

Raccomandazioni per l'utilizzo del test di attivazione dei basofili nella diagnosi delle malattie allergiche

Recommendations for the use of the basophil activation test in the diagnosis of allergic diseases

Ignazio Brusca¹ · Nicola Bizzaro² · Giampaola Pesce³ · Laura Caponi⁴ · Beatrice Caruso⁵ · Danilo Villalta⁶

Ricevuto: 21 settembre 2015 / Accettato: 5 novembre 2015 / Pubblicato online: 12 novembre 2015
© Springer-Verlag Italia 2015

Riassunto Il test di attivazione dei basofili (BAT) è un esame di laboratorio che si propone, tramite la valutazione citofluorimetrica di marcatori di attivazione dei basofili, di simulare *in vitro* un test di scatenamento allergenico *in vivo*. Il Gruppo di Studio in Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) propone alcune raccomandazioni sull'utilizzo di questa metodica nella diagnosi delle malattie allergiche. Lo scopo è fornire indicazioni sulle patologie di natura allergica in cui il test può essere utilizzato in maniera appropriata, al fine di ampliare le possibilità diagnostiche non invasive in quest'ambito della medicina. Il BAT deve essere comunque considerato un ausilio diagnostico di terzo livello, che richiede esperienza e competenza professionale e per questo motivo non è consigliabile un uso indiscriminato e largamente diffuso a tutti i Laboratori che si occupano di diagnostica allergologica, ma solamente in quei Centri che possiedono le indispensabili competenze specialistiche di allergologia e

immunologia di base. Il maggiore impegno economico rispetto ai test tradizionali è compensato dalla possibilità di evitare un notevole numero di *challenge* allergologici *in vivo* sicuramente più costosi e gravati da un certo grado di rischio per il paziente allergico.

Parole chiave Biomarker · Test di attivazione dei basofili (BAT) · Allergia alimentare · Allergia a farmaci

Summary The basophil activation test (BAT) is a laboratory test that aims to simulate *in vitro* an allergen-triggering test *in vivo*, through the flow cytometry evaluation of basophil activation markers. The Study Group on Allergology of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL) developed recommendations on the use of this method in the diagnosis of allergic diseases. The purpose is to provide directions on the most appropriate use of the test, in order to broaden the spectrum of non-invasive diagnostics in this area of medicine. However, as the BAT requires experience and professional competence, it should be considered as a third-level diagnostic aid. For this reason, its indiscriminate and widespread use in all Laboratories is not advisable, but should be limited to those centers that own the indispensable expertise on allergy and basic immunology laboratory tests. The greater economical commitment compared to traditional tests is compensated by the possibility of avoiding a remarkable number of allergy challenge tests *in vivo*, which are definitely more expensive and encumbered by a certain degree of risk for the patient.

Keywords Biomarkers · Basophil activation test (BAT) · Food allergy · Drug allergy

Per il Gruppo di Studio in Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio.

✉ I. Brusca
ignbr@libero.it

¹ UOC di Patologia Clinica, Ospedale Buccheri La Ferla Fatebenefratelli, Via Messina Marine 197, 90123 Palermo, Italia

² UO di Patologia Clinica, Ospedali di Tolmezzo e Gemona del Friuli, Tolmezzo, UD, Italia

³ DiMI, Università degli Studi di Genova/IRCCS-AOU San Martino IST, Genova, Italia

⁴ Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa, Italia

⁵ Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera, Verona, Italia

⁶ UO di Allergologia e Immunologia Clinica, Ospedale Santa Maria degli Angeli, Pordenone, Italia

