

Prueba de activación de basófilos en el seguimiento de pacientes que reciben inmunoterapia con veneno de himenópteros: revisión de la evidencia actual

Basophil activation test to follow-up of patients treated with hymenoptera venom immunotherapy: a review of current evidence

Virginia Rodríguez-Vázquez,¹ Sara López-Freire,¹ Paula Méndez-Brea,¹ María Teresa González-Fernández,¹ Cristian Hernández-Pérez,² Carmen Vidal,^{1,2}

¹ Servicio de Alergología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, España.

² Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Correspondencia:

Virginia Rodríguez Vázquez
virginia.rodriguez.vazquez@sergas.es

Recibido: 13-06-2022

Aceptado: 24-09-2022

DOI: 10.29262/ram.v69i3.1135

ORCID

Virginia Rodríguez Vázquez

0000-0001-7268-5094

Sara López Freire

0000-0001-8458-6384

Paula Méndez Brea

0000-0002-8281-2357

María Teresa González Fernández

0000-0002-2099-2436

Cristian Hernández Pérez

0000-0002-2844-2754

Resumen

La inmunoterapia con veneno de himenópteros (IVH) es, a largo plazo, un tratamiento eficaz para evitar nuevas reacciones sistémicas en pacientes con alergia a este tipo de insectos. La prueba de repicadura controlada es el estudio de referencia para confirmar la tolerancia del individuo. Sin embargo, no se ha generalizado su indicación clínica, por lo que la prueba de activación de basófilos (TAB) resulta una buena alternativa, pues valora de manera funcional la respuesta al alérgeno y está exenta de los riesgos asociados con la provocación. En esta revisión se explora la utilidad de la TAB en el seguimiento y valoración del éxito de la IVH. Se seleccionaron estudios que evalúan los cambios entre una TAB basal y en otro momento de la fase de inicio o mantenimiento de la IVH. Se incluyeron 10 estudios con datos de 167 pacientes, de los que el 29% había tenido prueba de repicadura controlada. Para vigilar la eficacia de la IVH debe explorarse la respuesta del basófilo, con la determinación de las concentraciones submáximas del alérgeno, que reflejan la sensibilidad del basófilo. Los cambios en la respuesta máxima (reactividad) no pueden aportar información del estado de tolerancia, especialmente en las fases iniciales de la IVH.

Palabras clave: Veneno de himenópteros; Inmunoterapia; Prueba de activación de basófilos; Tolerancia inmunológica

Abstract

Hymenoptera venom immunotherapy (HVI) is a long-term effective treatment to avoid new systemic reactions in patients with Hymenoptera allergy. The sting challenge test is considered the gold standard to confirm the tolerance. However, the use of this technique is not generalized in clinical practice, being the basophil activation test (BAT), which functionally explores allergen response, an alternative that does not entail any of the provocation risks associated with the sting challenge test. This study reviews the publications that used the BAT to follow up and evaluate the success of the HVI. Studies assessing the changes between a baseline BAT before the start and BATs performed between the starting and maintenance phases of the HVI were selected. Ten articles were found, comprising information from 167 patients, of which 29% used the sting challenge test. The studies concluded the importance of evaluating the responses with submaximal allergen concentrations, which reflect basophil sensitivity, to monitor the HVI using the BAT. It was also observed that changes in the maximum response (reactivity) could not reflect the clinical status of tolerance, particularly in the initial phases of HVI.

Key words: Hymenoptera venom; Immunotherapy; Basophil activation test; Immune tolerance

Introducción

Se estima que entre 0.3 y 7.5% de la población adulta, incluso el 3.4% de la infantil, ha padecido alguna reacción sistémica después de la picadura de un himenóptero, debido a la alergia a su veneno.¹ La mortalidad asociada varía del 0.03 al 0.48 por cada millón de habitantes al año.¹ La inmunoterapia con veneno de himenópteros (IVH) es el tratamiento de elección para evitar nuevas reacciones sistémicas, moderadas-graves, luego del contacto con el insecto.^{2,3} Entre el 75 y 85% de los pacientes con alergia al veneno de las abejas (*Apis mellifera*) y entre el 90 y 95% de los alérgicos al veneno de los vespídeos (*Vespula spp* o *Polistes spp*) consiguen protección después de realizar un ciclo de tratamiento, cuya duración recomendada varía de 3 a 5 años.^{4,5} Se consideran factores de buen pronóstico para la suspensión de la inmunoterapia con veneno de himenópteros: pérdida de sensibilización, evidenciada de resultado negativo en la determinación de IgE específica, ausencia de reacciones sistémicas durante la administración de las dosis de la vacuna, y buena tolerancia a las picaduras espontáneas o controladas en el medio hospitalario (denominada prueba de repicadura).⁶ La prueba de repicadura controlada, si bien no es recomendable realizarla con fines diagnósticos en pacientes sin tratamiento debido al riesgo alto de anafilaxia,⁷ se considera el estudio de referencia para el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros.^{3,7} Aun así, no posee una especificidad del 100%, y su indicación en la práctica clínica no se ha generalizado, principalmente por motivos éticos y debido a su complejidad técnica y de accesibilidad al insecto. La determinación de IgE específica al veneno de himenópteros es una prueba comúnmente empleada en la práctica clínica para detectar la sensibilización a himenópteros. Sin embargo, la evolución de los valores de IgE específica después la inmunoterapia no se correlaciona con el estado de tolerancia, pues el 50% de los casos no llega a negativizarse, aun cuando el paciente es capaz de tolerar la exposición.⁸ En este contexto, se han buscado métodos alternativos que estén exentos de riesgo y permitan predecir el éxito del tratamiento, y de esta forma diferenciar a los pacientes tolerantes de los que requieren tratamiento más prolongado o con mayores concentraciones. Entre las técnicas *in vitro* propuestas se encuentra la prueba de activación de basófilos (TAB), que valora de manera funcional la respuesta de activación del basó-

filo luego de la exposición con el alérgeno, lo que se considera una provocación *ex vivo*.⁹

La prueba de activación de basófilos cuantifica los cambios en la expresión de los marcadores de activación del basófilo después de la estimulación específica con el alérgeno. En la mayor parte de los protocolos se mide el marcador CD63, situado en la membrana de los gránulos intracitoplasmáticos en reposo y solo es accesible a su detección en la superficie celular después de la activación por la unión con la membrana celular. El CD63 no es un marcador exclusivo de basófilos, por lo que en esta prueba se utilizan otros marcadores específicos de reconocimiento de basófilos para diferenciarlos de otras células sanguíneas.¹⁰ La respuesta de activación del basófilo es heterogénea, varía entre los individuos dependiendo del alérgeno empleado. Entre las ventajas de la prueba de activación de basófilos destaca su alta especificidad de respuesta al alérgeno, y el hecho de haberse utilizado frente a inhalantes, alimentos, venenos de himenópteros, látex o medicamentos.⁹ Como prueba diagnóstica es especialmente útil en pacientes con discordancia entre las manifestaciones clínicas y resultados ambiguos de otras técnicas, cuando no existe una fuente alérgica adecuada para efectuar pruebas cutáneas o de provocación, o en situaciones en las que una nueva exposición pueda suponer un riesgo.⁹ Sin embargo, es una prueba de compleja facturación, que requiere medios técnicos específicos, como la disponibilidad de un citómetro de flujo, que no siempre se encuentra al alcance de todos los centros asistenciales.

