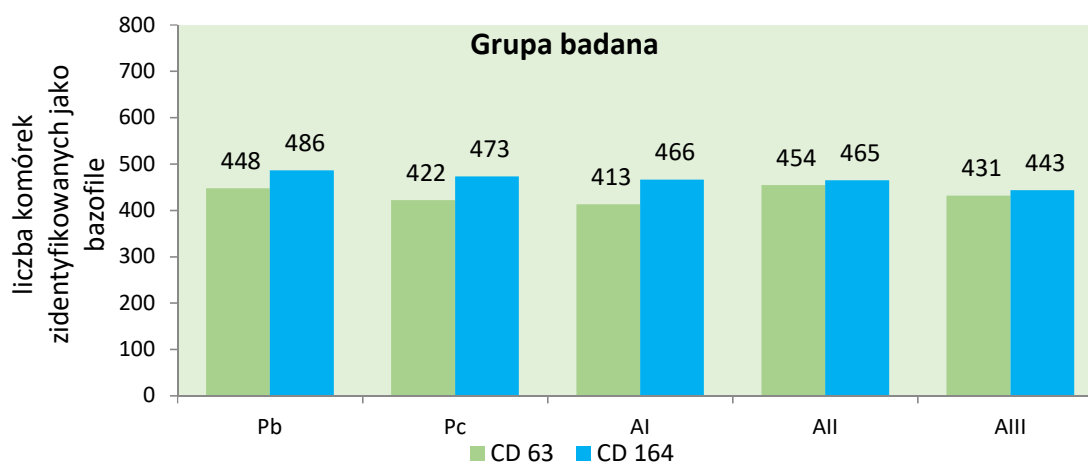
CD164	Grupa kontrolna (N = 26)		
	M	SD	Me
Pb	474,27	216,82	499,50
Pc	475,42	243,99	433,00
AI	447,31	196,32	466,00
AII	492,42	230,27	446,00
AIII	496,88	213,57	458,50

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana.

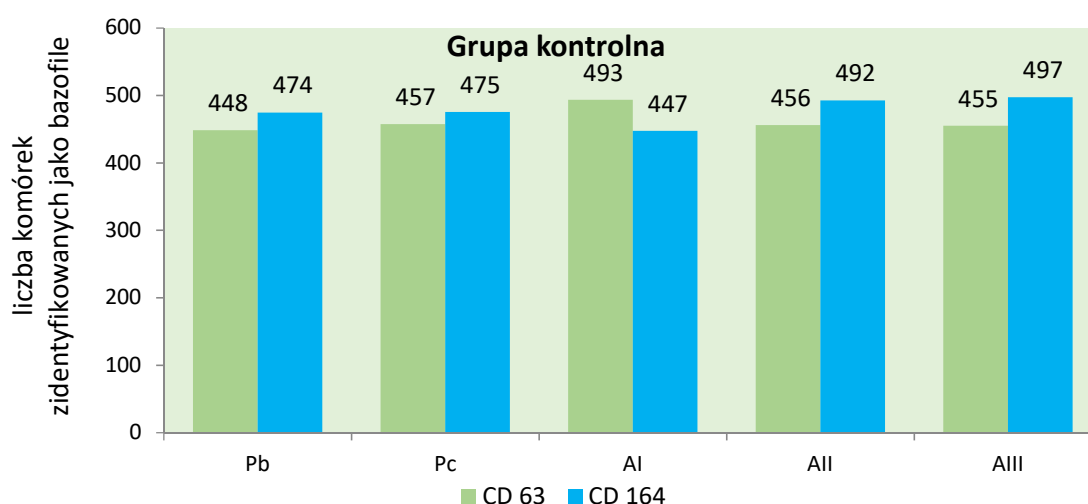
Na podstawie analizy powyżej przedstawionych danych zaobserwowano następujące różnice: w przypadku BAT z zastosowaniem CD63, we wszystkich próbkach pula komórek zidentyfikowanych jako bazofile była wyższa w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą badaną ( $MD < 0$ ; MD – różnica średnich grupa badana vs grupa kontrolna).

W teście aktywacji bazofila z CD164 średnia ilość bazofili była wyższa dla próbek Pb oraz zawierającej alergen w stężeniu pierwszym (AI) w przypadku grupy badanej, natomiast w pozostałych próbkach była wyższa dla grupy kontrolnej ( $MD < 0$ ).

Porównując oba testy, w przypadku wszystkich próbek, za wyjątkiem AI, w grupie kontrolnej średnia ilość zidentyfikowanych bazofili była wyższa dla testu z zastosowaniem markera powierzchniowego CD164. Zależności te zobrazowano na rycinach 21–22.



Rycina 21. Porównanie średnich wartości liczby komórek zabramkowanych jako bazofile w grupie badanej dla BAT z zastosowaniem CD63 i CD164



Rycina 22. Porównanie średnich wartości liczby komórek zabramkowanych jako bazofile w grupie kontrolnej dla BAT z zastosowaniem CD63 i CD164

Należy podkreślić, że uzyskane wartości średnie mieściły się we wskazaniach producenta (Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Szwajcaria), wg których liczba bramkowanych bazofilów nie powinna być niższa niż 300 [51]. W trakcie analizy otrzymanych wyników zauważono jednak, że w przypadku nielicznych osób (2 osoby w teście aktywacji bazofila z CD63 oraz 1 osoba w BAT z CD164), w zakresie pojedynczego stężenia alergenu liczba zebranych komórek była niska. Osoby te nie zostały jednak wykluczone z analizy, ponieważ uznano, że w zakresie pozostałych dwóch stężeń alergenowych spełniają kryteria uzyskania wynik dodatniego tj. liczba komórek zabramkowanych jako bazofile nie tylko przekracza zdefiniowany punkt odcięcia, a nawet osiąga jego podwojone wartości (600–700 komórek).

W następnym etapie zbadano rozkład zmiennych. Zbieżność z rozkładem normalnym została oceniona przy użyciu testu Shapiro-Wilka. W większości przypadków badany rozkład okazał się być normalny (tabela 19).

Brak normalności rozkładu zaobserwowano w przypadku następujących zmiennych:

- Pc, w teście aktywacji bazofila z CD63 w grupie badanej ( $p = 0,022$ ).
- Pc, w teście aktywacji bazofila z CD164 w grupie badanej ( $p = 0,039$ ).
- AII, w teście aktywacji bazofila z CD164 w grupie badanej ( $p = 0,041$ ).

Tabela 19. Ocena liczby komórek zabramkowanych jako bazofile – zestawienie wyników testu Shapiro-Wilka w poszczególnych próbkach dla obu testów BAT

Grupa	Marker	Próbka	W	p	S	K	Rozkład normalny
B	CD63	Pb	0,94	0,090	0,69	2,57	tak
B	CD63	Pc	0,91	0,022	0,79	2,64	nie
B	CD63	AI	0,93	0,080	0,71	2,69	tak
B	CD63	AII	0,94	0,130	0,70	2,79	tak
B	CD63	AIII	0,95	0,176	0,50	2,29	tak
K	CD63	Pb	0,97	0,658	0,01	2,04	tak
K	CD63	Pc	0,97	0,669	-0,03	2,18	tak
K	CD63	AI	0,96	0,396	-0,23	2,35	tak
K	CD63	AII	0,96	0,351	0,53	2,67	tak
K	CD63	AIII	0,97	0,688	0,01	2,92	tak
B	CD164	Pb	0,94	0,148	0,46	2,16	tak
B	CD164	Pc	0,92	0,039	0,93	3,66	nie
B	CD164	AI	0,95	0,243	0,49	2,46	tak
B	CD164	AII	0,94	0,133	0,53	2,35	tak
B	CD164	AIII	0,96	0,360	0,66	3,02	tak
K	CD164	Pb	0,96	0,361	-0,21	2,86	tak
K	CD164	Pc	0,95	0,242	0,17	2,03	tak
K	CD164	AI	0,98	0,820	0,14	2,79	tak
K	CD164	AII	0,92	0,041	0,49	2,08	nie
K	CD164	AIII	0,95	0,293	0,49	2,51	tak

W – wartość statystyki W testu Shapiro-Wilka, S – współczynnik skośności, K – kurtoza. Zbieżność z rozkładem normalnym weryfikowana za pomocą podanych statystyk oraz wizualnej oceny histogramu rozkładu zmiennej, B – grupa badana, K – grupa kontrolna.

Dokonano zestawienia obu grup – badanej i kontrolnej, kolejno dla BAT z CD63, z CD164 oraz dla obu testów, w zakresie wszystkich próbek. Wyniki analizy

statystycznej przedstawiono w tabelach 20–22. W przypadku parametrów gdzie stwierdzono rozkład normalny stosowano test t (wartość statystyki testu t dla prób niezależnych), w pozostałych natomiast test U Manna-Whitneya.

Tabela 20. Zestawienie porównawcze wartości p dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych grupach dla testu aktywacji bazofila z CD63

	<b>MD (95% CI)</b>	<b>Statystyka testowa</b>	<b>P</b>
Pb	-0,66 (-138,26; 136,94)	t = -0,01 df = 45	0,992
Pc	-116,50 (-198,00; 69,00) <sup>1</sup>	W = 308,00	0,340
AI	-80,38 (-202,33; 41,58)	t = -1,33 df = 45	0,191
AII	-1,15 (-138,36; 136,07)	t = -0,02 df = 45	0,987
AIII	-23,34 (-152,43; 105,75)	t = -0,36 df = 47	0,718

MD – różnica średnich (grupa badana vs. grupa kontrolna) z 95% przedziałem ufności (CI), t – wartość statystyki testu t dla prób niezależnych, df – liczba stopni swobody.

Tabela 21. Zestawienie porównawcze wartości p dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych grupach dla testu aktywacji bazofila z CD164

	<b>MD (95% CI)</b>	<b>Statystyka testowa</b>	<b>p</b>
Pb	11,91 (-123,89; 147,71)	t = 0,18 df = 51	0,861
Pc	-32,50 (-154,00; 135,00) <sup>1</sup>	W = 340,00	0,687
AI	18,55 (-99,14; 136,23)	t = 0,32 df = 51	0,753
AII	-51,00 (-179,00; 114,00) <sup>1</sup>	W = 329,00	0,550
AIII	-53,71 (-180,65; 73,24)	t = -0,85 df = 52	0,400

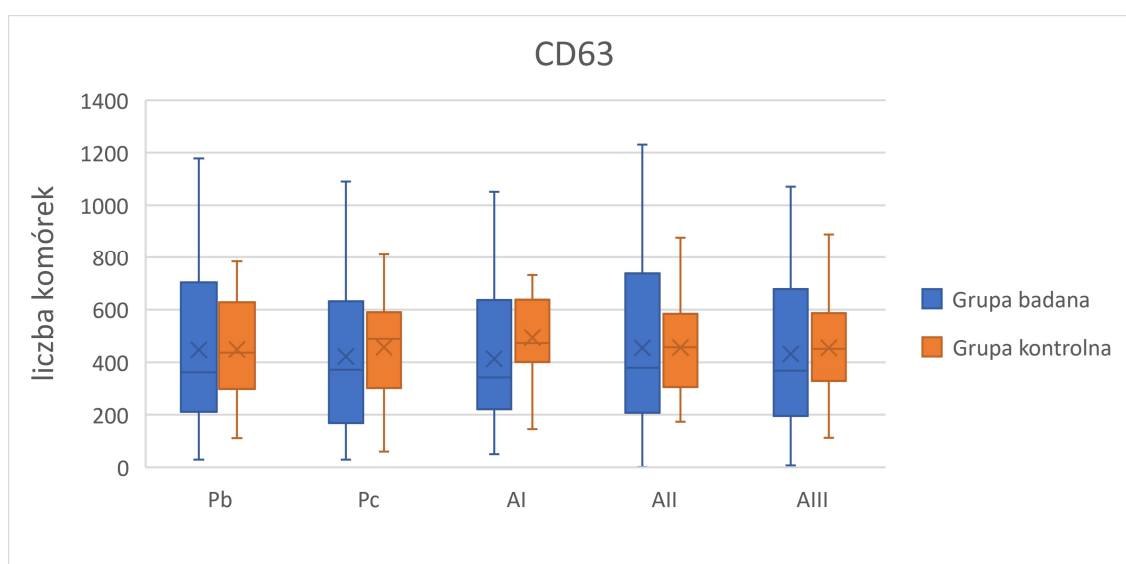
MD – różnica średnich lub median<sup>1</sup> (grupa badana vs. grupa kontrolna) z 95% przedziałem ufności (CI), t – wartość statystyki testu t dla prób niezależnych, df – liczba stopni swobody, W – wartość statystyki testu U Manna-Whitneya.

Tabela 22. Zestawienie porównawcze wartości *p* dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych testach aktywacji bazofila (z CD63 i CD164)

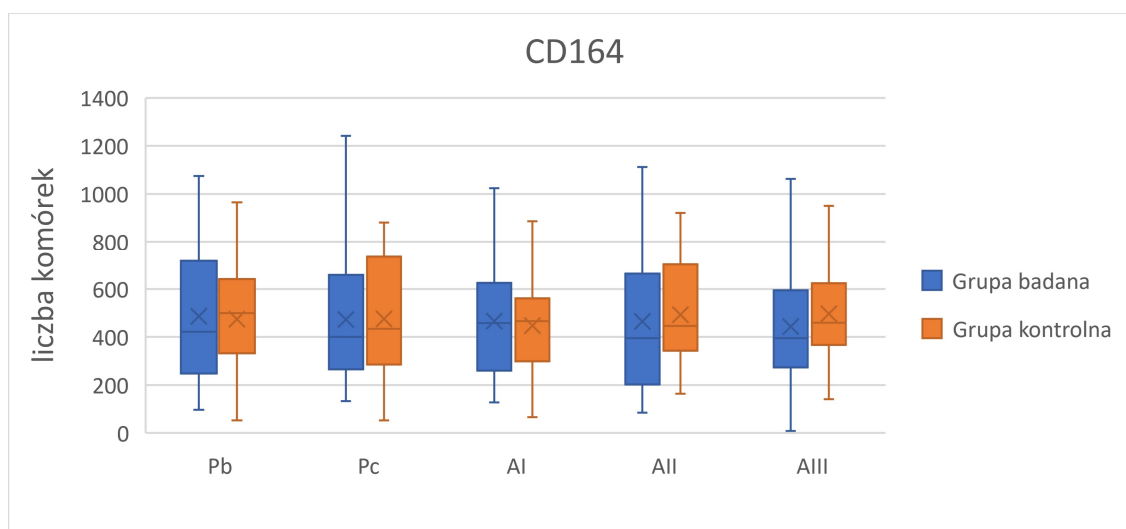
	MD (95% CI)	Statystyka testowa	p
Pb	-38,64 (-195,17; 117,89)	t = -0,50 df = 54	0,623
Pc	-29,00 (-216,00; 81,00) <sup>1</sup>	W = 338,50	0,385
AI	-52,96 (-188,84; 82,91)	t = -0,78 df = 53	0,438
AII	-10,14 (-168,10; 147,82)	t = -0,13 df = 54	0,898
AIII	-11,79 (-154,82; 131,25)	t = -0,17 df = 53	0,869

MD – różnica średnich lub median<sup>1</sup> (CD 63 vs. CD 164) z 95% przedziałem ufności (CI), t – wartość statystyki testu t dla prób niezależnych, df – liczba stopni swobody, W – wartość statystyki testu U Manna-Whitneya.

Zarówno w przypadku testu aktywacji bazofila z CD63 jak i CD164 w zakresie wszystkich próbek wykazano brak statystycznej istotności różnic pomiędzy grupą badaną a kontrolną. W porównaniu pomiędzy testami również nie stwierdzono różnic w ilości komórek zidentyfikowanych jako bazofile w obrębie wszystkich analizowanych zmiennych. Wizualna prezentacja rozkładów dla każdej próbki w podziale na grupy badaną i kontrolną i poszczególne markery aktywacji bazofili została przedstawiona na poniższych wykresach pudełkowych (ryciny 23 i 24).



Rycina 23. Wykres pudełkowy przedstawiający średnią liczbę komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych próbkach w grupach badanej i kontrolnej dla BAT z CD63



Rycina 24. Wykres pudełkowy przedstawiający średnią liczbę komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych próbkach w grupach badanej i kontrolnej dla BAT z CD164

#### 4.3.2. Ocena aktywacji bazofilów

Przed przystąpieniem do analizy, wszystkie uzyskane wyniki w poszczególnych próbkach pomniejszono o wartość spoczynkowej aktywacji bazofilów (Pb). Tym samym całkowitą ilość aktywowanych bazofilów, czyli wartości „brutto”, pomniejszono o wartość aktywacji bazofilów bez stymulacji bodźcem zewnętrznym (alergenem lub anty-IgE) otrzymując wyniki „netto”. Liczbę aktywowanych bazofilów wyznaczano jako procent aktywowanych komórek w stosunku do całej puli zabramkowanych bazofilów.

W dalszym etapie przeanalizowano wartości Pb (kontrola ujemna) zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie badanej, w obu testach BAT. Miało to na celu wyłonienie osób z podwyższoną spontaniczną aktywacją – czyli taką, która przekracza 10%. Żaden z uczestników badania jednak nie osiągnął takich wyników. Średnia wartość Pb dla testu z CD63 (całość badanej populacji) wyniosła 2,00 (min 1,8; max 3,45, SD 0,23), dla testu z CD164 2,01 (min 1,82, max 2,2, SD 0,11).

Kolejnym krokiem było wykluczenie z analizy osób z niedostateczną aktywacją bazofilów. Szacuje się, że nawet około 8–22% populacji należy do tzw. „non-responders” [52–54]. Są to osoby których bazofile nie reagują aktywacją po stymulacji bodźcem zewnętrznym – alergenem lub anty-IgE/anty-FcεRI, pomimo zachowanej prawidłowej gęstości receptorów FcεRI na powierzchni komórek oraz zdolności do ekspresji markerów powierzchniowych aktywacji bazofilów po stymulacji bodźcem IgE-niezależnym.

W celu jednoznacznego wyłonienia „non-responders” wyznaczono „cut off point” dla stymulacji anty-IgE:

$$\text{Cut off point} = x + 2SD$$

gdzie  $x$  to średnia arytmetyczna aktywacji spontanicznej (Pb) dla wszystkich uczestników badania; SD – odchylenie standardowe.

Dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 punkt odcięcia wyniósł:

$$\text{Cut off point} = 2,00 + 2 \cdot 0,23 = 2,46$$

Dla BAT z zastosowaniem CD164 wykonano następujące obliczenia:

$$\text{Cut off point} = 2,01 + 2 \cdot 0,11 = 2,23$$

Na podstawie wyznaczonych punktów odcięcia, określono grupy non-responders dla poszczególnych testów. Dla BAT z CD63 były to 3 osoby, natomiast dla testu z CD164 2 osoby (kolejno 1 osoba z grupy kontrolnej i 2 z grupy badanej oraz 2 osoby z grupy badanej, 0 z kontrolnej), co stanowiło 5,6% populacji badanej w przypadku CD63 oraz 3,7% populacji badanej dla CD164.

Osoby te wyłączono z dalszego opisu wyników. Pozostała zbiorowość stanowiła przedmiot statystyki opisowej. W tabelach 23–26 przedstawiono podstawowe parametry statystyczne odnoszące się do poziomu aktywacji bazofilów w poszczególnych próbkach w podziale na grupy kontrolną i badaną oraz różne testy BAT. Wyniki zaprezentowano również w formie wizualnej na rycinach 25 i 26.

Tabela 23. Ocena aktywacji bazofilów (%) w grupie badanej dla testu aktywacji bazofila z CD63 – statystyka opisowa

CD63	Grupa badana (N = 26)						
	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.
Pb	2,00	0,12	1,98	1,93	2,11	1,80	2,20
Pc	47,50	29,88	50,55	20,07	71,66	2,93	92,57
AI	47,65	38,06	44,78	11,77	88,74	0,00	95,55
AII	43,26	39,25	44,74	3,18	76,19	0,00	96,66
AIII	26,61	35,57	3,83	0,04	59,68	0,00	95,37

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Q1 – kwartył pierwszy, Q3 – kwartył trzeci, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna.

Tabela 24. Ocena aktywacji bazofilów (%) w grupie kontrolnej dla testu aktywacji bazofila z CD63 – statystyka opisowa

CD63	Grupa kontrolna (N = 25)						
	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.
Pb	1,94	0,10	1,94	1,85	2,01	1,80	2,12
Pc	54,71	26,44	63,55	36,65	71,39	2,56	90,61
AI	1,15	1,70	0,11	0,00	1,67	0,00	6,19
AII	0,87	1,66	0,06	0,00	0,80	0,00	7,29
AIII	1,15	2,49	0,00	0,00	0,68	0,00	10,28

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Q1 – kwartył pierwszy, Q3 – kwartył trzeci, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna.

Tabela 25. Ocena aktywacji bazofilów (%) w grupie badanej dla testu aktywacji bazofila z CD164 – statystyka opisowa

CD164	Grupa badana (N = 26)						
	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.
Pb	2,03	0,11	2,06	1,92	2,08	1,85	2,19
Pc	39,60	28,33	35,90	19,24	54,83	2,59	85,77
AI	43,29	27,62	38,24	24,41	66,90	1,17	93,02
AII	35,95	28,81	27,21	12,79	57,41	-2,19	92,66
AIII	20,30	22,75	12,43	4,40	22,24	0,00	84,71

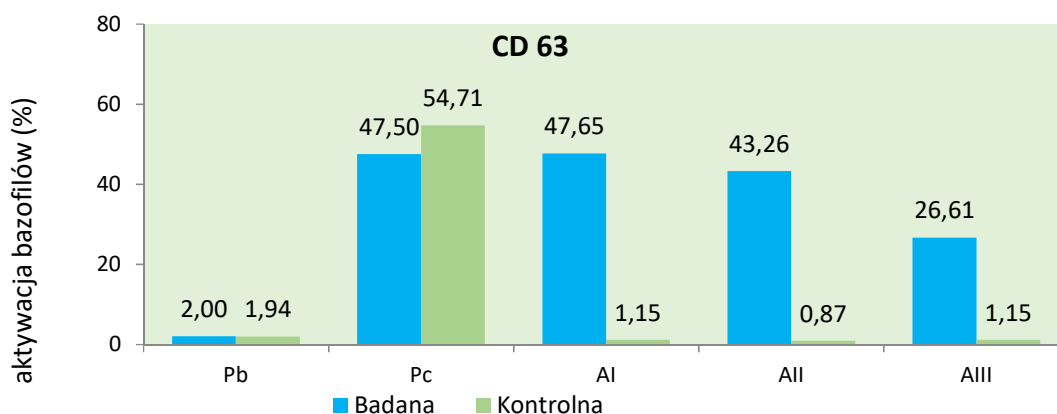
M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Q1 – kwartył pierwszy, Q3 – kwartył trzeci, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna.

Tabela 26. Ocena aktywacji bazofilów (%) w grupie kontrolnej dla testu aktywacji bazofila z CD164 – statystyka opisowa

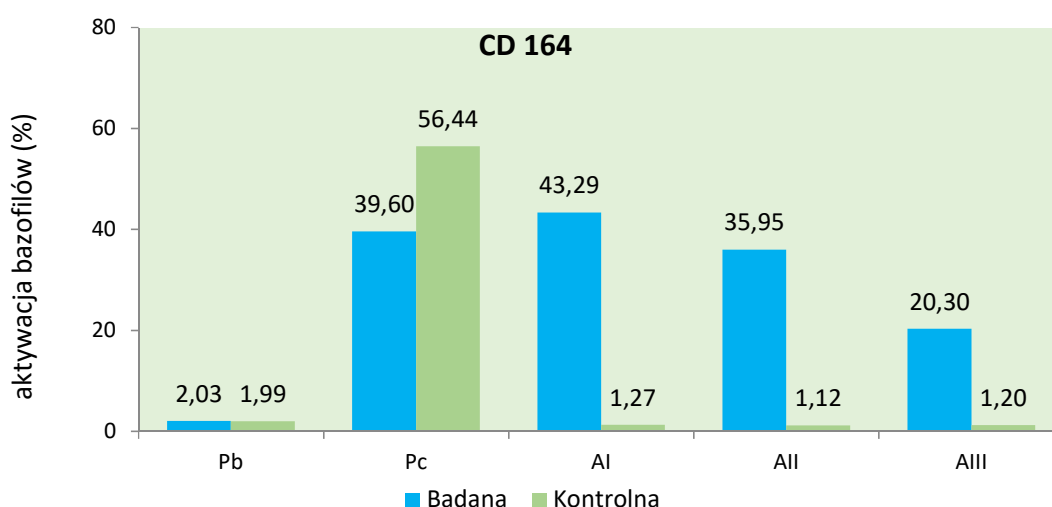
CD164	Grupa kontrolna (N = 26)						
	M	SD	Me	Q1	Q3	Min.	Maks.
Pb	1,99	0,12	1,96	1,90	2,06	1,82	2,20
Pc	56,44	19,39	60,94	48,19	68,04	9,16	80,25
AI	1,27	1,88	0,28	0,00	1,60	0,00	6,87
AII	1,12	1,95	0,16	0,00	1,42	0,00	7,66
AIII	1,20	1,71	0,16	0,00	1,69	0,00	5,63

M – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, Q1 – kwartył pierwszy, Q3 – kwartył trzeci, Min. – wartość minimalna, Maks. – wartość maksymalna.





Rycina 25. Średnia aktywacja bazofilów (%) w poszczególnych próbkach dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem markera CD 63, w podziale na grupę badaną i kontrolną



Rycina 26. Średnia aktywacja bazofilów (%) w poszczególnych próbkach dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem markera CD164, w podziale na grupę badaną i kontrolną

Na podstawie analizy powyżej przedstawionych danych zaobserwowano następujące zależności: w grupie pacjentów, w BAT z CD63, najwyższy średni poziom aktywacji bazofilów osiągnięto przy stężeniu alergenu AI 47,65%. Dla próbki AII średnia aktywacja bazofilów wyniosła 43,26%, natomiast dla najmniejszego stężenia *D. farinae* 26,61%. Maksymalna wartość aktywacji bazofilów wyniosła 96,66% dla próbki AII, jednak w pozostałych stężeniach alergenów wartości maksymalne były równie wysokie i przekraczały 95%.

