

## ARTIGO REVISÃO

Acta Med Port 2005; 18: 445-452

# ALERGIA A VENENO DE HIMENÓPTEROS

## Novos métodos de diagnóstico

BEATRIZ TAVARES

Serviço de Imunoalergologia. Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra.

## RESUMO

Nos últimos anos o aumento da frequência de doentes com história de anafilaxia à picada de himenópteros e testes convencionais negativos levou à aplicação de novas técnicas no diagnóstico desta alergia como o *Western blot* e provas de provocação *in vitro*, envolvendo a activação dos basófilos, com ulterior medição de mediadores como a histamina e os sulfidoleucotrienos (CAST - *Cellular Antigen Stimulation Test*) ou com a detecção de marcadores de activação na superfície celular por citometria de fluxo (*Flow CAST*). Neste artigo revêm-se sumariamente estas técnicas e o seu valor no diagnóstico deste tipo de alergia.

Palavras chave: *alergia, himenópteros, basófilos, histamina, sensibilidade, especificidade.*

## SUMMARY

**HYMENOPTERA VENOM ALLERGY – NEW DIAGNOSTIC METHODS**

During the past years, the number of patients with both anaphylaxis to hymenoptera sting and negative IgE detected by conventional methods has been increasing. To obviate this problem new assays have been tried, such as *Western blot* and *in vitro* challenge tests involving basophile activation, with either the measurement of histamine and sulphidoleukotrien released (CAST – *Cellular Antigen Stimulation Test*) or the detection of activation markers on the cell surface with flow cytometric analysis (*Flow CAST*). In this paper the principles of these assays as well as their diagnostic value in hymenoptera allergy are briefly reviewed.

Key words: *hymenoptera, allergy, basophile, histamine, sensitivity, specificity.*

## INTRODUÇÃO

As picadas de abelha, vespa ou outro himenóptero desencadeiam na grande maioria dos casos uma reacção local ligeira e em cerca de 2 a 19% uma reacção local exuberante, necessitando apenas de tratamento sintomático. No entanto, 0,8 a 5% da população desenvolve reacção anafiláctica ao veneno<sup>1</sup>. Segundo os critérios da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica<sup>1</sup> e da Academia Americana de Alergologia, Asma e Imunologia<sup>2</sup>, além de informações sobre medidas de evicção e utilização de kit de auto-administração de adrenalina, é este último grupo que necessita de investigação ulterior para decisão sobre a necessidade de imunoterapia com veneno.

O algoritmo diagnóstico da alergia a veneno de himenópteros inclui a história de anafilaxia, e a demonstração da existência de IgE específica ao veneno do insecto agressor por testes cutâneos ou doseamento sérico (figura 1).

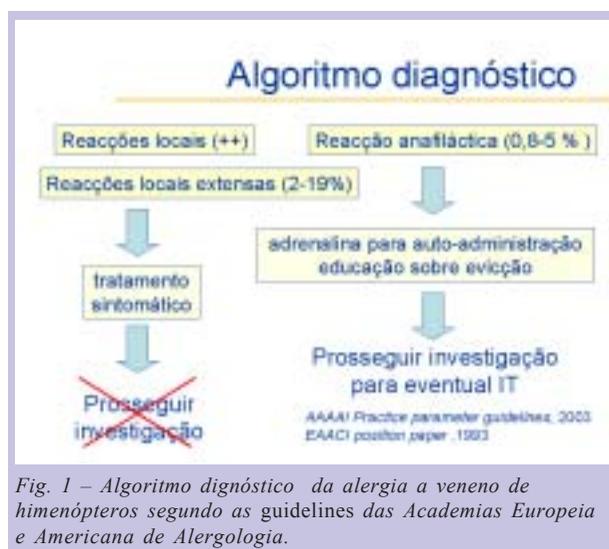


Fig. 1 – Algoritmo diagnóstico da alergia a veneno de himenópteros segundo as guidelines das Academias Europeia e Americana de Alergologia.

A identificação de um número cada vez maior de doentes com reacções anafiláticas e testes cutâneos negativos, tem preocupado cada vez mais os investigadores dedicados a esta área e levou mesmo à alteração das *guidelines* americanas em 2003, passando a incluir a repetição dos testes cutâneos e a aceitar a IgE sérica específica ao veneno como um teste diagnóstico complementar na decisão para iniciar imunoterapia (figura 2).