Por último, y aun disponiendo de un citómetro, la prueba de activación de basófilos es un estudio de difícil interpretación. Sus resultados se expresan, principalmente, en dos medidas de actividad del basófilo: 1) reactividad y 2) sensibilidad.⁹ La reactividad se refiere a la cantidad de basófilos que responden (CD63+) al estímulo del alérgeno, correspondiendo a la máxima respuesta alcanzada después de llegar a un *plateau*, en una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones. La principal utilidad de la medida de reactividad del basófilo es el diagnóstico de la patología alérgica, que alcanza una sensibilidad del 85-100% y especificidad del 83-100% para el veneno de himenópteros, cuando se utiliza CD63 como marcador de activación.^{11,12,13} En pacientes con anamnesis de reacciones sistémicas después de la picadura de algún himenóptero, en quienes el resultado de IgE específica

es negativo, la prueba de activación de basófilos ofrece como ventaja diagnóstica una mayor sensibilidad, que no se afecta por el tiempo transcurrido entre la reacción y la prueba,¹⁴ especialmente en pacientes con valores bajos de IgE total.¹⁵ También supone un método preciso y seguro para el diagnóstico de alergia a himenópteros en pacientes con mastocitosis.¹⁵ Además, es especialmente útil para identificar el himenóptero responsable en caso de doble sensibilización y falta de reconocimiento por parte del paciente, evitando así una doble inmunoterapia.^{16,17}

La sensibilidad, por su parte, hace referencia al umbral de concentración del alérgeno que produce una respuesta positiva. Puede expresarse de diferentes maneras: 1) EC50, que corresponde a la concentración que produce una respuesta en el 50% de los basófilos reactivos en una curva dosis-respuesta, 2) CD-sens, índice que resulta de la inversión del EC50 y al multiplicar por 100, o 3) LC50, que equivale al log10 de la concentración que produce un 50% de la activación de los basófilos. Otra aproximación a la sensibilidad es la ratio 0.1/1, medida que se ha relacionado con la aparición de efectos secundarios en la fase de incremento de la dosis de inmunoterapia con veneno de himenópteros.^{18,19} Así entendida, la sensibilidad es más útil que la reactividad para vigilar el efecto de la inmunoterapia, pues es capaz de detectar cambios en el umbral de respuestas, de modo que un descenso en la sensibilidad del basófilo se relaciona con tolerancia a largo plazo luego de finalizar la inmunoterapia con veneno de himenópteros.²⁰

No existe consenso de indicación de la prueba de activación de basófilos como biomarcador en la vigilancia de la respuesta a la inmunoterapia con veneno de himenópteros, ni en la valoración del éxito del tratamiento. La escasez de estudios y la cantidad reducida de pacientes, además de la heterogénea interpretación de los resultados realizada por los autores, añaden complejidad sobre la utilidad real del método en la práctica clínica.

El objetivo del presente estudio fue revisar las publicaciones que utilizan la prueba de activación de basófilos para vigilar la eficacia de la inmunoterapia con veneno de himenópteros, con la finalidad de extraer conclusiones relacionadas para su indicación.

Métodos

Se realizó una revisión de la literatura mediante la búsqueda electrónica en las bases de datos y metabuscadores Medline, Cochrane y clinicaltrials.gov, con límite temporal desde 1990, año en que se desarrolló la técnica, hasta el 8 de enero de 2021. Las palabras clave fueron: “*basophil activation test*” OR “*basophil reactivity*” AND “*hymenoptera venom immunotherapy*”. No se limitó la búsqueda por veneno de himenóptero específico, para evitar la exclusión de artículos en los que se hubiesen empleado varios venenos de diferentes especies que no fueran claramente especificadas en el título, resumen o palabras clave. Tampoco se limitó la búsqueda por tipo de artículo ni idioma, pero se descartaron los que no estuviesen en idioma inglés o español. Se investigaron las referencias adicionales en los propios artículos de la búsqueda. Se examinaron todos los artículos seleccionados por título y resumen, y se evaluaron de forma minuciosa los estudios que incluyeron datos de la prueba de activación de basófilos, con independencia del momento en que se había realizado la técnica y la duración de la inmunoterapia.²¹⁻⁵¹ Se excluyeron del análisis final los artículos que no incluyeron datos relacionados con el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. El diagrama de flujo de la búsqueda se representa en la **Figura 1**. De los artículos se analizaron: *a*) cantidad de pacientes incluidos en el estudio y edad (expresada en media, rango, o mediana, según se detalle en los estudios); *b*) punto de corte seleccionado para definir un resultado positivo en la prueba de activación de basófilos; *c*) dosis y alérgeno (veneno de *Apis mellifera*, *Vespula spp*, *Polistes spp*) utilizado en la prueba de activación de basófilos; *d*) tiempo de vigilancia de la inmunoterapia respecto al basal (antes de iniciar el tratamiento); *e*) desenlaces clínicos obtenidos; *f*) ejecución o no de la prueba de repicadura; y *g*) tolerancia a picaduras espontáneas (estudios que proporcionaron este dato).

Resultados

Se incluyeron 10 estudios⁵²⁻⁶¹ con datos de 182 pacientes que tuvieron reacciones sistémicas por alergia a la picadura de este tipo de himenópteros y recibieron inmunoterapia con veneno de este tipo de insectos.