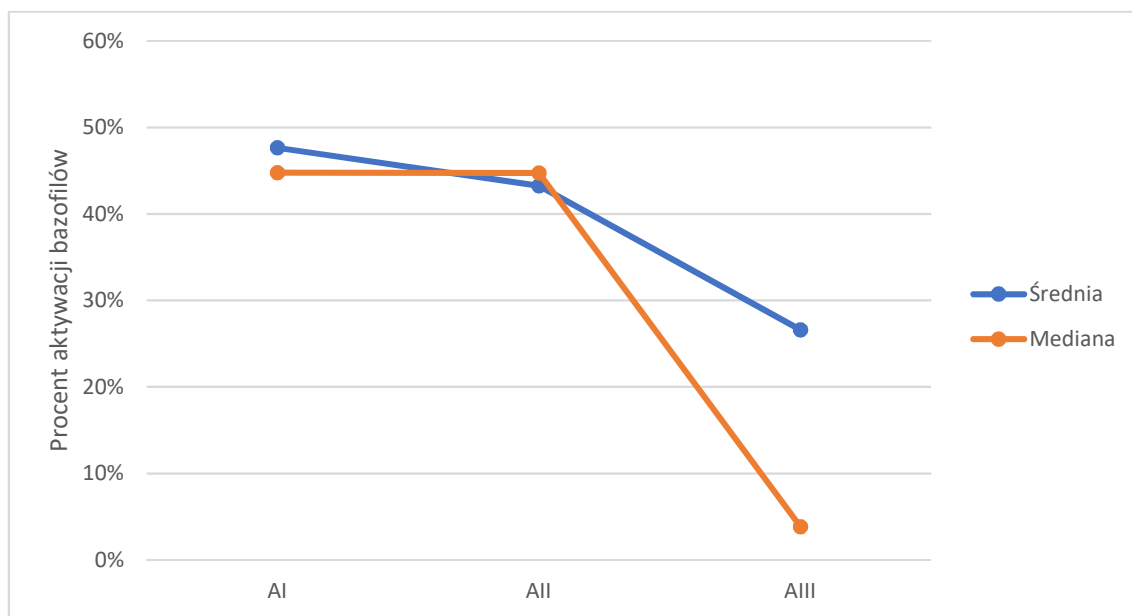
W przypadku zastosowania markera powierzchniowego CD164 osiągnięto następujące wyniki: w grupie badanej najwyższy średni poziom aktywacji bazofilów miała próbka z nierozcieńczonym alergenem AI – 43,29%, najniższy przy najmniejszym

stężeniu, AIII – 20,30%. Maksymalna wartość aktywacji wyniosła 93,02% dla alergenu w najwyższym stężeniu – AI.

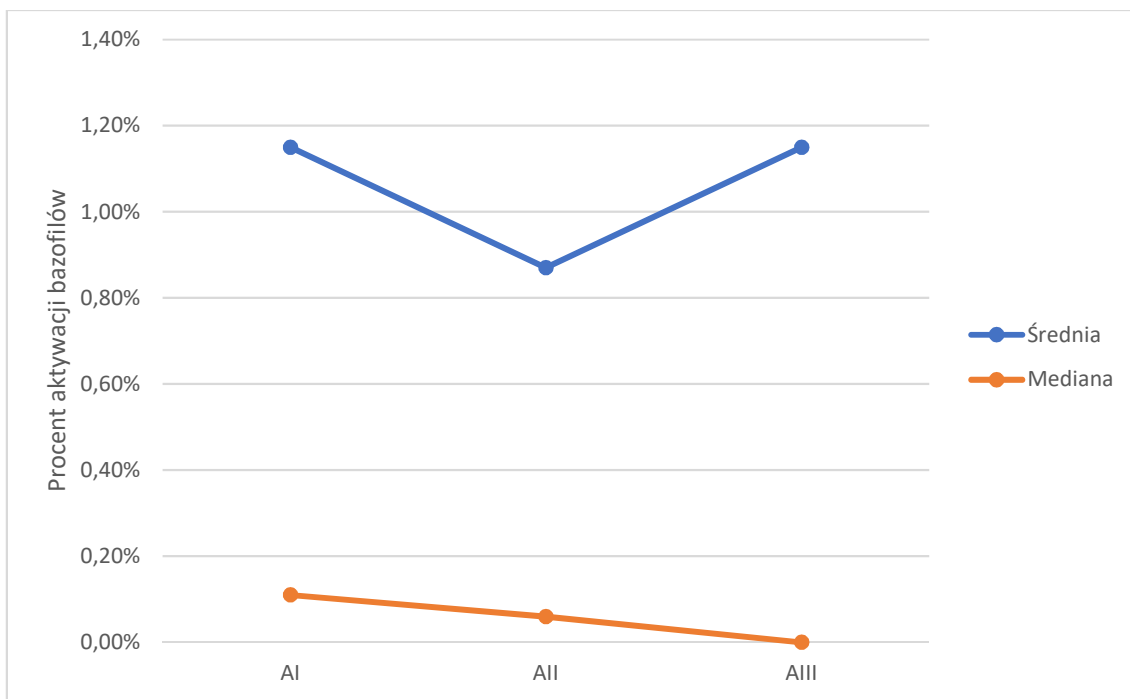
W grupie kontrolnej w obu testach BAT średni poziom aktywacji we wszystkich stężeniach alergenów był znacząco niższy niż w grupie pacjentów i oscylował w granicach 1%.

Porównując oba testy BAT z zastosowaniem różnych markerów aktywacji w każdym z nich największą średnią aktywację bazofilów osiągnięto w przypadku alergenu w najwyższym stężeniu – AI, najniższą w przypadku alergenu w największym rozcieńczeniu AIII.

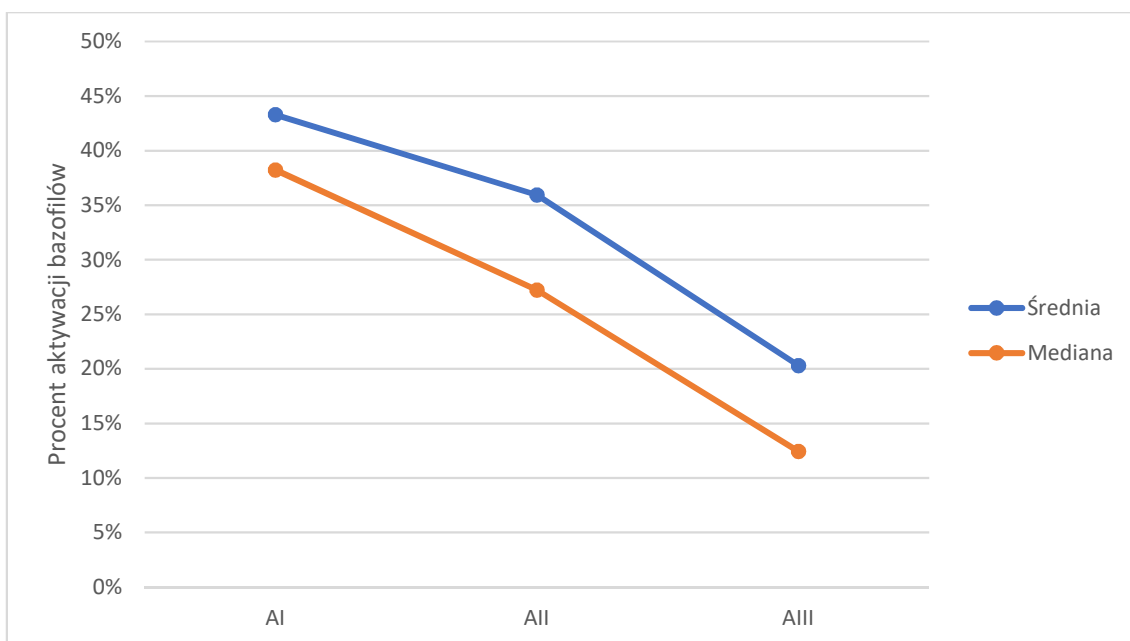
Rozkład uśrednionych wartości aktywacji bazofilów (z rozróżnieniem na średnią i medianę) przedstawiono na wykresach 27–31.



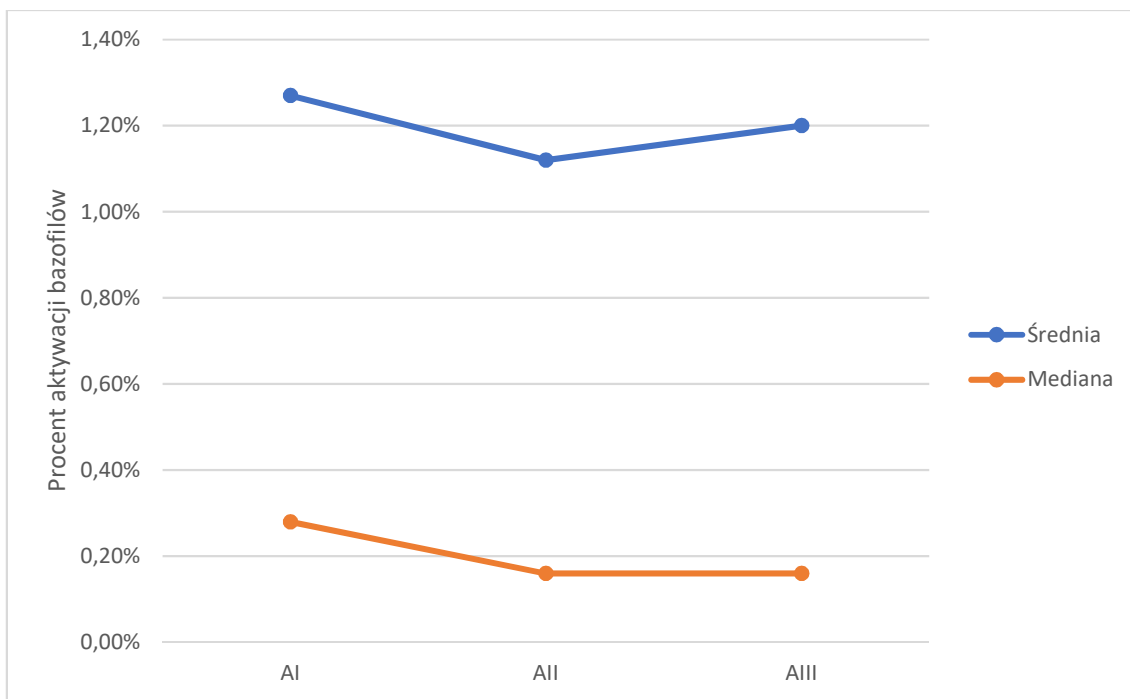
Rycina 27. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu *D. farinae* w grupie badanej, w BAT z zastosowaniem CD63



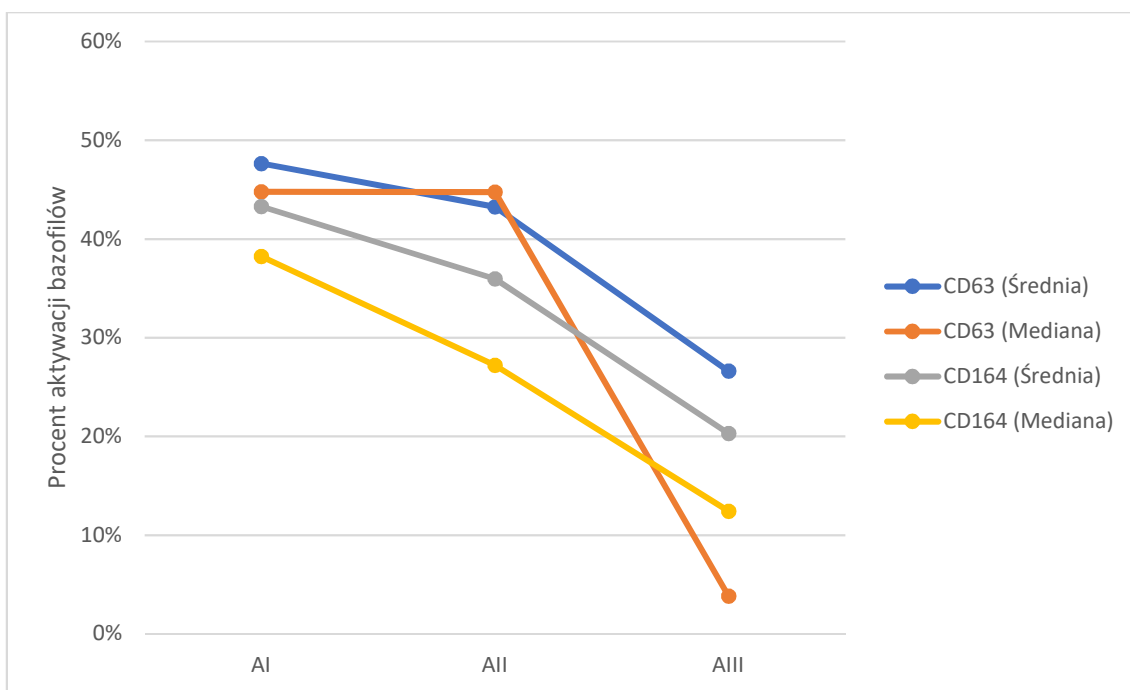
Rycina 28. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu *D. farinae*, w grupie kontrolnej, w BAT z zastosowaniem CD63



Rycina 29. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu *D. farinae* w grupie badanej, w BAT z zastosowaniem CD164



Rycina 30. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu *D. farinae* w grupie kontrolnej, w BAT z zastosowaniem CD164



Rycina 31. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu *D. farinae* w grupie badanej w BAT z zastosowaniem CD63 i CD164

W następnym etapie oceniono rozkład zmiennych. Zbieżność z rozkładem normalnym została oceniona przy użyciu testu Shapiro-Wilka, współczynnika skośności oraz kurtozy.

W większości przypadków badany rozkład okazał się być rozbieżny z rozkładem normalnym. Jedynie w przypadku próbki Pc dla BAT z CD63 w grupie kontrolnej zdecydowano o uznaniu rozkładu za normalny, mimo że test Shapiro-Wilka sugerował brak normalności. Podstawą tej decyzji były: wartość współczynnika skośności w przedziale od -1 do 1 ( $S = -0,71$ ), wartość kurtozy relatywnie bliska  $K = 3$  ( $K = 2,42$  w przypadku omawianego rozkładu) oraz wizualna ocena rozkładu (wykres typu histogram).

Normalność rozkładu zaobserwowano w przypadku następujących próbek:

- Pb, w teście aktywacji bazofila z CD63, w grupie badanej ( $p = 0,100$ ),
- Pb, w teście aktywacji bazofila z CD63, w grupie kontrolnej ( $p = 0,178$ ),
- Pc, w teście aktywacji bazofila z CD63, w grupie badanej ( $p = 0,056$ ),
- Pc, w teście aktywacji bazofila z CD63, w grupie kontrolnej ( $p = 0,034$ ),
- AI, w teście aktywacji bazofila z CD164, w grupie badanej ( $p = 0,167$ ),
- Pb, w teście aktywacji bazofila z CD164, w grupie kontrolnej ( $p = 0,233$ ).

Tabela 27. Ocena stopnia aktywacji bazofili dla poszczególnych próbek – zestawienie wyników testu Shapiro-Wilka dla obu testów BAT

Grupa	Marker	Próbka	W	p	S	K	Rozkład normalny
B	CD63	Pb	0,93	0,100	-0,03	1,76	tak
B	CD63	Pc	0,92	0,056	0,05	1,65	tak
B	CD63	AI	0,84	0,001	0,02	1,29	nie
B	CD63	AII	0,82	< 0,001	0,10	1,27	nie
B	CD63	AIII	0,73	< 0,001	0,86	1,98	nie
K	CD63	Pb	0,94	0,178	0,28	1,88	tak
K	CD63	Pc	0,91	0,034	-0,71	2,42	tak
K	CD63	AI	0,73	< 0,001	1,61	4,81	nie
K	CD63	AII	0,59	< 0,001	2,66	10,22	nie
K	CD63	AIII	0,54	< 0,001	2,58	8,96	nie
B	CD164	Pb	0,92	0,039	-0,19	1,84	nie
B	CD164	Pc	0,90	0,020	0,39	1,86	nie
B	CD164	AI	0,94	0,167	0,30	1,99	tak
B	CD164	AII	0,91	0,031	0,58	2,07	nie
B	CD164	AIII	0,81	< 0,001	1,48	4,35	nie
K	CD164	Pb	0,95	0,233	0,23	2,04	tak
K	CD164	Pc	0,90	0,017	-0,98	3,38	nie
K	CD164	AI	0,72	< 0,001	1,72	5,02	nie
K	CD164	AII	0,64	< 0,001	2,16	6,94	nie
K	CD164	AIII	0,74	< 0,001	1,37	3,73	nie

W – wartość statystyki W testu Shapiro-Wilka, S – współczynnik skośności, K – kurtoza. Zbieżność z rozkładem normalnym weryfikowana za pomocą podanych statystyk oraz wizualnej oceny histogramu rozkładu zmiennej.

Następnie porównano obie grupy – badaną i kontrolną kolejno dla BAT z CD63 oraz z CD164, w zakresie wszystkich próbek. Wyniki analizy statystycznej przedstawiono w tabelach 28–29. W przypadku próbek gdzie stwierdzono rozkład normalny stosowano test t (wartość statystyki testu t dla prób niezależnych), w pozostałych natomiast test U Manna-Whitneya.

Tabela 28. Zestawienie porównawcze wyników analizy statystycznej pomiędzy grupą badaną i kontrolną w zakresie wartości aktywacji bazofili w BAT z zastosowaniem markera CD63

CD63	MD (95% CI)	Statystyka testowa	p
Pb	0,06 (0,00; 0,12)	t = 1,93 df = 48	0,060
Pc	-7,21 (-23,07; 8,65)	t = -0,91 df = 49	0,366
AI	44,67 (16,96; 79,46) <sup>1</sup>	W = 584,00	< 0,001
AII	44,68 (5,94; 71,32) <sup>1</sup>	W = 545,00	< 0,001
AIII	3,83 (0,05; 34,03) <sup>1</sup>	W = 486,00	0,002

MD – różnica średnich lub median<sup>1</sup> (grupa badana vs. grupa kontrolna) z 95% przedziałem ufności (CI), t – wartość statystyki testu t dla prób niezależnych, df – liczba stopni swobody, W – wartość statystyki testu U Manna-Whitneya.

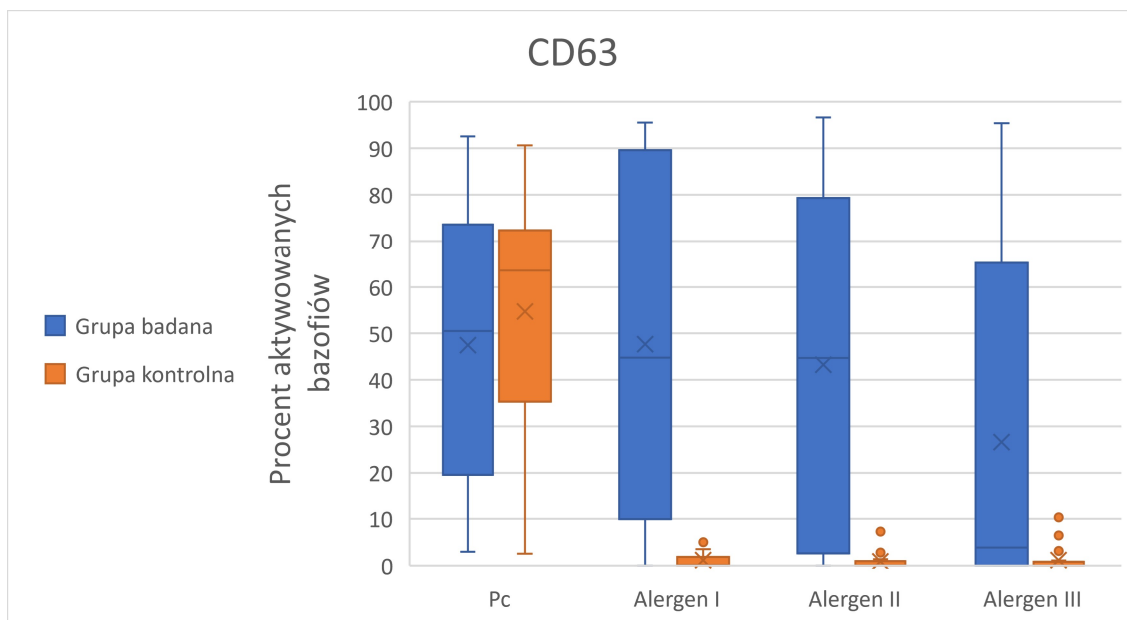
Tabela 29. Zestawienie porównawcze wyników analizy statystycznej pomiędzy grupą badaną i kontrolną w zakresie wartości aktywacji bazofili w BAT z zastosowaniem markera CD164

CD164	MD (95% CI)	Statystyka testowa	p
Pb	0,10 (-0,02; 0,12)	W = 416,00	0,155
Pc	-25,04 (-34,94; -2,62)	W = 215,00	0,024
AI	37,96 (30,90; 45,65)	W = 664,00	< 0,001
AII	27,05 (14,76; 49,43)	W = 637,00	< 0,001
AIII	12,27 (6,16; 17,09)	W = 584,00	< 0,001

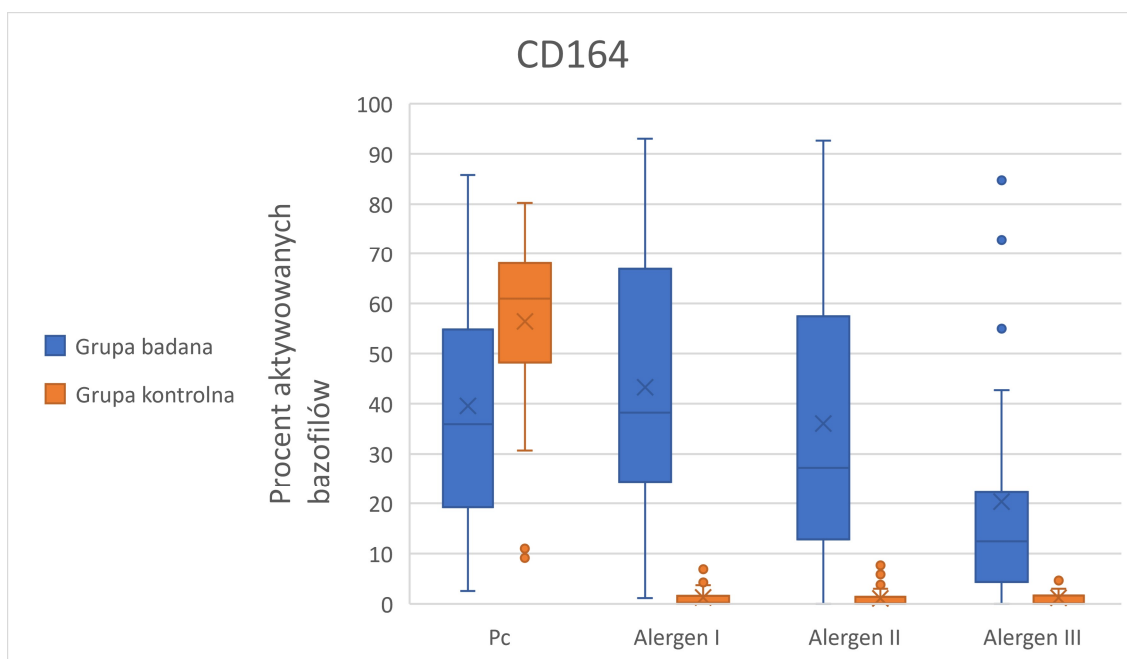
MD – różnica średnich lub median<sup>1</sup> (grupa badana vs. grupa kontrolna) z 95% przedziałem ufności (CI), t – wartość statystyki testu t dla prób niezależnych, df – liczba stopni swobody, W – wartość statystyki testu U Manna-Whitneya.

W przypadku BAT z zastosowaniem CD63 w zakresie próbek Pb i Pc nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w zakresie poziomu aktywacji bazofili pomiędzy grupą

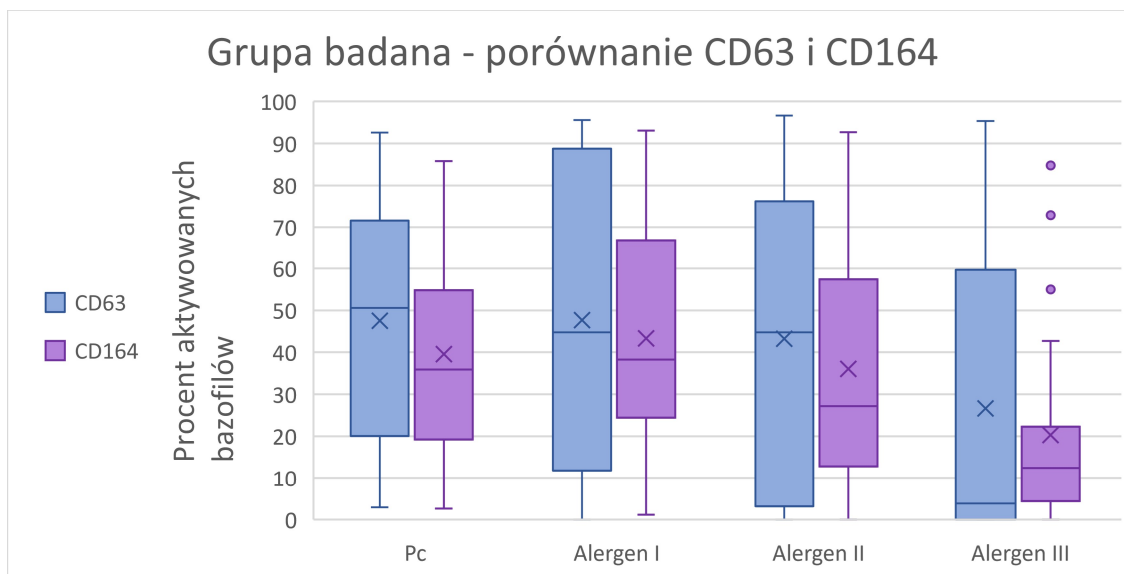
badaną i kontrolną. Brak równości pomiędzy grupami zaobserwowano natomiast w próbkach po stymulacji alergenem – AI, AII i AIII. W teście aktywacji bazofila z CD164, w przypadku wszystkich próbek oprócz kontroli ujemnej, wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy pacjentami a zdrowymi uczestnikami badania. Wyniki przedstawiono w formie wizualnej na rycinach 32–34.



Rycina 32. Porównanie grupy kontrolnej i badanej w zakresie aktywowanych bazofilów w teście BAT z CD63



Rycina 33. Porównanie grupy kontrolnej i badanej w zakresie aktywowanych bazofilów w teście BAT z CD164



Rycina 34. Porównanie liczby aktywowanych bazofilów w grupach badanych pomiędzy testami BAT z CD63 i CD164

#### 4.3.3. Ocena efektywności diagnostycznej testu aktywacji bazofila z zastosowaniem markera CD164. Czulość i specyficzność testów BAT

Oszacowanie przydatności diagnostycznej testu BAT w dużej mierze zależy od wyboru optymalnego punktu odcięcia. Należy określić taką wartość procentową aktywowanych bazofilów (będących miarą ekspresji CD63 lub CD164), która podzieli badaną zbiorowość na dwie grupy (uczulonych na *D. farinae* lub zdrowych) i będzie najkorzystniejsza z punktu widzenia czulości i specyficzności.

Dla każdego z potencjalnych punktów odcięcia (% aktywowanych bazofilów) wyznaczono wartości prawdziwie dodatnie (PD), prawdziwie ujemne (PU), fałszywie dodatnie (FD) i fałszywie ujemne (FU). Obserwacje prowadzono oddzielnie dla każdego ze stężeń alergenu (AI – AIII), dla obu testów BAT oraz asIgE.