Note storiche

Il test di attivazione dei basofili nasce nella seconda metà degli anni '90 e, nella sua formulazione originale, era basato sul rilevamento di una modifica del fenotipo di membrana dei basofili attivati dopo incubazione *in vitro* con l'allergene [1, 2]. Il marcatore di membrana utilizzato era il CD63, una molecola presente in differenti cellule (basofili, monociti, mastociti, piastrine), contenuta in granuli intracitoplasmatici, la quale, dopo la degranolazione, viene massimamente espressa sulla membrana cellulare. Il *challenge in vitro* tra le cellule e l'allergene determina l'espressione del CD63 sulla membrana cellulare, testimoniando l'avvenuta degranolazione dei basofili e quindi la sensibilizzazione del paziente verso l'allergene testato [2–4]. Il test, inizialmente proposto per identificare le sensibilizzazioni IgE mediate, si è dimostrato in grado di rilevare anche reazioni in cui le IgE non erano evidenziabili e, a differenza delle altre metodiche diagnostiche (IgE specifiche, *skin prick test*), si caratterizzava per la specificità molto elevata [5, 6]. Il test, inoltre, era in grado di diagnosticare le manifestazioni allergiche non IgE mediate, con un'accuratezza diagnostica inferiore rispetto a quelle indotte dalle IgE, ma rimanendo comunque l'unico presidio *in vitro* disponibile per questo tipo di reazioni allergiche [5–7]. Una delle problematiche che si è evidenziata è stata la necessità di un *priming* immunologico delle cellule, al fine di incrementare la sensibilità del test. Tra le diverse molecole utilizzate è stata scelta e inserita nei primi kit commerciali l'interleuchina-3 (IL-3). La concentrazione di IL-3 è un fattore critico, in quanto all'aumentare della concentrazione corrisponde un incremento di sensibilità, ma anche un incremento della degranolazione aspecifica e quindi una diminuzione della specificità [6, 8–12]. Successivamente, tra i marcatori di attivazione è stato proposto il CD203c (*neural cell surface differentiation antigen E-NPP3*) che mostra risultati correlabili a quelli ottenuti con il CD63 con alcuni aspetti che in parte possono essere considerati vantaggiosi: (1) è espresso esclusivamente sui basofili e sui mastociti; (2) diversamente dal CD63, non compare *ex-novo* nella membrana cellulare, ma dopo attivazione viene over-espresso; (3) non necessita di *priming* immunologico. Nel complesso l'uso del CD203c facilita l'identificazione della popolazione dei basofili nella lettura dei preparati al citofluorimetro e non richiedendo IL-3 risulta meno influenzato del CD63 da fattori ambientali. Di contro, non essendo un marcatore comparso *ex-novo* sulla superficie cellulare, richiede maggiore esperienza nella scelta della soglia identificativa dei basofili attivati [4, 12–16].

Utilità del BAT nella diagnostica allergologica

Da tempo gli algoritmi nella diagnostica allergologica prevedono un primo approccio *in vivo* tramite lo *skin prick test*

(SPT) con estratti allergenici e, qualora necessario, il dosaggio *in vitro* delle IgE specifiche. Questo approccio classico negli ultimi anni è stato notevolmente modificato alla luce dell'introduzione della diagnostica allergologica molecolare (CRD), cioè al dosaggio delle IgE rivolte verso le singole molecole allergeniche contenute nella fonte allergenica. Vi sono ambiti dell'allergologia, però, in cui né la diagnostica classica né la CRD sono sufficienti a pervenire a una diagnosi corretta. Questo può avvenire per la non disponibilità di specifici estratti o per la scarsa standardizzazione degli stessi, come pure per il limitato numero di molecole allergeniche oggi disponibili per la CRD.

Prendendo in esame le principali cause di allergia è possibile valutare in quali casi l'esecuzione del BAT può essere vantaggiosa:

- nell'allergia agli inalanti, SPT, dosaggio di IgE specifiche per estratti allergenici e CRD permettono di identificare sia la fonte allergenica sensibilizzante primaria, causa della sintomatologia, sia le molecole responsabili delle cross-reattività e ciò permette un'adeguata selezione dei pazienti da sottoporre a immunoterapia specifica (ITS). Inoltre, vi è disponibilità di marcatori sia biochimici (proteina cationica degli eosinofili, ossido nitrico) sia clinici in grado di valutare adeguatamente la risposta alla terapia. Tranne casi particolari, quindi, il BAT non rappresenta uno strumento in grado di offrire un valore diagnostico aggiuntivo nella diagnosi delle allergie da inalanti;
- nell'allergia al latte, SPT e dosaggio delle IgE specifiche hanno un buon valore predittivo. Va ricordato, però, che lo SPT può fornire risultati falsi positivi e che la diagnostica *in vitro* classica non supera la sensibilità dell'85%. La CRD non presenta al momento un pannello completo delle molecole responsabili di reazioni. Non sono disponibili, per esempio, Hev b2 (β -1,3-glucanasi), Hev b12 (*Lipid Transfer Protein*) e Hev b13 (*early nodule-specific protein*). Test *in vivo* che ampliano le possibilità diagnostiche nei confronti del latte sono la prova d'uso e il *prick by prick*. Questi ultimi approcci, d'altra parte, non sono in grado di distinguere tra reazioni indotte dal latte o da un altro componente dei manufatti e non sono privi di rischi. L'utilizzo del BAT, quindi, può potenzialmente essere utile;
- nell'allergia al veleno di imenotteri sono frequenti le reazioni crociate tra gli insetti. La CRD non ci offre un adeguato pannello di molecole e la sua utilità è ancora limitata. La Rast-inibizione, utilizzata per meglio identificare l'insetto responsabile della reazione ai fini dell'ITS, è di non semplice interpretazione e abbastanza costosa. Non sono disponibili marcatori in grado di predire con certezza l'avvenuta desensibilizzazione indotta dall'ITS. Infatti, il ruolo delle IgG4 specifiche, come marcatori di avvenuta protezione nei confronti dell'insetto indotta dalla ITS,

è abbastanza controverso. Per la sua caratteristica di simulare *in vitro* un *challenge* e verificare anche quantitativamente la reattività dei basofili nei confronti dell'allergene, il BAT può essere utilizzato sia in sede di diagnosi sia in corso di ITS;

- nelle allergie alimentari, SPT e dosaggio delle IgE specifiche, in particolare usando la CRD, sono in grado di fornire moltissime informazioni in sede diagnostica. Il limite di questi test è che è possibile ritrovare positività sia ai test *in vivo* che a quelli *in vitro* in assenza di sintomatologia clinica. Per questo motivo il *gold standard*, non privo di rischi, per la diagnosi dell'allergia alimentare è stato e rimane il *challenge* con l'alimento, nelle sue varie forme di esecuzione. L'utilizzo dell'ITS nelle allergie alimentari non trova, attualmente indicazione. In ambito pediatrico esistono e vengono attuati in alcuni centri dei protocolli di desensibilizzazione. Inoltre, in particolare per il latte, un certo numero di pazienti pediatrici può sviluppare nel tempo una tolleranza. Anche in questo caso lo sviluppo di una tolleranza per l'alimento può essere valutato solo con il *challenge*. Il BAT nelle allergie alimentari quindi può essere di notevole aiuto sia nell'individuare i pazienti effettivamente allergici ad un alimento, sia per individuare i pazienti in cui si è instaurata tolleranza;
- nelle allergie a farmaci, SPT e diagnostica *in vitro* sono di limitata utilità. Lo SPT è infatti poco sensibile e il dosaggio di IgE specifiche è disponibile solo per pochi farmaci, anch'esso poco sensibile e spesso positivo per un lasso di tempo relativamente breve dopo la reazione. I farmaci possono inoltre determinare reazioni anche con meccanismi non IgE mediati. L'intradermoreazione con il farmaco è molto più sensibile dello SPT, ma così come il *challenge* non è priva di rischi per il paziente ed è abbastanza indagine. Il BAT può risultare utile tenendo comunque conto che la reazione può non essere indotta dalla molecola nativa, con cui si esegue normalmente il test, ma da un suo frammento, frutto del metabolismo, e che si comporta da aptene.

BAT: quando utilizzarlo (vantaggi e limiti)

Allergia al lattice

Il test si è dimostrato dotato di elevata accuratezza diagnostica. Negli studi effettuati con un congruo numero di pazienti la sensibilità del test è risultata compresa tra il 79,5% e il 100% e la specificità tra il 97% e il 100% [17–22]. Inoltre il test è risultato positivo nella maggior parte degli allergici al latex negativi sia allo *skin prick test* sia alle IgE specifiche, così come è risultato negativo in un'elevata percentuale di pazienti con IgE specifiche presenti ma clinicamente asintomatici [17].

