

Acute geneesmiddelenallergie: mogelijkheden en beperkingen van basofielenactiveringstests

Immediate drug hypersensitivity: potentials and limitations of basophil activation tests

Prof. dr. D.G. Ebo¹

SAMENVATTING

Hoewel geneesmiddelenprovocatietests nog altijd beschouwd worden als de gouden standaard ter ondersteuning van de diagnose van een acute geneesmiddelenallergie, is hun voorspellende waarde niet absoluut en zijn zij niet altijd mogelijk, vanwege ethische en praktische redenen. De diagnose van een AGA berust daarom meestal op een grondige anamnese aangevuld met huidtests en bepaling van geneesmiddelen-specifiek IgE. Deze tests zijn niet absoluut predictief en geneesmiddelen-specifieke IgE-tests zijn nauwelijks beschikbaar. De ontwikkeling, validatie en harmonisatie van nieuwe cellulaire tests zoals de basofielenactiveringstests blijft dus noodzakelijk. Dit overzicht focust op de toepassingen en beperkingen van de basofielenactiveringstest bij acute geneesmiddelallergie.

(NED TIJDSCHR ALLERGIE & ASTMA 2017;17:71-78)

SUMMARY

Diagnosis of immediate drug hypersensitivity reactions (IDHR) is based upon history taking, skin tests and quantification of drug-specific IgE antibodies. Unfortunately, this is often insufficient to correctly identify patients with IgE-mediated IDHR and impossible for non-IgE mediated IDHR. Drug provocation tests (DPT) are considered the 'gold standard' diagnostic but are not always possible to perform for ethical and to a lesser extent practical reasons. Therefore, the development and clinical validation of new cellular tests such as basophil activation tests (BAT) was necessary. This review focuses on the applications of BAT in IDHR.

INLEIDING

Hoewel gecontroleerde geneesmiddelenprovocatietests (GPT) beschouwd worden als de gouden standaard binnen de diagnostische benadering van acute geneesmiddelenallergieën (AGA), wordt de uitvoering van GPT in de dagelijkse allergologische praktijkvoering

sterk gehinderd door het risico van levensbedreigende reacties en is een correcte GPT simpelweg niet mogelijk (bijvoorbeeld met 'neuromuscular blocking agents'; NMBA). Bovendien heeft ook de GPT geen absoluut voorspellende waarde. Vandaar dat de bevestiging van het vermoeden van een (IgE/FcεRI-afhankelijke) AGA

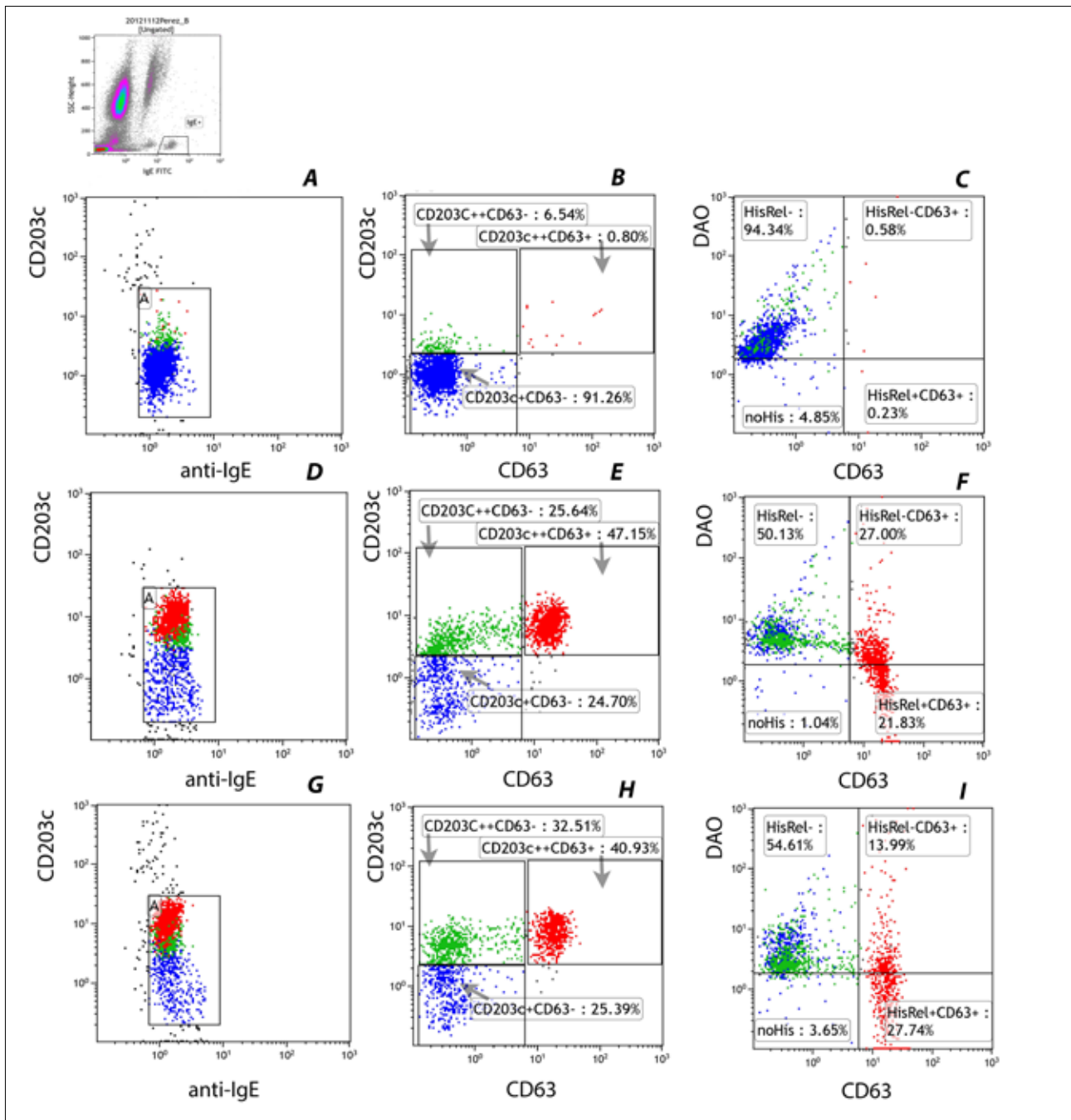
¹adjunct-diensthoofd, departement Immunologie – Allergologie – Reumatologie, Universitair Ziekenhuis Antwerpen.