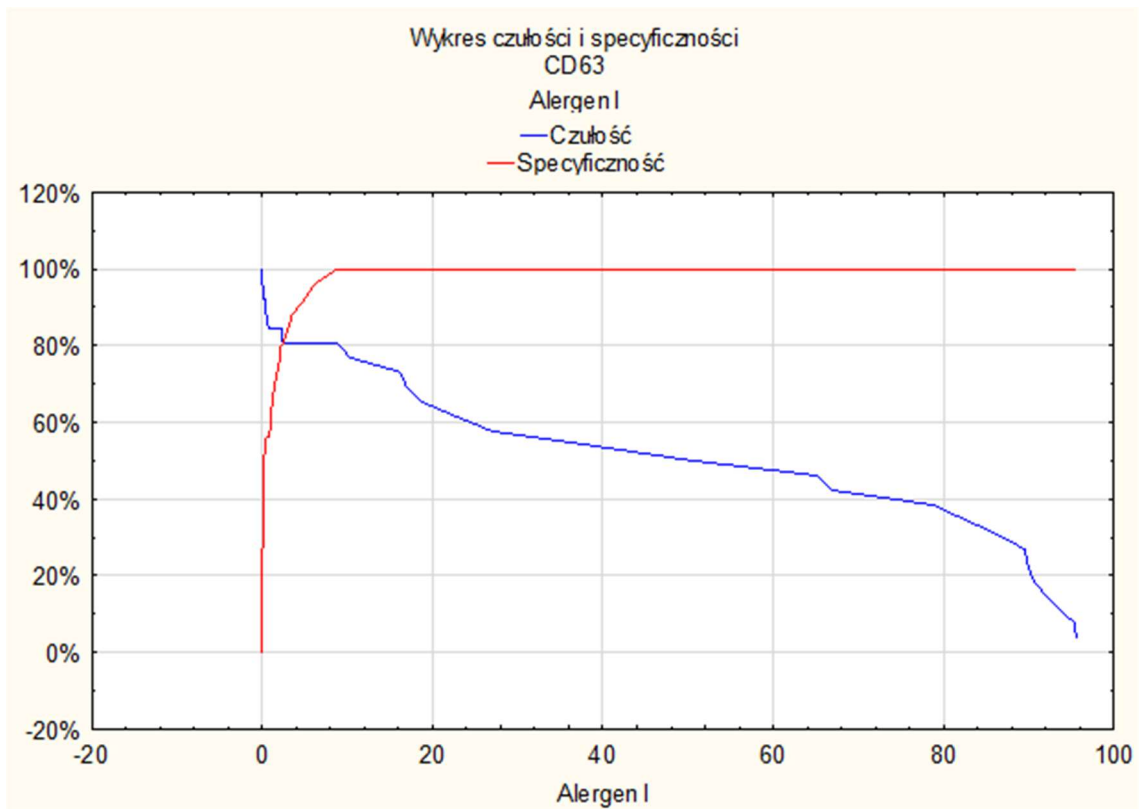
Czulość, czyli prawdopodobieństwo otrzymania wyniku dodatniego u osoby uczulonej na *D. farinae* oraz swoistość tj. prawdopodobieństwo uzyskania ujemnego wyniku u osoby zdrowej, obliczono według następujących wzorów:

$$\text{czulość} = \frac{PD}{PD+FU}$$

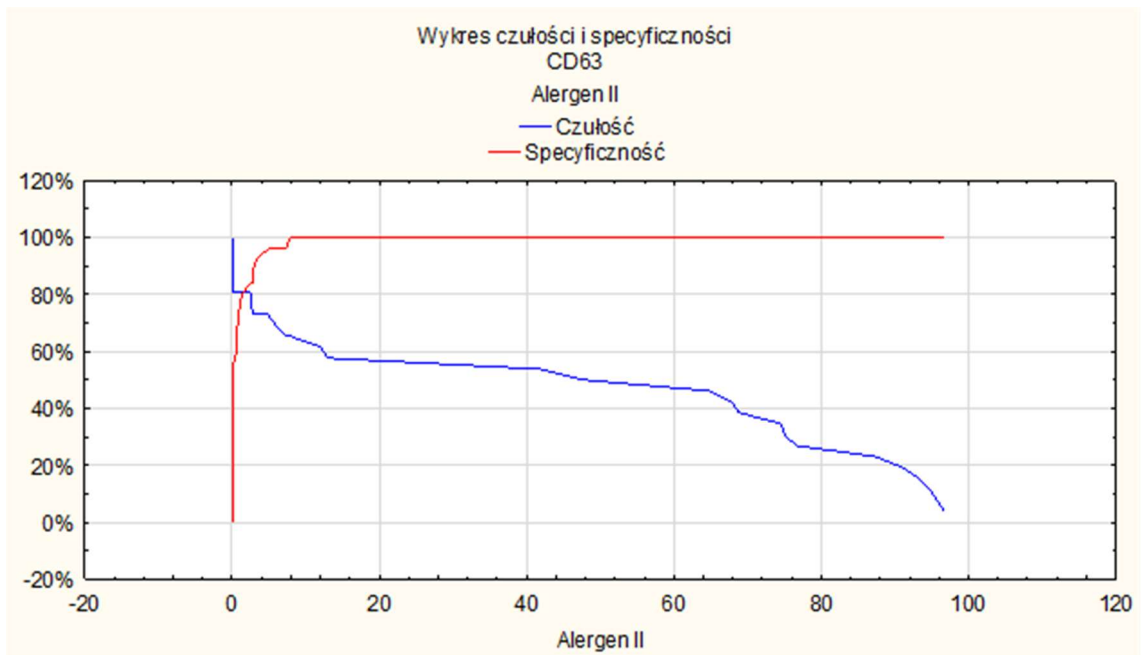
$$\text{swoistość} = \frac{PU}{FD+P}$$



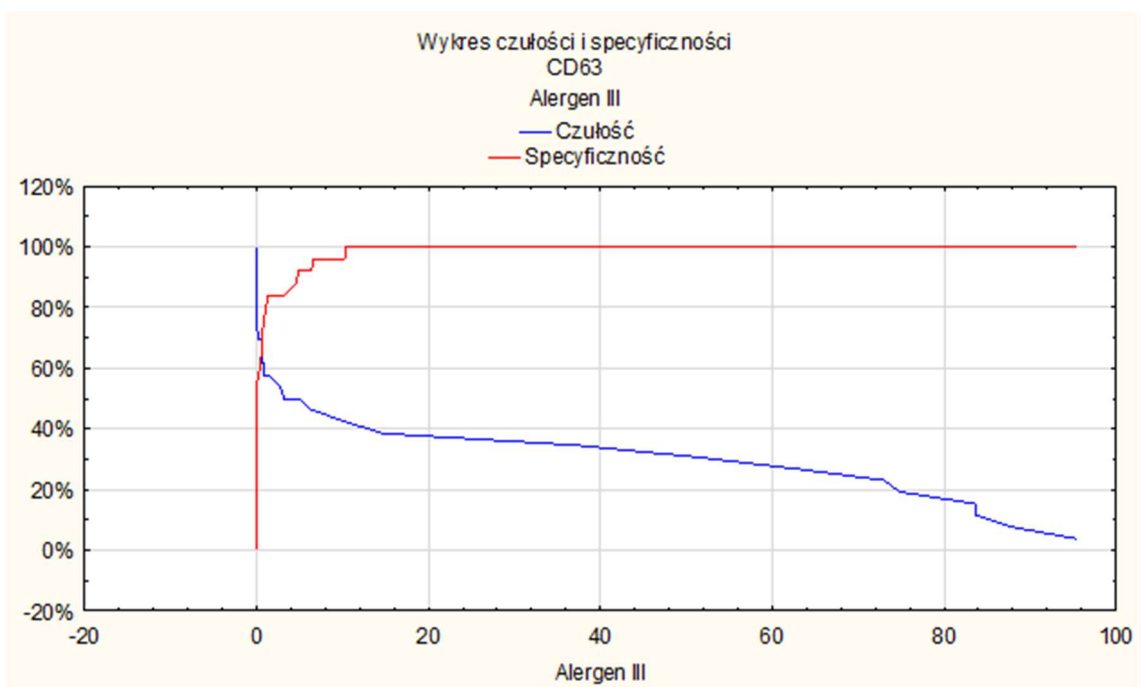
Przeanalizowano zależności pomiędzy obiema zmiennymi. Zamieszczone poniżej wykresy (35–41) przecięcia czułości i specyficzności pozwalają na zlokalizowanie punktu, w którym jednocześnie obie wartości są największe dla poszczególnych parametrów.



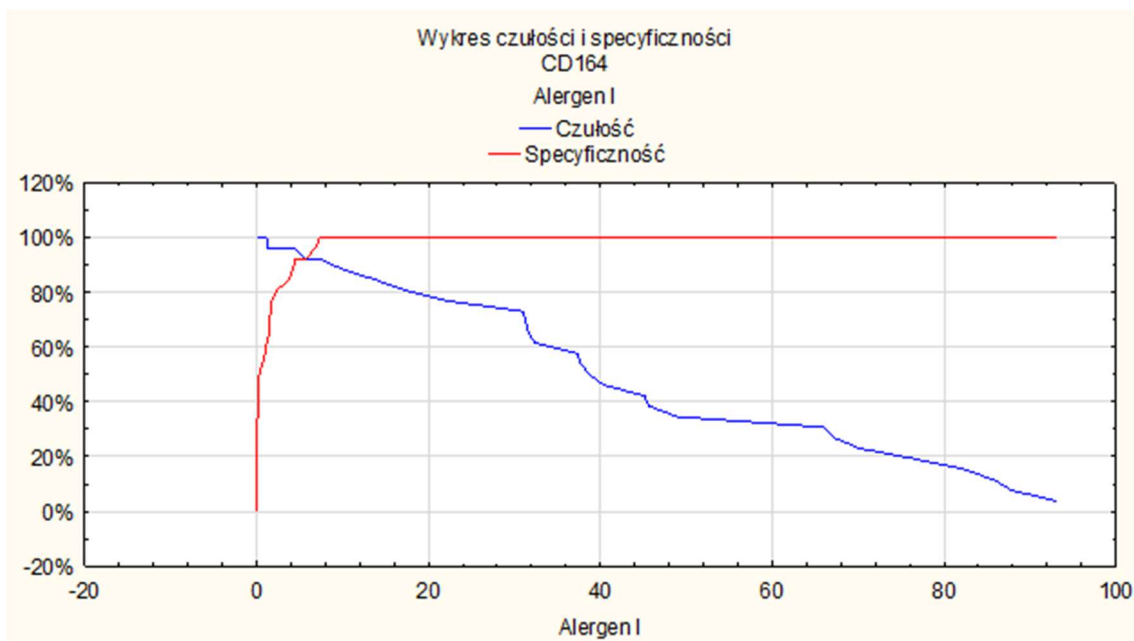
Rycina 35. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu I)



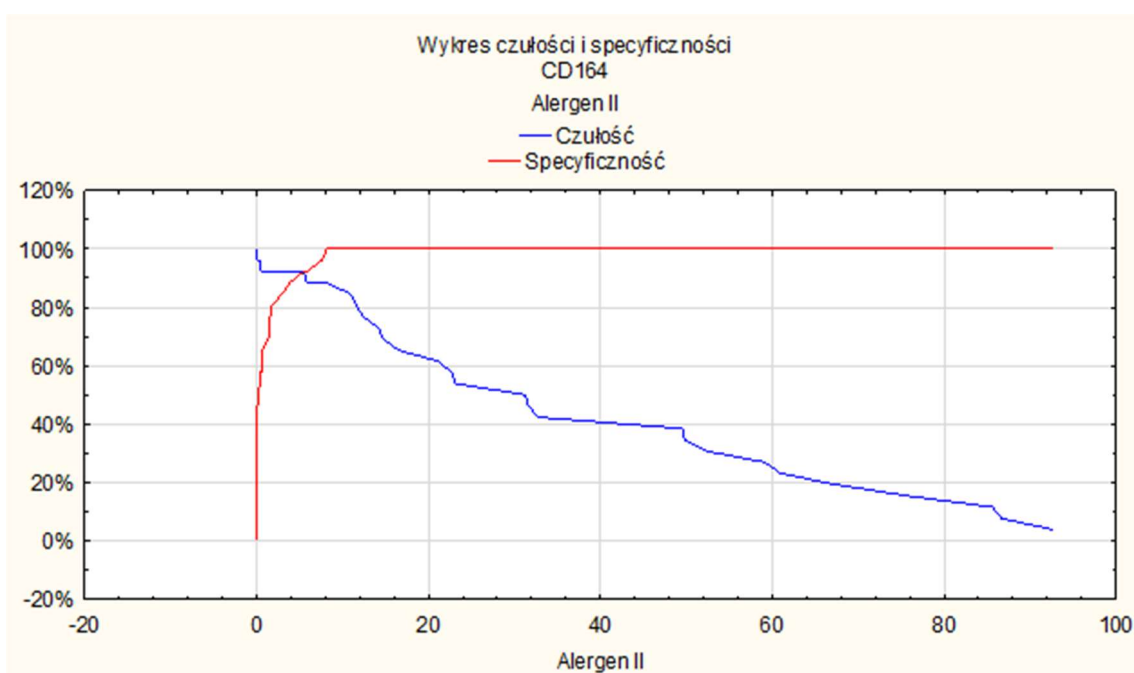
Rycina 36. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu II)



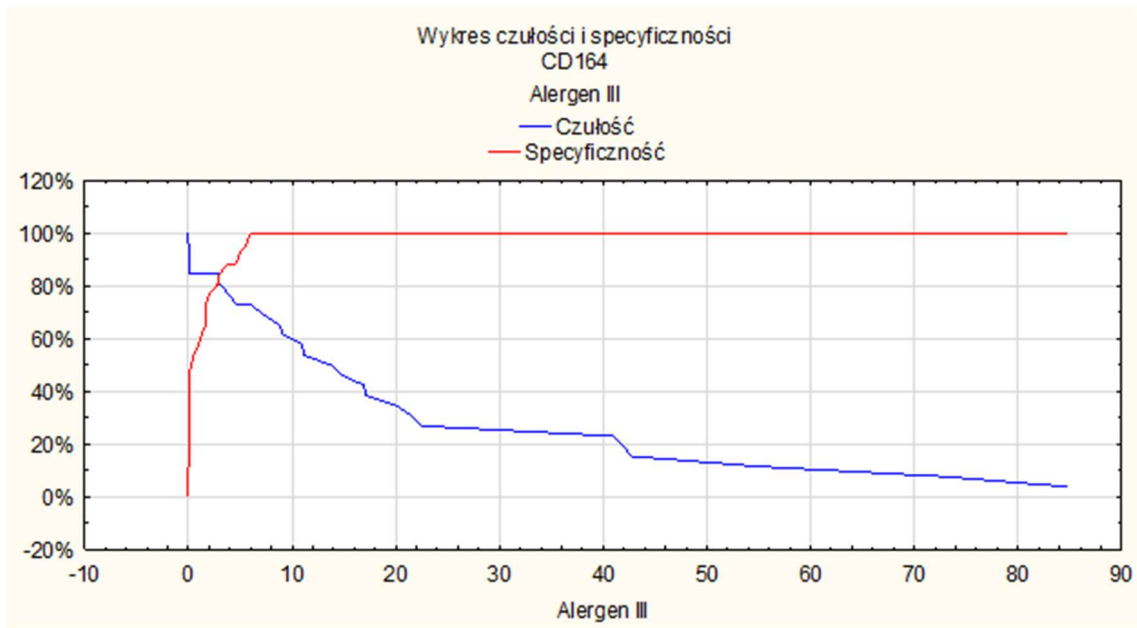
Rycina 37. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu III)



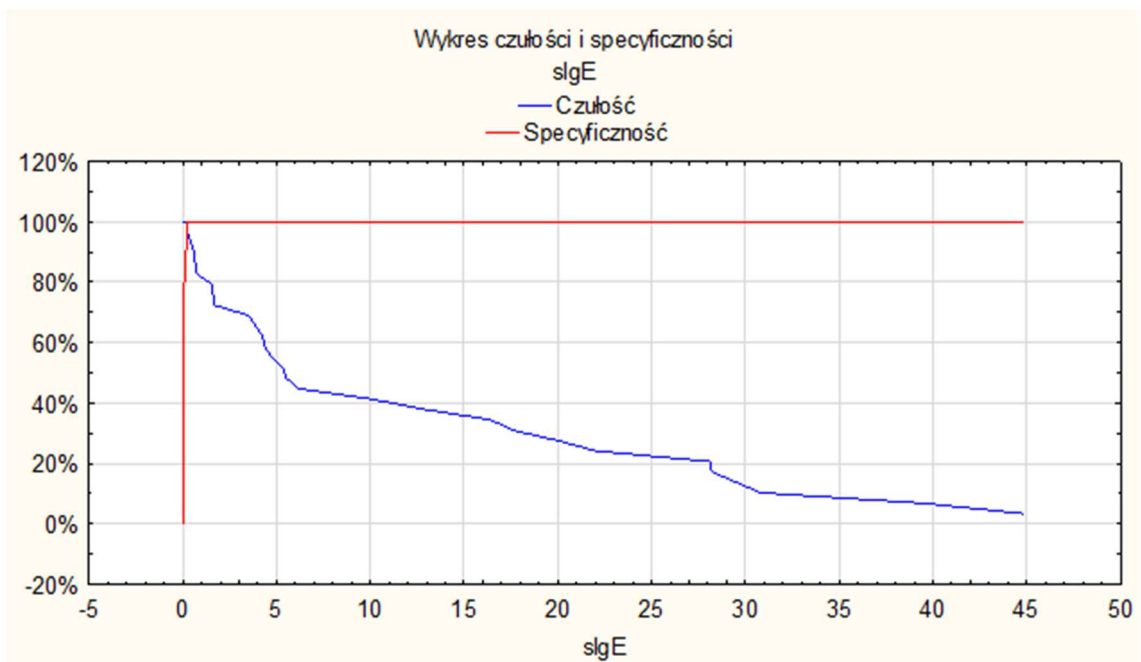
Rycina 38. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu I)



Rycina 39. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu II)

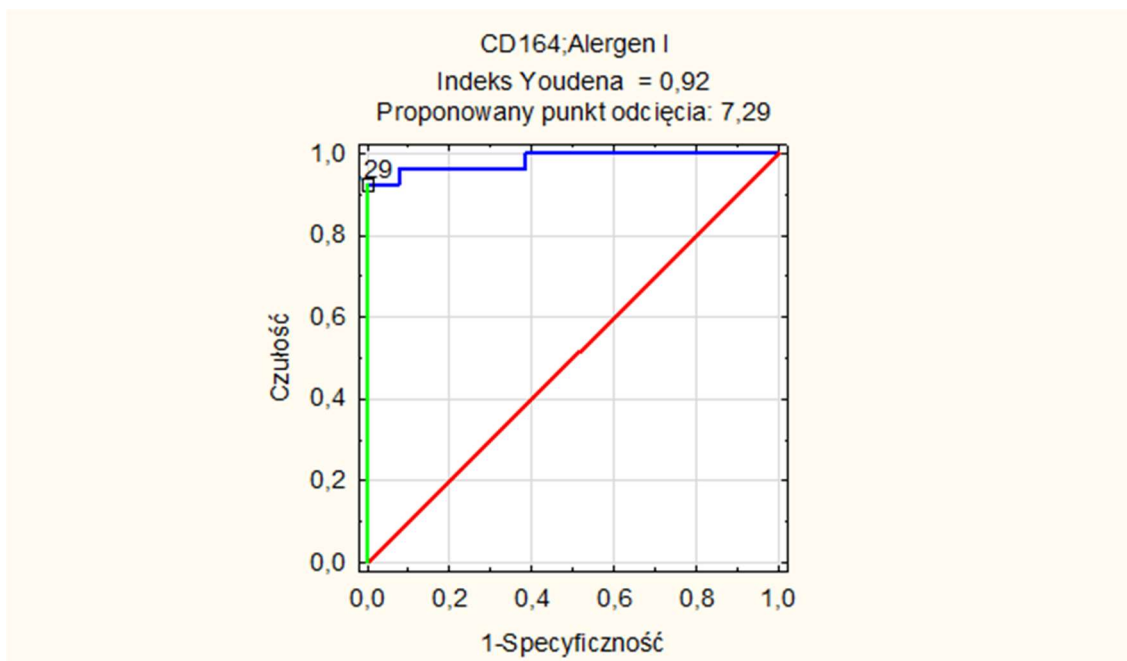


Rycina 40. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu III)

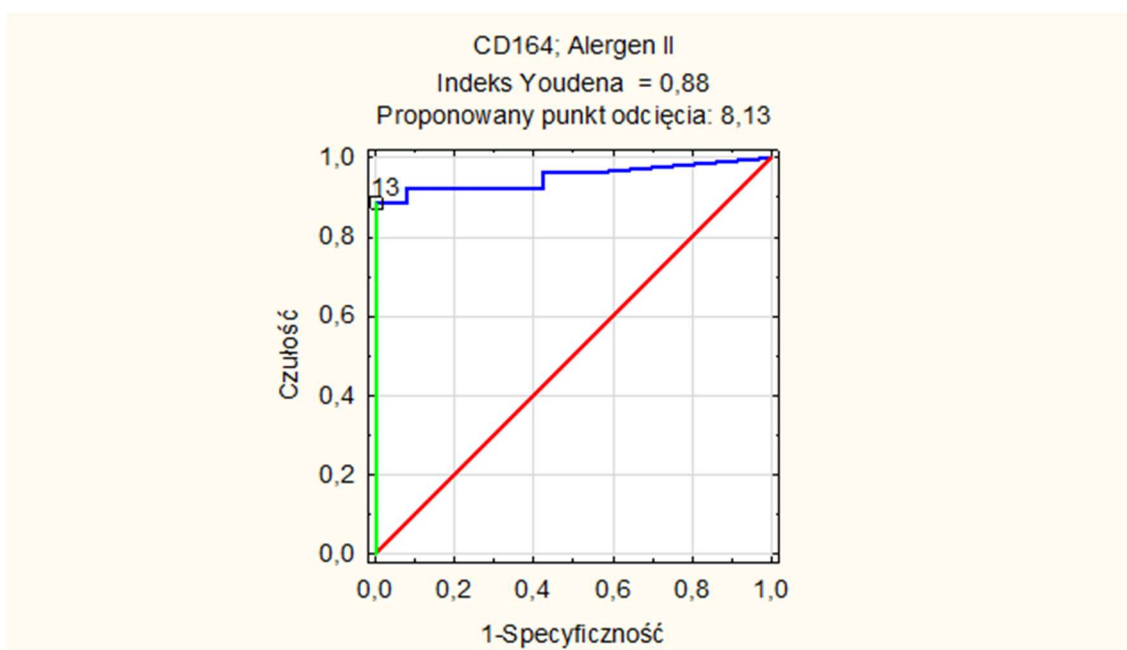


Rycina 41. Wykres czułości i specyficzności dla oznaczenia alergenowo swoistego IgE

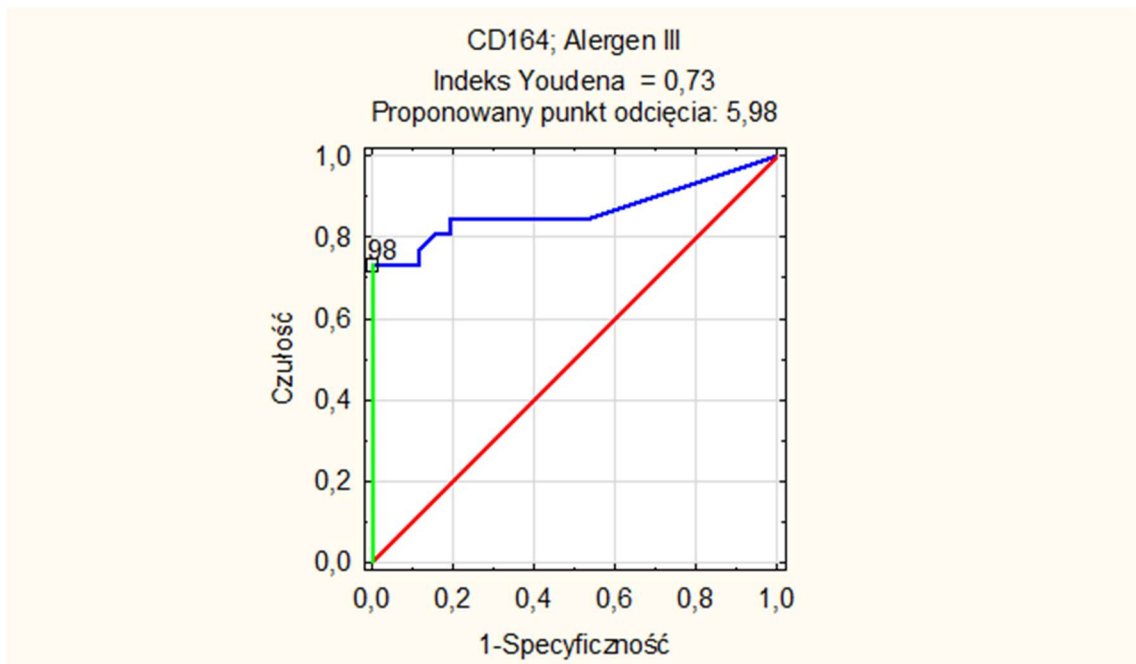
W celu jeszcze bardziej precyzyjnej oceny jakości analizowanych testów oraz wyznaczenia punktu odcięcia wykreślono krzywe ROC (Ryciny 42–53).



