

Il test di attivazione dei basofili in citofluorimetria nella diagnosi delle reazioni allergiche e pseudo allergiche ad antibiotici betalattamici e FANS

I. Brusca^a, S. Corrao^b, G. Sceusa^a, M. Barrale^a, G. Dragotto^c, T. Gristina^a, P. Li Vigni^a, V. Cantisano^a, S.M. La Chiusa^a

^aU.O. di Patologia Clinica, Ospedale Buccheri La Ferla F.B.F. Palermo

^bDipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi, Palermo

^cU.O. di Allergologia, A.R.N.A.S., Ospedale Civico, Palermo

Riassunto

Premesse. La diagnosi dell'allergia a farmaci presenta molte difficoltà ed incertezze. Recentemente sono stati proposti metodi che utilizzano marcatori di attivazione dei basofili, evidenziabili in citofluorimetria dopo incubazione delle cellule in vitro con il farmaco.

Metodi. Nel nostro studio abbiamo analizzato i risultati ottenuti con questa metodica nella diagnosi delle reazioni di ipersensibilità a farmaci. La popolazione studiata è stata costituita da 138 pazienti consecutivi con reazioni avverse da farmaci ed un gruppo di volontari sani. Il gruppo A consiste in 92 pazienti con reazione allergica determinata da antibiotici betalattamici (BLAT); il gruppo B da 46 pazienti con ipersensibilità a NSAID. Il gruppo di controllo da 30 volontari che non avevano mai avuto reazioni allergiche a farmaci e che avevano nell'ultimo anno assunto NSAID e BLAT (gruppo C). L'attivazione dei basofili è stata valutata in citofluorimetria utilizzando come marker il CD63. Gli allergeni testati sono stati: Metamizolo, Aspirina, Ibuprofene e Acetaminofene per i NSAID; Penicillina G, Penicillina V, Amoxicillina, Ampicillina MDM, PPL e

Cefuroxime per i BLAT. Sono stati considerati positivi gli allergeni con una attivazione dei basofili almeno doppia rispetto al controllo negativo del paziente.

Risultati. Nel gruppo A 58 su 92 pazienti erano positivi ad almeno uno dei farmaci testati (sensibilità = 63,0%; 95%CI 53,6-72,5). Nel gruppo B 30 su 46 pazienti presentavano attivazioni significative dei basofili (sensibilità = 65,2; 95%CI 55,9-74,5). Nel gruppo C 4 pazienti erano positivi ai BLAT e 7 ai NSAID. La specificità del test nei confronti dei farmaci testati è stata quindi 86% (95%CI 80,00-93,33) per i BLAT e di 76,7 (95%CI 68,4-84,9) per i NSAID. Il valore predittivo positivo è risultato 93,5 (95%CI 88,7-98,4) per i BLAT e 81,1 per i NSAID (95%CI 73,4-88,8). Il valore predittivo negativo è risultato 43,3 (95%CI 33,6-53,1) per i BLAT e 60,5 per i NSAID (95%CI 50,9-70,1).

Conclusioni. I risultati ottenuti evidenziano, la sensibilità del metodo rispetto agli altri test *in vitro* e la sua capacità di diagnosticare anche le reazioni pseudoallergiche ma i dati sulla specificità suggeriscono la necessità di una attenta valutazione clinica.

Summary

Flow cytometric basophil activation test in patients with allergic or pseudoallergic reactions to betalactamic antibiotics and non steroidal anti-inflammatory drugs

Background. The diagnosis of hypersensitivity drug reac-

tions may be difficult and uncertain. Recently, new diagnostic tools has been introduced. They measure activation markers of human basophil by the use of cytofluorometry after in vitro incubation of these cells with drug. We analysed the results obtained by these tool in the diagnosis of hypersensitivity drug reaction.

