

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v66n3.61820>

# Prueba de activación de basófilos: aspectos técnicos, metodológicos y su utilidad clínica

*Basophil activation test: technical aspects, methodology and clinical utility*

Recibido: 03/01/2017. Aceptado: 08/05/2017.

Pablo Sabogal-Cuadro<sup>1</sup> • Josefina Zakzuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Cartagena - Instituto de Investigaciones Inmunológicas - Cartagena - Colombia.

Correspondencia: Josefina Zakzuk, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena. Campus de Zaragocilla, edificio Biblioteca, piso 1. Teléfono: +57 5 6698491. Cartagena. Colombia. Correo electrónico: jzakzuku@unicartagena.edu.co.

## | Resumen |

**Introducción.** La prueba de activación de basófilos (PAB) se considera una técnica confiable y segura para el diagnóstico de problemas alérgicos.

**Objetivo.** Profundizar en el estado del arte de la PAB y su utilidad clínica.

**Materiales y métodos.** Se realizó una revisión narrativa de la literatura mediante la búsqueda electrónica en las bases de datos y metabuscadores Ovid Medline, Google Scholar y PubMed, sin limitar la búsqueda por fecha, idioma o tipo de artículo. Se buscaron artículos sobre los detalles técnicos de la PAB y su utilidad clínica en el manejo de las enfermedades alérgicas.

**Resultados.** De los marcadores de activación, CD63 ha sido el más estudiado y es el que mejor representa un evento de degranulación anafiláctica, mientras que CD203c es representativo de varias formas de degranulación. La superioridad de uno sobre otro como prueba diagnóstica depende del problema alérgico estudiado. En cuanto a los métodos de detección de basófilos, su selección con un único marcador, CCR3, se propone como una opción con buena relación de costo-efectividad.

**Conclusiones.** La PAB es una herramienta prometedora para evaluar en clínica las reacciones alérgicas de forma segura. Es necesario una mayor estandarización de protocolos para obtener resultados más reproducibles.

**Palabras clave:** Basófilos; Hipersensibilidad; Inmunoglobulina E; Citometría de Flujo (DeCS).

**Sabogal-Cuadro P, Zakzuk J.** Prueba de activación de basófilos: aspectos técnicos, metodológicos y su utilidad clínica] Rev. Fac. Med. 2018;66(3):447-57. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v66n3.61820>.

## Introducción

La generación de respuesta inmune de tipo inflamatorio beneficia al hospedero cuando se presenta de forma oportuna (contra un patógeno, por ejemplo) y con una intensidad suficiente para eliminar la amenaza sin ocasionar daños colaterales mayores a los que se derivan del agente nocivo. Sin embargo, en ciertas ocasiones esta

## | Abstract |

**Introduction:** Basophil activation test (BAT) is considered a reliable and safe technique for diagnosing allergic diseases.

**Objective:** To make a thorough analysis of the state of the art regarding BAT and its clinical utility.

**Materials and methods:** A narrative literature review of BAT and its clinical utility in the management of allergic diseases was performed in the Ovid Medline, Google Scholar and PubMed databases and metasearch engines, without limiting the search by date, language or type of article.

**Results:** Regarding basophil activation markers, CD63 is the most studied and the best representative of anaphylactic degranulation, while CD203c is representative of several types of degranulation. The superiority of one activation marker over the other as a diagnostic tool depends on the allergic disease under study. With respect to basophil detection methods, selection with a single marker, CCR3, is proposed as an option with a good cost-effectiveness ratio.

**Conclusions:** BAT is a promising tool to evaluate clinically allergic reactions in a safe manner. Better standardization of protocols is necessary to achieve reproducible results.

**Keywords:** Basophils; Hypersensitivity; Immunoglobulin E; Flow Cytometry (MeSH).

**Sabogal-Cuadro P, Zakzuk J.** [Basophil activation test: technical aspects, methodology and clinical utility]. Rev. Fac. Med. 2018;66(3):447-57. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v66n3.61820>.

respuesta inmunitaria ante un antígeno puede desarrollarse de manera inadecuada y excesiva, lo que genera manifestaciones clínicas de hipersensibilidad.

A medida que se conoce más sobre los mecanismos patogénicos de las reacciones clínicas exageradas a estímulos que son tolerados por la mayoría de las personas, se ha vuelto más complejo clasificar y definir estas condiciones. Teniendo en cuenta que una parte de

estas reacciones no se produce por mecanismos inmunológicos, los consensos de expertos han decidido denominar como alergia solo a las reacciones de hipersensibilidad mediada por mecanismos inmunológicos; dentro de estas se incluyen la clásicamente conocida como hipersensibilidad tipo I, mediada por IgE, pero también las mediadas por otros mecanismos inmunológicos descritos en la clasificación clásica de Phillip Gell y Robin Coombs, la cual, a pesar de sus limitaciones teórico-prácticas, continúa siendo utilizada como marco de referencia en clínica (1).

Las diversas descripciones de cómo el sistema inmune puede generar reacciones de hipersensibilidad también han tenido un impacto en las herramientas diagnósticas que se utilizan. En este sentido, el reconocer que hay reacciones alérgicas mediadas por otros isotipos diferentes a la IgE se acopla a la necesidad de detectar otros mecanismos de activación del sistema inmune que puedan aplicarse en clínica.

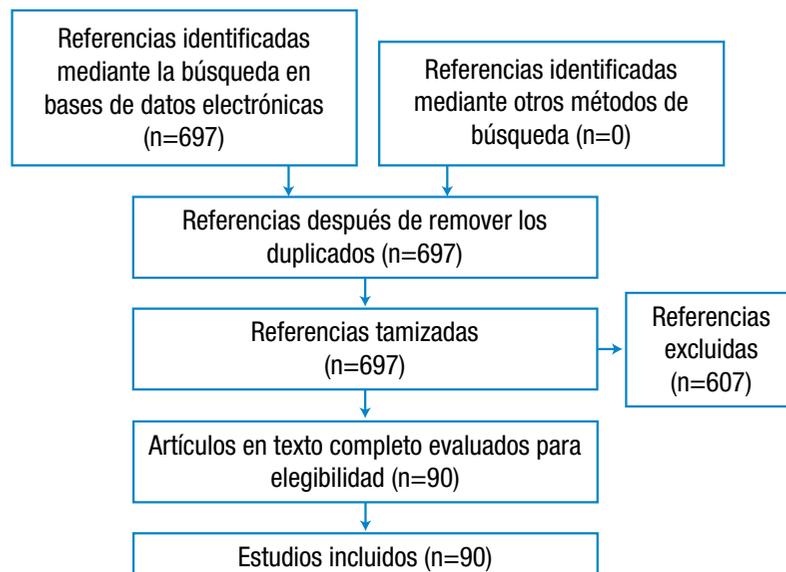
La prueba de activación de basófilos (PAB) aparece como una herramienta útil para un estudio más incluyente de distintos mecanismos inmunológicos relacionados con hipersensibilidad. Esta técnica se utiliza desde hace algunas décadas, pero la aplicación más reciente de citometría de flujo ha mejorado su sensibilidad y especificidad. En los últimos años sus usos clínicos se han extendido y, en esencia, tiene mayor campo en el estudio de alergias a medicamentos, como

escalón previo a la prueba de exposición. También es de utilidad en alergia alimentaria para monitorizar la eficacia de la inmunoterapia, en los procedimientos de desensibilización y en el estudio de procesos alérgicos en los que no se puede detectar por los métodos convencionales la existencia de IgE específica (2).

El objetivo de esta investigación fue revisar de manera detallada la forma de realización de la PAB, su utilidad clínica en el manejo de las enfermedades alérgicas, los avances metodológicos en su desarrollo y su posicionamiento como una prueba recomendada en el diagnóstico de algunos problemas alérgicos.

## Materiales y métodos

Se realizó una revisión narrativa de la literatura mediante la búsqueda electrónica en las bases de datos y metabuscadores Ovid Medline, Google Scholar y PubMed, sin limitar la búsqueda por fecha, idioma o tipo de artículo. La fecha final de búsqueda fue el 1 de octubre de 2016. Se buscaron artículos sobre los detalles técnicos de la prueba, los fundamentos teóricos y su utilidad clínica en el manejo de enfermedades alérgicas. Para la selección final de los artículos se tuvo en cuenta aquellos cuyo texto completo estuviera disponible para lectura o descarga. El flujograma de búsqueda se presenta en la Figura 1.