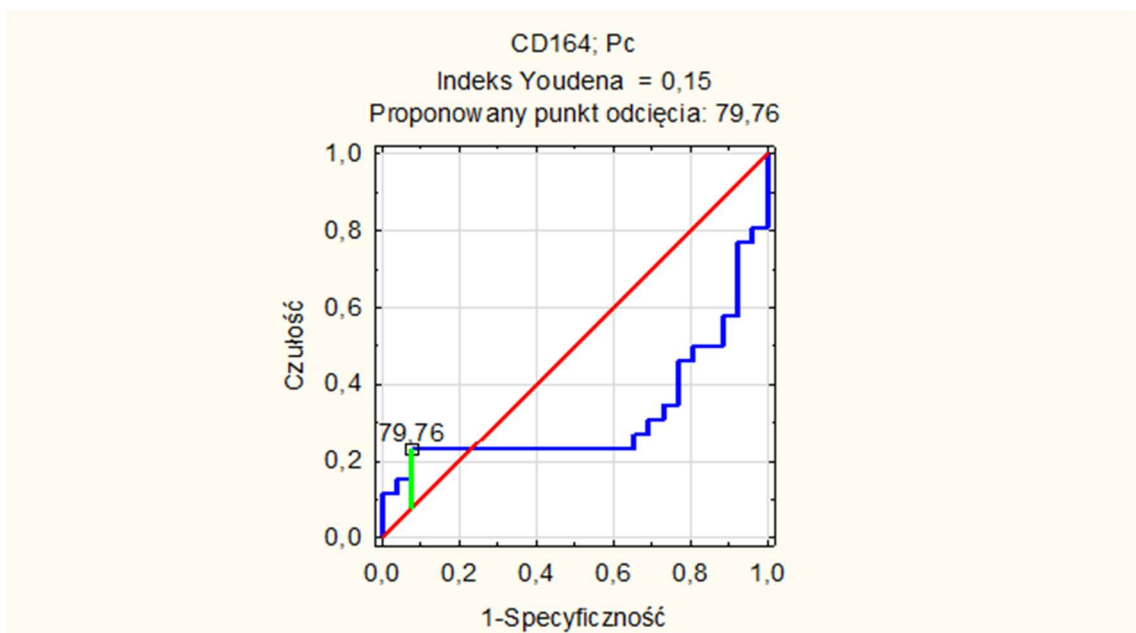
Rycina 42. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu I)



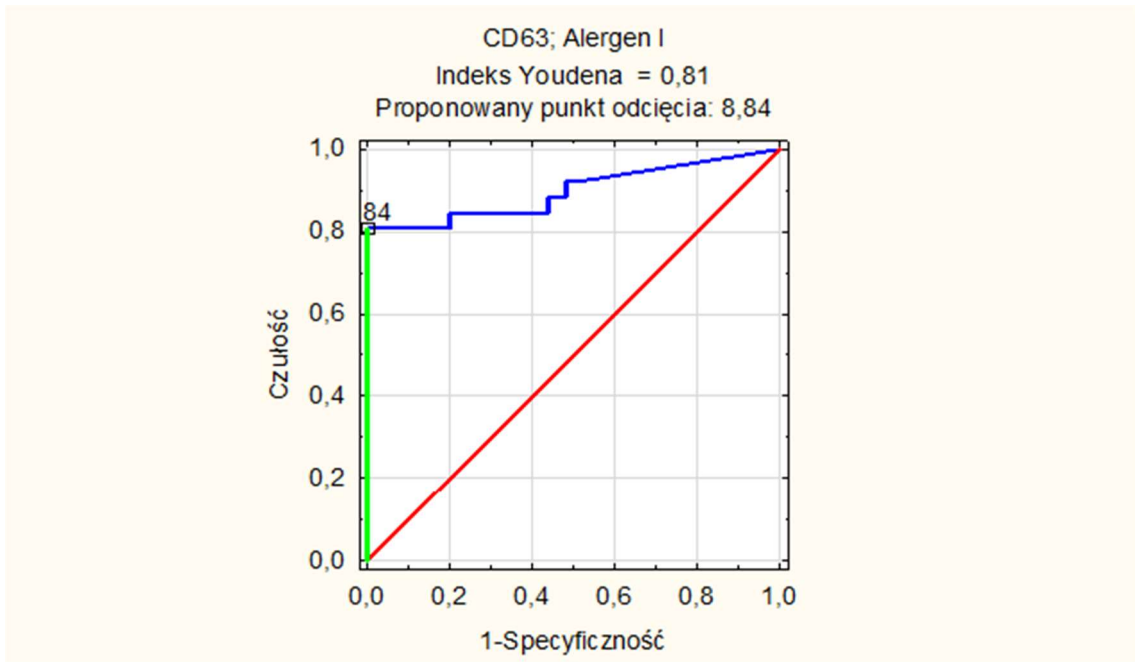
Rycina 43. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu II)



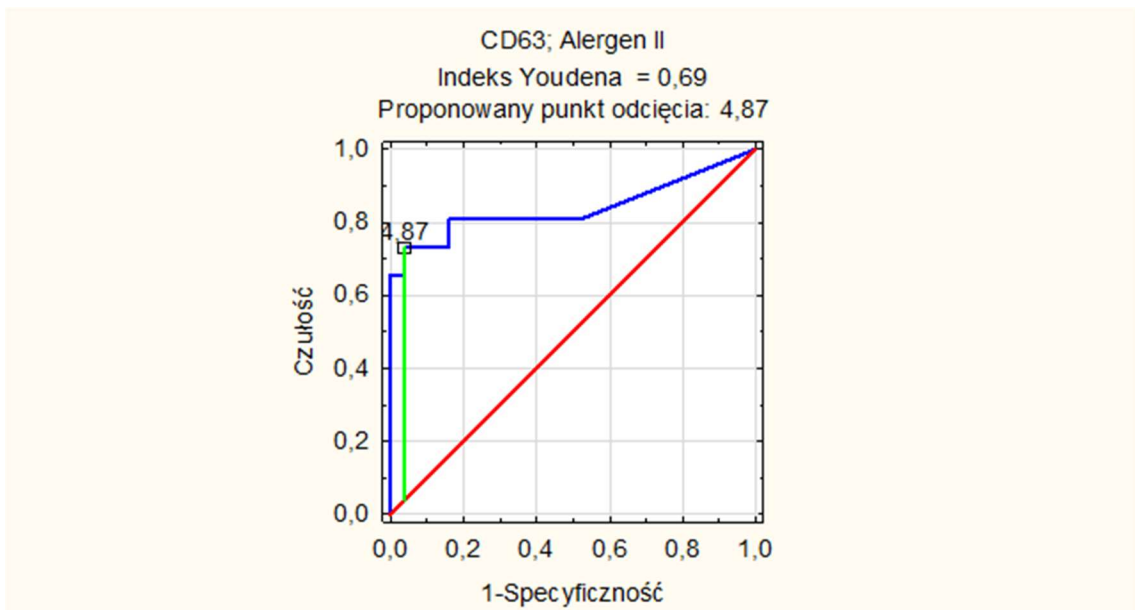
Rycina 44. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu III)



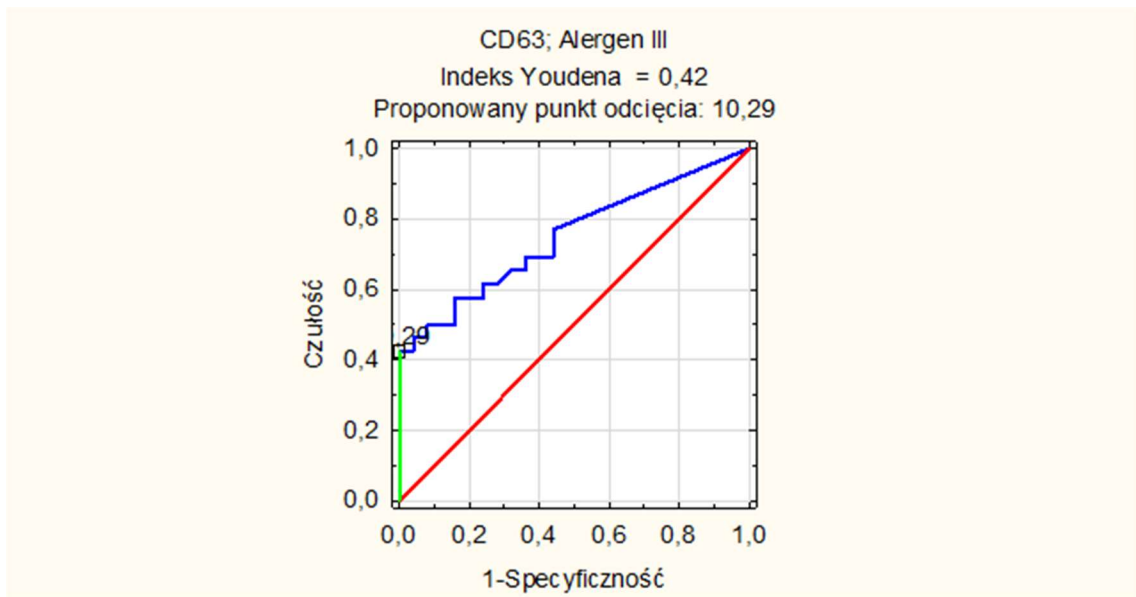
Rycina 45. Krzywa ROC dla kontroli dodatniej (Pc), w teście aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164



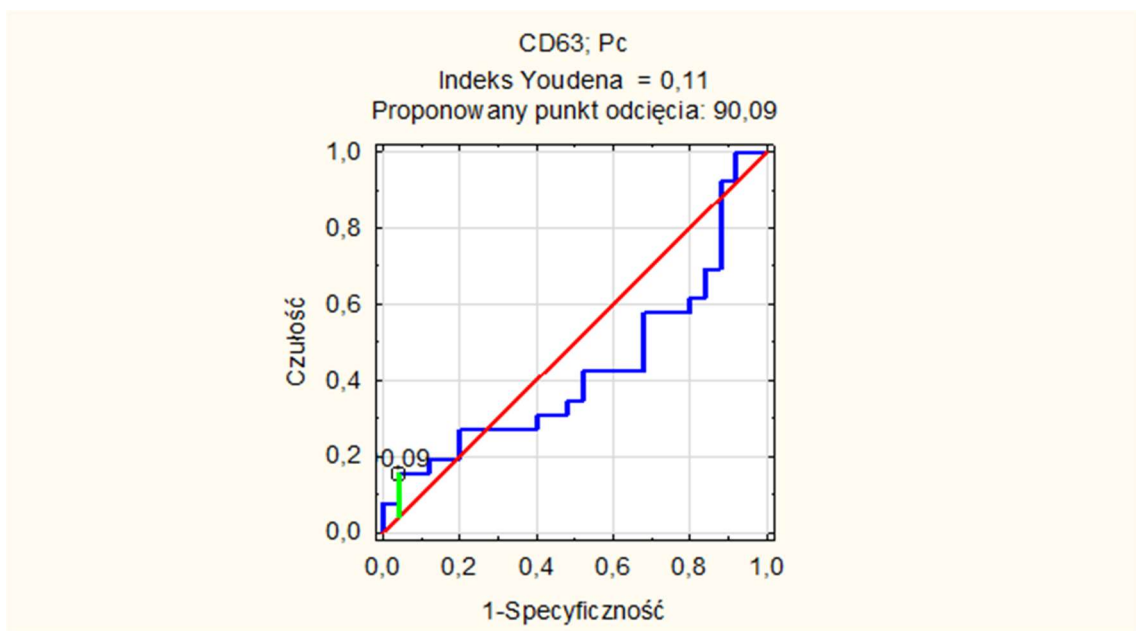
Rycina 46. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu I)



Rycina 47. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu II)

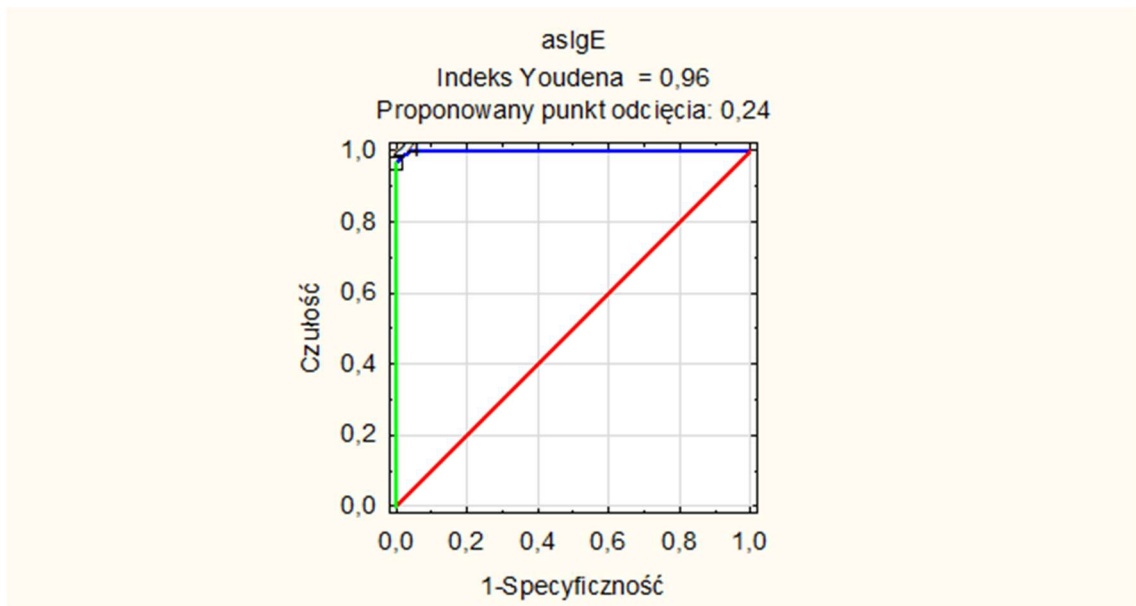


Rycina 48. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu III)

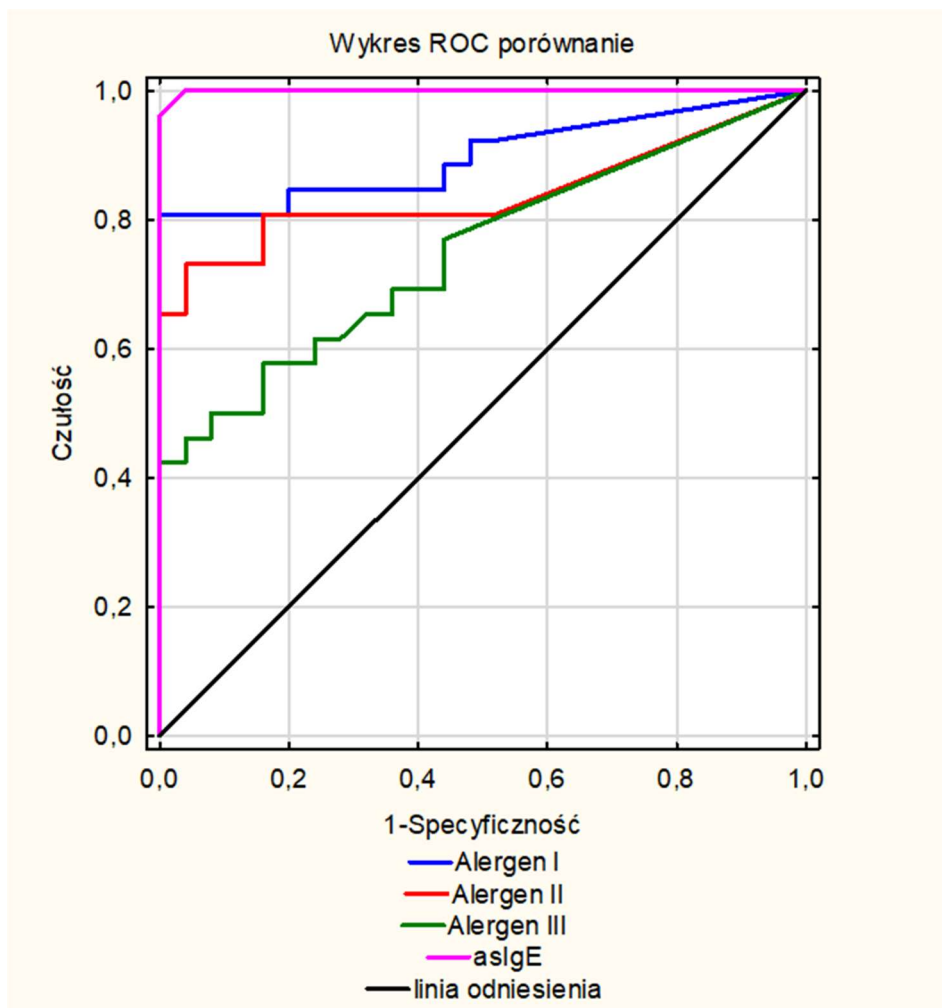


Rycina 49. Krzywa ROC dla kontroli dodatniej (Pc) w teście aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63

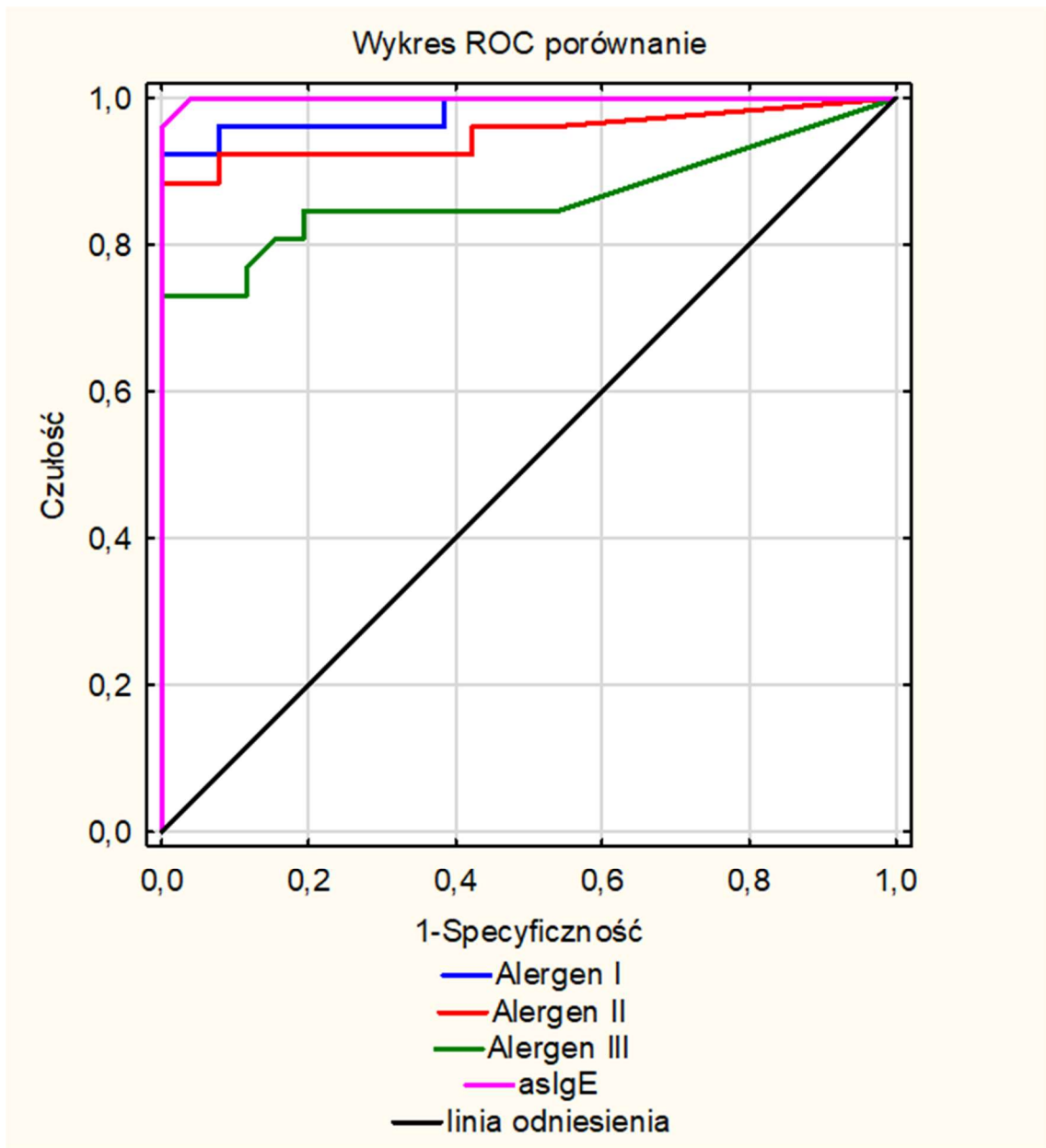




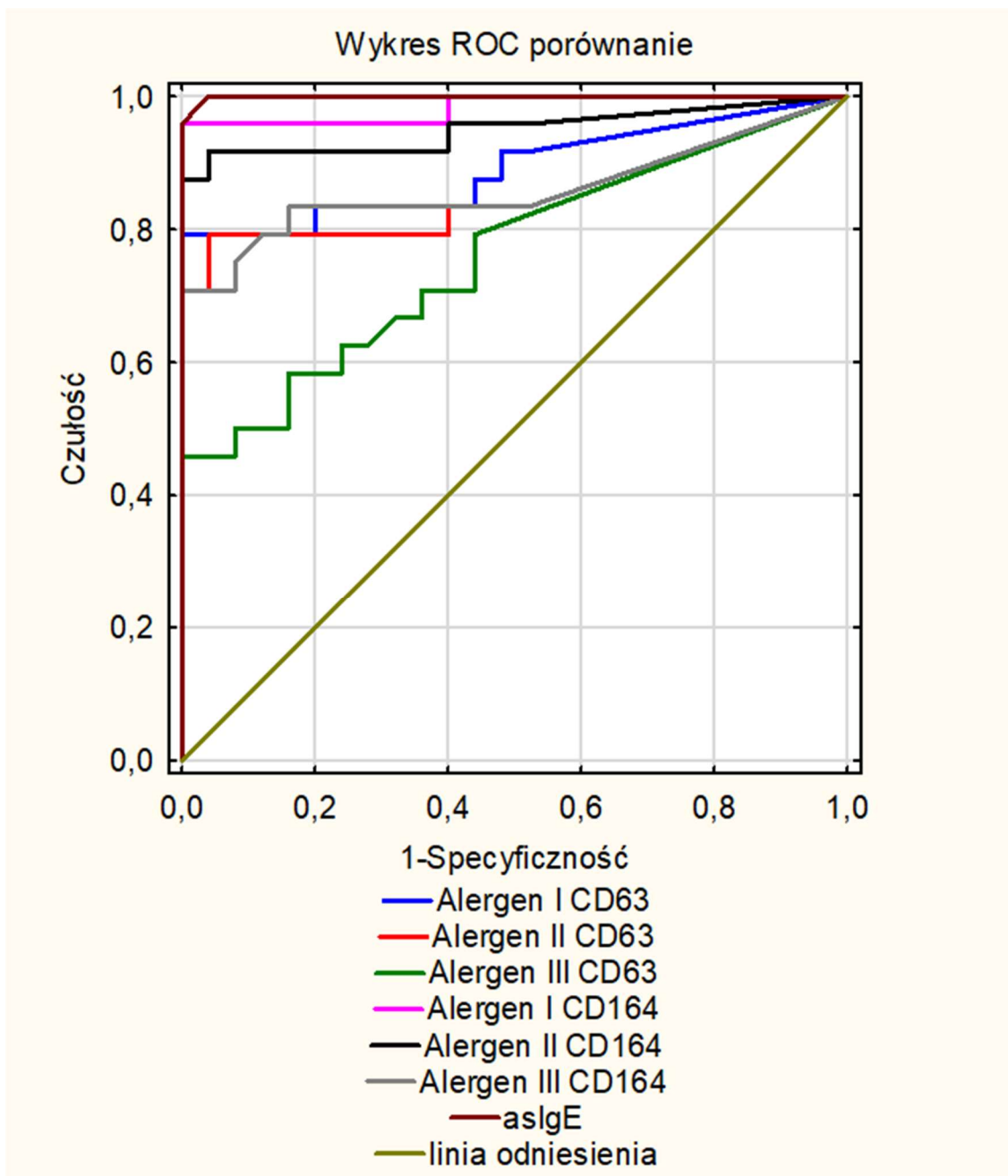
Rycina 50. Krzywa ROC dla oznaczenia asIgE



Rycina 51. Zestawienie krzywych ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 oraz oznaczenia asIgE



Rycina 52. Zestawienie krzywych ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 oraz oznaczenia asIgE



Rycina 53. Zestawienie krzywych ROC dla testów aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 i CD164 oraz oznaczenia asIgE

W kolejnym etapie obliczono indeks Youdena dla wszystkich zmiennych (Tabela 30). W tym celu wykorzystano następujący wzór:

$$\text{Indeks Youdena} = \text{czulość} + \text{swoistość} - 1$$

Dodatkowo, jeśli zdefiniujemy czulość i swoistość możemy obliczenia przedstawić jako:

$$\text{Indeks Youdena} = \frac{PD}{PD+FU} + \frac{PU}{PU+F} - 1$$

Wartość indeksu Youdena mieści się w przedziale  $< 0,1 >$ . Wskaźnik przyjmuje wartość zerową, kiedy test diagnostyczny daje taki sam odsetek wyników dodatnich w grupie pacjentów jak i w grupie zdrowych. Im bardziej doskonały test, tj. im wyższa jest suma czułości i swoistości, tym wartość indeksu jest bliższa jedności [55].

Tabela 30. Indeks Youdena dla analizowanych zmiennych w teście aktywacji bazofila z CD63 i CD164 oraz oznaczenia asIgE

CD63	Indeks Youdena	CD 164	Indeks Youdena
Pc	0,11	Pc	0,15
Alergen I	0,81	Alergen I	0,92
Alergen II	0,69	Alergen II	0,88
Alergen III	0,42	Alergen III	0,73
asIgE	0,96	asIgE	0,96

Zarówno w przypadku testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 jak i CD164, najwyższy indeks Youdena osiągnięto dla największego stężenia alergenu, AI. W przypadku średniego stężenia alergenu, AII, w BAT z CD164, wartości wskaźnika były jednak zbliżone do obserwowanych przy próbce AI. Spośród wszystkich testów, najbardziej bliski jedności był wskaźnik uzyskany dla oznaczenia asIgE. Jednak tak dużą dokładność uzyskujemy tylko wówczas, jeśli przyjmujemy wyznaczony poprzez wykreślenie krzywej ROC punkt odcięcia na poziomie 0,24 kU/l, a nie ogólnie stosowaną normę 0,35 kU/l.

Poniżej, w tabeli 31 przedstawiono zestawienie pozostałych wartości wyznaczonych poprzez wykreślenie krzywych ROC, w tym zdefiniowane cut off point odpowiadające poszczególnym stężeniom alergenów z różnicowaniem na kolejne testy BAT.

Tabela 31. Zestawienie wartości wyznaczonych na podstawie krzywych ROC dla testu aktywacji bazofila z CD63, CD164 oraz oznaczenia asIgE

CD63	Czułość	Swoistość	Punkt odcięcia %	AUC	p
Pc	0,154	0,96	90,09	0,429	0,3922
Alergen I	0,808	1	8,84	0,898	0,0000
Alergen II	0,731	0,96	4,87	0,838	0,0000
Alergen III	0,424	1	10,29	0,748	0,0003
<b>CD164</b>					
Pc	0,231	0,923	79,76	0,318	0,0237
Alergen I	0,923	1	7,29	0,982	0,0000
Alergen II	0,885	1	8,13	0,951	0,0000
Alergen III	0,731	1	5,98	0,865	0,0000
<b>asIgE</b>	0,964	1	0,24	0,999	0,0000

AUC – pole pod krzywą ROC; p – poziom istotności; punkt odcięcia – procent aktywnych bazofilów, wyznaczający punkt odcięcia.

Miarą jakości otrzymanych wyników, obok indeksu Youdena, jest pole pod krzywą ROC – AUC (area under ROC curve). Gdy krzywa ROC pokrywa się z przekątną ( $x = y$ ), wówczas AUC jest równe 0,5, a test diagnostyczny jest tak samo precyzyjny jak losowy przydział otrzymywanych wyników do grupy dodatniej i ujemnej. Im większe pole powierzchni pod krzywą (im bliższe wartości 1), tym dokładniejsza klasyfikacja poszczególnych uczestników badania do grupy uczulonych na *D. farinae* i zdrowych, na podstawie analizowanej zmiennej [56]. W przypadku obu testów BAT, największe AUC uzyskano przy najwyższym stężeniu alergenów (AI), przy czym zbliżone wartości otrzymano również dla próbek AII (Rycina 52 i 53). AUC dla BAT z CD164 było wyższe w zakresie wszystkich stężeń alergenów w porównaniu z wynikami uzyskanymi w teście aktywacji bazofila z CD63. Potwierdzeniem tych wyników jest graficzne zestawienie krzywych ROC dla wszystkich testów (rycina 54). Należy również zauważyć, że na przedstawionym wykresie, wyraźnie dominują linie dla asIgE oraz BAT z CD164 (AI i AII) i są to testy o największej efektywności diagnostycznej. Aby w sposób jednoznaczny określić różnice pomiędzy wartościami AUC krzywych ROC, dla testów o największej efektywności diagnostycznej przeprowadzono test DeLonga [57]. Na podstawie wykonanej analizy nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy testami BAT z CD63 i CD164 (w zakresie stężeń AI) oraz CD164 i oznaczeniem asIgE, natomiast przy porównaniu AUC testu z CD63 oraz oznaczenia asIgE osiągnięto poziom istotności statystycznej ( $p = 0,03$ ) (tabela 32).

*Tabela 32. Zestawienie porównawcze wyników testu DeLonga dla poszczególnych krzywych ROC dla obu testów BAT oraz asIgE*

Zestawiane krzywe ROC	Wartość AUC	p
ROC CD63(AI)/ROC CD164 (AI)	0,898 / 0,982	0.09112
ROC CD63(AI)/ROC asIgE	0,898/ 0,999	0.03247
ROC CD164(AI)/ROC asIgE	0,982 / 0,999	0.28290

Oba testy BAT charakteryzowały się wysoką czułością i swoistością. W tabeli 32 dokonano zestawienia procentowych wartości czułości, swoistości oraz ich sumy dla obu testów BAT oraz oznaczenia asIgE.