Methods. We studied 138 patients who suffered from hypersensitivity drug reactions [92 out of 138 had had an hypersensitivity reaction caused by betalactamic antibiotics (group A) and 46 by NSAIDs (group B)] and 30 volunteers (group C) who had never had hypersensitivity reactions. All of the healthy subjects had undertaken NSAID and antibiotics in the last 12 month. Basophil activation has been studied by cytofluometry using CD63 as a marker. Tested allergenic antigens were: metimazol, ASA, ibuprofen, paracetamol (as NSAIDs) and penicillin G, penicillin V, amoxicillin, ampicillin, eMDM, PPL, cefuroxime, as betalactamic antibiotics (BLAT). Basophil activation was considered positive when we found out at least a doubled reaction respect to the control group.

Results. In group A, 58 patients out of 92 resulted po-

sitive for at least one of the studied drugs (sensitivity = 63,0; 95%CI 53,6-72,5). In group B, 30 out of 46 presented significant basophil activation (sensitivity = 65,2; 95%CI 55,9-74,5). In group C, 4 patients were positive for BLAT and 7 for NSAID. Specificity was respectively 86,7 (95%CI 80,0-93,3) for BLAT and 76,7 (95%CI 68,4-84,9) for NSAID. The positive predictive value was 93,5 (95%CI 88,7-98,4) for BLAT and 81,1 for NSAID (95%CI 73,4-88,8). The negative predictive value was 43,3 (95%CI 33,6-53,1) for BLAT and 60,5 for NSAID (95%CI 50,9-70,1).

Conclusions. Our data show a good diagnostic capacity of pseudo-allergic reaction by basophil activation, but specificity values suggest that we need more attention for a correct clinical evaluation.

Key words: CAST, CD63 expression, in vitro diagnosis.

Introduzione

L'identificazione degli antigeni responsabili di reazioni allergiche è essenziale sia ai fini diagnostici, sia per impostare misure efficaci di prevenzione nei riguardi di queste manifestazioni. I protocolli diagnostici prevedono, nella maggior parte dei casi, una accurata raccolta dei dati anamnestici, dei tests *in vivo* e dei tests di laboratorio. Per quanto riguarda la diagnostica delle reazioni allergiche a farmaci, i tests *in vivo* non sono privi di rischi e possono determinare sia falsi positivi che falsi negativi. Notevolmente carente è la diagnostica di laboratorio. Classicamente, infatti, in laboratorio vengono ricercate IgE specifiche per allergene. Nel caso dei farmaci, sono disponibili e scientificamente validati immunodosaggi per pochi farmaci, non molto sensibili e che tendono a negativizzarsi in poco tempo. Alcuni farmaci, in particolare gli anti infiammatori non steroidei (NSAID), possono d'altronde indurre degranolazioni delle cellule effettrici mediate da leucotrieni, complemento, per azione diretta del farmaco o comunque non da IgE. Oltre al dosaggio di IgE specifiche sono disponibili altri test di modesta diffusione nei laboratori di allergologia, che potrebbero ampliare le possibilità diagnostiche¹. Negli ultimi anni sono comparsi nella letteratura scientifica un certo numero di studi che hanno evidenziato il potenziale uso della citofluorimetria nella diagnostica *in vitro* delle allergopatie²⁻¹³. La base su cui si fondano questi test è la dimostrazione di un cambiamento del fenotipo di membrana dei basofili attivati dopo incubazione *in vitro* con l'allergene. Sono stati identificati diversi marcatori di membrana dei basofili che in corso di attivazione vanno incontro ad up o a down regulation. I marcatori maggiormente studiati sono il CD63 ed il CD203c.

Il CD63 (gp53) è una tetraspanina presente in differenti cellule (es. basofili, monociti, mastociti, piastrine). E' contenuta in granuli intracitoplasmatici e in corso di

attivazione viene espressa con grande densità sulla superficie cellulare^{4,14-19}. Il CD203c (neural cell surface differentiation antigen E-NPP3 PD-1 b B10, gp130PD-1 b B10, gp130 RB13-6), è espresso esclusivamente sui basofili, sui mastociti e sulle cellule loro progenitrici ed è, similmente al CD63, sovraespresso in corso di attivazione di questi tipi cellulari¹⁷⁻²⁴.