Raccomandazione Nella diagnosi dell'allergia al latex, il BAT in associazione alla CRD può essere utile sia per identificare i soggetti allergici al latex negativi ai test classici, sia per distinguere tra soggetti sensibilizzati e allergici.

Allergia al veleno di imenotteri

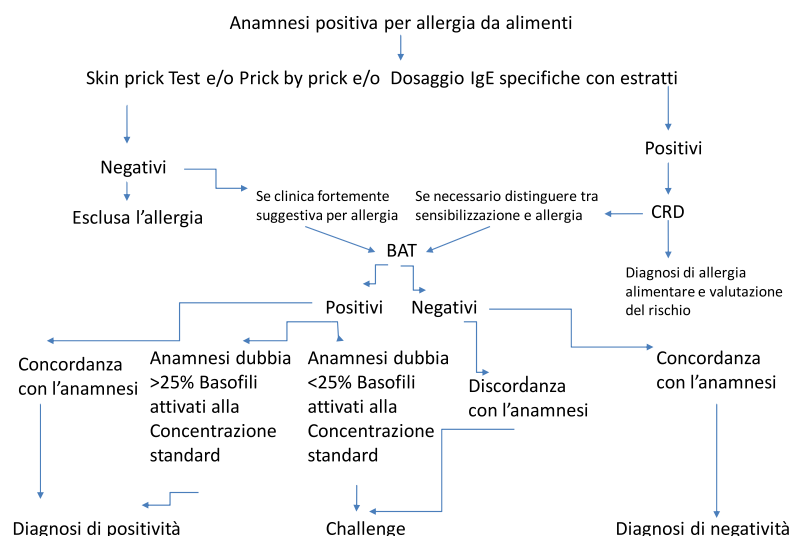
Per quanto riguarda l'allergia al veleno di imenotteri (*hymenoptera venom allergy*, HVA) il test presenta valori di sensibilità tra il 70% e il 100% e valori di specificità tra l'85% e il 100% [7]. Uno dei problemi evidenziati dagli studi effettuati è che la sensibilizzazione verso i carboidrati cross reattivi (CCD), di scarsa rilevanza clinica, viene rilevata dal BAT, inficiando così il valore clinico del risultato [23, 24]. Nonostante questo il BAT, dai pochi dati a oggi pubblicati, nei casi di doppia positività a insetti, sembra correlare bene con i risultati ottenuti con la CRD, rispetto alla quale dimostra una maggiore sensibilità [25, 26]. Da un punto di vista diagnostico il BAT si è dimostrato di notevole aiuto nel chiarire l'effettiva sensibilità del paziente [27, 28]. Inoltre, effettuando delle curve dose-risposta sui veleni identificati positivi con le metodiche classiche e la CRD, è possibile paragonare le concentrazioni di veleno in grado di determinare l'attivazione, al 50% o massimale, dei basofili. Questo dato è clinicamente rilevante ed è utilizzabile per identificare l'insetto pungitore. Un altro campo in cui il BAT può essere utilizzato nella HVA è il monitoraggio del paziente in immunoterapia. Nel caso del veleno di imenotteri è ben documentata una caduta dei livelli di reattività del paziente, indice di un'avvenuta tolleranza verso il veleno responsabile dell'allergia [29–33].

Raccomandazione L'utilizzo del BAT nell'allergia al veleno di imenotteri è da riservare ai casi con dubbi diagnostici sull'insetto pungitore, nel contesto dei risultati degli altri approcci diagnostici utilizzati. Molto promettente è il possibile impiego nel monitoraggio del paziente per valutare l'efficacia dell'immunoterapia.