Tabela 33. Porównanie czułości i swoistości oraz ich sumy dla BAT z CD63, CD164 oraz asIgE

CD63	Czułość	Swoistość	SUMA%
Pc	15,4	96	111,4
Alergen I	80,8	100	180,8
Alergen II	73,1	96	169,1
Alergen III	42,4	100	142,4
<b>asIgE</b>	96,4	100	196,4
<b>CD164</b>			
Pc	23,1	92,3	115,4
Alergen I	92,3	100	192,3
Alergen II	88,5	100	188,5
Alergen III	73,1	100	173,1

Największą czułość i swoistość osiągnięto dla CD164 z wykorzystaniem alergenu w stężeniu AI: suma czułości i swoistości wyniosła 192,3%. Zbliżone wyniki osiągnięto dla oznaczenia asIgE przy czym czułość testu była nieco większa – 96,4% (suma 196,4%). Dla CD63 największą sumę czułości oraz swoistości – 180,5%, również osiągnięto dla alergenu w stężeniu AI.

W dalszym etapie przeanalizowano czułość i swoistość BAT przy łącznym zastosowaniu obu markerów – CD164 oraz CD63 w zakresie stężenia alergenu, dla którego osiągnięto największą dokładność diagnostyczną (AI). Po raz kolejny wyznaczono wartości prawdziwie dodatnie, prawdziwie ujemne, fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne. Dla poszczególnych testów otrzymano następujące wyniki:

Tabela 34. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla BAT z CD164

Wynik testu	Stan faktyczny	
	Chory	Zdrowy
Chory	PD 24	FD 0
Zdrowy	FU 2	PU 26

Tabela 35. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla BAT z CD63

Wynik testu	Stan faktyczny	
	Chory	Zdrowy
Chory	PD 21	FD 0
Zdrowy	FU 5	PU 25

Po połączeniu obu metod (CD 164 i CD63) uzyskano następujące wartości:

Tabela 36. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla BAT z CD63 i CD164

Wynik testu	Stan faktyczny	
	Chory	Zdrowy
Chory	PD 26 osoby	FD 0
Zdrowy	FU 2 osoby	PU 26 osób

Następnie korzystając z przedstawionych na początku rozdziału wzorów, wyliczono czułość i swoistość dla obu, równocześnie zastosowanych metod diagnostycznych. Uzyskano czułość 92,8% oraz swoistość 100% (suma: 192,8%), czyli nieznacznie większe wartości jak dla pojedynczo stosowanego testu BAT z CD164.

W celu poszukiwania metody diagnostycznej o jeszcze większej efektywności, połączono dwa testy o największej zaobserwowanej w badaniu dokładności: oznaczenie asIgE (z wyznaczonym punktem odcięcia na poziomie 0,24 kU/l) oraz BAT z CD164, przy zastosowaniu alergenu w stężeniu I, otrzymując następujące wyniki:

Tabela 37. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla łącznego zastosowania asIgE oraz BAT z CD164

Wynik testu	Stan faktyczny	
	Chory	Zdrowy
Chory	PD 28	FD 0
Zdrowy	FU 0	PU 26

$$\text{Czułość} = \frac{28}{28+0} = 1$$

$$\text{Specyficzność} = \frac{26}{26+0} = 1$$

Analogicznych obliczeń dokonano dla oznaczenia asIgE (z wyznaczonym punktem odcięcia na poziomie 0,24 kU/l) oraz BAT z CD63 dla największego stężenia alergenu (AI):

Tabela 38. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla łącznego zastosowania asIgE oraz BAT z CD63

Wynik testu	Stan faktyczny	
	Chory	Zdrowy
Chory	PD 26 osoby	FD 0
Zdrowy	FU 2 osoby	PU 26 osób

$$\text{Czułość} = \frac{26}{26+2} = 0,92$$

$$\text{Specyficzność} = \frac{26}{26+0} = 1$$

Jak wynika z obliczeń, połączenie obu metod diagnostycznych – testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 oraz oznaczenia asIgE, prowadziło do poprawy wyników i osiągnięcia 100% czułości i swoistości (suma 200%). W przypadku BAT z CD63 zmiana była mniej uchwytana – osiągnięto 92% czułość, przy 100% swoistości. Warto również nadmienić, że w przypadku zmiany cut off dla asIgE na powszechnie stosowany 0,35 kU/l uzyskano mniejszą czułość testu – 96,4% (swoistość 100%, suma 196,4%).



## 5. Dyskusja

### 5.1. Test aktywacji bazofilów. W poszukiwaniu biomarkera idealnego w diagnostyce chorób alergicznych

Stały wzrost częstości występowania chorób alergicznych wymaga stosowania odpowiednich metod diagnostycznych, które charakteryzuje jak największa czułość i swoistość [58]. Prawidłowe rozpoznanie oraz zidentyfikowanie sprawczych alergenów warunkuje ocenę ryzyka związanego z danym uczuleniem, jak również podjęcie odpowiedniej profilaktyki oraz osiągnięcie długoterminowej poprawy poprzez wdrożenie celowanego leczenia. Obecnie, szczególną uwagę zwraca się na heterogenność chorób alergicznych oraz podejmuje się próbę ich definiowania poprzez poszczególne fenotypy molekularne (endotypy) [10, 59–62]. Tym samym, w myśl medycyny spersonalizowanej oraz precyzyjnej, odchodzi się od dotychczasowego, jednolitego schematu postępowania diagnostycznego i leczniczego.

Rozpatrywanie poszczególnych schorzeń alergicznych na poziomie molekularnym wymaga jednak wdrożenia równie precyzyjnych metod diagnostycznych oraz zaangażowania odpowiednich biomarkerów. Idealny biomarker to taki, który jest łatwo dostępny, wysoce powtarzalny, cechujący się dużą czułością i swoistością, dający się oznaczyć w sposób jak najmniej inwazyjny, nie poddający się modyfikacji przez inne stany chorobowe [63]. Korzyści wynikające z odpowiednio dobranego biomarkera to nie tylko prawidłowe rozpoznanie, ale również możliwość monitorowania odpowiedzi na leczenie, stratyfikacja ryzyka oraz niejednokrotnie szansa na wcześniejszą diagnozę [64]. Ze względu na tak rozbudowane kryteria użyteczności diagnostycznej, pomimo nieustających badań nad nowymi biomarkerami, dotychczas tylko kilka z nich jest wykorzystywanych w praktyce klinicznej.

W zamysł medycyny precyzyjnej, ukierunkowanej molekularnie, doskonale wpisuje się test aktywacji bazofila, a wykorzystywane w BAT markery aktywacji pełnią funkcję biomarkerów, których użyteczność kliniczna, jak zostanie to przedstawione w dalszej części pracy, może być niezwykle szeroka. Test aktywacji bazofila funkcjonuje w diagnostyce chorób alergicznych od lat dziewięćdziesiątych, niemniej jednak nadal istnieją znaczące różnice w metodologii przeprowadzania badania. Zasadnicze problemy to brak standaryzacji procedur laboratoryjnych oraz wartości punktu odcięcia dla wyniku

dotadniego, stosowanie przez poszczególne ośrodki i laboratoria różnych protokołów identyfikacji bazofilów oraz wreszcie różnych markerów aktywacji [46].

Obecnie najczęściej wykorzystywanymi markerami do ilościowego oznaczenia bazofilów aktywowanych, metodą cytometrii przepływowej, są CD63 oraz CD203c. Należy jednak podkreślić, że żaden z nich nie osiąga absolutnej swoistości i czułości, stąd istnieje potrzeba dalszych badań w tym obszarze [28]. Alternatywą wartą uwagi, o prawdopodobnie co najmniej porównywalnej czułości i swoistości w stosunku do CD63 wydaje się być antygen CD164. Badania dotyczące znaczenia CD164 w diagnostyce chorób alergicznych mają jednak ograniczony zasięg i wymagają dalszej kontynuacji, zwłaszcza w kontekście zaangażowania innych alergenów [65].

W niniejszej pracy poddano analizie użyteczność diagnostyczną testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164, w porównaniu z najszerzej stosowanym markerem aktywacji CD63, wśród pacjentów z przewlekłym alergicznym nieżytem nosa wywołanym alergią na roztocze kurzu domowego (*Dermatophagoides farinae*). W poszukiwaniu lepszej czułości i specyficzności metod *in vitro*, podjęto również próbę opracowania nowego testu diagnostycznego wykorzystującego oba markery aktywacji bazofilów – CD164 i CD63 lub też skojarzenia uzyskanych w obu testach BAT wyników z oznaczeniem asIgE. Tym samym, przedstawione badanie jest próbą odpowiedzi na pytanie, czy łączne zastosowanie BAT i asIgE może być alternatywą dla punktowych testów skórnych i zastąpić diagnostykę „*in vivo*” diagnostyką „*in vitro*”.

## **5.2. Metody diagnostyki chorób alergicznych „*in vivo*” kontra metody „*in vitro*”.**

W powstały imperatyw stosowania zasad medycyny precyzyjnej i poszukiwania nowych biomarkerów doskonale wpisuje się idea diagnostyki „*in vitro*”. Niemniej jednak nieprzerwanie trwa dyskusja które z metod – „*in vitro*” czy „*in vivo*”, mają najlepszy bilans korzyści w stosunku do swoich ograniczeń. W przedstawionym badaniu, jednym z głównych założeń było odniesienie uzyskanych metodami „*in vitro*” wyników (BAT, oznaczenie stężenia asIgE) do rezultatów testów skórnych, jako metody diagnostycznej która obecnie stanowi tzw. „złoty standard”. W związku z tym, wykazano szczególną dbałość w kwestii doboru uczestników do grupy badanej i kontrolnej zwłaszcza w zakresie braku przeciwwskazań czy czynników utrudniających przeprowadzenie PTS. Co więcej, choć w populacji ogólnej są notowane pozytywne wyniki u osób bez zdiagnozowanej

choroby, żaden z uczestników grupy kontrolnej nie uzyskał dodatnich odczynów dla testowanych alergenów. Również wszyscy uczestnicy z grupy badanej spełnili główne kryterium włączenia i uzyskali dodatnie wyniki PTS dla alergenu, będącego przedmiotem badania – *D. farinae*, czemu towarzyszyły objawy przewlekłego ANN w wywiadzie. Tym samym w przedstawionym badaniu uzyskano sytuację, kiedy czułość i swoistość testów skórnych wyniosła 100%. W szeroko pojętej praktyce klinicznej interpretacja czy przeprowadzenie PTS może być jednak bardziej problematyczne. Jednym z najbardziej istotnych ograniczeń jest konieczność odstawienia leków mogących działać supresyjnie na odpowiedź natychmiastową w obrębie skóry (np. leków antyhistaminowych, trójpierścieniowych leków antydepresyjnych, inhibitorów kalcyneuryny) [66]. Ponadto, choć testy skórne są uważane za bezpieczną metodę diagnostyczną, istnieje potencjalne ryzyko wystąpienia reakcji uogólnionej w trakcie ich wykonywania (przyjmuje się, że częstość anafilaksji wynosi około 0,02%, przy czym większe ryzyko stanowi testowanie alergenów pokarmowych oraz leków) [15, 66, 67]. Wpływ na wynik i jakość testu mają również umiejętności badacza, moc ekstraktu alergenowego oraz jego stabilność, która zmienia się z czasem lub pod wpływem warunków przechowywania [68, 69]. Reaktywność skóry może być również przyczyną fałszywie ujemnych wyników – jest znacząco mniejsza u starszych ludzi, jak również zmienia się w wyniku długotrwałej ekspozycji na promieniowanie UV, w szczególności zaś po oparzeniu [15, 66]. Negatywny wynik testu może być związany ze składem samego ekstraktu, który nie zawiera uczulającego alergenu. Możliwa jest również sytuacja odwrotna – tj. uzyskanie fałszywie dodatniego wyniku. Ekstrakty alergenowe są zwykle otrzymywane z naturalnych źródeł i składają się z mieszanin alergenów oraz składników potencjalnie niealergizujących – lipidów, soli, pigmentów i metabolitów. Alergenami są głównie białka lub glikoproteiny, ale inne składniki ekstraktu np. węglowodany lub związki małowcząsteczkowe o charakterze haptenów również mogą indukować reakcję alergiczną [23]. Oprócz wyżej wymienionych trudności, należy również zauważyć, że wiele badań wskazuje na mniejszą dokładność diagnostyczną PTS w przypadku alergii pokarmowej [69, 70]. Obecnie nadal złotym standardem w diagnostyce alergii pokarmowej pozostaje doustna próba prowokacyjna, która niesie ze sobą potencjalne ryzyko anafilaksji [71]. Podobne wyzwanie stanowi diagnostyka alergii na leki. Ponadto, choć testy skórne punktowe, płatkowe i śródskórne są najłatwiej dostępnymi narzędziami do oceny nadwrażliwości na leki, ich użyteczność diagnostyczna dla wielu farmaceutyków wciąż nie została ustalona [72].

Przedstawione powyżej dylematy związane z PTS stały się podstawą do pojawienia się koncepcji całkowitego zastąpienia diagnostyki „in vivo” diagnostyką „in vitro”. Niewątpliwie metody „in vitro” mają wiele zalet, m.in. ograniczenie ekspozycji na alergeny, brak konieczności odstawiania leków mogących wpłynąć na wyniki oraz brak zależności od doświadczenia osoby która przeprowadza badanie. Podkreśla się że w przypadku diagnostyki „in vitro” wyniki mają wymiar znacznie bardziej ilościowy niż w przypadku PTS, a pomiary charakteryzują się stałą precyzją i powtarzalnością [23]. Coraz częściej mówi się także o zmianie strategii diagnozowania w chorobach alergicznych – z tzw. „bottom up” na rzecz „top down” czyli stosowania analizy odgórnej obejmującej jak największą ilość zmiennych już w pierwszych etapach postępowania z pacjentem, a następnie celowanego doboru kolejnych badań diagnostycznych [23, 24]. Jest to szczególnie uzasadnione postępowanie w przypadku ciężkich, uogólnionych reakcji alergicznych o nieznannej etiologii. W taką koncepcję, idealnie wpisują się metody „in vitro”, zwłaszcza CRD, która obecnie zrewolucjonizowała diagnostykę chorób alergicznych. Rzeczywiście, zastosowanie technik molekularnych w wybranych przypadkach klinicznych wykazuje istotną przewagę w porównaniu z diagnostyką opartą wyłącznie na ekstraktach alergenowych [73, 74]. Wiadomo, że ekstrakty alergenowe charakteryzują się zmiennością składu, ponadto nie zawsze zawierają wszystkie istotne klinicznie molekuly [73, 75, 76]. Klasycznym przykładem jest zwykle niskie stężenie w ekstraktach komponent Der p 10 i Der p 23, ważnych w diagnostyce uczulenia na roztocze [75]. W przypadku Der p 23 dodatkowo istotny jest fakt, że szacunkowo około 5% pacjentów z alergią na HDM wykazuje monowalentne uczulenie na tę molekulę alergenową. Tym samym, opierając się wyłącznie na dodatnich wynikach diagnostyki opartej na ekstraktach, istnieje możliwość błędnej kwalifikacji chorych do immunoterapii alergenowej, podczas kiedy wiadomo, że tacy pacjenci mogą nie odnieść korzyści z leczenia [77].

Na wykorzystanie zalet wynikających z zastosowania rekombinowanych alergenów pozwalają również inne metody „in vitro”, w szczególności – test aktywacji bazofila [78, 79]. Metoda ta obecnie budzi duże nadzieje, gdyż w wielu przypadkach może stanowić odpowiedź na działania zmierzające w kierunku poszukiwania jeszcze doskonalszych systemów diagnostycznych niż dotychczas poznane. Zarówno ocena stężenia przeciwciał IgE swoistych dla określonych komponent alergenowych jak i powszechnie stosowane oznaczenie stężenia asIgE mają bowiem swoje ograniczenia [23, 80] i w chwili obecnej nie są na tyle doskonałe, aby całkowicie zastąpić ryzykowne

próby prowokacyjne z alergenem (choć należy podkreślić, że trwają intensywne badania w tym względzie) [81, 82]. W prezentowanym badaniu również mierzono się z pewnymi dylematami związanymi z tą metodą diagnostyczną, co przedstawiono poniżej.

Odnosząc się do uzyskanych rezultatów oznaczenia stężenia asIgE, należy zauważyć, że w grupie kontrolnej żaden z uczestników nie zanotował wyniku fałszywie dodatniego, natomiast w grupie badanej trzy osoby (10,3%) osiągnęły stężenie asIgE poniżej 0,35 kU/l, czyli poniżej punktu odcięcia, przy którym wynik jest uznawany za pozytywny. Wyniki te zinterpretowano jako fałszywie ujemne. W poszukiwaniu możliwości zwiększenia dokładności diagnostycznej testu podjęto pewne manewry – tj. wykreślono krzywą ROC i ustalono nowy punkt odcięcia dla asIgE – 0,24 kU/l, w którym suma czułości i swoistości była jak największa, a pole pod krzywą AUC jak najbardziej zbliżone do jedności (rozdział 4.3.3.).

Obniżenie punktu odcięcia w naszym badaniu jest zbieżne z wieloma publikacjami, w których podnoszono ten problem [50, 83, 84]. Ustalenie cut off dla asIgE na poziomie 0,35 kU/l zostało opracowane kilka dekad temu w oparciu o parametry techniczne stosowanych wówczas testów [83]. Tymczasem obecnie stosowane systemy doskonale identyfikują stężenie swoistych przeciwciał IgE ustalonym już na poziomie 0,1 kU/l. Ponadto wiele opracowań wskazuje na możliwe różnice w zakresie stężenia całkowitego IgE oraz asIgE w zależności od badanej populacji czy też rodzaju alergenu [49, 50, 85]. Przykładem mogą być pacjenci z FDEIA (Food-dependent exercise induced anaphylaxis), u których stwierdza się niejednokrotnie niskie stężenia asIgE w kierunku uczulającego pokarmu czy też pacjenci z mastocytozą, gdzie z analogicznych przyczyn za punkt odcięcia dodatniego wyniku stężenia asIgE dla jadu owadów przyjmuje się 0,17 kU/l [86, 87]. Należy jednocześnie podkreślić, że w przypadku niektórych pacjentów to właśnie niskie, nie wysokie stężenia asIgE mogą się wiązać z większym ryzykiem reakcji systemowych o ciężkim przebiegu [84]. Nawiązując do pracy Sturm i wsp. jeśli stężenie całkowitego IgE jest niskie, a stężenia asIgE wahają się pomiędzy 0,1 a 0,35 kU/l, wynik należy rozważać jako pozytywny. Co prawda cytowana praca dotyczy pacjentów uczulonych na jad owadów błonkoskrzydłych, jednak w przypadku obecności sugestywnych objawów klinicznych należy wziąć pod uwagę takie podejście również w przypadku innych rodzajów nadwrażliwości IgE zależnej lub zastosować alternatywne metody diagnostyczne.

Odnosząc się po raz kolejny do uzyskanych w badaniu wyników, warto poruszyć także kwestie mechanizmów związanych z immunoterapią alergenową. Wiadomo, że w trakcie

początkowej fazy leczenia dochodzi do przejściowego zwiększenia stężenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE, po czym w trakcie kontynuacji terapii następuje ich stopniowe zmniejszenie [88]. Analizując dane zawarte w kwestionariuszu badania okazuje się, że znaczny odsetek uczestników z grupy pacjentów (64,3%) to właśnie osoby leczone w przeszłości lub aktualnie immunoterapią alergenową, w tym dwie z grupy badanej które osiągnęły wyniki poniżej 0,35 kU/l. Tym samym nie można wykluczyć, że związane z tym mniejsze stężenia asIgE mogą być przyczyną osiągniętych w badaniu wyników fałszywie ujemnych.

Podsumowując, zarówno w kontekście przedstawionego badania, przytoczonych wyżej przykładów czy też wielokrotnie poruszanego w piśmiennictwie problemu lokalnych reakcji alergicznych (LAR, LAA – local allergic asthma), interpretacja każdego wyniku asIgE powinna być zindywidualizowana, z uwzględnieniem ryzyka związanego z danym uczuleniem oraz przede wszystkim oceną istotności klinicznej [50, 89, 90]. Jednocześnie zgodnie z obecnym trendem należy podejmować dalsze wysiłki zmierzające do rozstrzygnięcia kwestii znamienności klinicznej wyników uzyskanych drogą diagnostyki „in vitro” co pozwoli na jednoznaczne rozróżnienie osób z „niemy” uczuleniem i objawami choroby alergicznej, a tym samym zredukuje potrzebę przeprowadzania prób prowokacyjnych. [91–93]. Wielkie nadzieje w tym względzie budzi test aktywacji bazofila, a jego znaczenie w diagnostyce chorób alergicznych przedstawiono poniżej.

### **5.3. Znaczenie BAT w diagnostyce chorób alergicznych.**

Metodą diagnostyczną, która jest często stosowana w przypadku uzyskania wyników niejednoznacznych lub w razie niepowodzenia innych testów jest BAT [28]. Test aktywacji bazofila ma wiele zalet. Podstawową jest brak kontaktu z potencjalnie uczulającym alergenem. Jest to kluczowa kwestia u pacjentów z ciężką reakcją alergiczną w wywiadzie, gdyż w takich przypadkach testy prowokacyjne wiążą się z dużym ryzykiem. Inne atuty to: niewielka inwazyjność, wysoka wiarygodność i obiektywność wyniku, który jest wolny od efektu placebo, brak konieczności hospitalizacji pacjenta, możliwość jednoczesnego przeprowadzenia badania dla kilku alergenów. Ponadto, przed badaniem nie jest wymagane odstawienie leków antyhistaminowych, które co prawda blokują receptory H1 i uniemożliwiają ich interakcję z histaminą, nie wpływają jednak na uwalnianie mediatorów oraz ekspresję markerów aktywacji bazofilów [15]. Wszystkie

wymienione powyżej korzyści sprawiają, że test aktywacji bazofilów ma obecnie ugruntowaną pozycję w diagnostyce nadwrażliwości IgE-zależnej [46]. Jak dotąd, potwierdzono jego użyteczność diagnostyczną w alergii na jad owadów błonkoskrzydłych, leki, pokarmy oraz alergeny wziewne [65, 94–98].

Ostatnie doniesienia wskazują na możliwość zastosowania testu aktywacji bazofila do oceny istotności klinicznej alergii oraz jej nasilenia [99–102]. W wielu badaniach, dotyczących przede wszystkim alergii na pokarmy, udowodniono, że szacowana ciężkość reakcji alergicznej koreluje z reaktywnością bazofilów (BR-basophil reactivity). Reaktywność bazofilów jest wyrażana jako procent aktywowanych bazofilów po stymulacji uczulającym alergenem, a więc dostarcza bezpośredniej informacji na temat ilości komórek w danej chwili objętych procesem degranulacji i uwalniających mediatory wazoaktywne. Z kolei tzw. wrażliwość bazofilów (basophil allergen threshold sensitivity; parametry EC50 lub CD-sens) jest często wykorzystywana do oszacowania wyniku doustnej próby prowokacyjnej, ponieważ określa stężenie alergenu przy którym ma miejsce aktywacja 50% bazofilów, co zwykle odpowiada pojawieniu się objawów klinicznych [101].

Użyteczność wymienionych parametrów jest jednak dużo szersza i wykracza poza ramy tylko i wyłącznie diagnostyki alergii pokarmowej. Jak wskazują ostatnie doniesienia, wrażliwość bazofilów okazała się również wiarygodnym i powtarzalnym narzędziem do monitorowania efektów terapii anty-IgE (omalizumab) oraz immunoterapii alergenowej (w badaniach dotyczących alergii na brzozę, trawy oraz jad owadów błonkoskrzydłych wykazano stopniową redukcję w trakcie leczenia CD-sens, prawdopodobnie w mechanizmie IgG-zależnego blokowania receptorów FcεRI) [28, 103–106].

Analizując kolejne korzyści wynikające z diagnostyki opartej na BAT należy także zauważyć, że test aktywacji bazofila jest testem funkcjonalnym, tj. informuje o zdolności bazofilów do aktywacji po uruchomieniu sygnalizacji związanej ze znajdującym się na ich powierzchni receptorem FcεRI (poprzez przyłączenie przez ten receptor fragmentu Fc przeciwciała IgE, z następowym związaniem cząsteczek alergenu lub też integracją z przeciwciałami anty-IgE) [101]. To zdecydowana przewaga w stosunku do testów opierających się wyłącznie na oznaczeniu asIgE [107]. Niektórzy autorzy są zdania, że BAT daje możliwość prawidłowej diagnozy nawet wówczas, kiedy stężenie asIgE jest niskie lub nie jest w ogóle wykrywalne w surowicy lub skórze, jak w przypadku LAR czy LAA [108]. Ponadto BAT obok testu skórniego z surowicą autologiczną (ASST – autologous serum skin test) oraz słabo dostępnych w praktyce klinicznej testów

immunologicznych na obecność przeciwciał IgM lub IgG przeciw FcεRI/IgE, jest biomarkerem autoimmunologicznej przewlekłej pokrzywki spontanicznej o typie IIb (TIIb aiCSU), stanowiąc spośród wszystkich wyżej wymienionych testów najbardziej efektywną pojedynczą metodę diagnostyczną [109]. Tym samym, test aktywacji bazofila jest metodą „in vitro” o niezwykle dużym potencjale i szerokim zastosowaniu, która stanowi istotny krok w kierunku precyzyjnej diagnostyki chorób alergicznych.

#### **5.4. Markery aktywacji bazofilów**

Najlepiej dotychczas poznanym markerem aktywacji bazofilów jest CD63. CD63, funkcjonujący również pod nazwą LAMP-3 (lysosomal-associated membrane protein) jest białkiem błonowym, które występuje w obrębie tych samych wewnątrzkomórkowych ziarnistości, które zawierają mediatory reakcji alergicznej [28]. Ekspresja CD63 na bazofilach w stanie spoczynku jest niezwykle niska, natomiast w wyniku stymulacji receptorów FcεRI dochodzi do integracji ziarnistości z błoną komórkową na drodze egzocytozy, a tym samym translokacji cząsteczek CD63 na powierzchnię bazofilów. Wielokrotnie udowodniono, że wzrost ekspresji tego antygeny na powierzchni bazofilów jednoznacznie koreluje z uwalnianiem histaminy, podkreśla się również jego związek z anafilaksją [28, 110, 111].