**Figura 1.** Flujograma PRISMA de la búsqueda y selección de artículos en la presente revisión. Fuente: Elaboración propia.

## Resultados

De la revisión de la literatura se identificaron 90 referencias, de las cuales 10 correspondieron a revisiones de tema y 80 a artículos originales de texto completo. Todos los artículos identificados fueron escritos en idioma inglés.

## Discusión

A continuación se abordan diferentes temas relacionados con la revisión de publicaciones sobre la PAB. En primer lugar, se realiza una breve reseña de los conceptos básicos sobre la biología, las formas de activación (anticuerpos, citoquinas y otros) y los mecanismos de secreción del basófilo. Luego, se discuten aspectos más específicos de la prueba, como las estrategias de identificación de esta población

celular y sus marcadores de activación, y aspectos metodológicos de importancia y su uso en el diagnóstico de alergias.

### Conceptos básicos sobre la biología y la activación del basófilo

Los basófilos son granulocitos circulantes muy poco frecuentes (<1% de los leucocitos en sangre) que responden a varios estímulos, entre estos a la IgE a través de receptores FcεRI que tras su activación liberan diferentes mediadores preformados y otros sintetizados *de novo* característicos de la reacción alérgica, tales como histamina, LTC4 y citoquinas Th2, como interleucina (IL) 4 e IL-13.

El papel del basófilo como célula efectora en varios trastornos alérgicos no se conoce lo suficiente, aunque se sabe que aumenta en número y hace parte del infiltrado inflamatorio del tejido afectado

(3). No obstante, la detección de su activación puede utilizarse como indicador de sensibilización ante un antígeno/alergeno y funciona como ayuda diagnóstica en diferentes enfermedades alérgicas (2,4).

### Formas de activación del basófilo

Los basófilos expresan en su superficie citoplasmática una variedad de receptores que le confieren la capacidad de responder a distintas señales que regulan sus funciones de desarrollo y efectoras. Por tanto, además de la degranulación, el basófilo puede activarse y efectuar otras formas diferentes de respuesta de acuerdo al estímulo inductor. Algunos de los más importantes mecanismos de activación en los basófilos comprenden:

#### Anticuerpos

*Inmunoglobulina E:* los basófilos expresan el receptor de IgE de alta afinidad y median reacciones de hipersensibilidad tipo I tras el entrecruzamiento de los complejos IgE-FcεRI por antígenos multivalentes, incluyendo alergenicos, lo que provoca activación/degranulación de la célula (5). Falta mucho por conocer sobre el papel directo del basófilo en la generación de reacciones de hipersensibilidad, aunque se sabe que participa en varios procesos que culminan en que otras células efectoras liberen su contenido proinflamatorio en cantidades suficientes para inducir fenómenos clínicamente visibles (6).

*Inmunoglobulina G:* en ratones se ha observado que los basófilos promueven una vía alternativa de anafilaxia. Tsujimura *et al.* (7) encontraron que tras la estimulación con complejos IgG1-alergeno, los basófilos liberan factor de activación plaquetaria, llevando así a anafilaxia sistémica a través del aumento de la permeabilidad vascular. La vía de señal de la IgG a través de su receptor FcγRIIA contribuye en reacciones alérgicas y anafilácticas en humanos, sin embargo se ha observado en células diferentes a los basófilos (8). De esta manera, aunque se ha encontrado cierta relación entre anafilaxia y vías mediadas por receptores IgG, no se conocen estudios que demuestren tal mecanismo en basófilos humanos.

#### Citoquinas

La IL-3 tiene un papel crucial en la biología del basófilo, pues participa no solo como factor de diferenciación (9), sino también como agente regulador de la función de estas células en las que aumenta la síntesis de histamina y su liberación ante una posterior estimulación por vía IgE (10), induce mayor expresión del marcador de activación CD63 ante estímulos como el alergeno específico (11,12) y aumenta de forma inespecífica la expresión de CD203c, otro marcador de activación, en basófilos en reposo (13).

La linfopoyetina estromal tímica (TSLP, por su sigla en inglés) puede promover selectivamente la hematopoyesis de basófilos a partir de precursores de la médula ósea e inducir respuestas en basófilos maduros periféricos en ambientes suficientes y deficientes en interleucina (IL) -3 (14). La IL-18 coestimula la producción de IL-4 e IL-13 por basófilos en respuesta tanto a IL-3 como a entrecruzamiento de los FcεRI (15), al igual que la IL-3 aumenta la síntesis de leucotrienos (16). La IL-33 ha mostrado capacidad de aumentar la liberación de mediadores inducida por IgE y sinergia con la IL-3 para producir citoquinas Th2 en basófilos de manera independiente de IgE (17).

### Otras formas de activación

El efecto de las enzimas ha sido estudiado, en especial las de tipo proteasas de cisteína, sobre la activación del basófilo (18). Asimismo, se ha descrito que la papaína induce la liberación de IL-4 e IL-6 en basófilos murinos y la migración de estos al ganglio linfático (19). Otro mecanismo de activación no específica descrito en los basófilos es la activación por superantígenos, como la glicoproteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana que puede unirse a la región VH3 de la IgE promoviendo la liberación de IL-4 e IL-13 (20). De igual forma, la proteína L (expresada en *Peptostreptococcus magnus*) induce la liberación de estas mismas citoquinas, pero por interacción con la cadena κ de la IgE (21).

### Mecanismos de secreción

Se ha observado que los basófilos activados pueden presentar dos patrones de secreción regulada del contenido de sus gránulos. Una es la degranulación anafiláctica (DA), en la que se producen cambios morfológicos rápidos y una secreción coordinada de mediadores desde sus gránulos de forma rápida y explosiva que se completa en minutos tras la estimulación; por lo general, esta es observada in vivo en respuestas de hipersensibilidad inmediata IgE-dependientes (22-24). La otra es la degranulación gradual (PMD, por su sigla en inglés) en la que la secreción es gradual o lenta (22,23,25). La PMD es el evento visto con más frecuencia en basófilos analizados que participan en varias condiciones y enfermedades in vivo, tales como rechazos de injertos de piel en humanos, lesiones ampollares penfigoides, leucemia de basófilos, linfoma, síndrome de Sézary, entre otras (22,23,26); esta forma de degranulación también se ha observado en los mastocitos, en situaciones clínicas como alergia por contacto, hipersensibilidad retardada, urticaria pigmentosa, ampollas penfigoides, melanoma, glomerulonefritis crónica, pielonefritis, adenoma renal, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, poliposis familiar del colon, fibrosis intersticial pulmonar, inflamación crónica de la mucosa del seno maxilar, tumores metastásicos primarios, estimulación mecánica o con frío de la piel, heridas de la piel en sanación y angiogenesis (22,23,26).

Aunque por sus características la DA y la PMD pueden ser vistas como fenómenos independientes, en realidad se han propuesto como extremos de un mismo modelo general de degranulación que depende de la tasa de formación de las vesículas; en este modelo, una tasa lo suficientemente baja permite que las vesículas transiten de manera individual transportando el contenido granular. Sin embargo, conforme la tasa aumenta, las vesículas ya no pueden mantener su individualidad y tienden a fusionarse formando canales que pueden interconectar gránulos adyacentes o gránulos con la membrana de la célula, creando así la anatomía característica de la degranulación anafiláctica (25).

### Prueba de activación de basófilos y marcadores de activación

La técnica actual de la PAB se basa en la cuantificación de los cambios en la expresión de marcadores de activación tras la estimulación con el alergeno específico y la consecuente degranulación del basófilo (2). Dentro de sus usos se encuentra la evaluación experimental de la alergenicidad y el diagnóstico de sensibilización con fines clínicos. A continuación se describen los marcadores de activación más estudiados y se reseñan algunos otros que han sido propuestos.

### CD63

También denominado LAMP-3 (glicoproteína-3 de membrana asociada a lisosoma), es un miembro de la superfamilia transmembrana 4 o tetraspaninas presente en diferentes tipos de células, como basófilos, mastocitos, macrófagos y plaquetas (11). Este es una proteína que en estado de reposo se encuentra anclada a la membrana del granulo, pero que cuando se presenta la degranulación anafiláctica, la fusión del granulo con la membrana plasmática causa su expresión en la superficie celular de un basófilo activado (27,28). Por ser el primero en describirse, ha sido el marcador de activación de basófilos más estudiado (29).