Não há dúvida que nos últimos anos houve uma melhoria da *performance* dos métodos serológicos de doseamento de IgE sérica específica, quer na instrumentação com uma maior precisão devido à automatização, a utilização de métodos de calibração mais fáceis de comparar

com a referência da OMS para a IgE total no soro, a melhoria dos programas de controlo de qualidade intra-ensaio e algoritmos de análise de dados mais precisos e quantitativos. Verificou-se também uma melhor capacidade dos materiais de adsorção alergénica, garantindo excesso de alergénios não solúveis e uma evolução nos reagentes, com utilização de venenos de himenópteros mais purificados, caracterizados e reprodutíveis, reagentes anti-IgE humana mono e policlonal mais ávidos e específicos e utilização de marcadores não isotópicos mais seguros<sup>2</sup>.

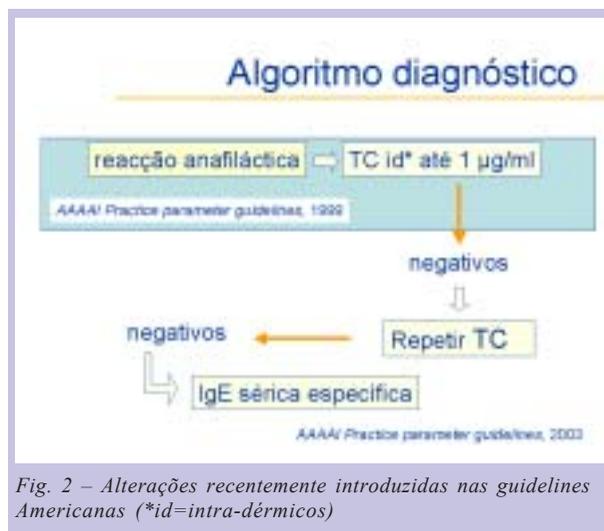


Fig. 2 – Alterações recentemente introduzidas nas guidelines Americanas (\*id=intra-dérmicos)

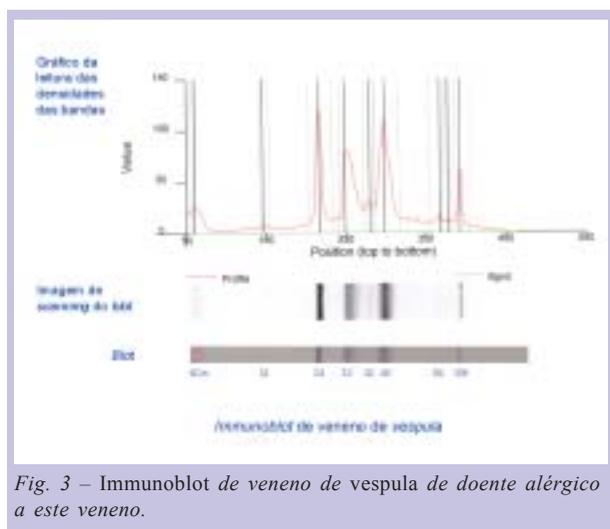
### Novos métodos de diagnóstico

Apesar de toda esta evolução, persistem casos de reacções anafiláticas com testes cutâneos negativos e IgE sérica específica negativa. Este facto tem conduzido à utilização de métodos alternativos no diagnóstico da alergia a veneno de himenópteros.

Assim, nos últimos anos têm sido estudadas as capacidades diagnósticas do *Western blot* nesta área.

Os extractos alergénicos são constituídos por uma mistura complexa de proteínas, que podem ser separadas electroforéticamente por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A incubação desta matriz com o soro do doente e posteriormente com anticorpo monoclonal anti-IgE, anti-IgG ou outro marcado com uma enzima (ex. fosfatase alcalina) que reage com uma substância cromogénica entretanto adicionada, revela o padrão de anticorpos específicos de cada indivíduo. Para uma análise mais detalhada, é feito em seguida o *scanning* e a avaliação qualitativa e semi-quantitativa por meio de densitometria, para detectar as bandas. Medindo a distância de cada banda desde o ponto de aplicação do corante, os pesos moleculares são calculados, de acordo

com uma fórmula baseada em pesos moleculares *standard* (figura 3).