Drugim, najczęściej stosowanym markerem aktywacji bazofilów jest CD203c, czyli ENPP-3 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3) – neuronalny powierzchniowy antygen różnicowania neuronów należący do rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz. Jest to rodzina białek transbłonowych, które biorą udział w rozszczepianiu wiązań fosfodiesterowych i fosfosiarczanowych różnych cząsteczek [112, 113]. CD203c występuje również na komórkach progenitorowych CD34<sup>+</sup> i jest obecny na wszystkich etapach różnicowania bazofilów [112]. Unikalną cechą CD203c jest fakt, że jako jedyny marker stosowany w BAT wykazuje ekspresję zarówno na bazofilach spoczynkowych jak i po ich aktywacji. Dodatkowo CD203c charakteryzuje niezwykle szybki wzrost ekspresji pod wpływem stymulacji alergenowej – wynosi on ponad 60% po około 5 minutach od pobudzenia receptorów FcεRI [112, 114]. Podobny, szybki profil aktywacji wykazuje CD164 oraz CD13, którego użyteczność diagnostyczna została dotychczas potwierdzona jedynie dla alergenów *D. farinae*, pyłków brzozy i traw [45, 113]. W przypadku CD63 proces aktywacji jest wyraźnie dłuższy, co sugeruje rozbieżne z CD203c szlaki sygnalizacyjne lub też inny mechanizm



transportu tego markera na powierzchnię komórki. Wyjaśnieniem może być również fakt, że cząsteczki CD203c prawdopodobnie znajdują się w pęcherzykach, blisko błony, podczas kiedy molekuly CD63 przechowywane są razem z mediatorami reakcji alergicznej w granulkach. Wzrost ekspresji CD203c nie zawsze jest jednak tożsamy z mechanizmem IgE-zależnym. W niektórych przypadkach może być częścią procesu późnej aktywacji bazofilów za pośrednictwem cytokin, głównie IL-3; wówczas kinetyka aktywacji jest dużo dłuższa (około 90 minut) [112]. Sygnalizacja indukowana przez IL-3 może niekorzystnie wpływać na wyniki BAT, poprzez możliwy spontaniczny wzrost ekspresji CD203c u osób bez zdiagnozowanej choroby i tym samym generować wyniki fałszywie ujemne. Z kolei ograniczeniem po stronie CD63 jest fakt, że oprócz bazofilów jest również markerem aktywacji płytek krwi i leukocytów, co również może być przyczyną wyników fałszywie ujemnych [112]. Różnic pomiędzy tymi dwoma markerami można wymienić więcej. Niektóre badania wskazują na wpływ statyn na hamowanie IgE – zależnego wzrostu ekspresji CD203c na powierzchni bazofilów [112, 115], inne na możliwe okołodobowe wahania ekspresji CD203c [116]. Takich zależności nie odnotowano jednak w przypadku CD63 [112]. Odnosząc się do aspektu klinicznego, na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań porównawczych obu markerów, wydaje się, że CD203c jest bardziej czułym markerem w diagnostyce alergii na amoksyliny [117], z kolei CD63 w nadwrażliwości na leki z grupy NMBA (neuromuscular blocking agents) (czułość 79% vs 36%) [118] oraz diagnostyce pokrzywki autoimmunologicznej [28]. Z kolei w alergii na lateks dane są sprzeczne – Boumiza i współautorzy wykazywali przewagę protokołu z zastosowaniem CD203c, podczas kiedy inne badania wskazywały na większą czułość CD63 [113, 119, 120]. W przypadku diagnostyki alergii na jad owadów błonkoskrzydłych wielokrotnie w badaniach potwierdzono wysoką czułość zarówno CD203c, wahającą się w przedziale 87–97% (swoistość 84,6–100%) [121–124] jak i CD63 – czułość 86–92% (swoistość 80–100%) [124–127], chociaż w badaniu Eberlein i wsp. wykazano w tym względzie przewagę na rzecz CD203c (czułość 97% vs 89%) [123]. W przypadku alergii wziewnej status CD203c versus CD63 pozostaje właściwie niest ustalony, ze względu na nieliczne badania porównawcze, aczkolwiek publikacja dotycząca alergii na sierść kota wskazuje na taką samą skuteczność diagnostyczną obu markerów [28, 128].

Wobec pewnych niedoskonałości CD63 oraz CD203c oraz braku jednoznaczności w kwestii który z nich wykazuje największą użyteczność (nieliczne badania

komparatywne), ważną inicjatywą jest poszukiwanie nowych markerów aktywacji. Jak dotąd istnieje niewiele publikacji na ten temat. W 1993 Gane i wsp. zwrócili uwagę na antygen powierzchniowy leukocytów o aktywności kinazy tyrozynowej – CD45, opisując nowy protokół identyfikacji bazofilów oparty na przeciwciałach anti-IgE oraz anti-CD45. W kolejnych badaniach udowodniono, że wzrost ekspresji tego markera na powierzchni bazofilów następuje w mechanizmie IgE–zależnym, co więcej zjawisko aktywacji cechuje się bardzo dużą dynamiką [129]. Prace badawcze nie były jednak dalej kontynuowane, a CD45 jak dotąd nie jest stosowany w praktyce klinicznej [113]. Podobnie, jedynie ograniczone dane są dostępne na temat markerów CD107a i CD107b (charakteryzują się wolniejszym niż CD45 profilem aktywacji), których użyteczność diagnostyczna w stosunku do określonych alergenów dotychczas nie została potwierdzona [45, 128].

Warto w tym miejscu wspomnieć o najnowszych badaniach, które analizują inne możliwości określania aktywacji bazofilów tj. poprzez obserwację fosforylacji określonych cząsteczek wewnątrzkomórkowych, takich jak np. kinaza białkowa aktywowana mitogenem p38 (MAPK) lub przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji – STAT 5, które są częścią kaskady sygnalizacyjnej dla IgE i jej receptora o wysokim powinowactwie [128, 130]. Ostatnio pojawiły się również próby oceny aktywacji bazofilów przy pomocy spektrometrii masowej – CyTOF (Cytometry by Time-of-Flight mass spectrometry), innowacyjne z powodu możliwości wykorzystania próbek krwi przechowywanych wcześniej nawet do 24 godzin [131] lub też zastosowanie barwienia awidyną Av.A488 (AlexaFluor488-labeled avidin) [132]. Należy jednak podkreślić, że wszystkie wymienione powyżej nowe techniki pozostają nadal w sferze wstępnych badań.

Tymczasem markerami których użyteczność została częściowo potwierdzona, są aneksyna V oraz szczególnie budzący duże nadzieje – CD164. Aneksyna V jest białkiem, które znajduje się w wielu tkankach (m.in. w nerkach), ściśle powiązany z procesem apoptozy. W praktyce klinicznej, aneksyna V uważana jest za wczesny marker apoptozy i wykorzystywana w diagnostyce uszkodzenia tkanek [133]. Jak się okazuje, aneksyna V może być również stosowana jako marker aktywacji bazofilów. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano kolejno 97% czułość i 100% swoistość testu BAT z zastosowaniem aneksyny V w diagnostyce alergii na żyto zwyczajne, oraz 100% czułość i swoistość w diagnostyce alergii na *Alternaria alternata* [134, 135].

Równie obiecujące są doniesienia na temat kolejnego markera aktywacji bazofilów – CD164. CD164 jest homodimeryczną cząsteczką, o masie cząsteczkowej 160 kD [113].

Należy do rodziny transbłonowych sialomucyn, które jako cząsteczki sygnałowe odgrywają istotną rolę w procesie hematopoezy, regulując różnicowanie i proliferację komórek na poszczególnych etapach ich rozwoju [113, 136]. Sialomucyny mają również ścisły związek ze zjawiskiem cytoadhezji, jednocześnie posiadając zdolności antyadhezyjne [136, 137]. Wiele badań wskazuje również na związek CD164 z procesem kancerogenezy [136]. Wysoką ekspresję CD164 wykazano na limfocytach T CD4<sup>+</sup> u pacjentów z zespołem Sezary'iego, jak również powiązano z proliferacją, migracją i inwazją komórek nowotworowych w raku pęcherza moczowego, jajnika oraz prostaty [138–141]. Pomimo znacznego postępu w badaniach nad rolą CD164 w onkologii, doniesienia na temat jego znaczenia w patogenezie chorób alergicznych mają ograniczony zasięg. Zwiększenie ekspresji CD164 na powierzchni bazofilów w mechanizmie IgE – zależnym po raz pierwszy opisał Hennersdorf i wsp. [45]. Następnie użyteczność diagnostyczną BAT z zastosowaniem CD164 jako markera aktywacji bazofilów w diagnostyce alergii na pyłki traw została potwierdzona w opracowaniu autorstwa Wolańczyk-Mędrali i wsp. [65]. Pomimo niezwykle obiecujących wyników uzyskanych w cytowanej pracy (osiągnięto 100% czułość i swoistość), wciąż nie została przeprowadzona walidacja wyżej wymienionej metody diagnostycznej w stosunku do innych alergenów, co stało się przedmiotem niniejszego badania.

## **5.5. Testy aktywacji bazofilów. Identyfikacja populacji bazofilów**

Jednym z kluczowych etapów testu aktywacji bazofila, od którego zależy jakość uzyskanych wyników jest wyłonienie odpowiednio czystej populacji bazofilów. Bazofile identyfikuje się metodą cytometrii przepływowej na podstawie pozytywnej ekspresji molekuł typowych dla immunofenotypu tych komórek – szczegółowo na temat poszczególnych protokołów identyfikacji bazofilów wypowiedziano się w rozdziale 1.6.3. Podsumowując dane z piśmiennictwa, wybór strategii bramkowania bazofilów ograniczono do dwóch możliwości, które charakteryzują się największą precyzją i stabilnością spośród wszystkich pozostałych czyli CD123<sup>positive</sup>/HLA-DR<sup>negative</sup> oraz SSC<sup>low</sup>/CCR3<sup>positive</sup> [40, 41]. W oparciu o doświadczenia laboratorium ośrodka w którym prowadzono badanie, spodziewanej wysokiej selektywności wyłonionej populacji bazofilów oraz możliwości wykorzystania w tym celu tylko jednego markera identyfikacyjnego, ostatecznie zdecydowano o wyborze protokołu z zastosowaniem

przeciwciała anty-CCR3. Metoda ta pozwala na bramkowanie bazofilów na podstawie wysokiej, konstytutywnej ekspresji eotaksyny CCR3 na ich powierzchni oraz obserwacji rozproszenia światła na ziarnistościach wewnątrzkomórkowych (SSC<sup>low</sup>). Obecnie uważa się, że bramkowanie bazofilów z zastosowaniem anty-CCR jest znacznie łatwiejsze niż w przypadku jakiegokolwiek innej dostępnej metody [51].

Odnosząc się do uzyskanych w badaniu wyników, w teście aktywacji bazofila z CD63 w grupie badanej średnio bramkowano 433 komórek (Me 365), natomiast w grupie kontrolnej 461 komórek (Me 457). W BAT z CD164 średnia komórek zidentyfikowanych jako bazofile wyniosła 466 w grupie badanej (Me 403) oraz 477 w grupie kontrolnej (Me 461). Uzyskane wartości mieściły się we wskazaniach producenta (Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Szwajcaria), wg których liczba bramkowanych bazofilów nie powinna być niższa niż 300 [51]. Niemniej jednak w przypadku trzech uczestników badania, w zakresie pojedynczego stężenia alergenu, liczba zebranych komórek była znacznie mniejsza. Należy jednak uznać, że rozbieżność ta nie wpłynęła na jakość testu BAT, ponieważ w zakresie pozostałych dwóch stężeń alergenowych wymienione osoby spełniały kryteria uzyskania wyniku dodatniego, tj. liczba komórek zabramkowanych jako bazofile przekraczała zdefiniowany punkt odcięcia. Co więcej, osoby te reagowały po stymulacji (swoistej i nieswoistej) aktywacją bazofili na poziomie 90% i powyżej.

Wykonana analiza statystyczna pokazała, że zarówno w przypadku testu aktywacji bazofila z CD63, jak i CD164, w zakresie wszystkich próbek wykazano brak statystycznej istotności różnic pomiędzy grupą badaną a kontrolną. W porównaniu pomiędzy testami również nie stwierdzono różnic w ilości komórek zidentyfikowanych jako bazofile w obrębie wszystkich analizowanych zmiennych (tabela 20–22). Kwestią wartą poruszenia jest również fakt, że w niektórych badaniach obserwowano pewne zmniejszenie ekspresji CCR3 na powierzchni bazofilów po stymulacji alergenem. W przedstawionym badaniu nie zanotowano jednak statystycznie istotnych różnic w zakresie ilości zidentyfikowanych jako bazofile komórek przed i po stymulacji alergenowej, co w przypadku naszego eksperymentu potwierdza dużą stabilność tego markera identyfikacyjnego.

## **5.6. Kontrola jakości testu. Kontrola dodatnia i ujemna. Non-responders**

Miarami jakości testu aktywacji bazofila, które decydują o prawidłowej interpretacji wyników są kontrole pozytywna oraz negatywna. Kontrola pozytywna odzwierciedla

zdolność bazofilów do aktywacji po stymulacji przeciwciałem anti-IgE (alternatywnie anti-FcεRI), natomiast kontrola ujemna stanowi tzw. tło badania i niesie informację o spontanicznej aktywacji bazofilów.

Średnia wartość komórek aktywowanych w próbkach niestymulowanych w obu testach BAT była niska; dla testu z CD63 wyniosła 2,00% (Me 1,95%; min 1,8%; max 3,45%), dla testu z CD164 2,01% (Me 2,04%; min 1,82%; max 2,2%). Tym samym, w nawiązaniu do opracowania de Weck i wsp., uzyskane wyniki były zgodne z większością publikacji na temat BAT, gdzie wartość spoczynkowej aktywacji wynosiła poniżej 5% [38].

W wyniku stymulacji przeciwciałem anti-IgE zaobserwowano w obu testach BAT umiarkowany wzrost ekspresji markerów aktywacji CD63 lub CD164 – średni odsetek bazofilów CD63 dodatnich wyniósł 47,5% (Me 50,55%) w grupie badanej oraz 54,71% (Me 63,55%) w grupie kontrolnej, natomiast średnia aktywacja bazofilów w teście z CD164 wyniosła 39,6% (Me 35,9%) w grupie badanej i 56,44% (Me 60,94%) w grupie kontrolnej. 5,6% uczestników w teście aktywacji bazofila z CD63 (3 osoby) oraz 3,7% (2 osoby) populacji badanej w BAT z CD164 odpowiedziało niedostateczną aktywacją bazofilów (poniżej wyznaczonego na podstawie wartości spoczynkowej aktywacji punktu odcięcia). Osoby te zostały zakwalifikowane jako „non-responders” i wyłączone z dalszej analizy statystycznej. Jednocześnie należy podkreślić, że uzyskane wyniki były zgodne z wieloma obserwacjami, które określają procent non-responders nawet na ok 8–22% populacji ogólnej [52–54]. Występowanie chorych, u których nie dochodzi do aktywacji bazofilów po stymulacji receptorów FcεRI, jest jednym z większych problemów związanych z BAT. Przyczyn zjawiska anergii bazofilów należy upatrywać w zaburzeniach wewnątrzkomórkowych szlakach sygnalizacyjnych, przede wszystkim ze zmniejszonym stężeniem fosfatazy Syk, dodatkowo w połączeniu z podwyższoną ilością CD45 [28, 46, 52]. Niektóre badania wskazują również, że spadek stężenia fosfatazy Syk koreluje z jednoczesnym wzrostem alergenowo swoistych IgE i jest jednym z mechanizmów ograniczenia reakcji alergicznej [52]. Co ciekawe, w przedstawionym badaniu większość z non-responders to uczestnicy rekrutujący się z grupy pacjentów, dodatkowo w trakcie lub po leczeniu immunoterapią alergenową. Warto w tym miejscu przywołać pracę Thyagarajan i wsp., w której analizie poddano wpływ doustnej immunoterapii alergenowej stosowanej w alergii na orzeszki ziemne na reaktywność bazofili, wyrażoną jako wzrost ekspresji CD63 oraz CD203c [142]. Jednym z efektów cytowanej publikacji było zdefiniowanie supresji bazofilów jako biomarkera OIT (oral immunotherapy), co zresztą jest zbieżne z doniesieniami na temat SCIT [103–106]. Autorzy sugerują również możliwą

utrata ekspresji Syk w korelacji z leczeniem AIT. Kwestia ta wymaga jednak dalszych badań, z jednoczesnym oznaczeniem stężenia fosfatazy Syk przed oraz w trakcie trwania immunoterapii.

## **5.7. Użyteczność CD164 w diagnostyce alergii na *D. farinae*.**

### **Porównanie czułości i swoistości BAT z CD63 oraz**

### **CD164. Łączne zastosowanie wszystkich metod „in vitro”**

Wzrost ekspresji markerów aktywacji bazofilów w obecności alergenu jest procesem charakterystycznym dla osób uczulonych, dlatego jednym z oczekiwanych efektów obu testów BAT było uzyskanie całkowicie odmiennych profilów aktywacji bazofilów w wyniku stymulacji alergenowej w populacji zdrowych uczestników badania oraz zbiorowości pacjentów. W grupie kontrolnej średni poziom aktywacji bazofilów we wszystkich stężeniach alergenów był niski i oscylował wokół wartości 1,05% dla BAT z CD63 oraz 1,19% dla BAT z CD164. Z kolei w grupie badanej obserwowano zdecydowany wzrost komórek CD63 lub CD164 dodatnich w odpowiedzi na stymulację alergenem *D. farinae* we wszystkich trzech stężeniach – dla testu z CD63 notowano średnie wartości na poziomie 39,2% (Me 20,73), natomiast dla CD164 33,2% (Me 22,96). Analiza statystyczna definitywnie potwierdziła istotne różnice pomiędzy aktywacją bazofilów w grupie pacjentów oraz zdrowych uczestników ( $p < 0,001$ ).

Aktywacja bazofilów jest zależna od dawki alergenu [143]. Obecnie istnieje rekomendacja, aby w badaniach uwzględniać szeroki zakres stężeń alergenów, ponieważ zastosowanie tylko pojedynczej dawki nie odzwierciedla w pełni odpowiedzi bazofilów i może prowadzić do błędnych wniosków [46]. Ponadto istnieje wiele czynników które mogą mieć wpływ na proces aktywacji bazofilów tj. rodzaj alergenu, jego powinowactwo do asIgE, gęstość receptorów FcεRI na powierzchni komórek czy wreszcie osobnicze zróżnicowanie odpowiedzi na bodziec wśród pacjentów [46, 144].

W przypadku omawianego badania również obserwowano zróżnicowanie w zależności od stężenia alergenu wzrost ekspresji CD63 oraz CD164. Porównując oba testy BAT, w każdym z nich największą średnią aktywacją bazofili osiągnięto w przypadku alergenu w najwyższym stężeniu – 225 ng/ml (AI). Niższe stężenie alergenu skutkowało spadkiem aktywacji (ryciny 28 oraz 30). W przypadku BAT z zastosowaniem CD63 powyższy model odpowiedzi wystąpił u 40,9% pacjentów, podczas kiedy 18,1% pacjentów odpowiadało

stabilną aktywacją w zakresie dwóch pierwszych stężeń alergenów. W przypadku BAT z CD164 wzrost reaktywności bazofilów przy rosnącym stężeniu alergenu zaobserwowano aż u 66% pacjentów, a 16,6% wykazywało prawie jednakową aktywację w przypadku alergenów w stężeniu AI i AII. Maksymalną wartość aktywacji (96,66%) osiągnięto dla alergenu w średnim stężeniu (AII) dla BAT z CD63, natomiast w teście z CD164 dla alergenu w stężeniu AI (93,02%).

Wyznaczenie punktu odcięcia, precyzyjnie dzielącego badaną zbiorowość na dwie grupy – uczulonych oraz zdrowych, stanowi moment krytyczny analizy od którego zależy prawidłowa interpretacja wyniku BAT. Aktualnie brak jest konsensusu w kwestii wartości punktu odcięcia dla wyniku dodatniego.

W przypadku niniejszego badania, definicję cut off point oparto na wykreśleniu oraz analizie krzywych ROC oraz oszacowaniu indeksu Youdena. Krzywa ROC jest często stosowanym narzędziem do oceny diagnostycznej wydajności testu. Każdy punkt na krzywej ROC to kombinacja określonej czułości i swoistości testu, a poprzez wybór wartości progowej uzyskujemy kompromis pomiędzy tymi dwoma wskaźnikami [145]. Krzywe ROC są powiązane z wartością AUC (pole pod krzywą), która również obrazuje jakość klasyfikacyjną analizowanej zmiennej diagnostycznej [146].

W obu testach BAT najwyższą wartość indeksu Youdena osiągnięto dla alergenu w najwyższym stężeniu tj. AI (0,81 oraz 0,92, odpowiednio dla BAT z CD63 i CD164). W przypadku BAT z CD164 we wszystkich stymulowanych alergenem próbkach osiągnięto absolutną swoistość (wszyscy badani z grupy kontrolnej uzyskali wyniki ujemne). Przy wartości odcięcia 7,29% osiągnięto czułość 92,3% (wyniki były pozytywne dla 24 pacjentów, przy  $n = 26$ ). Niższe stężenia alergenu skutkowały spadkiem czułości – do 88% dla próbki AII oraz 73,1% dla AIII, przy punktach odcięcia 8,13% oraz 5,98%.

W teście aktywacji bazofila z CD63 maksymalna czułość była mniejsza niż w BAT z CD164 i wyniosła – 80,8% dla alergenu w stężeniu pierwszym (wyniki dodatnie uzyskało 21 pacjentów przy  $n = 26$ ), przy 100% swoistości oraz cut off 8,84%. W pozostałych próbkach stymulowanych alergenem osiągnięto czułość 73,1% oraz 42,4% (cut off kolejno 4,87% oraz 10,29%) oraz swoistość 96% oraz 100%.

Wartość AUC dla BAT z CD164 w dwóch pierwszych stężeniach alergenów była porównywalna tj. 0,98 versus 0,95. AUC bardzo często jest uważane za miarę zgodności. Tym samym, jeśli wszystkich uczestników badania podzielić na poszczególne pary – gdzie po jednej stronie znajdują się osoby zdrowe, a po drugiej chore, uzyskane w przedstawionym badaniu wartości AUC oznaczają, że test średnio w 98% (AI) lub 95%

(AII) prawidłowo klasyfikuje poszczególnych uczestników badania do grupy uczulonych na *D. farinae* i zdrowych. Należy podkreślić, że uzyskane wartości AUC świadczą o znakomitej jakości testu [145]. Dla BAT z CD63 AUC dla dwóch pierwszych stężeń alergenów wyniósł 0,89 oraz 0,83, co również świadczy o wysokiej jakości metody.

W celu porównania obu testów wykreślono krzywe ROC na wspólnym wykresie. Graficzna ocena wyników pozwala stwierdzić, że wyraźnie dominują linie dla asIgE oraz BAT z CD164 (AI i AII), dopiero potem kształtują się zarysy krzywych ROC dla AI testu z CD63 oraz AIII BAT z CD 164. Na podstawie analizy statystycznej nie wykazano jednak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wartościami AUC, co oznacza, że testy pozwalają uzyskać podobny efekt diagnostyczny. Kwestia ta dotyczyła również porównania testu BAT z CD164 (w zakresie stężenia I) z oznaczeniem asIgE, które cechowała najwyższa czułość spośród wszystkich metod diagnostycznych, tj. 96% przy 100% swoistości. Należy jednak zauważyć, że tak doskonałe wyniki dla asIgE uzyskano po zmianie punktu odcięcia z 0,35 na 0,24 kU/l, co szczegółowo omówiono w rozdziale 5.2.

Znakomite efekty uzyskane w przedstawionym badaniu są porównywalne z tymi, które osiągnięto w opracowaniu Wolańczyk-Mędrali i współautorów [65]. W przytoczonej publikacji, zarówno czułość, jak i swoistość testu BAT z zastosowaniem CD164 w diagnostyce alergii na pyłki traw, określono na poziomie 100% w najwyższym (12 ng/ml) zastosowanym stężeniu alergenu. Z kolei w stężeniu alergenu – 1,2 ng/ml, czułość testu wyniosła 70,83%, przy absolutnej, 100% swoistości. Co prawda, autorzy nie przeprowadzili bezpośredniego porównania z innymi powszechnie stosowanymi markerami aktywacji bazofilów, jednakże analogiczne badanie z zastosowaniem CD63 wśród populacji uczulonych na pyłki traw wskazywało na podobne wyniki – uzyskano czułość na poziomie 91% i 75% oraz swoistość 100% dla obu stężeń alergenów [44]. W związku z tym powstała hipoteza, że BAT z zastosowaniem CD164 może być stosowany z co najmniej porównywalną wydajnością co z CD63. Kontynuacje i potwierdzenie powyższej tezy odnajdujemy w przedstawionym badaniu. Należy również zauważyć, że oba eksperymenty są wspólne metodologicznie – tj. wykorzystują ten sam protokół identyfikacyjny SSC<sup>low</sup>/CCR3<sup>positive</sup>. Jest to istotne w kwestii bezpośredniego porównania wyników, gdyż w zależności od zastosowanego protokołu identyfikacji bazofilów, zmianie mogą ulec czułość i swoistość [98, 147].

CD164 jest dotychczas słabo poznanym markerem aktywacji bazofilów, stąd przedstawione badanie jest pierwszym, które pozwala ocenić jego użyteczność w diagnostyce alergii na roztocze kurzu domowego (*D. farinae*). Odwołując się do innych



publikacji dotyczących roli BAT w potwierdzeniu alergii na HDM, w zależności od rodzaju alergenu, czułość testu wahała się od 90,6–100% przy 98–100% swoistości dla *D. pteronyssinus* oraz 77,3–89,3% przy 100% swoistości dla *D. farinae* (tabela 39). We wszystkich przytoczonych opracowaniach test aktywacji bazofila przeprowadzono przy zastosowaniu markera CD63, przy czym najbardziej zbieżne metodologicznie (ten sam profil identyfikacji bazofilów) było badanie autorstwa Wolańczyk–Mędrala i wsp. [44, 98, 147–150]. W cytowanej pracy osiągnięto 93,75% czułość oraz 100% swoistość, a więc wartości wyższe niż te uzyskane w prezentowanym badaniu przy zastosowaniu protokołu z CD63 oraz porównywalne do wyników BAT z CD164. Pomimo wielu podobieństw, należy jednak zauważyć, że oba projekty omawiają aktywację bazofilów po stymulacji różnymi alergenami (co prawda wykazujących znacznego stopnia homologię), co ogranicza możliwości pełnego zestawienia skuteczności diagnostycznej testów i może mieć przełożenie na osiągnięte parametry czułości i swoistości.

*Tabela 39. Czułość i swoistość testu aktywacji bazofilów w diagnostyce alergii na roztocze kurzu domowego [44, 98, 147–150]*

<b>Autor badania</b>	<b>alergen</b>	<b>stężenie</b>	<b>Cut-off</b>	<b>Czułość</b>	<b>swoistość</b>
Wolańczyk-Mędrala i wsp.	<i>D. pteronyssinus</i>	250 ng/mL	15%	93,75%	100%
Sanz i wsp.	<i>D. pteronyssinus</i>	1.4 mg /mL	15%	93,3%	98,4%
Gonzales-Munoz i wsp.	<i>D. pteronyssinus</i>	16 lg/m	8%	100%	100%
Li i wsp.	<i>D. farinae</i>	1 µg/mL	11,9%	77,3%	100%
Śpiewak i wsp.	<i>D. pteronyssinus</i>	2.25 ng/ml	15%	90,63%	100%
Czarnobilska i wsp.	<i>D. farinae</i>	-	15%	89,3%	100%

W tym miejscu warto również podkreślić, że omawiane badanie stanowi pierwsze tego typu, które dokonuje bezpośredniego porównania obu markerów aktywacji – CD63 oraz CD164 w diagnostyce chorób alergicznych (badanie na temat CD164 zespołu Hennesdorf i wsp. miało na celu odkrycie szczególnych własności markerów aktywacji i nie miało przełożenia na określoną sytuację kliniczną) [45]. Jest to innowacja godna podkreślenia, gdyż w piśmiennictwie funkcjonują zaledwie nieliczne publikacje porównujące różne markery, nawet te najczęściej stosowane tj. CD63 oraz CD203c [28]. W związku z tym, pomimo iż najczęściej stosowanym markerem aktywacji jest CD63, nie można jednoznacznie stwierdzić który z markerów wykazuje największą użyteczność w diagnostyce chorób alergicznych. Ponadto, różnice w dokładności testu aktywacji bazofila z zastosowaniem określonego markera mogą wynikać z innych warunków technicznych czy zastosowania różnych protokołów identyfikacyjnych w poszczególnych laboratoriach i ośrodkach [113]. Zważywszy na pewne niedoskonałości dotychczas znanych markerów aktywacji, istotnym jest też pytanie, czy ich łączne zastosowanie pozwoliłoby na wyeliminowanie wzajemnych wad i stworzenie metody diagnostycznej o jeszcze większej czułości i swoistości niż dotychczas poznane. Podążając za tą koncepcją należy również podnieść kwestie czy jednoczesne zastosowanie kilku metod „in vitro” może zwiększyć dokładność testu, a tym samym całkowicie zastąpić diagnostykę „in vivo” metodami „in vitro”.