Un aspetto che è inoltre largamente discusso è l'utilizzo della IL-3. Questa citochina si è dimostrata in grado di incrementare la sensibilità del test, anche se a discapito della specificità²⁵⁻³³.

In questo studio abbiamo valutato un kit commerciale (Flow-Cast), in un gruppo di pazienti che avevano manifestato reazioni allergiche ad antibiotici betalattamici (BLAT) e ad anti infiammatori non steroidei, (NSAID), in confronto al dosaggio delle IgE specifiche commercialmente disponibili.

Lo scopo del nostro studio è stato valutare le prestazioni del Flow Cast alla luce di un suo possibile utilizzo clinico nella diagnostica delle reazioni allergiche o pseudoallergiche a NSAID ed a BLAT.

Materiali e metodi

La popolazione studiata è stata formata da 138 pazienti consecutivi, 92 di questi avevano sofferto di una reazione allergica documentata sicuramente riferibile a BLAT, in 89 si era trattato di sindrome orticaria-angiodema (SOA), in 3 casi di Shock Anafilattico (gruppo A); 46 pazienti avevano sofferto di SOA sicuramente riferibile ad un farmaco del pannello di NSAID testati (gruppo B). E' stata scelta come popolazione di controllo un gruppo di 30 donatori volontari, di cui 15 affetti da allergopatie respiratorie, che non avevano mai avuto reazioni allergiche a farmaci e che avevano nell'ultimo anno assunto NSAID e BLAT (gruppo C).

Il gruppo A era formato da 38 uomini e 54 donne, età media 30.1 anni (range 4-69). Il gruppo B era for-

mato da 18 uomini e 28 donne, età media 31.61 anni (range 7-66). Il gruppo C era formato da 14 uomini e 16 donne, età media 32.6 anni.

I pazienti dei gruppi A e B sono stati selezionati dopo un'attenta valutazione anamnestica e con i seguenti criteri di inclusione: reazione insorta entro due ore dall'assunzione del farmaco, nessun altro farmaco assunto nelle 24 ore precedenti, SOA avvenuta solamente in occasione dell'assunzione del principio attivo. Le reazioni allergiche erano avvenute da 1 mese a 2 anni prima dell'esecuzione del test. In 14 pazienti del gruppo A e 5 pazienti del gruppo B, che avevano assunto nuovamente il principio attivo la reazione si era ripetuta. Nessuno dei pazienti è stato sottoposto, a diagnostica *in vivo* prima dell'esecuzione dei tests *in vitro*, secondo le indicazioni del comitato etico.

È stato utilizzato il kit commerciale Flow Cast (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Svizzera). Il kit utilizza il CD63 come marcatore di attivazione dei basofili e prevede l'utilizzo di un tampone contenente IL-3 nelle fasi di isolamento delle cellule ed incubazione con l'allergene. I tests sono stati eseguiti seguendo le istruzioni del produttore. Sono state inoltre seguite le seguenti procedure: 1) i campioni sono stati processati entro un'ora dal prelievo, 2) i reagenti sono stati utilizzati entro una settimana dalla apertura del kit, 3) tutta la procedura fino al termine della incubazione dei campioni con l'allergene è stata eseguita sotto cappa a flusso laminare preventivamente bonificata e resa latex-free.

La lettura citofluorimetrica è stata effettuata a 488 nm sul citofluorimetro FACSSCAN II equipaggiato con laser 15 nW argon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e l'analisi effettuata con il software Cell Quest. Sono stati utilizzati gli allergeni disponibili dalla Bühlmann ad eccezione della preparazione commerciale Rocefin (Roche Ltd, Basilea, Svizzera), utilizzato nelle diluizioni seriali da 50 a 1000 mcg/ml in un paziente che era andato incontro a shock anafilattico in seguito alla sua somministrazione.

Gli allergeni Bühlmann utilizzati sono stati: penicillina V, penicillina G, amoxicillina, ampicillina, PPL, MDM, cefuroxime, per quanto riguarda i BLAT; ibuprofene, metamizolo, aspirina e acetaminofene per quanto riguarda i NSAID. Per ogni paziente è stato eseguito un controllo negativo, incubando le cellule solo con il tampone con IL-3 e un controllo positivo, incubando le cellule con un anti IgE. Sono stati considerati positivi gli allergeni che determinavano una attivazione superiore al 5% dei basofili ed almeno doppia rispetto al controllo negativo.