Allergie alimentari

Nei riguardi delle allergie alimentari la sensibilità e la specificità variano, rispettivamente, tra il 65% e il 100% e tra il 62,5 e il 100% [7]. In quest'ambito della patologia il BAT si pone come il test *in vitro* più fedele alle manifestazioni cliniche [34]. È stato dimostrato come il BAT possa aiutare a distinguere con buona specificità tra pazienti allergici e pazienti solamente sensibilizzati (positività ai prick test e alle IgE specifiche) senza manifestazioni cliniche [35–38]. In pazienti allergici all'arachide, per esempio, il BAT eseguito sia con il CD63 sia con il CD203, evidenzia valori di *likelihood ratio* positivi e negativi che variano ripetitivamente tra 23,8–24,4 e 0,02–0,05, mentre le curve ROC mostrano

Fig. 1 Utilizzo suggerito del BAT nell'algoritmo diagnostico dell'allergia alimentare



un'area sotto la curva di 0,96–0,97 [38]. In pazienti allergici al latte, il valore predittivo negativo sul *challenge* in doppio cieco con placebo è risultato pari al 96% [39].

Il possibile posizionamento del BAT nell'algoritmo diagnostico dell'allergia alimentare è riportato nella Figura 1.

Raccomandazione Per la diagnosi e il follow-up dei pazienti con allergia alimentare, il BAT può notevolmente limitare il ricorso al *challenge* in doppio cieco con placebo.

Allergia a farmaci

La maggior parte degli studi pubblicati in letteratura sul BAT sono stati effettuati proprio sull'allergia a farmaci a conferma di quanto sia utile e necessario poter disporre di test *in vitro* dedicati a quest'ambito della diagnostica. Il BAT potenzialmente si pone come test di riferimento per il fatto che è in grado di evidenziare, oltre che le reazioni IgE mediate, anche quelle non IgE mediate. Un aspetto importante da tenere in considerazione è che la maggior parte dei dati esistenti nella letteratura scientifica è stata ottenuta utilizzando la metodica inizialmente descritta da Sainte Laudy [1, 2], ma numerosi studi hanno utilizzato metodiche *home-made* o variazioni significative rispetto al protocollo iniziale e questo è alla base delle differenze nei risultati ottenuti. I metodi attualmente in commercio presentano sostanziali modifiche rispetto al protocollo iniziale, tali da poter portare a una differente accuratezza diagnostica, come è già stato evidenziato in altri ambiti [40]. Il BAT è stato studiato su numerose classi di farmaci. Per quanto riguarda gli antinfiammatori non steroidei (FANS), la sensibilità riscontrata varia dal 30% al 76%, mentre la specificità varia tra l'80% e il 98,6% [7, 41–44]. La sensibilità del test risulta aumentata quando viene saggiato un pannello di farmaci, piuttosto che un singolo FANS [42–44]. Le false positività sembrano essere dose-dipendenti e legate alla modalità di esecuzione del test,

in particolar modo alla preparazione delle cellule: leucociti isolati versus *buffy-coat* o sangue intero [44, 45]. Per quanto riguarda gli antibiotici beta-lattamici, la sensibilità riscontrata varia tra il 9% e il 63% e la specificità tra l'83% e il 100% [7, 43, 46, 47]. Anche per i beta-lattamici, il test eseguito su un pannello di farmaci garantisce una maggiore sensibilità rispetto al test eseguito su singolo farmaco [43, 47]. Lo *European Network for Drug Allergy* (ENDA) raccomanda di testare almeno un pannello di quattro antibiotici, tra cui ovviamente il farmaco responsabile della reazione [47]. Sempre l'ENDA evidenzia che l'utilizzo delle IgE specifiche verso il pannello di antibiotici beta-lattamici disponibili non porta ad alcun miglioramento dell'accuratezza diagnostica. Per quanto riguarda i farmaci miorilassanti, la sensibilità riportata varia dal 36% al 91% e la specificità dall'87% al 100% [7, 48, 49]. Sono stati pubblicati studi su altri farmaci, con risultati simili a quanto ottenuto nelle classi di farmaci sopradescritte, ma i dati non sono sufficienti per avere informazioni abbastanza complete sull'accuratezza del BAT in questi casi.