Este método permite obter uma informação mais detalhada do que a pura detecção de anticorpos específicos de veneno<sup>3</sup>. Além da confirmação da presença de bandas alergénicas específicas, pode ser utilizado no controlo de qualidade de alergénios, na análise de determinantes, na estimativa de pesos moleculares, em estudos de inibição e de reactividade cruzada e na monitorização de imunoterapia.

Zollner et al em 2001, num estudo em 30 doentes alérgicos a veneno de vespa e, em 20 recém-nascidos e 30 indivíduos sem história de reacção sistémica ou local exuberante à picada de himenóptero que serviram como controlo, verificou uma elevada sensibilidade (100%) deste método, comparativamente aos testes cutâneos (87%) e ao doseamento de IgE no soro (AlaSTAT *microplate*) (90%). A especificidade, considerando o aparecimento de uma única banda como resultado positivo, foi inferior à

ideal (70%), quando comparada com a obtida para os testes cutâneos (90%) e o doseamento de IgE sérica específica (93%). No entanto, se as bandas correspondentes ao antigénio 5 e à hialuronidase, alergénios *major* do veneno de vespa, fossem identificadas, a especificidade subia para os 97% e 100% respectivamente. Estes resultados levaram os autores a concluir que a superioridade do *Western blot* no que respeita à sensibilidade e especificidade, faz deste teste uma técnica com valor no diagnóstico da alergia a veneno de vespa<sup>3</sup> (Quadro I).

Recentemente têm sido aplicadas ao estudo da alergia a venenos as **provas de provocação *in vitro***, envolvendo a activação dos basófilos, com posterior medição de mediadores como a histamina e os sulfidoleucotrienos (CAST - *Cellular Antigen Stimulation Test*) ou detecção de marcadores de activação na superfície celular por citometria de fluxo (*Flow CAST*).

Estes testes têm início com a separação de células com um gradiente de densidade (ex. *Ficol Hypaque*) a partir de sangue total anti-coagulado com heparina.

As células isoladas são incubadas com controlo negativo (solução salina), controlo positivo (anti-IgE) e alergénios a testar (ex. veneno), por um período de tempo definido e com um número pré-definido de concentrações. Posteriormente, podem ser efectuadas várias medições para identificar indivíduos em que os basófilos tenham sido activados pela pré-incubação com veneno, presumivelmente através da ligação do anticorpo IgE ao receptor Fc epsilon<sup>4</sup> (figura 4).

Os **testes de libertação de histamina pelos basófilos<sup>5</sup>** e o ***cellular allergosorbent test (CAST)*<sup>6</sup>** envolvem medições quantitativas de histamina pré-formada ou sulfidoleucotrieno C4 produzido *de novo* respectivamente, que são libertados quando o alergénio estabelece uma

Quadro I – Análise comparativa da sensibilidade e especificidade dos vários testes

Veneno	Doentes (n)	Controlos (n)	Western blot		CAST (LTC4)		Teste libertação de histamina		Flow CAST		slgE		Testes cutâneos		Ref
			sen	esp	sen	esp	sen	esp	sen	esp	sen	esp			
Vespa	30	Recém-nascidos 20	100%	70%							90%	93%	87%	90%	3
		Adultos 30													
Himenópteros	45	10			100%		89%		100%	100%	88%		85%		33
Himenópteros	26	8					87%	86%	87%	91%					14
Vespa	50	20							92%	80%	76%	85%	100%		36
Abelha Vespa e Polistes Total	23	30							91,3%	90,0%	95,7%	70,0%	95,7%		26
	34								85,3	83,3%	88,2%	63,3%	91,2%		
	57								87,7	86,7%	91,2%	66,7%	93,0%		

sen – sensibilidade; esp – especificidade; slgE – doseamento de IgE sérica específica; Ref – referência

ponte entre duas moléculas de IgE na superfície dos basófilos. Contudo, o consumo de tempo e o custo destes ensaios em dois tempos (a) incubação celular e (b) quantificação de mediadores, tem limitado a sua aplicação<sup>4</sup> (figura 4).