Sono state determinate le IgE specifiche per ampicillina, amoxicillina, penicilloyl G, penicilloyl V su strumentazione Immulite 2000 (DPC, Los Angeles, USA), Cefaclor su Unicap system (Phadia, Uppsala, Svezia), acido acetil salicilico e pirazolone su Eneasytem (Bioallergy, Roma). È stato inoltre dosato l'ECP sierico (DPC, Immulite 2000) in tutti i pazienti dei gruppi ana-

lizzati.

Sono stati quindi successivamente effettuati tests *in vivo*, dal prick test alla somministrazione della dose terapeutica, per quei farmaci che determinavano attivazioni inferiori al 5% ed al doppio del controllo negativo.

Risultati

Nel gruppo A 58 su 92 pazienti erano positivi con il Flow Cast ad almeno uno dei farmaci testati (sensibilità = 63,0; 95%CI 53,6-72,5). 36 pazienti sono risultati sensibili al PPL, 34 all'MDM, 28 all'amoxicillina, 26 all'ampicillina, 14 alla penicillina G, 22 alla penicillina V e 18 al Cefuroxime. Solamente in 13 casi il risultato è stato positivo per un singolo farmaco: 6 PPL, 3 MDM, 2 amoxicillina e 2 penicillina G. Il prospetto delle positività ai BLAT è presentato in dettaglio nella Tabella I. Nel gruppo C 4 pazienti presentavano attivazioni superiori al cut-off stabilito: 2 all'ampicillina, 1 all'amoxicillina ed uno al PPL. La specificità del test è stata pari quindi a 86,7 (95%CI 80,00-93,3). Nessuno dei tubi con le diluizioni di Rocefin ha determinato attivazione significativa dei basofili. Le IgE specifiche sono risultate positive ad almeno uno dei farmaci testati in 24/92 casi (sensibilità = 26,1; 95%CI 17,5-34,7), ed in nessun caso del gruppo di controllo. La maggiore concordanza si è avuta per l'ampicillina (test di concordanza k di Cohen = 0.76). La correlazione tra Flow Cast ed IgE specifiche è stata $r = 0.46$ ed in nessun caso si è riscontrata negatività al primo e positività al secondo test. Nel gruppo B 30 su 46 pazienti presentavano attivazioni significative dei basofili con il farmaco responsabile della reazione (sensibilità = 65,2; 95%CI 55,9-74,5). 18 risultavano sensibili alla lys-aspirina, 12 all'ibuprofene, 10 al metamizolo, 9 all'acetaminofene. In 20 casi l'attivazione dei basofili è stata indotta da un singolo farmaco: 12 dalla lys-aspirina, 4 dall'ibuprofene, 2 dal metamizolo, 2 dall'acetaminofene. Il prospetto delle positività ai NSAID è presentato in dettaglio nella Tabella II. Nel gruppo C in 7 casi si registrava una attivazione superiore al cut-off stabilito per i farmaci lys-aspirina (3 casi), metamizolo (2 casi), ibuprofene (2 casi). La specificità del test nei confronti dei NSAID è stata quindi del 76,7 (95%CI 68,4-84,9). Il valore predittivo positivo è risultato 93,5 (95%CI 88,7-98,4), per i BLAT e 81,1 per i NSAID (95%CI 73,4-88,8). Il valore predittivo negativo è risultato 43,3 (95%CI 33,6-53,1), per i BLAT e 60,5 per i NSAID (95%CI 50,9-70,1).

Le IgE specifiche per NSAID sono risultate positive in 1 paziente del gruppo B (ac. acetil salicilico), ed in nessuno del gruppo C. La correlazione tra i livelli di attivazione del controllo positivo e n. di sensibilizzazioni è stata di $r = 0.0866$ per i BLAT e di $r = -0.335$ per i NSAID. L'ECP sierico è stato trovato tendenzialmente elevato nei pazienti con attivazione basale > 15%, ma la correlazione tra questi due parametri è stata $r = 0.26$.