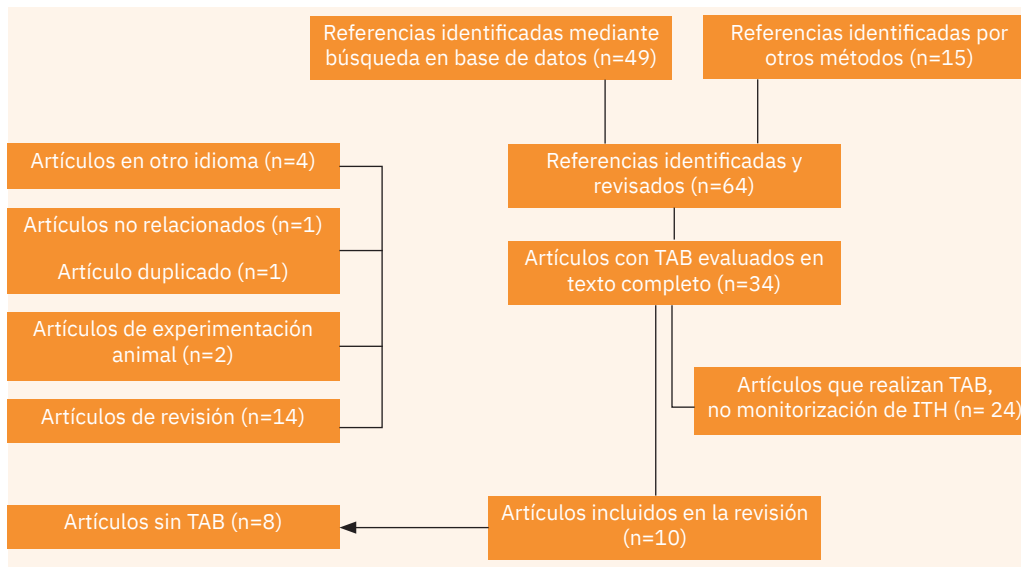


Figura 1. Diagrama de flujo de la búsqueda y selección de artículos de la revisión

Para el análisis se consideraron sólo los pacientes que realizaron todo el seguimiento planteado en el estudio, y que contaran con los resultados de la prueba de activación de basófilos basal (TAB), previo al inicio de la inmunoterapia, positivo al veneno y al menos otra TAB en diferentes momentos de la fase de inicio o mantenimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Esta selección dio un total de 167 pacientes, de los que 137 fueron adultos y 30 menores de 18 años al iniciar los estudios. Respecto al himenóptero responsable de la reacción sistémica, 46 pacientes fueron alérgicos a *Apis mellifera* y 121 a véspidos: 102 a *Vespa spp*, 15 a *Polistes spp* (*Polistes dominulus*), 3 a *Vespa crabro*⁵² y 1 paciente tenía doble sensibilización a *Vespa spp* y *Polistes spp*.⁵³ En la muestra se incluyeron 11 pacientes con mastocitosis sistémica que procedían de un único estudio.⁵⁴ Los datos demográficos de los pacientes se muestran en el **Cuadro 1**.

En todos los estudios se cuantificó CD63 por citometría de flujo, mientras que en 2 trabajos^{54,55} se utilizó CD203c como marcador de activación complementario. No se analizó el método para la técnica de activación ni selección de la población de basófilos, pero los estudios revisados debieron disponer de datos de activación espontánea (control negativo) y de control positivo (con anti-IgE, anti receptor de alta afinidad de IgE [FcεRI], o N-formilmetionil-leucil-feni-

lalanina [fMLP]). Para la activación con el alérgeno se emplearon al menos dos concentraciones del veneno implicado, seleccionadas después de efectuar la curva dosis-respuesta. En varios estudios^{54,56,59} se especificó que la prueba de activación de basófilos se llevó a cabo antes de la administración de la dosis de inmunoterapia con veneno de himenópteros, para evitar el efecto de desgranulación de los basófilos luego de aplicar la inyección por vía subcutánea del alérgeno.

El umbral de reactividad, o positividad, establecido por la mayoría de los autores fue >15% de células CD63+, salvo en el trabajo de Chichocka y colaboradores⁵⁶ que reportaron 10%, y en tres de ellos no se especificó el umbral de positividad.^{54,55,57} El umbral de sensibilidad se expresó con LC50 en dos estudios.^{54,55} Los ensayos emprendidos por Zitnik y su grupo⁵⁹ sugieren que la sensibilidad del basófilo, expresada en ratio 0.1/1, es útil para predecir los efectos secundarios durante la fase de incremento de la dosis de inmunoterapia con veneno de himenópteros. Sin embargo, en otros estudios no se confirma la utilidad de ratio para esta finalidad.⁵⁵

En dos estudios^{60,61} efectuaron la prueba de repicadura controlada en 48 pacientes, con resultado positivo en 1 caso. En tres investigaciones^{57,58,59} reportaron concurrencia de picaduras espontáneas durante la inmunoterapia con veneno de himenópteros y todas fueron bien toleradas.

Cuadro 1. Resumen de los estudios de la revisión: características de la muestra, variables analizadas y resultados								
Autor	n	Edad	Concentraciones	Tipo de veneno o (positividad)	Umbral (positividad)	Resultados	Replicadura	
Cichočka-Jarosz E ⁵⁶	4/5	9.5-18* 14.4**	1.15 pg/mL – 11.5 pg/mL 0.115 ng/mL – 1.15 ng/mL 11.5 ng/mL (0.0115 ug/mL)	<i>Apis mellifera</i>	10%	Basal (T0) – 15 días (T1) – 40 días (T2)	Sin cambios a la máxima concentración. Permanece positivo T1 y T2 (R)	No
Zitnik S ⁹	26/31	4-18* 10.7**	0.1 µg/mL – 1 µg/mL	<i>Apis mellifera</i>	15%	Basal (T0) – 5 días (T1) – 6 meses (T2) – 2/4 años (T3)	Sin cambios T1 con 0.1 y 1 µg/mL. Disminución significativa T2 y T3 a 0.1 µg/mL (S)	No
Eržen R ⁶⁰	12 (a) 11 (b)	25-68* 46**	0.1 µg/mL 1 µg/mL	<i>Apis mellifera</i> <i>Vespula spp</i>	15%	Basal (T0) – 1 año (T1) – Fin de la ITE (T2) – Tras replicadura (T3)	Sin cambios en T1. T2 y T3 descenso res-puesta X4 con 0.1 µg/mL (S) en tolerantes a replicadura.	Sí
Rodríguez A ⁵⁸	2 (a) 3 (b) 5 (c)	14-76*	25 ng/mL - 100 ng/mL 500 ng/mL - 1 µg/mL	<i>Apis mellifera</i> <i>Vespula germanica</i> <i>Polistes dominula</i>	15%	Basal (T0) – 1 mes (T1) – 3 meses (T2) – 6 meses (T3) – 12 meses (T4) – 18 meses (T5) – 24 meses (T6) – 60 meses (T7)	Descenso significativo T2 a 100 ng/mL (S) No mantenido entre T3-T5 y descenso T6 y T7	No
Sainte-Laudy J ⁵²	2 (a) 10 (b) 3 (d)	20-76*	9 ng/mL- 28 ng/mL 83 ng/mL - 0.25 µg/mL	<i>Apis mellifera</i> <i>Vespula spp</i> <i>Vespa spp</i>	15%	Basal (T0) – 21 semanas (T1) – 3-5 años (T2)	Descenso en reactividad T2 expresado como AUC ₀₋₅ (S)	Sí
Urta JM ⁵³	2 (b) 10 (c) 1 (e) /14	47.2** ± 16.2 (DS)	0.1 µg/mL 1 µg/mL	<i>Vespula spp</i> <i>Polistes dominula</i> <i>Vespula / Polistes spp</i>	15%	Basal (T0) – 6 meses (T1)	Descenso significativo T1 en las dos concentraciones (R)	No
Erdmann SM ⁶¹	25	18-58* 44**	0.1 µg/mL 1 µg/mL	<i>Vespula spp</i>	15%	Basal (T0) – 6 meses (T1)	No cambios en T1 con 0.1 µg/mL (R) Positivo en 23/25 Todos Replicadura negativa	Sí
Ebo DG ⁵⁷	22	17-73* 46.5**	0.01 µg/mL – 0.1 µg/mL 1 µg/mL 10 µg/mL	<i>Vespula spp</i>	No específica	Basal (T0) – 5 días (T1) – 6 meses (T2)	Descenso significativo en T2 con la concentración 0.01 µg/mL (S). Sin cambios T1	No