### CD203c

Identificado por Buhning *et al.* (30) como marcador adicional de activación de basófilos, es una proteína transmembrana de tipo II, miembro de la familia de fosfatasa/fosfodiesterasas de nucleótidos (31), cuya función en el basófilo es desconocida (28).

Su expresión varía de acuerdo con el estado atópico del individuo: las personas asmáticas con exacerbaciones presentan mayor expresión basal e inducida por anti-IgE que los pacientes con control de la enfermedad; incluso, su expresión es mayor durante la exacerbación que durante el periodo de mejoría clínica (32).

### Otros indicadores de la activación de basófilos

La activación del basófilo también se ha evaluado mediante el empleo de otros marcadores, p. ej., midiendo el grado de fosforilación de MAPK p38, un miembro de las cinasas activadas por mitógeno cuya fosforilación aumenta conjuntamente con la regulación al alza de CD63 (33). CD13, CD107a y CD164 son otros indicadores de activación que se han identificado (34); no obstante, se requieren más estudios y ensayos de validación que permitan verificar si estos marcadores pueden ser utilizados en la práctica para el diagnóstico de alergias y si su uso mejoraría el desempeño de la PAB y sus resultados.

### Estrategias de identificación de basófilos y su activación

Para medir la activación de basófilos es esencial su discriminación del resto de células sanguíneas. Existen varias formas de identificar basófilos humanos por citometría de flujo y de separarlos de otros leucocitos durante los ensayos de activación (35-37). Esta selección debe ser bastante cuidadosa, pues influye en la eficacia diagnóstica de la prueba (38). Dentro de los aspectos que deben tenerse en cuenta para la selección de los mejores marcadores celulares están su especificidad para discriminar basófilos, su patrón de expresión en condiciones de reposo y durante la activación celular, la variabilidad interindividuo y la representatividad del marcador en la población real de basófilos. Otro aspecto conveniente es que con un mínimo de marcadores se puede identificar a la población de manera óptima, lo que ahorra costos y tiempo en el desarrollo de la prueba.

Dentro de las estrategias de selección más conocidas se encuentran:

- a) la combinación de anti-CD123 (subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-3) con anti HLA-DR para excluir células presentadoras de antígeno y monocitos (13,35,36).
- b) la combinación de anti-CRTH2 (receptor D2), anti-CD3 (exclusión de células T) y anti-CD203c para identificar estas células en la región más baja de "Side Scatter" (SSC<sup>low</sup>), donde, por su complejidad, se encuentran las células mononucleares y los basófilos (37).

c) el uso de anti-CCR3 (receptor 3 de quimiocinas CC, expresado en basófilos, mastocitos y linfocitos Th2), también conocido como CD193 con o sin el empleo de un segundo marcador (35,39).

d) la detección de IgE en la superficie de los basófilos, aunque esta se complica en pacientes con bajos niveles de este anticuerpo, además, la IgE puede hallarse también en la superficie de otras células (como monocitos y eosinófilos), lo que eleva la cantidad de células contaminantes y reduce la especificidad de la prueba (35,40). A pesar de esto, una selección adecuada permite discriminar los basófilos con este marcador en compañía de algún otro, como CD45 (41) o CD203c, por lo que sigue siendo empleado (42).

e) el marcador CD203c podría usarse como marcador de identificación ya que entre las células sanguíneas se expresa exclusivamente en basófilos y se regula al alza tras su activación por alérgeno o anti-IgE en basófilos maduros (30); sin embargo, su baja expresión basal ha obstaculizado en muchos casos su empleo como único marcador para la adquisición de los basófilos en reposo (41).

Una técnica bastante utilizada para determinar basófilos y cuantificar su activación se basa en la caracterización de las células por anti-IgE y la evaluación de su estado de activación por anti-CD63 (43,44). Esta técnica es empleada por estuches comercialmente disponibles, como Basotest™ (Becton Dickinson, Pont de Claix, France); sin embargo, el hecho de que no se utilice un marcador adicional para diferenciar los basófilos de otras células sanguíneas que también poseen IgE en su superficie, sumado a que este protocolo utiliza como control positivo el péptido inductor de degranulación fMLP (que activa el basófilo por vía FRP-1, diferente a la vía usada por alérgenos dependiente de anticuerpos), hacen que el empleo de este producto sea menos recomendable (11,45) en comparación con otros que basan su selección en combinaciones de marcadores que permiten mejor discriminación y utilizan como control positivo anticuerpos anti-IgE (que al igual que los alérgenos, activan al basófilo por vía IgE-dependiente). Un ejemplo es el Allergenicity Kit™ (Beckman Coulter, Fullerton, California, Estados Unidos), que identifica los basófilos como una población CD3<sup>+</sup> CRTH2<sup>+</sup> CD203c<sup>+</sup> (44).

De diferentes estudios que han comparado la eficiencia de las estrategias de selección de basófilos para realizar pruebas de activación (46-48), el trabajo de Eberlein *et al.* (46) es el que incluye mayor número de estrategias. Estos autores concluyen que se puede identificar una mayor cantidad de basófilos al seleccionarlos como células anti-CCR3<sup>+</sup>, anti-IgE<sup>+</sup> o anti IgE<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup> en comparación con la estrategia CRTH2<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (46). Aunque en el presente estudio la detección de IgE se recomienda para seleccionar basófilos con una alta pureza, otros autores consideran lo contrario (35,46) y mencionan como desventaja que este es un marcador con alta variabilidad interindividual (35,47) no recomendando su uso como único marcador de selección.

CCR3 es un marcador altamente confiable y con poca variabilidad interindividual que permite obtener gran cantidad relativa de basófilos, con alta pureza, independiente del componente atópico del paciente (35,46), por lo que podría considerarse el mejor marcador individual para identificar basófilos. Por otra parte, para el estudio de la urticaria crónica, mediante la PAB indirecta, se ha comparado el empleo de CCR3 o CD123 y la combinación de ambos, encontrándose que esta última presenta mejores resultados, por lo que se recomienda como método de selección (49).

En la Tabla 1 se describen varias estrategias de selección que usan los estuches de determinación de activación de basófilos disponibles comercialmente.

**Tabla 1.** Estuches comerciales para evaluar activación de basófilos por citometría de flujo.

Estuche	Marca comercial	Selección	Marcadores de Activación	Control positivo
Allergenicity kit®	Beckman Coulter	CRTH2 <sup>pos</sup> CD203c <sup>dim</sup> CD3 <sup>neg</sup> CRTH2 <sup>pos</sup> CD203c <sup>pos</sup> CD3 <sup>neg</sup>	CD203c <sup>pos</sup>	Anti-IgE
Basotest®	Becton Dickinson	IgE <sup>pos</sup>	CD63 <sup>pos</sup>	Nformyl-Met-Leu-Phe (fMLP)
Flow CAST®	Bühlmann Laboratories AG	CCR3 <sup>pos</sup> SSC <sup>low</sup>	CD63 <sup>pos</sup>	Nformyl-Met-Leu-Phe (fMLP) y Anti-IgE
Flow CAST highsens®	Bühlmann Laboratories AG	CCR3 <sup>pos</sup> SSC <sup>low</sup>	CD63 <sup>pos</sup> CD203c <sup>pos</sup>	Nformyl-Met-Leu-Phe (fMLP) y Anti-IgE
Basostep®	Inmunostep	CD123 <sup>pos</sup> CD203c <sup>pos</sup> HLA-DR <sup>neg</sup>	CD63 <sup>pos</sup> CD203c <sup>pos</sup>	Mezcla de Nformyl-Met-Leu-Phe (fMLP)-Anti-IgE
BasoFlowEx® Kit	Exbio	CD203c <sup>pos</sup> SSC <sup>low</sup>	CD63 <sup>pos</sup>	Nformyl-Met-Leu-Phe (fMLP) y Anti-IgE

Fuente: Elaboración propia.

## Aspectos metodológicos de la PAB

Para realizar la PAB se puede emplear sangre total o leucocitos aislados. El empleo de sangre total hace más práctica la manipulación (reduciendo el número pasos de centrifugación), pero se argumenta que puede presentar diferencias relevantes con respecto al empleo de leucocitos aislados; un ejemplo es la posible interferencia de componentes del suero (anticuerpos

específicos para el alérgeno, entre otros) que, si bien puede representar de manera más cercana lo que ocurre en condiciones fisiológicas, puede también llevar a un descenso en la sensibilidad del ensayo o permitir que componentes del suero causen activación inespecífica en los controles e interferencias debido a agregados de plaquetas (ya que estas también expresan CD63) (50,51). La Figura 2 muestra el esquema general de los pasos a seguir en una PAB sobre sangre total.