Tabella I. Prospetto delle positività riscontrate ai BLAT.

<i>Clinica</i>	<i>Penicillina G</i>	<i>Penicillina V</i>	<i>MDM</i>	<i>PPL</i>	<i>Amoxicillina</i>	<i>Ampicillina</i>	<i>Cefuroxime</i>
SOA	-	-	+	-	-	-	-
Anafilassi	+	+	+	+	+	+	+
SOA	-	-	-	+	-	-	-
SOA	-	-	-	-	+	+	-
SOA	-	-	-	+	-	+	+
SOA	-	+	+	+	+	+	+
SOA	-	-	+	-	-	-	-
SOA	-	+	+	+	+	+	+
SOA	+	+	+	+	+	+	+
SOA	-	-	-	+	+	+	+
SOA	-	-	-	-	+	-	-
SOA	-	+	-	-	-	-	+
SOA	-	-	+	+	+	+	+
SOA	-	-	-	+	-	-	-
SOA	+	+	+	-	+	-	-
SOA	-	+	+	+	-	+	-
SOA	-	-	+	+	-	+	-
SOA	-	-	+	+	+	-	-
SOA	+	+	+	+	-	-	-
SOA	+	+	-	+	+	+	+
SOA	-	-	+	+	-	-	-
SOA	-	+	+	+	+	+	-
SOA	+	+	+	+	+	+	-
SOA	-	-	-	+	-	-	-
SOA	-	-	+	-	-	-	-
SOA	-	-	+	-	-	-	-
SOA	+	-	+	+	+	+	+
SOA	-	-	+	+	+	-	-
SOA	-	-	-	-	+	+	-
SOA	-	-	-	+	-	-	+
SOA	-	+	+	+	+	-	+
SOA	+	-	-	-	-	-	-
SOA	-	+	+	+	+	+	+
SOA	-	+	+	+	+	+	+
SOA	-	-	-	+	+	-	+
SOA	-	-	-	-	+	-	-
SOA	-	+	+	-	-	-	+
SOA	-	-	+	+	+	+	+
SOA	-	-	-	+	-	-	-
SOA	-	-	+	+	+	+	+
SOA	+	+	+	+	+	+	+
SOA	+	-	+	+	-	+	-
SOA	-	+	+	+	+	+	-
SOA	-	+	+	+	+	+	-
SOA	-	-	+	+	+	+	-
SOA	-	+	+	-	+	+	-
SOA	+	+	+	+	+	+	+
SOA	+	-	+	+	-	+	-
SOA	-	+	+	+	+	+	-
SOA	+	+	+	-	+	+	-
SOA	-	-	-	+	-	-	-
SOA	-	-	-	+	-	-	-
Anafilassi	+	-	+	+	-	-	-
SOA	+	-	-	-	-	-	-

SOA=sindrome orticaria-angioedema; PPL= benzylpenicilloyl-polylysine; MDM= minor determinant mixture

Tabella II. Prospetto delle positività riscontrate ai NSAID.

<i>Clinica</i>	<i>Ibuprofene</i>	<i>Metamizolo</i>	<i>Acetaminofene</i>	<i>Lys-Aspirina</i>
SOA	+	+	+	+
SOA	-	+	-	-
SOA	-	-	+	-
SOA	+	+	-	-
SOA	-	+	+	+
SOA	-	-	-	+
SOA	-	-	-	+
SOA	+	+	+	+
SOA	+	-	-	-
SOA	-	-	-	+
SOA	-	-	-	+
SOA	+	-	-	-
SOA	-	-	-	+
SOA	+	-	-	-
SOA	-	-	-	+
SOA	-	-	-	+
SOA	-	-	-	+
SOA	+	+	-	-
SOA	-	-	-	+
SOA	+	-	+	+
SOA	+	+	+	+
SOA	+	+	-	+
SOA	-	-	-	+
SOA	-	-	-	+
SOA	-	+	+	-
SOA	-	-	+	-
SOA	-	+	-	-
SOA	-	-	-	+
SOA	+	-	+	-

SOA=sindrome orticaria-angioedema

In entrambi i gruppi di pazienti, la risposta non è stata apparentemente influenzata dal tempo trascorso dalla reazione allergica, in quanto si sono avute risposte positive anche nei casi di reazioni risalenti a 2 anni prima.