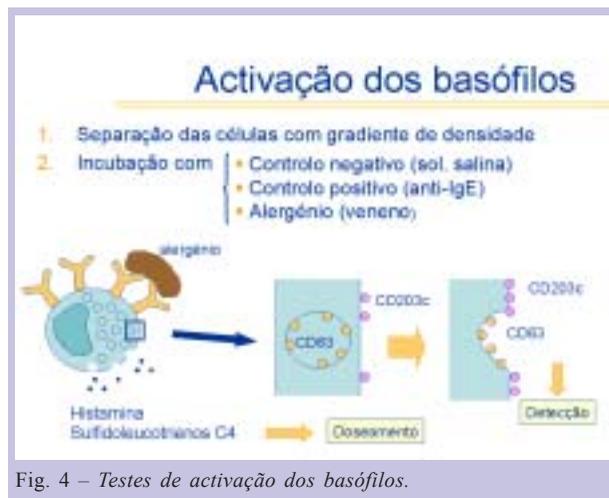


Fig. 4 – Testes de activação dos basófilos.

Com a técnica de **citometria de fluxo**, tornou-se possível a análise das características fenotípicas e alterações das células quando marcadas com anticorpos específicos conjugados com fluorocromos ou corantes. Os fluorocromos são usualmente excitados por luz laser e a fluorescência é emitida e quantificada por um ou vários fotomultiplicadores, permitindo a detecção simultânea de um ou vários fluorocromos. A base do diagnóstico de alergia pela citometria de fluxo é a quantificação de alterações na expressão de marcadores na superfície da membrana dos basófilos. Estas células, quando encontram um alérgeno específico reconhecido pela IgE ligada ao receptor de superfície FcεRI, não só segregam e geram mediadores bioativos quantificáveis, mas também aumentam a expressão de diferentes marcadores de superfície (ex. CD45, CD63, CD69, CD203c) que podem ser detectados por citometria de fluxo multicolor usando anticorpos monoclonais específicos. Presentemente, os marcadores mais frequentemente utilizados são o CD63 e o CD203c<sup>4</sup>.

O **CD63** (gp53) é membro da superfamília transmembrana-4 e é expresso em diferentes células, como os basófilos, os mastócitos, os macrófagos e as plaquetas<sup>7,8</sup>. Nos granulócitos em repouso, o CD63 está localizado nas membranas dos grânulos intra-citoplasmáticos e praticamente ausente da superfície celular<sup>9-11</sup>, mas durante a exocitose quando as membranas dos grânulos se fundem com a membrana celular, é translocado para a superfície celular<sup>12-14</sup> (figura 4).

Nos basófilos, foi demonstrada uma correlação estreita entre a expressão de CD63 e a libertação de histamina<sup>15</sup>.

O **CD203c** (ectonuclido pirofosfatase / fosfodiesterase 3) é expresso selectivamente na superfície de basófilos, mastócitos e seus progenitores CD34<sup>+</sup>16-18 e aumenta a sua produção em resposta à ligação de alérgenos ou anti-IgE a duas moléculas de IgE na superfície celular<sup>19,20</sup>. Binder M e col. verificaram que após incubação de células com veneno em doentes sensibilizados, a expressão deste marcador aumentou 2 a 11 vezes em 27 dos 34 doentes testados<sup>21</sup> (figura 4).

### Aspectos técnicos

Após separação das células com gradiente de densidade e *priming* com IL3, para indução de uma maior libertação de mediadores ou expressão de CD63<sup>22-24</sup> e aumento da sensibilidade do teste<sup>21,25</sup>, procede-se à incubação com controlo negativo (solução salina), controlo positivo (anti-IgE) e extracto alérgénico nativo (veneno), ou alérgénico recombinante. Posteriormente, efectua-se a marcação celular com anti-IgE-FITC (ou anti-CDw123-ficoeritina) e para melhorar a identificação de basófilos, com anti-CD45-PE-cianina (ou anti-HLA-DR-ficoeritina-cianina 5). Finalmente, os basófilos activados são marcados com anti-CD63-PE (ou anti-CD63-FITC). Os basófilos são identificados como a única população de células que cora positivamente para o CDw123 e negativamente para HLA-DR<sup>26</sup>. Posteriormente os eritrócitos são lisados e os leucócitos fixados. As percentagens de basófilos activados são corrigidas, subtraindo a expressão espontânea de CD63 (controlo negativo) do valor obtido com a estimulação alérgica<sup>27</sup>.