Milkensen S ⁵⁵	18/ 20	54 (44-61) ***	10 pg/mL – 1 µg/mL – 0.01 µg/mL 0.1 µg/mL – 1 µg/mL – 10 µg/mL	<i>Vesputa spp</i>	No específica	Basal (T0) – 1 semana (T1) – 2 semanas (T2) – 3 semanas (T3) – 4 semanas (T4) – 7 semanas (T5) – 11 semanas (T6)	Aumenta LC50 en T3 respecto a T0 (S)	No
Bidad K ⁵⁴	11/17	39-67* 56 **	0.5 ng/ mL 5 ng/ mL – 50 ng/mL – 500 ng/mL – 5 µg/mL	<i>Vesputa spp</i>	No específica	Basal (T0) – 6 semanas (T1) – 1 año (T2)	Descenso significativo en T1 a dosis submáximas. LC50↑ incrementa en T1. Sin diferencia significativa en T2	No

IVH: inmunoterapia con veneno de himenópteros; TAB: prueba de activación de basófilos; n: cantidad de pacientes con TAB positivo en T0 y que completaron el periodo seguimiento del estudio / población inicial de estudio, en el caso de que no coincidan.

En las referencias con diferentes himenópteros se identifican como:

(a) Cantidad de pacientes con IVH *Apis mellifera*

(b) Cantidad de pacientes con IVH *Vesputa spp/ Vesputa germanica*

(c) Cantidad de pacientes IVH *Polistes spp/ Polistes dominula*

(d) Cantidad de pacientes IVH *Vespa spp*

(e) Cantidad de pacientes con IVH *Vesputa* y *Polistes spp*

Edad representada como * rango * Edad media - desviación standard (DS) *** mediana - rango intercuartil (RiQ).

Tiempo monitorización T0: TAB realizada antes de iniciar la IVH; T1, T2, T3...: TABs realizadas durante la IVH. El momento de la realización se detalla en la tabla, en días, semanas, meses o años, según se refiere en los estudios.

R: reactividad; S: sensibilidad

† LC50 log10 de la concentración que produce un 50% de la activación de los basófilos

‡ AUC área bajo la curva

Los principales resultados de los 10 estudios revisados se enlistan en el **Cuadro 1**. A continuación se realiza el análisis específico para valorar las siguientes variables: 1) concentración del veneno empleada, 2) periodo de inmunoterapia con veneno de himenópteros en que se efectuó el estudio, 3) edad de la población estudiada y 4) prueba de repicadura.

Concentración de veneno de himenóptero empleada en la prueba de activación de basófilos

La mayor parte de los estudios reportó la curva dosis-respuesta frente a diferentes concentraciones del alérgeno hasta alcanzar el *plateau* de respuesta máxima, lo que permitió la validación de la técnica para los ensayos posteriores. En la fase de estudio longitudinal se utilizaron, al menos, dos concentraciones, incluida la respuesta máxima. Sin embargo, se ha observado que la concentración óptima del alérgeno depende del uso que se quiera proporcionar a la técnica y cuando se emplea la prueba de activación de basófilos como diagnóstico, la concentración utilizada debe ser capaz de discriminar entre pacientes y controles. De acuerdo con estos hallazgos, Ebo y sus colaboradores⁵⁷ encontraron que la concentración de 10 µg/mL de veneno muestra una sensibilidad del 83.8% y especificidad del 100%. En otros estudios, la concentración de himenóptero fue inferior, concretamente 1 µg/mL,^{57,61} 0.1 µg/mL^{55,53} y 0.5 µg/mL.⁵⁴ Con base en estos resultados, la selección de la concentración es un factor importante, pues con concentraciones altas la prueba de activación de basófilos es incapaz de marcar diferencias en distintos momentos de la evolución de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Por el contrario, el empleo de concentraciones submáximas: 0.1 µg/mL,^{58,59,60} 0.05 µg/mL⁵⁴ y 0.01 µg/mL⁵⁷ puede discernir entre el estado basal y la situación después de transcurrido un tiempo de inmunoterapia. En conclusión, estas concentraciones (reflejo de la sensibilidad del basófilo) son las más apropiadas para vigilar los cambios en la respuesta del basófilo después de la inmunoterapia con veneno de himenópteros.

Momento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros en que se realiza la prueba de activación de basófilos

En la fase inicial de la inmunoterapia con veneno de himenópteros es imposible detectar cambios signifi-

cativos y permanentes en las respuestas de activación alérgeno-específica del basófilo. El empleo de pautas rápidas de inicio, como en los estudios de Chichocka y su grupo,⁵⁶ y Ebo y colaboradores,⁵⁷ en donde se aplicó un protocolo *rush* que alcanzó la dosis de mantenimiento en 5 días, no permitió detectar la modificación de la respuesta al comparar la situación basal con el momento en que se alcanza la dosis de mantenimiento. Estos autores comprobaron que, incluso, luego de aplicar una dosis adicional de mantenimiento, la respuesta del basófilo permanecía inalterada.⁵⁶ Por su parte, el ensayo de Mikkelsen y cols.⁵⁵ valoró la sensibilidad del basófilo expresada con LC50 después de emplear pautas lentas de incremento de la dosis de inmunoterapia con *Vespula spp*, es decir, un protocolo de 7 (11 dosis) o 16 semanas (1 dosis/semana). Los autores observaron un aumento transitorio en la sensibilidad del basófilo en la tercera dosis, para volver a los valores basales en las sucesivas dosis y que se mantuvieron hasta la primera dosis de mantenimiento de la inmunoterapia.