**Figura 2.** Esquema general de la prueba de activación de basófilos en sangre total.

Fuente: Elaboración propia.

Otro tipo de PAB que se usa principalmente en investigación biomédica se hace de manera indirecta y utiliza basófilos de un donador distinto al paciente evaluado. Por lo general se extraen células mononucleares periféricas y se someten a un procedimiento de lavado con ácido láctico para remover de los basófilos a las inmunoglobulinas unidas a membranas (“stripping”), las cuales se incuban con el suero “sospechoso” y el alérgeno a evaluar (52). Este procedimiento es bastante útil cuando no se puede contar con sangre fresca, p. ej., en pacientes que viven lejos de una unidad con citometría de flujo o en la evaluación de pacientes con urticaria crónica (49).

## Muestreo de sangre

El procedimiento de la PAB inicia con la extracción de sangre del paciente mediante algún anticoagulante, casi siempre heparina. Hay opciones comerciales, como el Allergenicity kit, para hacer el BAT con muestras tomadas en tubos con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) o ácido cítrico-citrato-dextrosa, las cuales incluyen una solución de activación para reponer el calcio que se quela con estos anticoagulantes y es necesario para la degranulación de los basófilos (2). Asimismo, se ha reportado que no hay diferencia significativa entre los resultados de la prueba con el marcador anti-CD63 tras almacenar la sangre a 4°C durante 24 horas empleando EDTA o citrato, pero no con heparina (53). Sin embargo, en otra publicación más reciente, la eficiencia de la prueba no se ve alterada con este anticoagulante bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura

(54). El mantenimiento de la muestra a temperatura ambiente por largos periodos reduce de forma significativa la reactividad del basófilo en la prueba de activación (51).

## Controles

El control negativo evalúa la expresión basal de los marcadores de activación y, por lo general, se utiliza el mismo diluyente en el que se encuentra el alérgeno a evaluar. Tradicionalmente, el control positivo consiste en anticuerpos anti-IgE monoclonales o policlonales. También se pueden emplear anticuerpos monoclonales anti FCεRI, con el que se han encontrado mayores tasas de activación y un mayor número de respondedores (45,50,51). El péptido bacteriano N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP) puede emplearse para evaluar la calidad de los basófilos; sin embargo, se ha recomendado evitar su uso como control positivo (11,45), puesto que activa a los basófilos a través del FPR-1 (receptor acoplado a proteína G que activa vías MAPK y fosfolipasa C) y no por estimulación mediada por IgE-FCεRI. Alrededor del 10-15% de los individuos tienen basófilos “no respondedores” al control positivo de la vía dependiente de IgE; en estos casos, los resultados de la PAB no son confiables (11).

## Estimulación con alérgeno

Las concentraciones empleadas para la PAB son alérgeno-dependientes, haciéndose necesario estandarizar la técnica para cada uno de ellos

mediante titulación a distintas concentraciones (2). En general, los alérgenos medicamentosos son activos en el rango de los mg/mL y pueden ser diluidos de 5 a 25 veces sin perder su actividad. Por su parte, los alérgenos proteicos son empleados a menudo en concentraciones del orden de los µg/mL y pueden ser diluidos hasta ng/mL o pg/mL manteniendo su actividad. El tiempo de incubación es, por lo general, de 15 a 20 minutos y está acorde a la dinámica de expresión de los marcadores de activación (CD203c o CD63), siendo CD203 el de aparición más temprana.

### Pretratamiento con IL-3

Aunque la necesidad de preactivación de los basófilos con IL-3 ha sido causa de controversia (11), se ha demostrado que una corta preincubación (de máximo 10 min) con IL-3 (2 ng/mL) no aumenta la expresión de CD63 basal, pero sí induce mayor expresión de mediadores y de CD63 ante estímulos como el alérgeno específico (11), permitiendo aumentar la sensibilidad del ensayo (41,55).

La IL-3 se ha empleado con éxito para normalizar la reactividad de basófilos de donantes sanos usados para el diagnóstico de urticaria espontánea crónica (39). Sin embargo, la estimulación con esta aumenta de forma inespecífica la expresión de CD203c en basófilos en reposo, lo que reduce de manera significativa la diferencia entre basófilos activados y los no activados; por tanto no se recomienda su uso cuando la PAB se realiza con este marcador de activación (13,41).

### Interpretación de resultados

#### Empleando CD63

La expresión de CD63 se presenta tras el proceso de degranulación anafiláctica del basófilo (28), tiene un pico máximo de expresión a los 25-30 minutos y coincide con el momento de la liberación de la histamina (27).

Para la evaluación apropiada de los resultados debe tenerse en cuenta el número absoluto de basófilos identificados, que debe ser de al menos 150, y el porcentaje de basófilos activados, que en el control negativo debe ser <5%. Existen dos medidas comunes de activación de basófilos: la reactividad y la sensibilidad, ambas recomendadas por la Academia Europea de Asma, Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) para la interpretación de la PAB. La primera equivale al porcentaje de basófilos que responde a determinado estímulo y la segunda a la mínima concentración de alérgeno necesaria para que responda el 50% de los basófilos reactivos ( $EC_{50}$ ). Para el análisis de la reactividad basta con evaluar la activación de basófilos ante una o dos concentraciones de alérgeno. Es importante emplear un control positivo que evalúe la reactividad de los basófilos antes de someterlos a la estimulación con el alérgeno (2).

Tras determinar la reactividad se puede evaluar la sensibilidad, dado que esta se da en función de la reactividad de los basófilos. Para esto se hacen lecturas de la reactividad de los basófilos a 6-8 concentraciones y la respuesta se grafica en una curva de respuesta versus concentración de alérgeno para determinar la  $EC_{50}$ . La sensibilidad puede ser expresada también como "CD-sens" (equivalente al inverso de  $EC_{50}$  multiplicado por 100) (2,56).

La activación de basófilos también puede evaluarse mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI, por su sigla en inglés). Para este fin, el incremento en la MFI se presenta como un valor relativo denominado índice de estimulación (SI, por su sigla en inglés), que resulta de la relación entre el MFI tras la estimulación y el MFI del control negativo (57). En general, un SI >2.0 puede ser considerado como una señal confiable de activación de basófilos inducida por

la sustancia de ensayo. La dependencia de dosis puede tomarse como una segunda confirmación confiable de reacción específica al alérgeno. Asimismo, en general, un porcentaje  $\geq 15\%$  de basófilos activados tras el reto alérgico podría indicar un estado alérgico; sin embargo, para establecer los puntos de corte para cada alérgeno es recomendable construir una curva ROC (del inglés, receiver operating characteristics) que permita seleccionar el punto de mayor sensibilidad con la máxima especificidad (50,57,58). Los puntos de corte empleados con mayor frecuencia en clínica aparecen en la Tabla 2.

Por último, para la correcta evaluación de los resultados siempre debe tenerse en cuenta la situación general del paciente (medicación, estación del año, inmunoterapia, exposición reciente a alérgenos y coexistencia de enfermedades).