A quantificação de expressão do CD203c é comparável ao método descrito acima, mas como a expressão de CD203c é exclusiva dos basófilos no sangue periférico, não é necessário a utilização de anti-IgE para identificação dos basófilos<sup>4</sup>.

O teste de activação dos basófilos é um teste *in vitro* simples e rápido, e tem sido sugerido como procedimento útil no diagnóstico de alergia alimentar<sup>12</sup>, a pólen<sup>28</sup>, ácaros<sup>29</sup>, medicamentos<sup>30,31</sup>, látex<sup>32</sup> e também na alergia a himenópteros<sup>33</sup>.

Sainte-Laudy J *et al* em 2000 verificaram um aumento de libertação de histamina e LTC4 em doentes sensibilizados a venenos, uma diminuição significativa da densidade de fluorescência e do número de células IgE positivas e um aumento significativo de células CD63 positivas.

O *Flow* CAST revelou uma grande sensibilidade (100%) e especificidade (100%) comparado com a história clínica, testes cutâneos e IgE sérica específica. A sensibilidade para os testes cutâneos foi de 85% e para a IgE sérica específica (CAP) de 88%; o *Flow* CAST e o teste de libertação de leucotrieno C4 foram os testes mais sensíveis (100%) seguidos do teste de libertação de histamina (89%). Verificou-se ainda uma correlação estatisticamente significativa entre o *Flow* CAST e a libertação de histamina e leucotrienos (CAST) pelas mesmas células<sup>33</sup>.

Santos *et al* em 2002 contrariamente ao estudo anterior, não encontraram resultados semelhantes para o CAST. Verificaram no estudo efectuado em 14 doentes alérgicos a venenos, existir uma boa correlação entre os resultados de IgE específica detectada por testes cutâneos, serologia e *Western blot*, não existindo no entanto, correlação significativa entre estes três métodos e o CAST. Concluíram que os resultados positivos no CAST levantam algumas questões acerca da possibilidade de existência de mecanismos de activação celular não dependentes da IgE e que o *immunoblot* pode ser um método adicional valioso no estudo da alergia a veneno de himenópteros<sup>34</sup>.

Lambert C *et al*, comparando o método de detecção de CD63 nos basófilos activados por citometria de fluxo com o teste de libertação de histamina em 26 doentes alérgicos e oito controlos não alérgicos, verificaram existir uma grande variabilidade na libertação de histamina nos diferentes indivíduos, vários não respondendo à anti-IgE. O CD63 não foi expresso de modo significativo nos basófilos não provocados, e a anti-IgE induziu a expressão de CD63 em  $38,5 \pm 19,7\%$  dos basófilos com grande variação (7,9 a 75,7%). A anti-IgE induziu  $50,4 \pm 14,5\%$  do total da histamina celular (15 a 86%) existindo uma grande discrepância entre as respostas específicas ao veneno. Concluíram que a sensibilidade e especificidade é semelhante nos dois métodos na detecção de IgE específica nos basófilos, embora o significado clínico destes testes deva ser elucidado com mais estudos<sup>14</sup>.

Eberlein-Koning B *et al* verificaram em 14 doentes alérgicos existir concordância em mais de 50% dos casos entre os testes cutâneos e o CAST, o *Flow* CAST e o teste de libertação de histamina, embora a correlação entre os dois primeiros métodos tivesse sido maior do que entre o CAST e o teste de libertação de histamina<sup>35</sup>.

Recentemente Erdmann *et al* e Sturm *et al* compararam a detecção de CD63 por citometria de fluxo com os testes

cutâneos e a IgE sérica específica (CAP System). No primeiro trabalho foi utilizada a técnica de marcação de basófilos com anti-IgE; no segundo, utilizaram o anti-CD123 e anti-HLA-DR que obviam alguns problemas da técnica clássica.

Erdmann *et al* estudaram 50 alérgicos e 20 controlos, verificando uma sensibilidade de 92% para o teste de activação dos basófilos, 76% para a IgE sérica específica e 100% para os testes cutâneos. A especificidade foi mais elevada para a IgE sérica específica (85%) em relação ao teste de activação dos basófilos (80%). A reactividade à IgE a veneno de vespa correlacionou-se positivamente com o número de basófilos CD63+ ( $r=0,65$ )<sup>36</sup>.