I tests in vivo effettuati in base ai criteri di scelta in precedenza citati, in 26 pazienti con BLAT ed in 20 con NSAID, sono risultati negativi.

Discussione

I risultati ottenuti mettono in evidenza nel caso dei BLAT, una sensibilità del Flow Cast superiore rispetto ai risultati riportati in letteratura ed una specificità leggermente inferiore^{34,35}. Utilizzando un cut-off pari a 3 volte il controllo negativo, i valori di sensibilità e specificità diventano pari rispettivamente al 47,83% ed al 96,67%, quindi simili ai dati della letteratura. Nel caso dei NSAID, la sensibilità riscontrata è simile a quanto riportato da Sanz et al.³⁶ con una specificità inferiore. In ogni caso benché la sensibilità riscontrata non è ele-

vata, i risultati ottenuti *in vivo* sono notevolmente promettenti, non avendo riscontrato alcun evento avverso alla somministrazione del farmaco nei pazienti negativi al test, secondo i criteri precedentemente riportati. Il Flow Cast può, a nostro parere, vantaggiosamente essere utilizzato per ridurre le probabilità pretest di avere reazioni indesiderate al test di provocazione. Grande attenzione bisogna porre, però, all'eliminazione di tutti quei fattori che possono indurre false attivazioni *in vitro*. A questo proposito, i livelli basali di attivazione non riflettono necessariamente una recente risposta allergica, come dimostrato dalla scarsa correlazione esistente con l'ECP sierico. L'attivazione elevata del controllo positivo è stata considerato segno di "alterato releasing" dei basofili, e quindi di una certa aspecificità della risposta. Sarebbe stato da aspettarsi, quindi, una correlazione con le plurisensibilizzazioni. Non abbiamo trovato alcuna conferma di questa ipotesi, anzi la correlazione riscontrata con i BLAT è inesistente ed addirittura tendenzialmente negativa con i NSAID. Questa classe di farmaci determina frequentemente reazioni di iper-

sensibilità non con un meccanismo anticorpo-mediato. Il Flow Cast rileva questo tipo di reazioni. Dato che il meccanismo non è determinato da una reazione di tipo antigene-anticorpo ma è connessa al meccanismo di azione dei NSAID ci sarebbe stato da aspettarsi con frequenza una risposta multipla principi attivi saggiati, al contrario spesso l'attivazione è stata determinata da un singolo farmaco. Nel caso dei BLAT, al contrario, le risposte multiple sono risultate più frequenti rispetto ai NSAID. Per quanto riguarda il tempo trascorso dall'evento acuto, la distanza di due anni sembra ininfluente sull'esito del test, anche se su questo aspetto sono necessari ulteriori studi.

L'utilizzo del Flow Cast è vantaggioso dal punto di vista clinico e rappresenta un notevole passo avanti nella diagnostica *in vitro* delle reazioni allergiche a farmaci, ma andrebbe riservato ai centri dotati della necessaria esperienza ed attrezzati per la corretta esecuzione ed interpretazione del test. Sono necessari ulteriori studi utili alla corretta messa a punto e standardizzazione della metodica ed alla stessa comprensione dei meccanismi e dei limiti del test.