Los principales cambios en la activación de los basófilos de las poblaciones analizadas se concentraron en la fase de mantenimiento y, especialmente, en los últimos años de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Para Rodríguez-Trabado y su grupo,⁵⁸ la primera determinación, luego de 3 meses de iniciar la inmunoterapia con veneno de himenópteros, es capaz de detectar un descenso significativo en la activación de los basófilos (después de una pauta de incremento semanal en 6 semanas y primeras dosis de mantenimiento). Sin embargo, a los 6 y 18 meses los resultados indican mayor activación, que disminuye de forma definitiva a los 2 años de tratamiento y se mantiene constante hasta el final. Al analizar la respuesta frente a las diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1 µg/mL), se observó que la negativización de la prueba de activación de basófilos al comienzo de la inmunoterapia con veneno de himenópteros era más evidente a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones la negativización se obtuvo principalmente al final de la inmunoterapia. Por tanto, para detectar los cambios en la activación del basófilo inducida por la inmunoterapia es de particular interés de respuesta a las concentraciones submáximas, especialmente en las primeras fases del tratamiento. En este contexto, Ebo y sus colaboradores⁵⁷ evaluaron la expresión de CD63 a diferentes concentraciones antes de iniciar la

inmunoterapia con veneno de *Vespula* y a los 6 meses de mantenimiento, y encontraron significación estadística solo entre la respuesta basal y a los 6 meses con la concentración submáxima (0.01 µg/mL), lo que representa un descenso de 10 veces en la sensibilidad de las células. Zitnik y su equipo de trabajo⁵⁹ reportaron resultados similares en la población infantil, con un descenso de 4 veces a concentración submáxima (0.1 µg/mL), que apareció desde los 6 meses y se mantuvo a largo plazo en más del 80% de los pacientes, mientras que con la concentración máxima de 1 µg/mL el descenso que apareció a los 6 meses regresó a los valores basales en la determinación final. La falta de valoración de la activación de basófilos a las concentraciones submáximas explica por qué en el estudio de Erdmann y cols.⁶¹ no se encontró supresión de la activación de basófilos a los 6 meses de tratamiento con *Vespula*, pues utilizó una concentración de 0.1 µg/mL, que producía una respuesta máxima de activación, según los datos aportados. Sin embargo, Urra y su grupo⁵³ constataron un descenso significativo en la activación a concentraciones máximas (1 µg/mL) en 12 de los 14 pacientes evaluados a los 6 meses de comenzar la inmunoterapia con veneno de himenópteros.

Todos los estudios que valoraron la respuesta del basófilo al final de la inmunoterapia con veneno de himenópteros^{52,58,59,60} informaron cambios significativos respecto al basal en la prueba de activación de basófilos. En el trabajo de Erzen y sus colaboradores,⁶⁰ el porcentaje de basófilos CD63+ fue del 80% antes de comenzar la inmunoterapia, con una concentración de veneno de 1 µg/mL, y del 41% con una concentración de 0.1 µg/mL. Al final de la inmunoterapia con veneno de himenópteros la activación de basófilos disminuyó 4 veces con la concentración submáxima y estos cambios se mantuvieron, incluso, después de la suspensión y posterior prueba de repicadura controlada, que fue tolerada indicando, por tanto, una protección permanente. En esta misma línea, los resultados de Zitnik y su grupo⁵⁹ señalan un descenso de 4 veces en la activación desde los 6 meses que se mantuvo hasta el final del tratamiento.

Edad de la población de estudio

Esta revisión incluye dos artículos^{56,59} que emplearon la prueba de activación de basófilos en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros.

teros en la población infantil, con 30 pacientes que representaron el 18% del total de la muestra revisada. En ambos ensayos, los pacientes eran alérgicos al veneno de *Apis mellifera*. Cabe remarcar que no se encontraron cambios sustanciales en los resultados respecto a los encontrados en la población adulta. En el estudio de Chichocka y colaboradores⁵⁶ se realizó la prueba de activación de basófilos en una etapa inicial de la inmunoterapia con veneno de himenópteros y se observó que la TAB permanecía positiva durante todo el periodo. En el estudio de Zitnik y sus colaboradores,⁵⁹ llevado a cabo con 26 niños, se encontró un descenso significativo y mantenido en la sensibilidad del basófilo desde los 6 meses del inicio de la inmunoterapia con *Apis mellifera* y a largo plazo tras finalizar la inmunoterapia. Este descenso a concentraciones submáximas se observó en el 80% de los niños que participaron en el estudio, mientras que con concentraciones máximas el descenso fue transitorio a los 6 meses para volver a valores basales. Como se había descrito previamente,¹⁸ la mayor sensibilidad del basófilo, medida en ratio 0.1/1, previo al inicio de la inmunoterapia, fue predictor de los efectos secundarios durante la fase de incremento de la dosis.⁵⁹

En este grupo de edad solo efectuaron repicaduras espontáneas en el 45% de los pacientes del estudio de Zitnik y cols,⁵⁹ que fueron bien toleradas.

Prueba de activación de basófilos para predecir el éxito del tratamiento comparado con la prueba de repicadura

En un estudio prospectivo de 25 pacientes que recibieron inmunoterapia con veneno de *Vespula*, se practicó la repicadura controlada a los 6 meses de iniciar la inmunoterapia.⁶¹ Puesto que solo el 8% de los pacientes tuvo resultados negativos con la prueba de activación de basófilos, a pesar de tolerar la exposición en la prueba de repicadura, los autores concluyen que la TAB no permite identificar a los pacientes tolerantes en ese momento de la inmunoterapia. Sin embargo, debe considerarse que la concentración que emplearon en el estudio (0.1 µg/mL) producía una respuesta de activación máxima en la TAB basal, por lo que no era idónea para valorar los cambios en la sensibilidad del basófilo.

En el estudio de Erzen y sus colaboradores⁶⁰ se valoró la relación entre los cambios en la prueba de activación de basófilos con la prueba de repicadura

realizada al final de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Los autores observaron un descenso significativo en la respuesta del basófilo con una concentración submáxima (0.1 µg/mL), y no encontraron cambios con la concentración de 1 µg/mL. Más del 95% de la población estudiada toleró la prueba de repicadura, por lo que los autores concluyen que a una concentración submáxima, la prueba de activación de basófilos supone un buen predictor del éxito del tratamiento, y que la supresión de la respuesta específica del basófilo es permanente después de suspender la inmunoterapia con veneno de himenópteros.

El resto de los estudios no informa la prueba de repicadura, pero tres de ellos recogieron datos de las picaduras espontáneas,^{57,58,59} y no produjeron reacciones sistémicas. No se dispone de información acerca de la relación entre los pacientes tolerantes a picaduras espontáneas y el resultado de la prueba de activación de basófilos.