Sturm *et al* estudaram 57 alérgicos e 30 controlos, verificando uma sensibilidade de 87,7% para o teste de activação dos basófilos, 91,2% para a IgE sérica específica e 93% para os testes cutâneos. A especificidade para o teste de activação dos basófilos foi de 86,7% e para a IgE específica de 66,7%. Nestes trabalhos, o teste de activação dos basófilos parece ser um método apropriado para identificar doentes alérgicos a veneno de himenópteros com uma sensibilidade comparável à dos métodos diagnósticos *standard*<sup>26</sup>.

No quadro I comparam-se a sensibilidade e especificidade dos vários testes segundo os diferentes autores.

O teste de activação dos basófilos baseado no CD63 parece ter várias limitações, comparativamente com o baseado no CD203c: necessita de anti-IgE adicional para identificar os basófilos; no entanto, os monócitos que também expressam FcεRI e CD63 podem interferir. Pode ainda equacionar-se o facto de a anti-IgE poder continuar a activação dos basófilos após estimulação alérgica, mas este problema é obviado por arrefecimento das células após estimulação alérgica e antes de juntar anti-IgE-FITC. Outro factor apontado é o facto de uma fracção de CD63 das plaquetas contaminantes activadas poder ligar-se aos basófilos; contudo, as plaquetas não aumentam a expressão de CD63 com a estimulação alérgica. Presentemente, a análise comparativa entre os dois métodos permite concluir pela existência de uma correlação significativa<sup>4</sup>.

Os estudos com anti-CD123 e anti-HLA-DR podem obviar alguns destes pontos.

Os testes de activação dos basófilos têm utilidade no estudo de casos difíceis, mas como testes diagnósticos secundários, pois exigem tratamento das amostras no período de 24 horas, o que desencoraja o uso rotineiro. A selecção do alergénio é importante e necessitam de ser realizados com múltiplas concentrações de veneno para

assegurar uma activação máxima. Existem falsos negativos: cerca de 5% dos doentes têm fenótipo não libertador, não reagindo ao controlo positivo (ex. anti-IgE); os basófilos podem estar em período refractário devido a exposição recente ao alérgeno (4 a 6 semanas) e alguns medicamentos como os glucocorticóides, a ciclosporina A e os imunomoduladores interferem nos resultados dos testes<sup>4</sup>.

Em conclusão o *Western blot* e os testes de provocação celular *in vitro* baseados na análise por citometria de fluxo do CD63 e CD203c, bem como os baseados na libertação de histamina e sulfidoleucotrienos parecem ter valor no estudo de casos difíceis, mas devem ser considerados como testes diagnósticos suplementares.