**Tabla 2.** Puntos de corte utilizados para considerar una prueba de activación de basófilos positiva.

Alérgeno (A)/hapteno (H)	Punto de corte	Referencia
A. inhalados	Reactividad >15%	(59)
A. de alimentos	Reactividad >15%	(58)
A. del látex	Reactividad =10-20%	(60,61)
Antibióticos (H) β-lactámicos (H)	Reactividad >6%	(40)
A. del veneno de himenópteros	Reactividad >25%	(13,62)

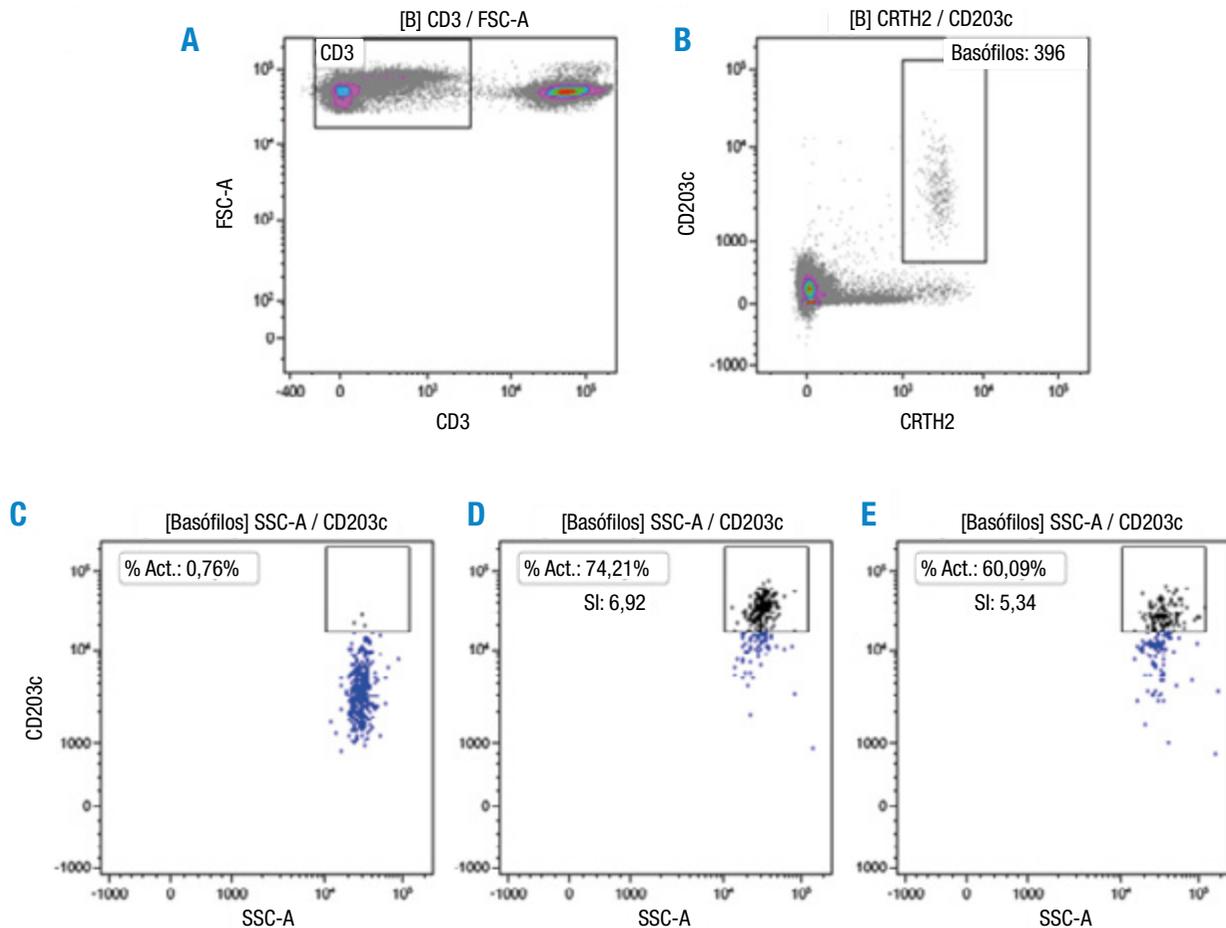
Fuente: Elaboración propia.

#### Empleando CD203c

CD203c es un marcador específico de basófilos y, aunque se expresa de manera constitutiva en la superficie celular, sus niveles aumentan con la activación. En contraste a CD63, el incremento de CD203c en superficie celular por lo general es más rápido y transitorio. Los niveles basales de CD203c expresados por basófilos pueden diferir de forma significativa entre individuos, además, diversos factores pueden afectar su expresión; de hecho, se han encontrado diferencias basales de esta entre las personas con asma e individuos no alérgicos (32).

La expresión de CD203c puede modificarse por los niveles de otras citoquinas. En específico, la IL-3 aumenta su expresión en ausencia de degranulación anafiláctica, por lo cual pueden hallarse niveles mayores de CD203c durante el curso de varios procesos inflamatorios (57). El incremento en la expresión de CD203c se presenta en forma de SI y, aunque también puede presentarse como porcentaje de basófilos activados, esto último no es lo más apropiado pues la expresión basal del marcador y, por lo tanto, la definición del punto de corte son diferentes para cada paciente (41). Al igual que para CD63, un SI >2 puede ser considerado como indicador confiable de activación de basófilos y la dependencia de la dosis se considera un segundo indicador fiable de una reacción específica al alérgeno (57,63).

Un ejemplo del análisis de los resultados se muestra en la Figura 3, donde a partir de células CD3<sup>-</sup> (Figura 3A), se seleccionaron los basófilos (Figura 3B) teniendo en cuenta las que son CD203c<sup>+</sup> CRTH2<sup>+</sup>. El porcentaje de activación (% Act.) se determinó usando como punto de corte el control negativo que corresponde a las células estimuladas con la solución de dilución del alérgeno (Figura 3C). La estimulación con 1 µg/mL de extracto *B. tropicalis* (Figura 3D) y anti IgE (Figura 3E) evidencia la sobreexpresión del marcador CD203c. Al interior de los cuadrantes se presenta el índice de estimulación (SI) que indican un resultado positivo para el alérgeno y el control de la prueba, >2 en ambos casos.



**Figura 3.** Prueba de activación de basófilos de un paciente con rinitis alérgica sensibilizado al ácaro *Blomia tropicalis* usando el estuche comercial Allergenicity kit™.

Fuente: Elaboración propia.

Sin embargo, el incremento en la expresión CD203c en basófilos activados es, por lo general, menos prominente que el de CD63; en pacientes con elevada expresión basal de CD203c la regulación positiva puede estar completamente ausente, originando falsos negativos. Por lo tanto, los resultados siempre deben ser interpretados a la luz de la situación general del paciente (medicación, estación del año, inmunoterapia, exposición reciente a alérgenos y coexistencia de enfermedades) (11).

### Factores que influyen en la realización de la prueba

El uso de antihistamínicos no afecta la expresión de CD63 o CD203c tras un evento de estimulación. En el caso de los corticoides orales, se ha demostrado que a concentraciones muy altas, inusuales en clínica, se interfiere en la expresión de CD63, mas no de CD203c (12,13).

### PAB en el diagnóstico de alergias

Comparado con la determinación de IgE específica, la PAB tiene la ventaja que evalúa una respuesta alérgica efectora y, por lo tanto, se espera que tenga una mayor concordancia clínica con los retos orales, prueba de oro para el diagnóstico de alergias (4). Su rendimiento como técnica diagnóstica, en comparación con la prueba cutánea (PC), es variable y depende del alérgeno o la molécula inductora de hipersensibilidad. En algunos casos se ha demostrado la superioridad de la PAB sobre la PC (56). Expertos consideran que en casos de falta

de concordancia entre la PC y la IgE específica, o en los que hacer una prueba *in vivo* ponga en peligro la vida del paciente, la PAB tiene un escenario ideal de aplicación. Aunque hay otras pruebas *ex vivo*, como los ensayos de liberación de histamina, la posición de la EAACI es que de estos no hay revisiones sistemáticas que permitan hacer un juicio apropiado de su aplicabilidad, y que hay limitaciones técnicas, como la reactividad cruzada de la histamina con otros metabolitos, que pueden alterar la especificidad cuando se hace su determinación. Por lo tanto, dicha academia considera que la PAB es superior a los otros métodos (2). Además, en comparaciones directas entre estos métodos, la PAB ha mostrado mayor sensibilidad, pero rendimiento diagnóstico parecido (64). La línea celular de rata con leucemia basofílica (RBL, por su sigla en inglés) también es una estrategia prometedora como prueba diagnóstica *ex vivo* (65); no obstante, faltan más estudios que evalúen su comportamiento clínico.

La utilidad de la PAB como prueba diagnóstica ha sido estudiada en distintas clases de alergia y ante un considerable número de alérgenos (Tabla 3), además, ha mostrado ser útil como herramienta complementaria para la evaluación y diagnóstico de alergia severa al maní en adultos. Se ha establecido que la reactividad de los basófilos es significativamente mayor en pacientes con historia de alergia severa al maní en comparación a pacientes sensibilizados (56).

La PAB también puede emplearse para revelar alergias severas ocultas a la soya en pacientes con alergia a maní (58). Hace poco, en un estudio en niños de 1 a 13 años, Santos *et al.* (56) identificaron variables en la PAB que permiten predecir los resultados del reto oral.