Le Figure 2 e 3 riportano due possibili posizionamenti del BAT nell'algoritmo della diagnostica dell'allergia a farmaci, legati sia all'organizzazione degli ambulatori allergologici sia a quella dei Laboratori diagnostici.

Raccomandazione Relativamente a FANS, antibiotici beta-lattamici e miorilassanti, il BAT ha una sensibilità non elevata, ma una buona specificità. È verosimile che questo dato possa essere esteso agli altri farmaci. Il test può essere utilizzato per confermare una diagnosi fortemente sospettata all'anamnesi o per diminuire le probabilità pre-test di reazione avversa prima di un *challenge in vivo*. Viceversa, non può essere utilizzato per escludere una sensibilizzazione ai farmaci. Nel caso dei FANS e dei beta-lattamici è preferibile utilizzare un pannello di farmaci della stessa classe e non un

Fig. 2 Utilizzo suggerito del BAT nell'algoritmo diagnostico dell'allergia a farmaci in Centri allergologici con maggiore competenza per i test *in vitro*

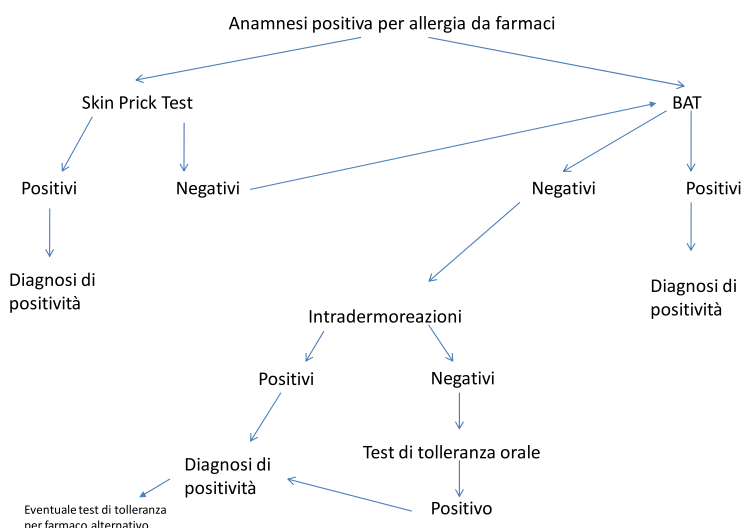
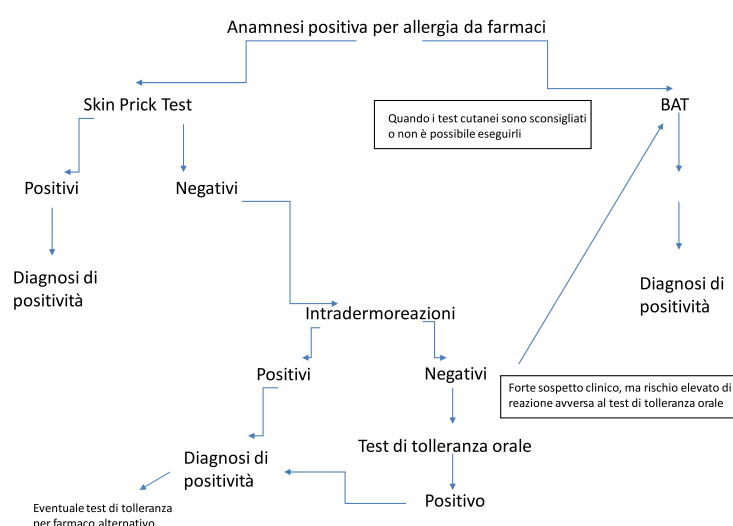


Fig. 3 Utilizzo suggerito del BAT nell'algoritmo diagnostico dell'allergia a farmaci in Centri allergologici con competenza per i test *in vivo*



singolo test con il farmaco sospettato della reazione. È consigliabile eseguire il BAT utilizzando almeno due diluizioni del farmaco, soprattutto per quello sospettato della reazione.

Conflitti di interesse Nessuno.