## BIBLIOGRAFIA

1. Position paper: Immunotherapy with hymenoptera venoms. (EAACI) The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48(14 Suppl):36-46.
2. GOLDEN DB, TRACY JM, FREEMAN TM, HOFFMAN DR: Insect Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Negative venom skin test results in patients with histories of systemic reaction to a sting. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:495-8.
3. ZOLLNER TM, SPENGLER K, PODDA M, ERGEZINGER K, KAUFMANN R, BOEHNCKE WH: The Western blot is a highly sensitive and efficient technique in diagnosing allergy to wasp venom. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1754-61.
4. EBO DG, HAGENDORENS MM, BRIDTS CH, SCHUERWEGH AJ, DE CLERCK LS, STEVENS WJ: In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004; 34:332-9.
5. NOLTE H: The clinical utility of basophil histamine release. *Allergy Proc* 1993; 14:251-4.
6. DEWECK AL, STADLER BM, URWYLER A, WEHENER HU, BÜHLMANN RP: Cellular allergen stimulation test (CAST). *Allergy Clin Immunol News* 1993; 5:9-14.
7. NIEUWENHUIS HK, VAN OOSTERHOUT JJ, ROZEMULLER E, VAN IWAARDEN F, SIXMA JJ: Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood* 1987; 70:838-45.
8. METZELAAR MJ, WIJINGAARD PL, PETERS PJ, SIXMA JJ, NIEUWENHUIS HK, CLEVERS HC: CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1991; 266:3239-45.
9. FÜREDER W, AGIS H, SPERR WR, LECHNER K, VALENT P: The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils. *Allergy* 1994; 49: 861-5.
10. VALENT P, SCHERNTHANER GH, SPERR WR et al: Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. *Immunol Rev* 2001;179:74-81.
11. YOSHIMURA C, YAMAGUCHI M, TIKURA M et al: Activation markers of human basophils: CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:817-23.
12. MONNERET-VAUTRIN DA, SAINTE-LAUDY J, KANNY G, FREMONT S: Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82:33-40.
13. SAINTE-LAUDY J, SABBAH A, VALLON C, GUERIN JC: Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. *Inflamm Res* 1998; 47:401-8.
14. LAMBERT C, GUILLOUX L, DZVIGA C, GOURGAUD-MASSIAS C, GENIN C: Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to Hymenoptera venom. *Cytometry* 2003; 52B:13-9.
15. KNOL EF, MUL FPJ, JANSEN H, CALAFAT J, ROOS D: Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:328-38.
16. BUHRING HJ, SEIFFERT M, GIESERT C et al: The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood* 2001; 97:3303-5.
17. BUCKLEY MF, LOVELAND KA, MCKINSTRY WJ, GARSON OM, GODING JW: Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. cDNA cloning of the human molecule, amino acid sequence, and chromosomal location. *J Biol Chem* 1990; 265:17506-11.
18. MURATA J, LEE HY, CLAIR T et al: cDNA cloning of the human tumor motility stimulating protein, autotoxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 1994; 269: 30479-84.
19. HAUSWIRTH AW, NATTER S, GHANNADAN M et al: Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:102-9.
20. BUHRING HJ, SIMMONS PJ, PUDNEY M et al: The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; 94:2343-56.
21. BINDER M, FIERLBECK G, KING T, VALENT P, BUHRING HJ: Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:160-8.
22. KURIMOTO Y, DE WECK AL, DAHINDEN CA: The effect of interleukin 3 upon IgE-dependent and IgE-independent basophil degranulation and leukotriene generation. *Eur J Immunol* 1991; 21:361-8.
23. SUGIYAMA H, EDA R, HOPP RJ, BEWTRA AK, TOWNLEY RG: Importance of interleukin-3 on histamine release from human basophils. *Ann Allergy* 1993; 71:391-5.
24. MIADONNA A, SALMASO C, COTTINI M, MILAZZO N, TEDESCHI A: Enhancement of basophil histamine release by interleukin-3: reduced effect in atopic subjects. *Allergy* 1996; 51:525-31.
25. COZON G, FERRANDIZ J, PEYRAMOND D, BRUNET J: Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1999; 27:182-7.
26. STURM GJ, BOHM E, TRUMMER M, WEIGLHOFER I, HEINEMANN A, ABERER W: The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy*

- 2004; 59:1110-7.
27. EBO DG, LECHKAR B, SCHUERWEGH AJ, BRIDTS CH, DE CLERCK LS, STEVENS WJ: Validation of a two-color flow cytometric assay detecting *in vitro* basophil activation for the diagnosis of IgE mediated natural rubber latex allergy. *Allergy* 2002; 57:706-12.
28. SAPORTA M, KAMEI S, PERSI L, BOUSQUET J, ARNOUX B: Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens. *Allergy* 2001; 56:442-5.
29. SANZ ML, SANCHEZ G, GAMBOA PM, et al: Allergen induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1007-13
30. 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; 102:192-9.
31. SANZ ML, GAMBOA PM, ANTEPARA I et al: Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:277-86.
32. SANZ ML, GAMBOA PM, GARCIA-AVILES C, et al: Flow cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130:33-9.
33. SAINTE-LAUDY J, SABBAAH A, DROUET M, LAURET MG, LOIRY M: Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1166-71.
34. SANTOS MC, CARLOS ML, PEDRO E, CARLOS AG: Laboratory diagnosis of hymenoptera venom allergy: comparative study between specific IgE, western blot and allergen leukocyte stimulation (CAST). *Allerg Immunol (Paris)* 2002; 34:6-9.
35. EBERLEIN-KONIG B, RAKOSKI J, BEHRENDT H, RING J: Use of CD63 expression as marker of *in vitro* basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004; 14:10-6.
36. ERDMANN SM, SACH B, KWIECIEN R, MOLL-SLODOWY S, SAUER I, MERK HF: The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 2004; 59:1102-9.