La inmunoterapia con veneno de himenópteros modifica la respuesta inmunológica específica frente al alérgeno, y estimula el cambio de una respuesta alérgica a otra de tolerancia a largo plazo, que se consigue de 3 a 5 años de iniciar la inmunoterapia.⁵ En la adquisición de este estado de tolerancia participan diferentes mecanismos celulares y humorales, incluida la desensibilización de células efectoras, modulación de la respuesta T y B con el cambio de isotipos, y aparición de células T reguladoras específicas. Estas células son secretoras de IL-10 y suprimen la respuesta proinflamatoria Th2, con reducción de la secreción de citocinas IL-3, IL-4, IL-5, e IL-13, así como de la migración y activación de las células efectoras, eosinófilos, mastocitos y basófilos, entre otras.^{62,63}

Por lo que se refiere al efecto de la inmunoterapia en los basófilos, ésta produce una disminución de su activación.⁶³ En la etapa más temprana (fase de incremento de la dosis) se observa la desensibilización de mastocitos y basófilos, que no es específica del alérgeno,⁶⁴ y afecta su estado de activación y la capacidad de liberación de mediadores,⁶⁵ además de ser decisiva para evitar eventos de anafilaxia.^{66,67} Este efecto protector se explica por la rápida regulación del receptor de Histamina 2 (H2R),⁶⁸ así como la expresión del receptor de alta afinidad de IgE FcεRI.⁶⁴ En esta misma línea, y en concreto con la inmunoterapia con veneno de *Vespula*, Nullens y sus colaboradores⁶⁹ midieron simultáneamente el contenido y la liberación

de histamina, y la expresión de marcadores de activación de basófilos. Comprobaron que, previo al inicio de la inmunoterapia con veneno de himenópteros, los pacientes alérgicos a este veneno tenían mayor concentración de basófilos que quienes habían sido expuestos, pero no eran alérgicos. Además, sus basófilos contenían incluso 2.5 mayor cantidad de histamina que el grupo control. Se observó también que durante la fase de incremento de la dosis, con una pauta *semi-rush*, los basófilos circulantes disminuían considerablemente, pero mantenían su contenido de histamina. Curiosamente, luego de 6 meses de mantenimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros, si bien la concentración de basófilos circulantes recuperaba su valor basal, se evidenciaba una disminución significativa del contenido y de la liberación de histamina en respuesta al alérgeno.⁶⁹ Estos hallazgos coinciden con los resultados de Erdmann y su grupo,⁶¹ quienes observaron que mientras la prueba de repicadura controlada, efectuada a los 6 meses de iniciar la inmunoterapia, fue bien tolerada, la mayoría de los pacientes mostraba positividad en la prueba de activación de basófilos, lo que parece reflejar que en esta fase se produce la señalización y fusión de los gránulos con la membrana externa, pero sin provocar la liberación de mediadores.

En resumen, el descenso de la activación de basófilos aparece entre los 18-24 meses de iniciar la inmunoterapia con veneno de himenópteros, principalmente a concentraciones submáximas, y se mantiene hasta completar el tratamiento,^{52,58,59,60} incluso después de aplicar la repicadura.⁶⁰ Además, a medida que se avanza en la inmunoterapia con veneno de himenópteros, el número de TAB que está por debajo del umbral de positividad aumenta, siendo más evidente a las concentraciones submáximas al comienzo de la inmunoterapia, y en los últimos años con altas concentraciones.⁵⁸ Algunos estudios señalan que los pacientes que no toleraban la repicadura, después de un periodo prolongado de inmunoterapia, tenían valores más altos de basófilos CD63 por el estímulo específico que los no respondedores.^{70,71} Otro estudio informó que la liberación de histamina fue mayor en pacientes que recibieron inmunoterapia con veneno de abeja, que reaccionaban con la prueba de repicadura realizada al finalizar la inmunoterapia, en comparación con los tolerantes.⁷² Todos estos estudios apoyan la indi-

cación de la prueba de activación de basófilos como biomarcador útil para vigilar la eficacia de la inmunoterapia con veneno de himenópteros²⁰ y sugiere que deben valorarse las concentraciones que produce una respuesta submáxima, puesto que los cambios en la respuesta máxima (reactividad) pueden no aportar información del estado clínico de tolerancia, especialmente en las fases iniciales del tratamiento.^{73,74}

La inmunoterapia con veneno de himenópteros es el único tratamiento eficaz para evitar reacciones sistémicas en pacientes alérgicos al veneno de insectos;^{75,76} sin embargo, no todos los sujetos alcanzan este efecto protector duradero.² En pacientes con alergia al veneno de himenópteros, la prueba de activación de basófilos puede emplearse como herramienta diagnóstica, debido a su alta sensibilidad y valor predictivo positivo similar o superior al de las pruebas cutáneas o la determinación de IgE específica,⁷⁰ incluso como alternativa para vigilar la eficacia de la inmunoterapia.¹⁹

Conclusiones

La selección de las concentraciones adecuadas para valorar la respuesta específica del basófilo debe efectuarse con base en la curva dosis-respuesta, que permita identificar la concentración máxima y submáxima, y conseguir la activación del 50% de los basófilos. La discriminación entre reactividad y sensibilidad es decisiva para utilizar la prueba de activación de basófilos en la vigilancia de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Los cambios en la sensibilidad del basófilo pueden observarse luego de un periodo prolongado de mantenimiento (entre 18-24 meses). La prueba de activación de basófilos puede implementarse durante el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros como marcador de eficacia del tratamiento, con resultados consistentes con los obtenidos en la prueba de repicadura. Es importante conocer los mecanismos de tolerancia inducida por la inmunoterapia y disponer de biomarcadores, y de esta forma vigilar la eficacia de la terapia y predecir el éxito del tratamiento.

Agradecimientos

Carla Granados (Trialance SCCL) prestó asistencia editorial, patrocinada por una beca de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEIAC) y financiada por Leti Pharma.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés respecto a este estudio.

Financiación

El estudio contó con la financiación por parte del Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad, PI19/01023 y la Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC).