Bibliografia

- Crockard AD, Ennis M. Basophil histamine release tests in the diagnosis of allergy and asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:345-50.
- Gane P, Pecquet C, Crespeau H, Lambin P, Leynadier F, Rouger P. Flow cytometric monitoring of allergen induced basophil activation. *Cytometry* 1995; 19:361-5.
- Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin JC. Diagnosis of latex allergy: comparison of histamine release and flow cytometric analysis of basophil activation. *Inflamm Res* 1996; 45(Suppl.1):S35-6.
- 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.
- Cozon GJN, Ferrandiz J, Peyramond D, Brunet JL. Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients. *Allergol Immunopathol* 1999; 27:182-7.
- Moneret-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.
- Monneret G, Gutowski MC, Bienvenu J. Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:393-6.
- Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E, Levy DA, Pecquet C, Chabane H, et al. Validation of a flow cytometric assay detecting *in vitro* basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:411-8.
- Paris-Kohler A, Demoly P, Persi L, Lebel B, Bousquet J, Arnoux B. *In vitro* diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:339-45.
- Monneret G, Benoit Y, Gutowski MC, Bienvenu J. Detection of basophil activation by flow cytometry in patients with allergy to muscle-relaxant drugs. *Anesthesiology* 2000; 92:275-7.
- Sainte-Laudy J, Sabbah 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.
- Wedi B, Novacovic V, Koerner M, Kapp A. Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production and basophil CD63 surface expression - inhibitory effects of anti-inflammatory drugs. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:552-60.
- Sanz ML, Sanchez G, Gamboa PM, Vila L, Uasuf C, Chazot M, et al. Ag-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.
- Fureder W, Agis H, Sperr WR, Lechner K, Valent P. The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils. *Allergy* 1994; 49:861-5.
- Valent P, Scherthaner GH, Sperr WR, Fritsch G, Agis H, Willheim M, et al. Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. *Immunol Rev* 2001; 179:74-81.
- Yoshimura C, Yamaguchi M, Iikura M, Izumi S, Kudo K, Nagase H, 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.
- Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, Majlesi Y, Scherthaner GH, Sperr WR, et al. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:102-9.
- Demoly P, Lebel B, Arnoux B. Allergen-induced mediator release tests. *Allergy* 2003; 58:553-8.
- 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.
- Deissler H, Lottspeich F, Rajewsky MF. Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130RB13-6 reveals relationship to human and murine J Biol Chem 1995; 270:9849-55.
- Deissler H, Blass-Kampmann S, Bruyneel E, Mareel M, Rajewsky MF. Neural cell surface differentiation antigen gp130(RB13-6) induces fibroblasts and glioma cells to express astroglial proteins and invasive properties. *FASEB J* 1999; 13:657-66.
- Buhring 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; 97:3303-5.
- Murata J, Lee HY, Clair T, Krutzsch HC, Arestad AA, Sobel ME, et al. cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 1994; 269:30479-84.
- Buhring HJ, Simmons PJ, Pudney M, Muller R, Jarrossay D, van Aegthoven A, et al. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human ba-

- sophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; 94:2343-56.
25. 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.
 26. 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.
 27. Miodonna 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.
 28. 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.
 29. Binder M, Fierlbeck G, King T, Valent P, Bühring 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.
 30. Lie WJ, Mul FP, Roos D, Verhoeven AJ, Knol EF. Degranulation of human basophils by picomolar concentrations of IL-3, IL-5, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 683-90.
 31. Lie WJ, Van der Veen MJ, Knol EF, Mul FP, Jansen HM, Roos D, et al. Influence of bronchial allergen challenge on histamine release by human basophils. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:882-90.
 32. Abrahamsen O, Haas H, Schreiber J, Schlaak M. Differential mediator release from basophils of allergic and non-allergic asthmatic patients after stimulation with anti-IgE and C5a. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:368-78.
 33. Kleine Budde I, de Heer PG, Van der Zee JS. The stripped basophil histamine release bioassay as a tool for the detection of allergen-specific IgE in serum. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126:277-85.
 34. Sanz ML, Gamboa PM, Antepará I, Uasuf C, Vila L, García-Aviles C, 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.
 35. Sanz ML, García MC, Caballero MR, Dieguez I, Gamboa PM. Basophil activation test in the diagnosis of allergy to medicines. *An Sist Sanit Navar* 2003; 26(Suppl 2):39-47.
 36. Sanz ML, Gamboa P, de Weck AL. A new combined test with flow cytometric basophil activation and determination of sulfidoleukotrienes is useful for in vitro diagnosis of hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:58-72.