W przedstawionym badaniu podjęto próbę zweryfikowania powyższych założeń. Przy zastosowaniu obu markerów – CD164 oraz CD63 osiągnięto niewielką zmianę czułości testu w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla pojedynczo stosowanego testu BAT z CD164 – tj. 92,8% versus 92,3% (swoistość niezmiennie wyniosła 100%). Z kolei połączenie testu aktywacji bazofila o największej efektywności tj. z zastosowaniem CD164 oraz oznaczenia stężenia asIgE pozwoliło na osiągnięcie czułości i swoistości absolutnej (jednak dla powszechnie stosowanego cut off 0,35 kU/l uzyskano mniejszą czułość testu – 96,4%). Na podstawie uzyskanych wyników, należy więc wnioskować, że poprzez połączenie BAT oraz asIgE uzyskujemy metodę diagnostyczną cechującą się jeszcze większą wydajnością niż pojedynczo stosowane testy komponentowe.

Ważne jest podkreślenie celowości powyższego eksperymentu. Strategia kompilacji dwóch lub nawet kilku testów diagnostycznych niewątpliwie zwiększa szansę na prawidłową diagnozę [151]. Ponadto, jak wskazują badania dotyczące PTS oraz asIgE, poszczególne testy nie zawsze dają wynik równoważny. Szacuje się, że w przypadku zastosowania tylko jednego z powyżej wymienionych testów nawet ¼ pacjentów

z chorobą alergiczną nie zostanie zdiagnozowana [152]. Z tego względu, łączne stosowanie kilku metod powinno być w szczególności rozważane w przypadkach trudnych, kiedy mamy do czynienia z wynikiem niejednoznacznym. Oczywiście, wymienione okoliczności stanowią jedocześnie rekomendację do wykonania samego testu aktywacji bazofila. Dlatego, zdaniem autora, już na tym etapie postępowania warto zastosować rozszerzoną diagnostykę z dołączeniem kolejnej metody „in vitro” (o strategii „top down” pisano w rozdziale 1.5). Jak widać na podstawie przedstawionego badania, taki manewr może zwiększyć dokładność diagnostyczna BAT, a nawet umożliwić osiągnięcie absolutnej czułości i swoistości testu. W sytuacji kiedy szacunkowo u około 6–35% chorych nie udaje się zidentyfikować przyczyny anafilaksji (anafilaksja stanowi jedno z podstawowych wskazań do wykonania BAT), nie można mieć wątpliwości, że walka o uzyskanie jak największej wydajności diagnostycznej w chorobach alergicznym może mieć szczególne znaczenie [153].

## 5.8. Podsumowanie

Podsumowując, BAT jest metodą diagnostyczną „in vitro” o niezwykle dużym potencjale. Spełnia wiele cech idealnego biomarkera: jest wysoce powtarzalny, cechuje się dużą czułością i swoistością, daje możliwość oznaczenia w mało inwazyjny sposób, jest dobrym narzędziem do monitorowania efektów leczenia terapii immunomodulacyjnych, może prowadzić do zmniejszenia odsetka wykonywanych prób prowokacyjnych. Oczekuje się, że wraz ze standaryzacją procedur związanych z BAT, jego rola w diagnostyce chorób alergicznym będzie jeszcze większa. W chwili obecnej zróżnicowanie metodologiczne pomiędzy poszczególnymi laboratoriami, zwłaszcza w zakresie stosowanych protokołów identyfikacji bazofilów czy też markerów aktywacji oraz brak potwierdzenia użyteczności BAT dla wielu klinicznie istotnych alergenów, stanowią istotną przeszkodę w ustaleniu miejsca testu aktywacji bazofilów w algorytmach diagnostycznych oraz wymuszają konieczność dalszych badań [25, 28]. W niniejszej pracy przedstawiono nowy protokół BAT z zastosowaniem CD164 w diagnostyce alergii na *D. farinae* charakteryzujący się bardzo dużą czułością i 100% swoistością. Po raz pierwszy również dokonano bezpośredniego porównania CD164 z obecnie najczęściej stosowanym markerem tj. CD63, uzyskując wyższą czułość w protokole BAT z CD164 (92,3% vs 80,8%) oraz opracowano nową metodę diagnostyczną poprzez kompilację kilku testów „in vitro” (BAT z CD164 oraz asIgE)

osiągając czułość i swoistość absolutną. Tak doskonałe wyniki powinny zachęcić do dalszych badań nad użytecznością BAT z zastosowaniem CD164 w uczuleniu na inne alergeny oraz rozpowszechnienia strategii kompilacji kilku metod „in vitro” w celu uzyskania jak największej dokładności diagnostycznej.

## 6. Wnioski

1. Test aktywacji bazofila z oceną ekspresji CD164 ma wysoką przydatność diagnostyczną w diagnostyce alergii na *Dermatophagoides farinae*. Czułość tego testu wynosi 92,3%, a swoistość 100%. Wartości te są równorzędne z badaniem stężenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE i oceną ekspresji CD63.
2. Łączne zastosowanie obu markerów aktywacji bazofilów – CD164 oraz CD63 nie przynosi korzyści w porównaniu z BAT opartym jedynie na protokole z CD164.
3. Kombinacja dwóch różnych metod in vitro - testu cytometrycznego z CD164 oraz oceny asIgE skutkuje zwiększeniem dokładności diagnostycznej w zakresie badanego profilu alergicznego i w przeciwieństwie do prób skojarzenia pozostałych testów pozwala na osiągnięcie 100% czułości i swoistości.

## 7. Streszczenie

### Wstęp

Na przestrzeni ostatnich lat można zaobserwować stały, dynamiczny wzrost częstości występowania chorób alergicznych. Aktualnie istnieje potrzeba wdrożenia diagnostyki o jak największej czułości i swoistości, ponieważ tylko prawidłowe rozpoznanie oraz zidentyfikowanie sprawczych alergenów, umożliwia podjęcie adekwatnych działań w tym względzie, przede wszystkim zastosowanie odpowiedniej profilaktyki oraz spersonalizowanej terapii. Od wielu lat złotym standardem w diagnostyce nadwrażliwości IgE-zależnej pozostają punktowe testy skórne, które jednak mają swoje wady i ograniczenia. Ważną i bezpieczną alternatywę w stosunku do metod „in vivo”, stanowią metody „in vitro”, przede wszystkim oznaczenie stężenia asIgE, ale również test aktywacji bazofila, który doskonale wpisuje się w zamysł medycyny precyzyjnej i ukierunkowanej molekularnie. Obecnie najczęściej wykorzystywanymi markerami aktywacji bazofilów są CD63 oraz w mniejszym stopniu CD203c. Należy jednak podkreślić, że żaden z nich nie osiąga absolutnej swoistości i czułości, nawet w przypadku alergii na alergeny wziewne. Alternatywą wartą uwagi, o prawdopodobnie co najmniej porównywalnej czułości i swoistości w stosunku do CD63, wydaje się być antygen CD164. Badania dotyczące znaczenia CD164 w diagnostyce chorób alergicznych jak dotąd mają jednak ograniczony zasięg i wymagają kontynuacji. W przedstawionym badaniu zaprezentowano nowy protokół BAT z zastosowaniem CD164 w diagnostyce alergii na *D. farinae* oraz dokonano bezpośredniego porównania uzyskanych wyników z obecnie najczęściej stosowanym markerem, tj. CD63, a także wynikami oznaczenia asIgE oraz punktowych testów skórnych.

### Cel pracy

Głównym celem badania było określenie przydatności diagnostycznej testu aktywacji bazofila z oceną ekspresji markera powierzchniowego CD164 w diagnostyce alergii na *Dermatophagoides farinae* poprzez porównanie uzyskanych wyników z punktowymi testami skórnymi oraz oznaczeniem stężenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE i oceną ekspresji CD63. Kolejnym celem pracy było wykazanie, w jakim stopniu łączne zastosowanie testów podnosi możliwości laboratoryjne analizowanych metod diagnostycznych w badaniu alergii na *Dermatophagoides farinae*.

## Material i metody

Badanie przeprowadzono u 28 pacjentów z alergią na roztocze kurzu domowego oraz u 26 zdrowych osób z grupy kontrolnej. U każdego z uczestników badania, po przeprowadzeniu dokładnego wywiadu połączonego z wypełnieniem kwestionariusza, wykonano punktowe testy skórne i oznaczono stężenie swoistych przeciwciał IgE oraz przeprowadzono testy aktywacji bazofilów z wykorzystaniem markerów CD63 oraz CD164. Identyfikacji populacji bazofilów dokonano przy zastosowaniu protokołu CCR3<sup>positive</sup>/SSC<sup>low</sup>, stymulacje nieswoiste bazofilów przeprowadzono stosując przeciwciało anti-IgE a swoiste przy użyciu alergenu *D. farinae* w trzech różnych stężeniach (AI = 225 ng/ml, AII = 22,5 ng/ml, AIII = 2,25 ng/ml). Definicję cut off point oparto na wykreśleniu oraz analizie krzywych ROC oraz oszacowaniu indeksu Youdena. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego R w wersji R – 4.1.2. oraz oprogramowania STATISTICA (wersja 13.3). Normalność parametrów została zweryfikowana testem Shapiro-Wilka. Porównania międzygrupowe zostały wykonane przy pomocy testów t dla grup niezależnych oraz testu U Manna-Whitneya. Zestawienia poszczególnych krzywych ROC dokonano przy pomocy testu DeLonga.

## Wyniki

W teście aktywacji bazofila z CD63 średnio bramkowano 447 komórek (Me 424), natomiast z CD164, 471 (Me 440). Nie stwierdzono w tym zakresie istotnych statystycznie różnic pomiędzy testami ( $p = 0,623$ ). U wszystkich uczestników badania, liczba aktywowanych bazofilów w próbkach niestymulowanych (Pb) była niska; dla testu z CD63 Me 1,95%; min 1,8%; max 3,45%, a dla testu z CD164 Me 2,04%; min 1,82%; max 2,2%. Pozytywną odpowiedź na stymulację przeciwciałem anti-IgE otrzymano u 51 osób ( $n = 54$ ) dla testu z CD63 (Me 59,85%, Min 4,46%, Max 94,63%) oraz 52 osób dla testu z CD164 (Me 55,47%, Min 4,64%, Max 87,96%). Niedostateczną aktywacją bazofilów (non-responders) odpowiedziało 5,6% uczestników w teście aktywacji bazofila z CD63 oraz 3,7% populacji badanej w BAT z CD164.

W wyniku stymulacji swoistej, w grupie zdrowych uczestników średni poziom aktywacji bazofilów we wszystkich stężeniach alergenów był niski – 1,05% dla BAT z CD63 oraz 1,19% dla BAT z CD164. W grupie osób z alergią na *D. farinae* obserwowano zdecydowany wzrost komórek CD63 lub CD164 dodatnich (w porównaniu z grupą kontrolną różnica istotna statystycznie;  $p < 0,001$ ). Największą średnią aktywację bazofili

osiągnięto w obu testach BAT przypadku alergenu w najwyższym stężeniu – 225 ng/ml (AI) (dla BAT z CD63: Me 44,78%, Min 0%, Max 95,55%; dla BAT z CD164: Me 38,24%; Min 1,17%; Max 93,02%). Niższe stężenie alergenu skutkowało spadkiem aktywacji. W obu testach BAT najwyższą wartość indeksu Youdena osiągnięto dla alergenu w najwyższym stężeniu tj. AI (0,81 oraz 0,92, odpowiednio dla BAT z CD63 i CD164). W przypadku BAT z CD164 przy wartości odcięcia 7,29% osiągnięto czułość 92,3% oraz 100% swoistość. Niższe stężenia alergenu skutkowały spadkiem czułości – do 88% dla próbki AII oraz 73,1% dla AIII, przy punktach odcięcia 8,13% oraz 5,98%. W teście aktywacji bazofila z CD63 maksymalna czułość była mniejsza niż w BAT z CD164 i wyniosła – 80,8% dla AI przy 100% swoistości oraz cut off 8,84%. W pozostałych próbkach stymulowanych alergenem osiągnięto czułość 73,1% oraz 42,4% (cut off kolejno 4,87% oraz 10,29%) oraz swoistość 96% oraz 100%. Dla oznaczenia asIgE czułość testu była nieco większa – 96,4% (cut off point 0,24 kU/l). Porównanie krzywych ROC i wartości AUC między testami o największej efektywności diagnostycznej (BAT z CD164 w zakresie stężenia AI oraz oznaczeniem asIgE) nie wykazało istotnie statystycznych różnic.

Przy zastosowaniu obu markerów – CD164 oraz CD63 osiągnięto niewielką zmianę czułości testu w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla pojedynczo stosowanego testu BAT z CD164. – tj. 92,8% versus 92,3% (swoistość wyniosła 100%). Połączenie testu aktywacji bazofila o największej efektywności tj. z zastosowaniem CD164 oraz oznaczenia stężenia asIgE pozwoliło na osiągnięcie 100% czułości i swoistości.

## **Wnioski**

1. Test aktywacji bazofila z oceną ekspresji CD164 ma wysoką przydatność diagnostyczną w diagnostyce alergii na *Dermatophagoides farinae*. Czułość tego testu wynosi 92,3%, a swoistość 100%. Wartości te są równorzędne z badaniem stężenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE i oceną ekspresji CD63.
2. Łączne zastosowanie obu markerów aktywacji bazofilów - CD164 oraz CD63 nie przynosi korzyści w porównaniu z BAT opartym jedynie na protokole z CD164.
3. Kombinacja dwóch różnych metod „in vitro” - testu cytometrycznego z CD164 oraz oceny asIgE skutkuje zwiększeniem dokładności diagnostycznej w zakresie badanego profilu alergicznego i w przeciwieństwie do prób skojarzenia pozostałych testów pozwala na osiągnięcie 100% czułości i swoistości.



## 8. Summary

### Introduction

In recent years, a steady, dynamic increase in the incidence of allergic diseases can be observed. Currently, there is a need for introducing diagnostics with the highest sensitivity and specificity, because only the identification of causative allergens enables the implementation of appropriate prophylaxis and personalized therapy. For many years, the gold standard in the diagnosis of IgE-mediated hypersensitivity has been skin prick tests, which however have their disadvantages and limitations. An alternative to “in vivo” methods is “in vitro” diagnostics, primarily the determination of allergen-specific IgE serum concentration, but also the basophil activation test, which fits perfectly into the concept of precision and molecularly targeted medicine. Currently, the most commonly used markers of basophil activation are CD63, and to a lesser extent CD203c. Nonetheless, it should be emphasized that none of them achieves absolute specificity and sensitivity, even in the case of allergies to inhalant allergens. An alternative worth considering, with probably at least comparable sensitivity and specificity to CD63, seems to be the CD164 antigen. However, research on the clinical significance of CD164 in the diagnosis of allergic diseases so far has limited scope and requires continuation. The presented study compares new basophil activation protocol using CD164 in patients with allergy to *D. farinae* with currently most commonly used marker – CD63, as well as sIgE and skin prick tests results.

### Objectives

The main aim of the study was to determine the diagnostic usefulness of the basophil activation test with assessment of the surface marker CD164 expression in the diagnosis of *Dermatophagoides farinae* allergy, by comparing the results with those obtained from skin prick tests, determination of allergen-specific IgE antibodies, and evaluation of CD63 expression. Another aim of the study was to demonstrate to whether the combined use of these tests enhances the laboratory capabilities of the analyzed diagnostic methods in the assessment of *Dermatophagoides farinae* allergy.

## Materials and methods

Twenty eight patients with a house dust mite allergy and twenty six healthy individuals as the control group were examined. First, the a detail history was taken combined with questionnaire completion. Then the participants underwent skin prick tests and the specific IgE antibodies serum concentrations were measured. Basophil activation tests using CD63 and CD164 markers were also performed. Basophil identification was based on the CCR3<sup>positive</sup>/SSC<sup>low</sup> protocol. Non-specific basophil stimulation was carried out using anti-IgE antibodies and specific stimulation using *D. farinae* allergen at three different concentrations (AI = 225 ng/ml, AII = 22.5 ng/ml, AIII = 2.25 ng/ml). The cut-off point was defined based on ROC curve analysis and calculation of the Youden index. Statistical analysis was performed using R software version 4.1.2 and STATISTICA version 13.3. The normality of the parameters was verified using the Shapiro-Wilk test. Inter-group comparisons were performed using t-tests for independent groups and the U Mann-Whitney test. The ROC curves were compared using the DeLong's test.

## Results

In the basophil activation test using CD63, the mean value of gated cells was 447 (Me 424) whereas using CD164, 471 cells (Me 440). No statistically significant differences were observed between the tests in this regard ( $p = 0.623$ ). In all participants, the number of activated basophils in unstimulated samples (Pb) was low, with a mean of 1.95% (Min 1.8%, Max 3.45%) for the CD63 test and 2.04% (Min 1.82%, Max 2.2%) for the CD164 test. A positive response to anti-IgE antibody stimulation was obtained in 51 individuals ( $n = 54$ ) for the CD63 test (Me 59.85%, Min 4.46%, Max 94.63%) and 52 individuals for the CD164 test (Me 55.47%, Min 4.64%, Max 87.96%). Insufficient basophil activation (non-responders) occurred in 5.6% of the participants tested with CD63 and in 3.7% when CD164 was used. As a result of specific stimulation, in the group of healthy participants, the mean percentage of activated basophils in all allergen's concentrations was low – 1.05% for BAT with CD63 and 1.19% for BAT with CD164. In the group of patients allergic to *D. farinae*, a significant increase in CD63 or CD164 positive cells was observed (compared to the control group, the difference was statistically significant;  $p < 0.001$ ). The highest basophil activation was achieved in both BAT tests in the case of the allergen at the highest concentration – 225 ng/ml (AI) (for CD63 BAT: Me 44.78%, Min 0%, Max 95.55%; for CD164 BAT: Me 38.24%; Min 1.17%, Max 93.02%). Lower

allergen concentrations resulted in a decrease in activation. In both BAT tests, the highest value of the Youden index was achieved for the allergen at the highest concentration – AI (0.81 and 0.92, respectively, for CD63 and CD164 BAT). In the case of CD164 BAT, at the cutoff value of 7.29%, a sensitivity of 92.3% and a specificity of 100% were achieved. Lower allergen concentrations resulted in a decrease in sensitivity – to 88% for sample AII and 73.1% for AIII, at cutoff points of 8.13% and 5.98%, respectively. In the basophil activation test with CD63, the maximum sensitivity was lower than in CD164 BAT and was 80.8% for AI at 100% specificity and a cutoff of 8.84%. Sensitivity of 73.1% and 42.4% (cutoffs were 4.87% and 10.29%) and specificity of 96% and 100% were achieved in other allergen-stimulated samples. The sensitivity of the asIgE test was slightly higher – 96.4% (cutoff point 0.24 kU/l). Comparison of ROC curves and AUC values between the most diagnostically efficient tests (CD164 BAT within the AI range, and asIgE) did not show any statistically significant differences. When both markers – CD164 and CD63 were used, there was a slight change in the sensitivity of the test compared to the values obtained for the BAT test with CD164 used alone, 92.8% versus 92.3% (specificity was 100%). Combining the most efficient basophil activation test using CD164 and measuring asIgE concentration allowed achieving 100% sensitivity and specificity.

## **Conclusions**

1. Basophil activation test with CD164 expression assessment has high diagnostic usefulness in diagnosing allergy to *Dermatophagoides farinae*. The sensitivity of this test is 92.3%, and specificity is 100%. These values are equivalent to those obtained when measuring the concentration of allergen-specific IgE antibodies and assessing CD63 expression.
2. The combined use of both basophil activation markers – CD164 and CD63 – does not provide any benefits compared to the BAT based solely on the CD164.
3. The combination of two different “in vitro” methods - the cytometric test with CD164 and the assessment of allergen-specific IgE serum concentration results in increased diagnostic accuracy for the examined allergic profile. In contrast to attempts to associate other diagnostic tests, this combination achieves 100% sensitivity and specificity.

## 9. Spis Rycin

Rycina 1.	Wpływ alergenów HDM na wzmocnienie odpowiedzi alergicznej Th2 z uwzględnieniem fazy wczesnej i późnej reakcji alergicznej.....	10
Rycina 2.	Degranulacja komórki tucznej .....	13
Rycina 3.	Schemat budowy cytometru przepływowego .....	17
Rycina 4.	Schemat rozkładu populacji leukocytów w cytometrze przepływowym w zależności od wielkości komórki i ziarnistości.....	18
Rycina 5.	Przykładowy sposób przedstawiania danych uzyskanych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej – strategia bramkowania bazofili – komórki CCR3 <sup>positive</sup> / SSC <sup>low</sup> .....	19
Rycina 6.	Przykładowy sposób przedstawiania danych uzyskanych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej: komórki w prawym górnym rogu wykresu – pozytywne dla obu parametrów – CCR3 <sup>positive</sup> oraz wykazujące wzrost ekspresji CD63 po stymulacji alergenem .....	19
Rycina 7.	Procentowy rozkład płci w grupie badanej i kontrolnej .....	29
Rycina 8.	Histogram struktury wieku w grupie badanej.....	30
Rycina 9.	Histogram struktury wieku w grupie kontrolnej.....	30
Rycina 10.	Histogram rozkładu masy ciała w grupie badanej .....	31
Rycina 11.	Histogram rozkładu masy ciała w grupie kontrolnej.....	31
Rycina 12.	Histogram rozkładu wzrostu w grupie badanej .....	32
Rycina 13.	Histogram rozkładu wzrostu w grupie kontrolnej .....	32
Rycina 14.	Zależność rozproszenia światła na ziarnistościach wewnątrzkomórkowych (SSC) od natężenia fluorescencji markera identyfikacji bazofilów – CCR3 ...	43
Rycina 15.	Zmiana ekspresji markera aktywacji bazofilów – CD63 w odpowiedzi na stymulację anti-IgE oraz stymulację alergenem w poszczególnych stężeniach.....	44
Rycina 16.	Zmiana ekspresji markera aktywacji bazofilów – CD164 w odpowiedzi na stymulację anti-IgE oraz stymulację alergenem w poszczególnych stężeniach.....	45
Rycina 17.	Histogram przedstawiający rozkład wartości średnich wyników PTS dla alergenu D. farinae w grupie badanej .....	50

Rycina 18. Porównanie wyników testów skórnych dla <i>D. farinae</i> w grupie badanej i kontrolnej (różnica istotna statystycznie, $p < 0,001$ ).....	51
Rycina 19. Wykres pudełkowy przedstawiający wyniki punktowych testów skórnych dla wszystkich stosowanych w badaniu alergenów w grupie badanej .....	52
Rycina 20. Rozkład wyników wg poszczególnych klas asIgE w grupie badanej.....	54
Rycina 21. Porównanie średnich wartości liczby komórek zabramkowanych jako bazofile w grupie badanej dla BAT z zastosowaniem CD63 i CD164.....	58
Rycina 22. Porównanie średnich wartości liczby komórek zabramkowanych jako bazofile w grupie kontrolnej dla BAT z zastosowaniem CD63 i CD164....	58
Rycina 23. Wykres pudełkowy przedstawiający średnią liczbę komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych próbkach w grupach badanej i kontrolnej dla BAT z CD63.....	61
Rycina 24. Wykres pudełkowy przedstawiający średnią liczbę komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych próbkach w grupach badanej i kontrolnej dla BAT z CD164.....	62
Rycina 25. Średnia aktywacja bazofilów (%) w poszczególnych próbkach dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem markera CD 63, w podziale na grupę badaną i kontrolną.....	65
Rycina 26. Średnia aktywacja bazofilów (%) w poszczególnych próbkach dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem markera CD164, w podziale na grupę badaną i kontrolną.....	65
Rycina 27. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu <i>D. farinae</i> w grupie badanej, w BAT z zastosowaniem CD63 .....	66
Rycina 28. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu <i>D. farinae</i> , w grupie kontrolnej, w BAT z zastosowaniem CD63.....	67
Rycina 29. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu <i>D. farinae</i> w grupie badanej, w BAT z zastosowaniem CD164 .....	67
Rycina 30. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu <i>D. farinae</i> w grupie kontrolnej, w BAT z zastosowaniem CD164.....	68

Rycina 31. Rozkład średniej wartości i mediany aktywacji bazofili w trzech różnych stężeniach alergenu <i>D. farinae</i> w grupie badanej w BAT z zastosowaniem CD63 i CD164 .....	68
Rycina 32. Porównanie grupy kontrolnej i badanej w zakresie aktywowanych bazofilów w teście BAT z CD63 .....	71
Rycina 33. Porównanie grupy kontrolnej i badanej w zakresie aktywowanych bazofilów w teście BAT z CD164 .....	71
Rycina 34. Porównanie liczby aktywowanych bazofilów w grupach badanych pomiędzy testami BAT z CD63 i CD164 .....	72
Rycina 35. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu I).....	73
Rycina 36. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu II) .....	74
Rycina 37. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu III) .....	74
Rycina 38. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu I).....	75
Rycina 39. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu II) .....	75
Rycina 40. Wykres czułości i specyficzności dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu III) .....	76
Rycina 41. Wykres czułości i specyficzności dla oznaczenia alergenowo swoistego IgE. 76	
Rycina 42. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu I).....	77
Rycina 43. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu II).....	77
Rycina 44. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 (Alergen w stężeniu III) .....	78
Rycina 45. Krzywa ROC dla kontroli dodatniej (Pc), w teście aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 .....	78
Rycina 46. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu I).....	79
Rycina 47. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu II).....	79

Rycina 48. Krzywa ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 (Alergen w stężeniu III).....	80
Rycina 49. Krzywa ROC dla kontroli dodatniej (Pc) w teście aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 .....	80
Rycina 50. Krzywa ROC dla oznaczenia asIgE .....	81
Rycina 51. Zestawienie krzywych ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 oraz oznaczenia asIgE .....	81
Rycina 52. Zestawienie krzywych ROC dla testu aktywacji bazofila z zastosowaniem CD164 oraz oznaczenia asIgE .....	82
Rycina 53. Zestawienie krzywych ROC dla testów aktywacji bazofila z zastosowaniem CD63 i CD164 oraz oznaczenia asIgE.....	83