Referencias

- Biló MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1467-1476 DOI: 10.1111/J.1365.2222.2009.03324. x.
- Dhami S, Zaman H, Varga EM, et al. Allergen immunotherapy for insect venom allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2017;72:342-365. DOI: 10.1111/all.13077
- Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2018;73:744-764. DOI: 10.1111/all.13262
- Müller U, Helbling A, Berchtold E. Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:529-535. DOI: 10.1016/0091-6749(92)90319-w
- Müller UR, Ring J. When can immunotherapy for insect sting allergy be stopped? *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;3:324-328. DOI: 10.1016/j.jaip.2014.11.018
- Bilò MB, Pravettoni V, Bignardi D, et al. Hymenoptera venom allergy: management of children and adults in clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2019;29:180-205. DOI: 10.18176/jiaci.0310
- Rüeff F, Przybilla B, Müller U, et al. The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on insect venom allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1996;51:216-225. DOI: 10.1111/j.1398-9995.1996.tb04596. x.
- Pravettoni V, Piantanida M, Primavesi L, et al. Determinants of venom - specific IgE antibody concentration during long-term wasp venom immunotherapy. *Clin Mol Allergy* 2015;13:29. DOI: 10.1186/s12948-015-0036-6.
- Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy* 2015;70:1393-1405. DOI: 10.1111/all.12698
- Sabogal - Cuadro P, Zakzuk J. Prueba de activación de basófilos: aspectos técnicos, metodológicos y su utilidad clínica. *Rev Fac Med* 2018;66:447-57. DOI: 10.15446/revfacmed.v66n3.61820
- Eberlein-König B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, et al. In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:5-11
- Ebo DG, Sainte-Laudy CH, Bridts CH, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006;61:1028-1039. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01039.x
- Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet, M et al. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1166-1171. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2000.00863.x
- Korošec P, Eržen R, Šilar M, et al. Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1730-1737. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03347. x.
- González-de-Olano D, Álvarez-Twose I, Morgado JM, et al. Evaluation of basophil activation in mastocytosis with Hymenoptera venom anaphylaxis. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80:167-75. DOI: 10.1002/cyto.b.20577
- Eberlein-König B, Rakoski J, Behrendt H, et al. 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
- Eberlein B, Krischan L, Darsow U, et al. 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;130:155-61. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.02.008
- Košnik M, Šilar M, Bajrovic N, et al. High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. *Allergy* 2005;60:1401-1406. DOI:10.1111/j.1398-9995.2005.00894. x.
- Korošec P, Žiberna M, Šilar M, et al. Immunological and clinical factors associated with adverse systemic reactions during the build-up phase of honeybee venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2015;45:1579-1589. DOI: 10.1111/cea.12582
- Blank S, Grosch J, Ollert M, et al. Precision medicine in Hymenoptera venom allergy: diagnostics, biomarkers, and Therapy of different endotypes and phenotypes. *Front Immunol* 2020;11:579409. DOI: 10.3389/fimmu.2020.579409
- Schiener M, Eberlein B, Moreno-Aguilar C, et al. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. *Allergy* 2017;72:98-108. DOI: 10.1111/all.13000

22. De Amici M, Barocci F, Caimmi S, *et al.* Clinical use of basophil activation test in drug, food and hymenoptera venom allergies. *Minerva Pediatr* 2019;71. DOI: 10.23736/S0026-4946.18.05144-7
23. Arzt L, Bokanovic D, Schrautzer C, *et al.* Immunological differences between insect venom-allergic patients with and without immunotherapy and asymptotically sensitized subjects. *Allergy* 2018;73:1223–31. DOI: 10.1111/all.13368
24. Jakob T, Rafei-Shamsabadi D, Spillner E, *et al.* Diagnostics in hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. *Allergo J Int* 2017;26:93–105. DOI: 10.1007/s40629-017-0014-2
25. Nittner-Marszalska M, Cichocka-Jarosz E. Insect sting allergy in adults: key messages for clinicians. *Pol Arch Med Wewn* 2015;125:929–37. DOI: 10.20452/pamw.3216
26. Tankersley MS, Ledford DK. Stinging insect allergy: State of the Art 2015. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;3:315–22. DOI: 10.1016/j.jaip.2015.03.012
27. Uyttebroek AP, Sabato V, Faber MA, *et al.* Basophil activation tests: time for a reconsideration. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:1325–35. DOI: 10.1586/1744666X.2014.959498
28. Cabrera CM, Urra JM, Alfaya T, *et al.* Expression of Th1, Th2, lymphocyte trafficking and activation markers on CD4+ T-cells of Hymenoptera allergic subjects and after venom immunotherapy. *Mol Immunol* 2014;62:178–85. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.06.023
29. Antolín D, Moreno C, Vega A, *et al.* Venom immunotherapy: an updated review. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14:449. DOI: 10.1007/s11882-014-0449-1
30. Ebo DG, van Vaerenbergh M, de Graaf DC, *et al.* *In vitro* diagnosis of hymenoptera venom allergy and further development of component resolved diagnostics. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:375–84. DOI: 10.1586/1744666X.2014.881252
31. Korošec P, Šilar M, Eržen R, *et al.* Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of Hymenoptera-allergic patients with emphasis on Individuals with negative venom-specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;161:363–8. DOI: 10.1159/000348500
32. Vinzón SE, Marino-Buslje C, Rivera E, *et al.* A naturally occurring hypoallergenic variant of vespidae Antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom as a candidate for allergen-specific immunotherapy. *PLoS One* 2012;7:e41351. DOI: 10.1371/journal.pone.0041351
33. Bonadonna P, Zanotti R, Melioli G, *et al.* The role of basophil activation test in special populations with mastocytosis and reactions to hymenoptera sting. *Allergy* 2012;67:962-5. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02849.x
34. Neis MM, Merk HF. Value of component-based diagnostics in IgE-mediated hymenoptera sting reactions. *Cutan Ocul Toxicol* 2012;31:117-23. DOI: 10.3109/15569527.2011.621080
35. Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, *et al.* Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespidae venom allergy. *PLoS One* 2011;6:e20842. DOI: 10.1371/journal.pone.0020842
36. Tracy JM, Lewis EJ, Demain JG. Insect anaphylaxis: addressing clinical challenges. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:332-6 DOI: 10.1097/ACI.0b013e32834877ab
37. Blank S, Seismann H, Michel Y, *et al.* Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy* 2011;66:1322-9. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02667.x
38. Demain JG, Minael AA, Tracy JM. Anaphylaxis and insect allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:318-22. DOI: 10.1097/ACI.0b013e32833a6c72
39. Verweij MM, De Knop KJ, Bridts CH, *et al.* P38 mitogen-activated protein kinase signal transduction in the diagnosis and follow up of immunotherapy of wasp venom. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:302-7. DOI: 10.1002/cyto.b.20531
40. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, *et al.* Hymenoptera venom allergy: taking the sting out of difficult cases. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:357-60.
41. Dubois AE, van der Heide S. Basophil-activation tests in Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:346-9. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3282638848
42. Machado DC, Horton D, Harrop R, *et al.* Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen specific IgE. *Eur J Immunol* 1996;26:2972-80. DOI: 10.1002/eji.1830261224
43. Brown SG, Haas MA; Black JA, *et al.* *In vitro* testing to diagnose venom allergy and monitor immunotherapy: a placebo-controlled, crossover trial. *Clin Exp Allergy* 2004;34:792-800. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2004.01949.x
44. Korošec P, Šilar M, Kopač P *et al.* Distinct contributory factors determine basophil-allergen sensitivity in grass pollen rhinitis and in anaphylactic wasp venom allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2016;171:89-101. DOI: 10.1159/000452102
45. Bergmann-Hug K, Fricker M, Hausmann O, *et al.* Sensitization to Hymenoptera venom in pollen allergic patients: Frequency and involvement of cross-reacting carbohydrate. *PLoS One* 2020;15:e0238740. DOI: 10.1371/journal.pone.0238740