Utilizando CD63 como marcador de activación, estos investigadores identificaron la reactividad alérgeno-específica a través de la PAB como biomarcador de la gravedad de las reacciones alérgicas al maní durante los retos orales. De igual forma, encontraron que la medición de la sensibilidad de los basófilos (medida por CD-sens) puede tener un valor clínico para estimar el umbral de las reacciones alérgicas al maní durante los retos orales. Estos hallazgos indican que la PAB puede funcionar como sustituto *in vitro* de los retos orales para estimar la severidad y el umbral de las reacciones alérgicas y mejorar el manejo de los pacientes con alergia a maní.

**Tabla 3.** Utilidad de la prueba de activación de basófilos como prueba diagnóstica de alergia ante distintos alérgenos.

Referencia	Alérgeno	Marcador de activación	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Abuaf <i>et al.</i> (66). 2012	AINEs	CD63	37-64	90
Aranda <i>et al.</i> (67). 2011	Quinolonas	CD63	41.7-79.2	88
Bavbek <i>et al.</i> (68). 2009	Lysina-ASA	CD63/CD203c	16.7-33.3	79.2-91.7
	Diclofenaco		16.7-22.2	100
De Week <i>et al.</i> (69). 2009	$\beta$ -lactámicos	CD63	50	89-97
Eberlein <i>et al.</i> (70). 2010	$\beta$ -lactámicos	CD63	53	80
Gómez <i>et al.</i> (71). 2010	Metamizol	CD63	54.9	85.71
Kim <i>et al.</i> (72). 2012	AINEs	CD63	61	91
Korosec <i>et al.</i> (73). 2011	ASA	CD63	79	70
Pinnobphun <i>et al.</i> (74). 2011	Medio de Contraste	CD63	46-61.5	88-100
Rodríguez-Trobado <i>et al.</i> (75). 2008	AINEs	CD63	42.85	100
Ocmant <i>et al.</i> (76). 2009	Maní	CD63/CD203c	86.7-88.9	94.1-97.1
	Huevo		62.5-88.9	96.4-100
Eberlein <i>et al.</i> (77). 2012	Abeja y YJ	CD63	57.1	90
Korosec <i>et al.</i> (78). 2009	Abeja-Avispa	CD63	75 %	92
Peternelj <i>et al.</i> (79). 2009	Abeja-Avispa	CD63	90	
Khan <i>et al.</i> (80). 2012	Aeroalérgenos	CD63	57-84	73-81
Ozdemir <i>et al.</i> (81). 2011	Mezcla de polen	CD203c	87-100	100
Wolczynyk-Medrała <i>et al.</i> (82). 2009	Acaros, mezcla de polen	CD63	87.5-94	100
Erdmann <i>et al.</i> (83). 2004	Abeja-Avispa	CD63	92%	80%
Frezzolini <i>et al.</i> (84). 2009	Anasakis	CD63	67	100
Santos <i>et al.</i> (85). 2014	Maní	CD63	97.6	96.0
		CD203c	100.0	94.0

Fuente: Elaboración propia.

Las limitaciones principales de la PAB en la práctica clínica se relacionan con la accesibilidad, la validación de los reactivos y su alto costo (86). El empleo de citometría de flujo disminuye su uso como prueba de rutina, a diferencia de la PC, que está disponible en el consultorio del especialista. No obstante, se espera que en un futuro la PAB se posicione como prueba diagnóstica de alergia en casos específicos en donde la superioridad es evidente.

### CD63 versus CD203c

Como se ha mencionado, para la medición de la activación de los basófilos casi siempre se emplean dos marcadores: CD63 y CD203c (Tabla 4). Diferentes estudios se han desarrollado para evaluar la idoneidad de cada uno en diferentes condiciones alérgicas. Al examinar la respuesta de basófilos ante el estímulo con anti-IgE o fMLP, se ha encontrado que la totalidad de basófilos que resultan CD63 negativos o “no respondedores” sí muestran activación si esta se mide mediante CD203c. Esto sugiere que en aquellos “no respondedores”, la PAB debería emplear ambos marcadores de activación (87).

**Tabla 4.** Principales características de los marcadores más empleados en test de activación de basófilos.

Características	CD63	CD203c
Sinónimos	LAMP-3	Enzima E-NNP3
En basófilos en reposo	Apenas detectable	Presente constitutivamente
Presentes en	Plaquetas y otras células sanguíneas	Específico de basófilos
Regulación al alza	Máxima a los 25-30 min. Asociada a la liberación del mediador	Máxima a 10-20 min. No necesariamente asociado a liberación del mediador
Inducción por IL-3	No, por sí sola	Sí
Intensidad de fluorescencia	Mayor	Menor
Aparición espontánea <i>in vivo</i>	Baja	Mayor
Eficiencia diagnóstica	Alta	Alta

Fuente: Elaboración propia.

Ambos marcadores mostraron ser igual de confiables en el diagnóstico de alergia al gato, siempre y cuando la prueba se desarrolle bajo las condiciones más adecuadas para cada marcador; por ejemplo, la preincubación con IL-3 en caso de que se emplee CD63 y no CD203c (41).

En pacientes con historia clínica de anafilaxia a amoxicilina se ha encontrado que CD203c puede ser mucho más sensible que CD63 (60% para CD203c, contra 20% para CD63) (40). Sin embargo, en este estudio los métodos de selección de los basófilos pudieron afectar en cierta forma los resultados, dado que para la prueba con CD63 los basófilos se identificaron solo como IgE<sup>+</sup>, sin emplear un segundo marcador para eliminar otras células que también expresan IgE, lo que ocasionó que entre las células seleccionadas para la evaluación de activación se observara, en ocasiones, hasta un 50% de células diferentes a basófilos (40).

Para la identificación de pacientes alérgicos a veneno de avispa y abeja se ha reportado que, aunque la sensibilidad de CD203c es

ligeramente mayor que la de CD63 (97% vs. 89%), ambos marcadores resultan confiables para el diagnóstico de pacientes con alergia a las picaduras por estos himenópteros (88).

## Conclusiones

La PAB ha mostrado tal confiabilidad clínica que se ha sugerido como sustituto *in vitro* de los retos orales para estimar la severidad de la alergia a alimentos como el maní, ofreciendo la ventaja que el diagnóstico se hace *ex vivo*, lo cual evita efectos adversos en el paciente. También se reconoce su utilidad en el diagnóstico de hipersensibilidad a medicamentos.

Dentro de las desventajas actuales del uso de la PAB está la falta de estandarización de la prueba entre laboratorios. Esto puede causar variabilidad en los resultados y dificultar la reproducibilidad de los hallazgos. Otras limitaciones en la práctica clínica son la accesibilidad y su alto costo; no obstante, se espera que en un futuro la PAB se posicione como prueba diagnóstica de alergia en casos específicos en donde la superioridad es evidente

## Conflicto de intereses

Ninguno declarado por los autores.

## Financiación

La presente investigación recibió apoyo financiero de la Universidad de Cartagena y Colciencias mediante Contrato 484-2012.

## Agradecimientos

A la Dra. Elizabeth García, investigadora principal del proyecto que apoyó financieramente los estudios de Maestría en Inmunología de PS.