Studi condotti su esseri umani e animali Per questo tipo di studio non è richiesto l'inserimento di alcuna dichiarazione relativa agli studi effettuati su esseri umani e animali.

Appendice

Hanno collaborato alla realizzazione di questo documento, partecipando alla revisione del lavoro, i seguenti componenti del Gruppo di Studio di Allergologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio:

- Pierfrancesco Agostini, Patologia Clinica e Laboratorio Analisi, Ospedale don Tonino Bello, Molfetta (BA), Italia

- Antonio Antico, Laboratorio Analisi, ULSS 4, Santorso (VI), Italia
- Marcello Bagnasco, DIMI, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia
- Chiara Bonaguri, Laboratorio Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Parma, Italia
- Gaia Deleonardi, Laboratorio Analisi, Ospedale Maggiore, Bologna, Italia
- Bruno Milanesi, Patologia Clinica, Desenzano del Garda (BS), Italia
- Fabrizia Musso Maura, Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera, Santa Croce, Cuneo, Italia
- Stefan Platzgummer, Laboratorio centrale, Ospedale Civile di Merano (BZ), Italia
- Vittorio Sargentini, Laboratorio Analisi, PTP Nuovo Regina Margherita, Roma, Italia
- Elio Tonutti, Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Udine, Italia

Bibliografia

1. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin JC (1996) Diagnosis of latex allergy: comparison of histamine release and flow cytometric analysis of basophil activation. *Inflamm Res* 45:S35–S36
2. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Vallon C et al (1998) Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry: comparison with histamine release. *Inflamm Res* 47:401–408
3. Füreder W, Agis H, Sperr WR et al (1994) The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils. *Allergy* 49:861–865
4. Monneret G, Gutowski MC, Bienvenu J (1999) Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method. *Clin Exp Immunol* 115:393–396
5. Crockard AD, Ennis M (2001) Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow? *Clin Exp Allergy* 31:975–977
6. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH et al (2004) In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 34:332–339
7. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM et al (2008) Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol* 146:177–189
8. Kurimoto Y, De Weck AL, Dahinden CA (1991) The effect of interleukin3 upon IgE-dependent and IgE-independent basophil degranulation and leukotriene generation. *Eur J Immunol* 21:361–368
9. Sugiyama H, Eda R, Hopp RJ et al (1993) Importance of interleukin-3 on histamine release from human basophils. *Ann Allergy* 71:391–395
10. Miadonna A, Salmaso C, Cottini M et al (1996) Enhancement of basophil histamine release by interleukin-3: reduced effect in atopic subjects. *Allergy* 51:525–531
11. Lie WJ, Mul FP, Roos D et al (1998) Degranulation of human basophils by picomolar concentrations of IL-3, IL-5, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Allergy Clin Immunol* 101:683–690
12. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM et al (2008) Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *J Investig Allergol Clin Immunol* 18:143–155
13. Bühring HJ, Simmons PJ, Pudney M et al (1999) The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 94:2343–2356
14. Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M et al (2002) Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol* 110:102–109
15. Demoly P, Lebel B, Arnoux B (2003) Allergen-induced mediator release tests. *Allergy* 58:553–558
16. Lambert C, Guilloux L, Dzviga C et al (2003) Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to Hymenoptera venom. *Cytometry B Clin Cytom* 52:13–19
17. Ebo DG, Lechkar B, Schuerwegh AJ et al (2002) Validation of a two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy. *Allergy* 57:706–712
18. Sanz ML, Gamboa PM, García-Avilés C et al (2003) Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 130:33–39
19. Hemery ML, Arnoux B, Dhivert-Donnadieu H et al (2005) Confirmation of the diagnosis of natural rubber latex allergy by the Basotest method. *Int Arch Allergy Immunol* 136:53–57
20. Sanz ML, García-Avilés MC, Tabar AI et al (2006) Basophil Activation Test and specific IgE measurements using a panel of recombinant natural rubber latex allergens to determine the latex allergen sensitization profile in children. *Pediatr Allergy Immunol* 17:148–156
21. Nettis E, Colanardi MC, Dambra PP et al (2006) Flow cytometric basophil activation test: detection of CD63 expression as a useful aid to diagnosis of latex allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 97:715–716
22. Rodríguez Trabado A, Fernández Pereira LM, Romero-Chala S et al (2013) Evaluation of latex subclinical sensitization by way of the basophil activation test and specific IgE to latex recombinant allergens. *Allergol Int* 62:385–387
23. Mertens M, Amler S, Moerschbacher BM et al (2010) Cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the results of the basophil activation test in hymenoptera-venom allergy. *Clin Exp Allergy* 40:1333–1345
24. Altmann F (2010) Basophil activation test is better but not good enough for the diagnosis of hymenoptera venom allergy: the problem of cross-reactive carbohydrate determinants. *Clin Exp Allergy* 40:1290–1292
25. Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B et al (2011) Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One* 6:e20842
26. Neis MM, Merk HF (2012) Value of component based diagnostics in IgE-mediated hymenoptera sting reactions. *Cutan Ocul Toxicol* 31:117–123
27. Eberlein B, Krischan L, Darsow U et al (2012) Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol* 130:155–161
28. Korošec P, Silar M, Eržen R et al (2013) 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* 161:363–368
29. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM et al (2008) The basophil activation test in the diagnosis and follow-up of hymenoptera venom allergy: an alternative point of view. *J Investig Allergol Clin Immunol* 18:493–494
30. Žitnik SE, Vesel T, Avčin T et al (2012) Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. *Pediatr Allergy Immunol* 23:166–172
31. Eržen R, Košnik M, Silar M et al (2012) Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy* 67:822–830
32. Uyttebroek AP, Sabato V, Faber MA et al (2014) Basophil activation tests: time for a reconsideration. *Expert Rev Clin Immunol* 10:1325–1335
33. Tankersley MS, Ledford DK (2015) Stinging insect allergy: state of the art 2015. *J Allergy Clin Immunol Pract* 3:315–322
34. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH et al (2005) Flow cytometric analysis of in vitro activated basophils, specific IgE and skin tests in the diagnosis of pollen-associated food allergy. *Cytometry B Clin Cytom* 64:28–33
35. Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y et al (2009) Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol Int* 58:193–199
36. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L et al (2009) Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy* 39:1234–1245
37. Wanich N, Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA et al (2009) Allergen-specific basophil suppression associated with clinical tolerance in patients with milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 123:789–794