46. Ebo DG, Faber M, Sabato V, *et al.* Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy. *Clin Exp Allergy* 2012;43:255-261. DOI: 10.1111/cea.12057
47. Siegmund BA, Vogelsang H, Machnik A, *et al.* Surface membrane antigen alteration on blood basophils in patients with Hymenoptera venom allergy under immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1190-1195. DOI: 10.1067/mai.2000.110928
48. Alfaya T, Soriano V, Soto T, *et al.* Key issues in hymenoptera venom allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2017;27:19-31. DOI: 10.18176/jiaci.0123
49. Čelesnik N, Vesel T, Rijavec M, *et al.* Short-term venom immunotherapy induces desensitization of FcεRI-mediated basophil response. *Allergy* 2012;67:1594-1600. DOI: 10.1111/all.12044
50. Kosnik M, Korošec P. Importance of basophil activation testing in insect venom allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2009;5:11. DOI: 10.1186/1710-1492-5-11
51. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, *et al.* The basophil activation test in the diagnosis and follow-up of hymenoptera venom allergy: an alternative point of view. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008;18:482-495. PMID: 19123451
52. Sainte-Laudy J, Touraine F, Cluzan D, *et al.* Follow-up of venom immunotherapy on Flow cytometry and definition of a protective index. *Int Arch Allergy Immunol* 2016;170:243-250. DOI: 10.1159/000449162
53. Urra JM, Cabrera CM, Alfaya T, *et al.* Agreement of skin test with IL-4 production and CD40L expression by cells upon immunotherapy of subjects with systemic reactions to Hymenoptera stings. *Mol Immunol* 2016;70:134-9. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.12.013
54. Bidad K, Nawijn MC, van Oosterhout AJ, *et al.* Basophil activation test in the diagnosis and monitoring of mastocytosis patients with wasp venom allergy on immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2014;10:375-84. DOI: 10.1002/cytob.21148
55. Mikkelsen S, Bibby BM, Bogebjerg M, *et al.* Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clinical and Molecular Allergy* 2010;8:2. DOI: 10.1186/1476-7961-8-2
56. Chichocka-Jarosz E, Dorynska A, Pietrzyk JJ, *et al.* Laboratory markers of mast cell and basophil activation in monitoring rush immunotherapy in bee venom-allergic children. *Immunotherapy* 2011;3:1013-7. DOI: 10.2217/imt.11.91
57. Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, *et al.* Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:196-203. DOI: 10.1002/cyto.b.20142
58. Rodríguez A, Cámara C, Ramos A, *et al.* Short-, intermediate-, and long-term changes in basophil reactivity induced by venom immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016;8:412-20. DOI: 10.4168/aaair.2016.8.5.412
59. Žitnik SE, Vesel T, Avčin T, *et al.* Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:166-72. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2011.01233.x
60. Eržen R, Košnik M, Šilar M, *et al.* Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy* 2012;67:962-5. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02817.x
61. Erdmann SM, Sachs B, Kwiczen R, *et al.* The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 2004;59:1102-1110. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2004.00624.x
62. Schiener M, Graessel A, Ollert M, *et al.* Allergen-specific immunotherapy of Hymenoptera venom allergy - also a matter of diagnosis. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13:2467-2481. DOI: 10.1080/21645515.2017.1334745
63. Akdis C, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J* 2015;8:17. DOI: 10.1186/s40413-015-0063-2
64. Čelesnik N, Šilar M, Eržen R, *et al.* Down-regulation of FcεRI-mediated CD63 basophil response during short-term VIT determined venom-nonspecific desensitization. *PLoS One* 2014;14:e94762. DOI: 10.1371/journal.pone.0094762.
65. Plewako H, Wosinska K, Arvidsson M, *et al.* Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;141:346-53. DOI: 10.1159/000095461
66. Patil SU, Shreffler WG. Immunology in the clinic review series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clin Exp Immunol* 2012;167:59-66. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04503.x
67. Demšar Luzar A, Korošec P, Košnik M, *et al.* Hymenoptera venom immunotherapy: immune mechanisms of induced protection and tolerance. *Cells* 2021;10:1575. DOI: 10.3390/cells10071575
68. Novak M, Mete M, Bussmann C, *et al.* Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1153-1158.e2. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.04.039
69. Nullens S, Sabato V, Faber M, *et al.* Basophilic histamine content and release during venom immunotherapy: Insights by

- flow cytometry. *Clinical Cytometry* 2013;84B:173-178. DOI: 10.1002/cyto.b.21084
70. Peternelj A, Silar M, Erzen R, *et al.* Basophil sensitivity in patients not responding to venom immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146:248-54. DOI: 10.1159/000116361
71. Kucera P, Cvackova M, Hulikova K, *et al.* Basophil activation can predict clinical sensitivity in patients after venom immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:110-16.
72. Eberlein-Konig B, Ullmann S, Thomas P, *et al.* Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization. *Clin Exp Allergy* 1995;25:704-12. DOI: 10.1111/j.1365-2222.1995.tb00007.x
73. Eberlein B. Basophil activation as marker of clinically relevant allergy and therapy outcome. *Frontiers in Immunology* 2020;11:1815. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01815
74. Ansotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, *et al.* IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J* 2020;13:100080. DOI: 10.1016/j.waojou.2019.100080
75. Bonifazi F, Jutel M, Bilô MB, and the EAACI interest group on insect venom hypersensitivity. Prevention and treatment of Hymenoptera venom allergy: Guidelines for clinical practice. *Allergy* 2005;60:1459-70. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00960.x
76. Sahiner UM, Durham SR. Hymenoptera Venom Allergy: ¿How Does Venom Immunotherapy Prevent Anaphylaxis from Bee and Wasp Stings? *Front Immunol* 2019;10:1959. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01959
77. Diagnostic value of the basophil activation test in evaluating Hymenoptera venom sensitization. *Wien Klin Wochenschr* 2009;121:344-348. DOI: 10.1007/s00508-009-1174-y