## Referencias

- Descotes J, Chquet-Kastylevsky G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology*. 2001;158(1-2):43-9. <http://doi.org/fkvqkb>.
- Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015;70(11):1393-405. <http://doi.org/f3ph2t>.
- Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, et al. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(1 Pt 1):99-107. <http://doi.org/dg58m6>.
- Santos AF, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool? *Clin Transl Allergy*. 2016;6:10. <http://doi.org/cpg2>.
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S73-80. <http://doi.org/crfr6s>.
- Cheng LE, Sullivan BM, Retana LE, Allen CD, Liang HE, Locksley RM. IgE-activated basophils regulate eosinophil tissue entry by modulating endothelial function. *J Exp Med*. 2015;212(4):513-24. <http://doi.org/f67qmm>.
- Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, Shindou H, Yoshida M, Nishikado H, et al. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*. 2008;28(4):581-9. <http://doi.org/cfdrd7>.
- Jönsson F, Mancardi DA, Zhao W, Kita Y, Iannascoli B, Khun H, et al. Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood*. 2012;119(11):2533-44. <http://doi.org/fkj6sg>.
- Valent P, Schmidt G, Besemer J, Mayer P, Zenke G, Liehl E, et al. Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils. *Blood*. 1989;73(7):1763-9.
- Valent P, Besemer J, Muhm M, Majdic O, Lechner K, Bettelheim P. Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(14):5542-6. <http://doi.org/c8cj9k>.
- Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy*. 2006;61(9):1028-39. <http://doi.org/cshv8w>.
- Sturm GJ, Kranzelbinder B, Sturm EM, Heinemann A, Grose-lj-Strele A, Aberer W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy*. 2009;64(9):1319-26. <http://doi.org/dgdw6v>.
- Sturm EM, Kranzelbinder B, Heinemann A, Grose-lj-Strele A, Aberer W, Sturm GJ. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: Characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(5):308-18. <http://doi.org/czcvqk>.
- Siracusa MC, Saenz SA, Hill DA, Kim BS, Headley MB, Doering TA, et al. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature*. 2011;477(7363):229-33. <http://doi.org/bdg8mz>.
- Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, et al. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):13962-6. <http://doi.org/d6jww6>.
- Zaitu M, Yamasaki F, Ishii E, Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Hamasaki Y. Interleukin-18 primes human basophilic KU812 cells for higher leukotriene synthesis. *Prostaglandins Leuk Essent Fatty Acids*. 2006;74(1):61-6. <http://doi.org/d4s33g>.
- Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*. 2009;113(7):1526-34. <http://doi.org/b48cf2>.
- Sokol CL, Medzhitov R. Emerging functions of basophils in protective and allergic immune responses. *Mucosal immunology*. 2010;3(2):129-37. <http://doi.org/bp6gxd>.
- Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*. 2008;9(3):310-8. <http://doi.org/fk2kzq>.
- Patella V, Giuliano A, Florio G, Bouvet JP, Marone G. Endogenous superantigen protein Fv interacts with the VH3 region of IgE to induce cytokine secretion from human basophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118(2-4):197-9. <http://doi.org/bjkw2g>.
- Genovese A, Borgia G, Björck L, Petraroli A, de Paulis A, Piazza M, et al. Immunoglobulin superantigen protein L induces IL-4 and IL-13 secretion from human Fc epsilon RI+ cells through interaction with the kappa light chains of IgE. *J Immunol*. 2003;170(4):1854-61. <http://doi.org/cpg3>.
- Crivellato E, Nico B, Mallardi F, Beltrami CA, Ribatti D. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;274(1):778-84. <http://doi.org/b529h6>.
- Dvorak AM. Ultrastructural studies of human basophils and mast cells. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(9):1043-70. <http://doi.org/d7n593>.
- Dvorak AM, Kissell S. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. *J Leukoc Biol*. 1991;49(2):197-210. <http://doi.org/cpg4>.
- Dvorak AM, MacGlashan DW Jr, Morgan ES, Lichtenstein LM. Vesicular transport of histamine in stimulated human basophils. *Blood*. 1996;88(11):4090-101.
- Dvorak A. Ultrastructural features of human basophil and mast cell secretory function. *Mast Cells and Basophils*. 2000;63-88. <http://doi.org/d8d44w>.
- Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(3 Pt 1):328-38. <http://doi.org/fqh57b>.

28. MacGlashan D Jr. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(9):1365-77. <http://doi.org/bt7734>.
29. Tschoepe D, Spangenberg P, Esser J, Schwippert B, Kehrel B, Roesen P, et al. Flow-cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets. *Cytometry*. 1990;11(5):652-6. <http://doi.org/dn2tjx>.
30. Bühring HJ, Simmons PJ, Pudney M, Müller R, Jarrossay D, van Aghthoven A, et al. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*. 1999;94(7):2343-56.
31. Bühring HJ, Seiffert M, Giesert C, Marxer A, Kanz L, Valent P, et al. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood*. 2001;97(10):3303-5. <http://doi.org/c9d7hd>.
32. Ono E, Taniguchi M, Higashi N, Mita H, Kajiura K, Yamaguchi H, et al. CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):483-9.e3. <http://doi.org/dz992h>.
33. Ebo DG, Dombrecht EJ, Bridts CH, Aerts NE, de Clerck LS, Stevens WJ. Combined analysis of intracellular signalling and immunophenotype of human peripheral blood basophils by flow cytometry: a proof of concept. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(11):1668-75. <http://doi.org/dcw398>.
34. Hennersdorf F, Florian S, Jakob A, Baumgärtner K, Sonneck K, Nordheim A, et al. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. *Cell Res*. 2005;15(5):325-35. <http://doi.org/ffbt52>.
35. Hausmann OV, Gentinetta T, Fux M, Ducrest S, Pichler WJ, Dahinden CA. Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy*. 2011;66(1):85-91. <http://doi.org/bdgt9>.
36. Nucera E, Pecora V, Buonomo A, Rizzi A, Aruanno A, Pascolini L, et al. Utility of Basophil Activation Test for monitoring the acquisition of clinical tolerance after oral desensitization to cow's milk: Pilot study. *United European Gastroenterol J*. 2015;3(3):272-6. <http://doi.org/cpg5>.
37. Imoto Y, Takabayashi T, Sakashita M, Tokunaga T, Ninomiya T, Ito Y, et al. Peripheral basophil reactivity, CD203c expression by Cryj1 stimulation, is useful for diagnosing seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen. *Immun Inflamm Dis*. 2015;3(3):300-8. <http://doi.org/cpg6>.
38. Konstantinou GN, Asero R, Ferrer M, Knol EF, Maurer M, Raap U, et al. EAACI taskforce position paper: evidence for autoimmune urticaria and proposal for defining diagnostic criteria. *Allergy*. 2013;68(1):27-36. <http://doi.org/f4jmvn>.
39. Gentinetta T, Pecaric-Petkovic T, Wan D, Falcone FH, Dahinden CA, Pichler WJ, et al. Individual IL-3 priming is crucial for consistent in vitro activation of donor basophils in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(6):1227-34.e5. <http://doi.org/bmq33h>.
40. Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, Gaouar H, Autegarden JE, Leynadier F, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(6):921-8. <http://doi.org/dh7css>.
41. Ocmant A, Peignois Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Schandené L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J Immunol Methods*. 2007;320(1-2):40-8. <http://doi.org/fsg79n>.
42. Leysen J, De Witte L, Sabato V, Faber M, Hagendorens M, Bridts C, et al. IgE-mediated allergy to pholcodine and cross-reactivity to neuromuscular blocking agents: Lessons from flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(2):65-70. <http://doi.org/f4prdg>.
43. Pâris-Köhler A, Demoly P, Persi L, Lebel B, Bousquet J, Arnoux B. In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(2):339-45. <http://doi.org/fd8pmn>.
44. Hemery ML, Arnoux B, Dhivert-Donnadieu H, Rongier M, Barbotte E, Verdier R, et al. Confirmation of the diagnosis of natural rubber latex allergy by the Basotest method. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;136(1):53-7. <http://doi.org/ds57f3>.
45. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(4):201-10. <http://doi.org/dk2hbk>.
46. Eberlein B, Hann R, Eyerich S, Pennino D, Ring J, Schmidt-Weber CB, et al. Optimizing of the basophil activation test: Comparison of different basophil identification markers. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014. <http://doi.org/cpg8>.
47. Michova A, Abugalia M, Ivanova T, Nikolov G, Taskov H, Petrunov B. Comparison of two-flow cytometry methods for basophil degranulation in patients sensitized to grass pollen. *Allergy*. 2006;61(9):1078-83. <http://doi.org/d663gk>.
48. Monneret G, Benoit Y, Debard AL, Gutowski MC, Topenot I, Bienvenu J. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol*. 2002;102(2):192-9. <http://doi.org/fwr67b>.
49. Kim Z, Choi BS, Kim JK, Won DI. Basophil markers for identification and activation in the indirect basophil activation test by flow cytometry for diagnosis of autoimmune urticaria. *Ann Lab Med*. 2016;36(1):28-35. <http://doi.org/f79p8s>.
50. Sanz M, Gamboa P, De Weck A. In vitro tests: basophil activation tests. In: Pichler WJ, editor. *Drug Hypersensitivity*. Basel: Karger; 2007. p. 391-402.
51. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008;18(3):143-55.
52. Kleine-Budde I, de Heer PG, van der Zee JS, Aalberse RC. The stripped basophil histamine release bioassay as a tool for the detection of allergen-specific IgE in serum. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126(4):277-85. <http://doi.org/b2cj5t>.
53. Sousa N, Martínez-Aranguren R, Fernández-Benitez M, Ribeiro F, Sanz ML. Comparison of basophil activation test results in blood preserved in acid citrate dextrose and EDTA. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(6):535-6.
54. Mukai K, Gaudenzio N, Gupta S, Vivanco N, Bendall SC, Maecker HT, et al. Assessing basophil activation by using flow cytometry and mass cytometry in blood stored 24 hours before analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(3):889-99.e11. <http://doi.org/f9zbpv>.
55. Cozon G, Ferrándiz J, Peyramond D, Brunet J. Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients. *Allergol Immunopathol*. 1999;27(4):182-7.
56. Santos AF, Du Toit G, Douiri A, Radulovic S, Stephens A, Turcanu V, et al. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):179-86. <http://doi.org/f2x27s>.
57. Valent P, Hauswirth AW, Natter S, Sperr WR, Bühring HJ, Valenta R. Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. *Methods*. 2004;32(3):265-70. <http://doi.org/cbktzn>.
58. Rentzos G, Lundberg V, Lundqvist C, Rodrigues R, van Odijk J, Lundell AC, et al. Use of a basophil activation test as a complementary diagnostic tool in the diagnosis of severe peanut allergy in adults. *Clin Transl Allergy*. 2015;5:22. <http://doi.org/gbn5tz>.
59. Sanz ML, Sánchez G, Gamboa PM, Vila L, Uasuf C, Chazot M, et al. Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow

- cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(7):1007-13. <http://doi.org/b8k2nq>.
60. **Trabado AR, Pereira LMF, Romero-Chala S, García-Trujillo JA, Hijón CC.** Evaluation of Latex Subclinical Sensitization by Way of the Basophil Activation Test and Specific IgE to Latex Recombinant Allergens. *Allergol Int*. 2013;62(3):385-7. <http://doi.org/cphb>.
  61. **Sanz ML, García-Avilés M, Gamboa PM, Maselli JP, Diéguez I, De Weck A.** The use of a flowcytometric basophil activation test (FAST) for the in vitro diagnosis of latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(1 Suppl 1):S284. <http://doi.org/b9d3nx>.
  62. **Sturm GJ, Böhm E, Trummer M, Weighofer I, Heinemann A, Aberer W.** The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy*. 2004;59(10):1110-7. <http://doi.org/dg3mf4>.
  63. **Patil SU, Shreffler WG.** Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(1):59-66. <http://doi.org/df84mc>.
  64. **Larsen LF, Juel-Berg N, Hansen KS, Mills EN, van Ree R, Poulsen LK, et al.** A comparative study on basophil activation test, histamine release assay, and passive sensitization histamine release assay in the diagnosis of peanut allergy. *Allergy*. 2018;73(1):137-44. <http://doi.org/cphg>.
  65. **Falcone FH, Alcocer MJ, Okamoto-Uchida Y, Nakamura R.** Use of humanized rat basophilic leukemia reporter cell lines as a diagnostic tool for detection of allergen-specific IgE in allergic patients: time for a reappraisal? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(11):67. <http://doi.org/cphh>.
  66. **Abuaf N, Rostane H, Barbara J, Toly-Ndour C, Gaouar H, Mathelier-Fusade P, et al.** Comparison of CD63 Upregulation Induced by NSAIDs on Basophils and Monocytes in Patients with NSAID Hypersensitivity. *J Allergy*. 2012;2012:580873. <http://doi.org/b5c4vn>.
  67. **Aranda A, Mayorga C, Ariza A, Dona I, Rosado A, Blanca-Lopez N, et al.** In vitro evaluation of IgE-mediated hypersensitivity reactions to quinolones. *Allergy*. 2011;66(2):247-54. <http://doi.org/d4cpnw>.
  68. **Baybek S, Ikinciogullari A, Dursun AB, Guloglu D, Arikan M, Elhan AH, et al.** Upregulation of CD63 or CD203c alone or in combination is not sensitive in the diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug intolerance. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;150(3):261-70. <http://doi.org/cg73hv>.
  69. **De Week AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Sturm G, Bilo MB, et al.** Diagnosis of immediate-type beta-lactam allergy in vitro by flow-cytometric basophil activation test and sulfidoleukotriene production: a multicenter study. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2009;19(2):91-109.
  70. **Eberlein B, León-Suárez I, Darsow U, Ruëff F, Behrendt H, Ring J.** A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(3):411-8. <http://doi.org/c54wtb>.
  71. **Gómez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G, et al.** Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrrone: value of basophil activation test in the identification of patients. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(8):1217-24. <http://doi.org/d6h4vb>.
  72. **Kim MS, Cho YJ.** Flow Cytometry-Assisted Basophil Activation Test as a Safe Diagnostic Tool for Aspirin/NSAID Hypersensitivity. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012;4(3):137-42. <http://doi.org/gcbrv9>.
  73. **Korosec P, Mavsar N, Bajrovic N, Silar M, Mrhar A, Kosnik M.** Basophil responsiveness and clinical picture of acetylsalicylic acid intolerance. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155(3):257-62. <http://doi.org/bw3hvg>.
  74. **Pinnobphun P, Buranapraditkun S, Kampitak T, Hirankarn N, Klaewsongkram J.** The diagnostic value of basophil activation test in patients with an immediate hypersensitivity reaction to radiocontrast media. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106(5):387-93. <http://doi.org/ctd2sg>.
  75. **Rodríguez-Trabado A, Cámara-Hijón C, Ramos-Cantariño A, Porcel-Carreño SL, Jiménez-Timón S, Pereira-Navarro G, et al.** Basophil activation test for the in vitro diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Allergy Asthma Proc*. 2008;29(3):241-9. <http://doi.org/b99chj>.
  76. **Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, Mascart F, et al.** Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(8):1234-45. <http://doi.org/bd3jjx>.
  77. **Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J.** 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*. 2012;130(1):155-61. <http://doi.org/f2gmjg>.
  78. **Korosec P, Erzen R, Silar M, Bajrovic N, Kopac P, Kosnik M.** Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(11):1730-7. <http://doi.org/fqhm3>.
  79. **Peternej A, Silar M, Bajrovic N, Adamic K, Music E, Kosnik M, et al.** Diagnostic value of the basophil activation test in evaluating Hymenoptera venom sensitization. *Wien klin Wochenschr*. 2009;121(9-10):344-8. <http://doi.org/c7nkdc>.
  80. **Khan FM, Ueno-Yamanouchi A, Serushago B, Bowen T, Lyon AW, Lu C, et al.** Basophil activation test compared to skin prick test and fluorescence enzyme immunoassay for aeroallergen-specific Immunoglobulin-E. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2012;8(1):1. <http://doi.org/fxngxf>.
  81. **Özdemir SK, Güloğlu D, Sin BA, Elhan AH, İkinciogullari A, Misirligil Z.** Reliability of basophil activation test using CD203c expression in diagnosis of pollen allergy. *Am J Rhinol Allergy*. 2011;25(6):e225-31. <http://doi.org/fwhj4q>.
  82. **Wolanczyk-Medrala A, Gogolewski G, Liebhart J, Gomulka K, Litwa M, Panaszek B, et al.** A new variant of the basophil activation test for allergen-induced basophil CD63 upregulation. The effect of cetirizine. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2009;19(6):465-73.
  83. **Erdmann SM, Sachs B, Kwiciecien R, Moll-Słodowy S, Sauer I, Merk HF.** The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy*. 2004;59(10):1102-9. <http://doi.org/dcj3k3>.
  84. **Frezolini A, Cadoni S, De Pita O.** Usefulness of the CD63 basophil activation test in detecting Anisakis hypersensitivity in patients with chronic urticaria: diagnosis and follow-up. *Clin Exp Dermatol*. 2010;35(7):765-70. <http://doi.org/dp9s2j>.
  85. **Santos AF, Douiri A, Bécares N, Wu SY, Stephens A, Radulovic S, et al.** Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(3):645-52. <http://doi.org/f2tqs6>.
  86. **Uyttebroek AP, Sabato V, Faber MA, Cop N, Bridts CH, Lapeere H, et al.** Basophil activation tests: time for a reconsideration. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(10):1325-35. <http://doi.org/f7fwj7>.
  87. **Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R, De Gironcoli M, Solero P, Tridente G, et al.** Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy*. 2008;6:12. <http://doi.org/dwdp6f>.
  88. **Eberlein-König B, Varga R, Mempel M, Darsow U, Behrendt H, Ring J.** Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy*. 2006;61(9):1084-5. <http://doi.org/d8qxcj>.