38. Santos AF, Douiri A, Bécares N et al (2014) Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol* 134:645–652
39. Rubio A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T et al (2011) Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy* 66:92–100
40. Carroccio A, Brusca I, Mansueto P et al (2013) A comparison between two different in vitro basophil activation tests for gluten- and cow's milk protein sensitivity in irritable bowel syndrome (IBS)-like patients. *Clin Chem Lab Med* 51:1257–1263
41. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR et al (2003) Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy* 58:312–317
42. Gamboa P, Sanz ML, Caballero MR et al (2004) The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 34:1448–1457
43. Brusca I, Corrao S, Sceusa G et al (2007) Il test di attivazione dei basofili in citofluorimetria nella diagnosi delle reazioni allergiche e pseudo allergiche ad antibiotici betalattamici e FANS. *RIMeL/IJLaM* 3:196–202
44. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM et al (2009) Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome. A multicenter study. I. Clinical findings and in vitro diagnosis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19:355–369
45. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM et al (2010) Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome: a multicenter study. II. Basophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its impact on pathogenesis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20:39–57
46. Sanz ML, Gamboa PM, Antépara I et al (2002) Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 32:277–286
47. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM et al (2009) Diagnosis of immediate-type beta-lactam allergy in vitro by flow-cytometric basophil activation test and sulfidoleukotriene production: a multicenter study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19:91–109
48. Moneret-Vautrin DA, Mertes PM (2010) Anaphylaxis to general anesthetics. *Chem Immunol Allergy* 95:180–189
49. Xin X, Zou Y, Xing L et al (2014) Investigation of drugs responsible for perioperative anaphylactic reactions using cellular allergen stimulation test. *Chin Med J (Engl)* 127:3738–3743