## 10. Spis Tabel

Tabela 1.	Ogólne wskazania do przeprowadzenia PTS .....	12
Tabela 2.	Przyczyny podwyższonego IgE całkowitego w surowicy .....	14
Tabela 3.	Charakterystyka głównych grup mediatorów reakcji alergicznej uwalnianych z ziarnistości bazofilów .....	21
Tabela 4.	Charakterystyka głównych markerów identyfikacji bazofilów .....	22
Tabela 5.	Struktura grupy badanej i kontrolnej według płci.....	29
Tabela 6.	Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej pod względem wieku, masy ciała i wzrostu .....	33
Tabela 7.	Klasy asIgE i odpowiadające im przedziały stężeń .....	41
Tabela 8.	Charakterystyka grupy badanej pod względem zgłaszanych objawów oraz chorób współistniejących.....	47
Tabela 9.	Podstawowe parametry statystyki opisowej dla testu z histaminą oraz porównanie między grupami.....	49
Tabela 10.	Analiza wyniku testów skórnych dla alergenu D. farinae w grupie badanej i kontrolnej.....	49
Tabela 11.	Analiza wyników PTS dla wszystkich testowanych alergenów w grupie badanej .....	52
Tabela 12.	Zestawienie wyników asIgE dla grupy kontrolnej i badanej z uwzględnieniem udziału badanych w poszczególnych klasach swoistego IgE .....	53
Tabela 13.	Zestawienie porównawcze wyników analizy statystycznej grupy badanej i kontrolnej w zakresie oznaczenia asIgE .....	54
Tabela 14.	Porównanie wyników oznaczenia stężenia asIgE przy różnych założeniach normy asIgE w analizowanej próbie pacjentów .....	55
Tabela 15.	Podstawowe parametry statystyki opisowej dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w grupie badanej dla BAT z zastosowaniem markera CD63.....	56
Tabela 16.	Podstawowe parametry statystyki opisowej dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w grupie kontrolnej dla BAT z zastosowaniem markera CD63 .....	56



Tabela 17. Podstawowe parametry statystyki opisowej dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w grupie badanej dla BAT z zastosowaniem markera CD164.....	57
Tabela 18. Podstawowe parametry statystyki opisowej dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w grupie kontrolnej dla BAT z zastosowaniem markera CD164.....	57
Tabela 19. Ocena liczby komórek zabramkowanych jako bazofile – zestawienie wyników testu Shapiro-Wilka w poszczególnych próbkach dla obu testów BAT .....	59
Tabela 20. Zestawienie porównawcze wartości p dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych grupach dla testu aktywacji bazofila z CD63.....	60
Tabela 21. Zestawienie porównawcze wartości p dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych grupach dla testu aktywacji bazofila z CD164.....	60
Tabela 22. Zestawienie porównawcze wartości p dotyczące liczby komórek zidentyfikowanych jako bazofile w poszczególnych testach aktywacji bazofila (z CD63 i CD164).....	61
Tabela 23. Ocena aktywacji bazofilów (%) w grupie badanej dla testu aktywacji bazofila z CD63 – statystyka opisowa.....	63
Tabela 24. Ocena aktywacji bazofilów (%) w grupie kontrolnej dla testu aktywacji bazofila z CD63 – statystyka opisowa.....	64
Tabela 25. Ocena aktywacji bazofilów (%) w grupie badanej dla testu aktywacji bazofila z CD164 – statystyka opisowa.....	64
Tabela 26. Ocena aktywacji bazofilów (%) w grupie kontrolnej dla testu aktywacji bazofila z CD164 – statystyka opisowa.....	64
Tabela 27. Ocena stopnia aktywacji bazofili dla poszczególnych próbek – zestawienie wyników testu Shapiro-Wilka dla obu testów BAT .....	69
Tabela 28. Zestawienie porównawcze wyników analizy statystycznej pomiędzy grupą badaną i kontrolną w zakresie wartości aktywacji bazofili w BAT z zastosowaniem markera CD63 .....	70
Tabela 29. Zestawienie porównawcze wyników analizy statystycznej pomiędzy grupą badaną i kontrolną w zakresie wartości aktywacji bazofili w BAT z zastosowaniem markera CD164.....	70

Tabela 30. Indeks Youdena dla analizowanych zmiennych w teście aktywacji bazofila z CD63 i CD164 oraz oznaczenia asIgE.....	84
Tabela 31. Zestawienie wartości wyznaczonych na podstawie krzywych ROC dla testu aktywacji bazofila z CD63, CD164 oraz oznaczenia asIgE .....	84
Tabela 32. Zestawienie porównawcze wyników testu DeLonga dla poszczególnych krzywych ROC dla obu testów BAT oraz asIgE .....	85
Tabela 33. Porównanie czułości i swoistości oraz ich sumy dla BAT z CD63, CD164 oraz asIgE.....	86
Tabela 34. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla BAT z CD164.....	86
Tabela 35. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla BAT z CD63.....	86
Tabela 36. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla BAT z CD63 i CD164.....	87
Tabela 37. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla łącznego zastosowania asIgE oraz BAT z CD164.....	87
Tabela 38. Wartości prawdziwie dodatnie (PD), fałszywie dodatnie (FD), fałszywie ujemne (FU), prawdziwie ujemne (PU) dla łącznego zastosowania asIgE oraz BAT z CD63 .....	87
Tabela 39. Czułość i swoistość testu aktywacji bazofilów w diagnostyce alergii na roztocze kurzu domowego .....	105

## Piśmiennictwo

1. Prescott S. Early-life environmental determinants of allergic diseases and the wider pandemic of inflammatory noncommunicable diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 131: 23–30.
2. Johansson S, Hourihane J, Bousquet J, i wsp. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy.* 2001; 56: 813–824.
3. Gołąb M, Jakóbiński M, Lasek W, i wsp. *Immunologia.* Warszawa, Polska: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2011.
4. Brożek J, Bousquet J, Agache J, i wsp. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 140: 950–958.
5. Wise S, Lin S, Toskala E, i wsp. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Allergic Rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2018; 8: 108–352.
6. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz A, i wsp. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* 2008; 63: 8–160.
7. Pietrzyk J, Szajewska H, Mrukowicz J. Podręcznik pediatrii oparty na zasadach EBM [online]. Liszki, Polska: Medycyna Praktyczna; 2021. <https://www.mp.pl/podrecznik/pediatrica>. Dostęp 30.03.2022.
8. Rondon C, Campo P, Togias A, i wsp. Local allergic rhinitis: Concept, pathophysiology, and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129: 1460–1467.
9. Sylvestre L, Jégu J, Metz-Favre C, i wsp. Component-Based Allergen Microarray: Der p 2 and Der f 2 Dust Mite Sensitization Is More Common in Patients With Severe Asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2016; 26: 141–143.
10. The Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention: 2022 report. <https://ginasthma.org/gina-reports/>. Dostęp 30.03.2022.
11. Calderón M, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, i wsp. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 136: 38–48.

12. Reithofer M, Jahn-Schmid B. Allergens with Protease Activity from House Dust Mites. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 1368.
13. Holt P, Rowe J, Kusel M, i wsp. Toward improved prediction of risk for atopy and asthma among preschoolers: a prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: 653–659.
14. Sudharson S, Kalic T, Hafner C, i wsp. Newly defined allergens in the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database during 01/2019-03/2021. *Allergy.* 2021; 76: 3359–3373.
15. Kruszewski J, Kowalski M, Kulus M. Standardy w alergologii: stanowiska paneli eksperckich Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. Poznań, Polska: Termedia; 2019.
16. Kay A. Landmarks in Allergy during the 19th Century. *Chem Immunol Allergy.* 2014; 100: 21–26.
17. Ishizaka K, Ishizaka T. Physicochemical properties of reaginic antibody. 1. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gammaA – or gammaG-globulin. *J Allergy.* 1966; 37: 169–185.
18. Ishizaka K, Ishizaka T, Hathorn E. Blocking of Prausnitz-Küstner sensitization with reagin by “A chain“ of human  $\gamma$ 1A-globulin. *Immunochemistry.* 1964; 1: 197–207.
19. Ishizaka K, Ishizaka T: Identification of  $\gamma$ E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol.* 1967; 99: 1187.
20. Stanworth D, Humphrey J, Bennich H, i wsp. Specific inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction by an atypical human myeloma protein. *Lancet.* 1967; 2: 330–332.
21. Bennich H, Ishizaka K, Johansson S, i wsp. Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulins. *Bull World Health Organ.* 1968; 38: 151–152.
22. Stone K, Prussin C, Metcalfe D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: 73–80.
23. Ansotegui I, Melioli G, Canonica G, i wsp. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J.* 2020; 13: 100080.
24. Majsiak E. Od odkrycia IgE, poprzez nanotechnologię do medycyny spersonalizowanej. *Alergia.* 2019; 4: 41–46.

25. Hemmings O, Kwok M, McKendry R, i wsp. Basophil Activation Test: Old and New Applications in Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2018; 18: 77.
26. Knol E, Mul F, Jansen H, i wsp. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 88: 328–338.
27. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin J. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg Immunol.* 1994; 26: 211–214.
28. Hoffmann H, Santos A, Mayorga C, i wsp. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy.* 2015; 70: 1393–1405.
29. Skierski J. Cytometria wczoraj i dziś – podróż przez dziesięciolecia. *Cytometria Polska.* 2012; 1: 4–10.
30. Pedreira C, Costa E, Lecrevisse Q, i wsp. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol.* 2013; 31: 415–425.
31. Delmonte O, Fleisher T. Flow cytometry: Surface markers and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 143: 528–537.
32. Shapiro H. *Practical flow cytometry.* Nowy Jork, Stany Zjednoczone: Wiley-Liss; 2003.
33. Bendall S, Nolan G, Roederer M, i wsp. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in immunology.* 2012; 33: 323–332.
34. Miyake K, Shibata S, Yoshikawa S, i wsp. Basophils and their effector molecules in allergic disorders. *Allergy.* 2021; 76: 1693–1706.
35. Varricchi G, Raap U, Rivellesse F, i wsp. Human mast cells and basophils-how are they similar how are they different? *Immunological Reviews.* 2018; 282: 8–34.
36. MacGlashan D. Basophil activation testing. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132: 777–787.
37. McGowan E, Saini S. Update on the Performance and Application of Basophil Activation Tests. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013; 13: 101–109.

38. De Weck A, Sanz M, Gamboa P, i wsp. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008; 18: 143–155.
39. Santos A, Shreffler W. Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy. *Clin Exp Allergy*. 2017; 47: 1115–1124.
40. Hausmann O, Gentinetta T, Fux M, i wsp. Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy*. 2011; 66: 85–91.
41. Santos A, Bécares N, Stephens A, i wsp. The expression of CD123 can decrease with basophil activation: implications for the gating strategy of the basophil activation test. *Clin Transl Allergy*. 2016; 6: 11.
42. Chirumbolo S, Bjorklund G, Vella A. Using a CD45<sup>dim</sup>/CD123<sup>bright</sup>/HLA-DR<sup>neg</sup> phenotyping protocol to gate basophils in FC for airway allergy. CD123 does not decrease. *Adv Respir Med*. 2017; 85: 193–201.
43. 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; 3: 9.
44. Wolańczyk-Mędrała A, Gogolewski G, Liebhart J, i wsp. A new variant of the basophil activation test for allergen-induced basophil CD63 upregulation. The effect of cetirizine. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19: 465–473.
45. Hennersdorf F, Florian S, Jakob, i wsp. 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 Research*. 2005; 15: 325–335.
46. Santos A, Alpan O, Hoffmann H. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy*. 2021; 76: 2420–2432.
47. Główny Urząd Statystyczny. Baza Demografia. Stan i struktura ludności. <https://demografia.stat.gov.pl/bazademografia/Tables.aspx>. Dostęp 27.12.2021.
48. Bojarska-Junak A, Mach A. Oznaczanie alergenowo swoistych IgE. *Alergia*. 2013; 2: 21–25.

49. Hong S, Ryu G, Seo M, i wsp. Optimal Cut off Values of Allergen-specific Immunoglobulin E to House Dust Mites and Animal Dander Based on Skin-prick Test Results: Analysis in 16,209 Patients with Allergic Rhinitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2018; 32: 23–26.
50. Siles R, Hsieh F. Allergy blood testing: A practical guide for clinicians. *Cleve Clin J Med*. 2011; 78: 585–592.
51. Flow CAST. Basophil activation test (BAT) Flow Cytometry. <https://www.buhlmannlabs.ch>. Dostęp 05.02.2023.
52. Puan K, Andiappan A, Lee B, i wsp. Systematic characterization of basophil anergy. *Allergy*. 2017; 72: 373–384.
53. Knol E, Mul F, Kuijpers T, i wsp. Intracellular events in anti-IgE nonreleasing human basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 1992; 90: 92–103.
54. Kepley C, Youssef L, Andrews R, i wsp. Syk deficiency in nonreleaser basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 279–284.
55. Perkins N, Schisterman E. The Youden index and the optimal cut-point corrected for measurement error. *Biom J*. 2005; 47: 428–441.
56. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 13: Receiver operating characteristic curves. *Crit Care*. 2004; 8: 508–512.
57. Robin X, Turck N, Hainard A, i wsp. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12: 77.
58. Ferrando M, Bagnasco D, Varricchi G, i wsp. Personalized Medicine in Allergy. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017; 9: 15–24.
59. Stevens W, Peters A, Tan B, i wsp. Associations Between Inflammatory Endotypes and Clinical Presentations in Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019; 7: 2812–2820.
60. Jakiela B, Soja J, Sladek K, i wsp. Heterogeneity of lower airway inflammation in patients with NSAID-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2021; 147: 1269–1280.
61. Kowalski M. Heterogeneity of NSAID-Exacerbated Respiratory Disease: has the time come for subphenotyping? *Curr Opin Pulm Med*. 2019; 25: 64–70.

62. Czarnowicki T, He H, Krueger J, i wsp. Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 143: 1–11.
63. Skevaki C, Van den Berg J, Jones N, i wsp. Immune biomarkers in the spectrum of childhood noncommunicable diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 137: 1302–1316.
64. Papi A, Brightling C, Pedersen S, i wsp. Asthma. *Lancet.* 2018; 391: 783–800.
65. Wolanczyk-Medrała A, Barg W, Liebhart J, i wsp. Validation of basophil CD164 upregulation for pollen allergy diagnosis. *Arch Immunol Ther Exp.* 2010; 58: 459–465.
66. Heinzerling L, Mari A, Bergmann K, i wsp. The skin prick test – European standards. *Clin Transl Allergy.* 2013; 3: 3.
67. Novembre E, Bernardini R, Bertini G, i wsp. Skin-prick-test induced anaphylaxis. *Allergy.* 1995; 50: 511–513.
68. Nevis I, Binkley K, Kabali C. Diagnostic accuracy of skin-prick testing for allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2016; 12: 20.
69. Justo X, Díaz I, Gil J, i wsp. Prick test: evolution towards automated reading. *Allergy.* 2016; 71: 1095–1102.
70. Soares-Weiser K, Takwoingi Y, Panesar S, i wsp. The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 2014; 69: 76–86.
71. Vlieg-Boerstra B, van de Weg W, van der Heide S, i wsp. Where to prick the apple for skin testing? *Allergy.* 2013; 68: 1196–1198.
72. Brockow K, Romano A. Skin Tests in the Diagnosis of Drug Hypersensitivity Reactions. *Curr Pharm Des.* 2008; 14: 2778–2791.
73. Roberts G, Pfaar O, Akdis C, i wsp. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy.* 2018; 73: 765–798.
74. Stringari G, Tripodi S, Caffarelli C, i wsp. The effect of component-resolved diagnosis on specific immunotherapy prescription in children with hay fever. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134: 75–81.
75. Casset A, Mari A, Purohit A, i wsp. Varying composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012; 159: 253–262.



76. Brunetto B, Tinghino R, Braschi M, i wsp. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. *Allergy*. 2010; 65: 184–190.
77. Jimenez-Feijoo R, Pascal M, Moya R, i wsp. Molecular diagnosis in house dust mite allergic patients suggests clinical relevance of Der p 23 in asthmatic children. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2019; 30: 127–132.
78. Balzer L, Pennino D, Blank S, i wsp. Basophil activation test using recombinant allergens: highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. *PLoS One*. 2014; 17: 9.
79. Bokanovic D, Aberer W, Hemmer W, i wsp. Determination of sIgE to rPhl p 1 is sufficient to diagnose grass pollen allergy. *Allergy*. 2013; 68: 1403–1409.
80. Lieberman J, Sicherer S. Diagnosis of food allergy: epicutaneous skin tests, in vitro tests, and oral food challenge. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011; 11: 58–64.
81. Lange L, Lasota L, Finger A, i wsp. Ana o 3-specific IgE is a good predictor for clinically relevant cashew allergy in children. *Allergy*. 2017; 72: 598–603.
82. Turner P, Duca B, Chastell S, i wsp. IgE-sensitization predicts threshold but not anaphylaxis during oral food challenges to cow's milk. *Allergy*. 2022; 77: 1291–1293.
83. Linden C, Misiak R, Wegienka G, i wsp. Analysis of allergen specific IgE cut points to cat and dog in the Childhood Allergy Study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011; 106: 153–158.
84. Sturm G, Arzt-Gradwohl L, Varga E. Medical Algorithms: Diagnosis and treatment of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2019; 74: 2016–2018.
85. Weghofer M, Thomas W, Kronqvist M, i wsp. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest*. 2008; 38: 959–965.
86. Morita E, Chinuki Y, Takahashi H. Recent advances of in vitro tests for the diagnosis of food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci*. 2013; 71: 155–159.
87. Gajewski P. *Interna Szczeklika – Mały podręcznik*. [online]. Kraków, Polska: Medycyna Praktyczna; 2022. <https://www.mp.pl/interna/>. Dostęp 30.01.2023.

88. Jutel M, Gajdanowicz P. Mechanisms induced by allergen immunotherapy: state of knowledge in 2018. *Alergologia Polska – Polish Journal of Allergology*. 2018; 5: 175–179.
89. Campo P, Salas M, Blanca-Lopez N, i wsp. Local allergic rhinitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016; 36: 321-332.
90. Eguiluz-Gracia I, Ariza A, Testera-Montes A, i wsp. Allergen Immunotherapy for Local Respiratory Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020; 20: 23.
91. Gellrich D, Högerle C, Becker S, i wsp. Is quantitative sIgE serology suitable for distinguishing between silent sensitization and allergic rhinitis to *Dermatophagoides pteronyssinus*? *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2019; 29: 124–131.
92. Huss-Marp J, Darsow U, Brockow K, i wsp. Can immunoglobulin E-measurement replace challenge tests in allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen? *Clin Exp Allergy*. 2011; 41: 1116–1124.
93. Beyer K, Grabenhenrich L, Härtl M, i wsp. Predictive values of component-specific IgE for the outcome of peanut and hazelnut food challenges in children. *Allergy*. 2015; 70: 90–98.
94. Leysen J, Sabato V, Verweij M, i wsp. The basophil activation test in the diagnosis of immediate drug hypersensitivity. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011; 7: 349–355.
95. Korošec P, Šilar M, Eržen R, i wsp. Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 161: 363–368.
96. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, i wsp. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy*. 2009; 39: 1234–1245.
97. Santos A, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool. *Clin Transl Allergy*. 2016; 6: 10.
98. Sanz M, Sánchez G, Gamboa P, i wsp. 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.

99. Santos A, Douiri A, Bécares N, i wsp. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134: 645–652.
100. Mehlich J, Fischer J, Hilger C, i wsp. The basophil activation test differentiates between patients with alpha-gal syndrome and asymptomatic alpha-gal sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 143: 182–189.
101. Santos A, Du Toit G, Douiri A, i wsp. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 135: 179–186.
102. Duan L, Celik A, Hoang J, i wsp. Basophil activation test shows high accuracy in the diagnosis of peanut and tree nut allergy: The Markers of Nut Allergy Study. *Allergy.* 2021; 76: 1800–1812.
103. Eržen R, Košnik M, Šilar M, i wsp. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy.* 2012; 67: 822–830.
104. Lalek N, Kosnik M, Silar M, i wsp. Immunoglobulin G-dependent changes in basophil allergen threshold sensitivity during birch pollen immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40: 1186–1193.
105. Schmid J, Würtzen P, Dahl R, i wsp. Early improvement in basophil sensitivity predicts symptom relief with grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134: 741–744.
106. Akdis M, Akdis C. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 621–631.
107. Altrichter S, Fok J, Jiao Q, i wsp. Total IgE as a Marker for Chronic Spontaneous Urticaria. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2021; 13: 206–218.
108. Eberlein B. Basophil Activation as Marker of Clinically Relevant Allergy and Therapy Outcome. *Front Immunol.* 2020; 11: 1815.
109. Schoepke N, Asero R, Ellrich A, i wsp. Biomarkers and clinical characteristics of autoimmune chronic spontaneous urticaria: Results of the PURIST Study. *Allergy.* 2019; 74: 2427–2436.

110. McGowan E, Saini S. Update on the Performance and Application of Basophil Activation Tests. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013; 13: 101–109.
111. Gober L, Eckman J, Sterba P, i wsp. Expression of activation markers on basophils in a controlled model of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119: 1181–1188.
112. Bühring H-J, 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: 317–329.
113. Wolanczyk-Medrala A, Barg W, Medrala W. CD164 as a Basophil Activation Marker. *Curr Pharm Des.* 2011; 17: 3786–3796.
114. Chirumbolo S. CD164 and other recently discovered activation markers as promising tools for allergy diagnosis: what's new? *Clin Exp Med.* 2011; 11: 255–257.
115. Majlesi Y, Samorapoompichit P, Hauswirth A, i wsp. Cerivastatin and atorvastatin inhibit IL-3-dependent differentiation and IgE-mediated histamine release in human basophils and downmodulate expression of the basophil-activation antigen CD203c/E-NPP3. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 107–117.
116. Ando N, Nakamura Y, Ishimaru K, i wsp. Allergen specific basophil reactivity exhibits daily variations in seasonal allergic rhinitis. *Allergy.* 2015; 70: 319–322.
117. Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, i wsp. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38: 921–928.
118. Sudheer P, Hall J, Read G, i wsp. Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia.* 2005; 60: 251–256.
119. Boumiza R, Monneret G, Forissier M, i wsp. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33: 259–265.
120. Ebo D, Lechkar B, Schuerwegh A, i wsp. Comments regarding 'Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63' by Boumiza et al. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33: 849.

121. Platz I, Binder M, Marxer A, i wsp. Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001; 126: 335–342.
122. Binder M, Fierlbeck G, King T, i wsp. Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 129: 160–168.
123. Eberlein-König B, Varga R, Mempel M, i wsp. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy.* 2006; 61: 1084–1085.
124. Bidad K, Nawijn M, van Oosterhout A, i wsp. Basophil Activation Test in the diagnosis and monitoring of mastocytosis patients with wasp venom allergy. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014; 86: 183–190.
125. Ebo D, Hagendorens M, Schuerwegh A, i wsp. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007; 72: 196–203.
126. Scherer K, Weber J, Jermann T, i wsp. Cellular in vitro assays in the diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008; 146: 122–132.
127. Erdmann S, Sachs B, Kwiecien R, i wsp. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy.* 2004; 59: 1102–1109.
128. Ocmant A, Peignois Y, Mulier S, i wsp. 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.
129. Gane P, Pecquet C, Lambin P, i wsp. Flow cytometric evaluation of human basophils. *Cytometry.* 1993; 14: 344–348.
130. Verweij M, Sabato V, Nullens S, i wsp. STAT5 in human basophils: IL-3 is required for its FcεRI-mediated phosphorylation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012; 82: 101–106.

131. Mukai K, Gaudenzio N, Gupta S, i wsp. Assessing basophil activation by flow cytometry and mass cytometry in blood stored 24 hours before analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 139: 889–899.
132. Mukai K, Chinthrajah S, Nadeau K, i wsp. A new fluorescent-avidin-based method for quantifying basophil activation in whole blood. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 140: 1202–1206.
133. Kupcho K, Shultz J, Hurst R, i wsp. A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. *Apoptosis.* 2019; 24: 184–197.
134. Skotny A, Gomułka K, Wolańczyk-Mędrala A, i wsp. Annexin V binding assay as a basophil activation test in an allergy to *Secale cereale*. *Postepy Dermatol Alergol.* 2021; 38: 1115–1117.
135. Królewicz E, Gomułka K, Wolańczyk-Mędrala A, i wsp. The diagnostic usefulness of the basophil activation test (BAT) with annexin V in an allergy to *Alternaria alternata*. *Adv Clin Exp Med.* 2018; 27: 1737–1744.
136. Jorgensen-Tye B, Levesque J-P, Royle L, i wsp. Epitope recognition of antibodies that define the sialomucin, endolyn (CD164), a negative regulator of haematopoiesis. *Tissue Antigens.* 2005; 65: 220–239.
137. Zannettino A, Bühring H, Niutta S, i wsp. The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. *Blood.* 1998; 92: 2613–2628.
138. Huang A, Chen M, Huang S, i wsp. CD164 regulates the tumorigenesis of ovarian surface epithelial cells through the SDF-1 alpha/CXCR4 axis. *Mol Cancer.* 2013; 12: 115.
139. Benoit B, Jariwala N, O'Connor G, i wsp. CD164 identifies CD4+ T cells highly expressing genes associated with malignancy in Sézary syndrome: the Sézary signature genes, FCRL3, Tox and miR-214. *Arch Dermatol Res.* 2017; 309: 11–19.
140. Zhang X, Zhang T, Li C, i wsp. CD164 promotes tumor progression and predicts the poor prognosis of bladder cancer. *Cancer Med.* 2018; 7: 3763–3772.
141. Havens A, Jung Y, Sun Y, i wsp. The role of sialomucin CD164 (MGC-24v or endolyn) in prostate cancer metastasis. *BMC Cancer.* 2006; 6: 195.

142. Thyagarajan A, Jones S, Calatroni A, i wsp. Evidence of pathway-specific basophil anergy induced by peanut oral immunotherapy in peanut-allergic children. *Clin Exp Allergy*. 2012; 42: 1197–1205.
143. Depince-Berger A, Sidi-Yahya K, Jeraiby M, i wsp. Basophil Activation Test: Implementation and Standardization Between Systems and Between Instruments. *Cytometry A*. 2017; 91: 261–269.
144. Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R, i wsp. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy*. 2008; 6: 1.
145. Carter J, Pan J, Rai S, i wsp. ROC-ing along: Evaluation and interpretation of receiver operating characteristic curves. *Surgery*. 2016; 159: 1638–1645.
146. Hanley J, McNeil B. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982; 143: 29–36.
147. González-Muñoz M, Villota J, Moneo I.: Analysis of basophil activation by flow cytometry in pediatric house dust mite allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008; 4: 342–347.
148. Li Y, Liu C, Li H, i wsp. Exploring the role of basophil activation test in diagnosis of *Dermatophagoides farinae* sensitization and evaluation of therapeutic efficacy of subcutaneous immunotherapy in children. *Scand J Immunol*. 2022; 96: e13168.
149. Śpiewak R, Gregorius A, Czarnobilska E. Optimization of the basophil activation test in the diagnosis and qualification for treatment by means of allergen-specific immunotherapy in children with respiratory allergy to house dust mites. *Clinical and Translational Allergy*. 2015; 5: P10.
150. Czarnobilska E, Gregorius A, Porebski G, i wsp. The benefits of using basophil activation test as a diagnostic tool prior to specific immunotherapy with inhalant allergens. *Przegl Lek*. 2012; 69: 1249–1253.
151. Macaskill P, Walter S, Irwig L, i wsp. Assessing the gain in diagnostic performance when combining two diagnostic tests. *Stat Med*. 2002; 21: 2527–2546.
152. de Vos. Skin Testing Versus Serum-Specific IgE Testing: Which Is Better for Diagnosing Aeroallergen Sensitization and Predicting Clinical Allergy? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014; 14: 430.

153. Cardona V, Ansotegui I, Ebisawa M, i wsp. World allergy organization anaphylaxis guidance 2020. World Allergy Organ J. 2020; 13: 100472.