Correspondentie graag richten aan: dhr. prof. dr. D.G. Ebo, Universiteit Antwerpen, Faculteit Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen (FGGW), departement Immunologie - Allergologie - Reumatologie, Campus Drie Eiken T5.95, Universiteitsplein 1, 2610 Antwerpen, België, tel.: +32 3 265 25 95, e-mailadres: immuno@uantwerpen.be

Belangenconflicten: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: acute geneesmiddelenallergie, basofielenactivering, BAT, CD63, CD203c, flowcytometrie, HistaFlow®, IgE

Keywords: basophil activation, BAT, CD63, CD203c, flow cytometry, Histaflow®, IgE, immediate drug hypersensitivity



FIGUUR 1. HistaFlow®-plots van een cefazolinreactieve patiënt. Degranulatie van de basofielen in reactie op stimulatie met cefazoline (100 µg/ml). A/B/C. Rustende cellen gestimuleerd met oplosbuffer, D/E/F. reactie op de positieve controlestimulatie met anti-IgE, G/H/I. reactie op het antibioticum. Alleen CD203c++/CD63+-cellen maken histamine vrij (daling van diamineoxidase (DAO), panels C/F/I). (aangepast volgens referentie 65).

veelal berust op huidpriktests (priktests (HPT), intradermale tests (IDT)) en, indien beschikbaar, de waarde van geneesmiddelen-sIgE in het serum van de patiënt. Daarbij moet rekening worden gehouden dat verscheidene van deze geneesmiddelen-sIgE-waarden nauwelijks of niet klinisch gevalideerd zijn en dat AGA op

basis van degranulatie van basofielen en mestcellen ook onafhankelijk van de vorming van IgE/FcεRI-complexen optreedt, maar wel via een basofielenactivatietest (BAT) aantoonbaar is. Dit overzicht focust op de toepassingen en de beperkingen van de BAT bij AGA.

TABEL 1. BAT bij acute allergie door 'neuromuscular blocking agents'.⁸⁻¹⁶

Stimulus	Referentietest	Activatiemarker	Gevoeligheid (%)	Specificiteit (%)	n	Referentie
Diverse NMBA	A	CD63	64	81	26	(8)
		CD45	43	96		
Diverse NMBA	A ± HT	CD63	54	100	56	(9)
Diverse NMBA	A	CD63	79	100	31	(10)
		CD203c	36	100		
Diverse NMBA	A ± HT	CD63	36-86*	93	92	(11)
Rocuronium	A ± HT	CD63	92**	100	22	(12)
Diverse NMBA	A ± HT ± IgE	CD63	60	100	49	(13)
Rocuronium	A	CD63	80	96	104	(14)
Diverse NMBA	A ± HT	CD63	68	100	56	(15)
Atracurium	A ± HT	CD63	71***	100	75	(16)

NMBA = 'neuromuscular blocking agents', A = anamnese, HT = huidtest, n = aantallen patiënten en controle-individuen

* hogere gevoeligheid als de analyse wordt verricht binnen 3 jaar na acute reactie,

** als rekening wordt gehouden met non-responders bedraagt de gevoeligheid 76%,

*** als rekening wordt gehouden met non-responders bedraagt de gevoeligheid 63%.

BASOFIELENACTIVERINGSTESTS: BAT EN HISTAFLOW®

De basis van de huidige BAT werd ruim 25 jaar geleden gelegd.¹ Britts et al. gaven in 2014 een goede uitleg van de basisprincipes en de technische uitvoering van de BAT/HistaFlow®.² De traditionele BAT berust op een flowcytometrische analyse van wijzigingen van activatie- en degranulatiemarkers op het oppervlaktemembraan. Deze veranderingen kunnen gedetecteerd en gekwantificeerd worden op het niveau van de individuele cel door gebruik te maken van specifieke monoklonale immunoglobulinen, die geconjugeerd zijn met verschillende LASER-exciteerbare fluorochromen. Circulerende basofielen worden daarbij veelal geïdentificeerd aan de hand van hun oppervlaktemarkeringen zoals CCR3 (CD193)/CD3, CD123/HLA-DR of IgE/CD203c. Van deze markeringen is enkel CD203c ('ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 enzyme'; E-NPP3) specifiek voor de basofielen. De activering van de basofielen wordt klassiek gemeten door het verschijnen van CD63 en verhoogde CD203c-expressie. Alternatieve markeringen van activering zijn de verhoogde expressie van inhiberende receptoren zoals CD300a, fosforylering van signaalmoleculen zoals 'p38 mitogen-activated protein kinase' (MAPK) en 'signal transducer and activator of transcription' (STAT).³⁻⁵ Onlangs is aangetoond dat ook het vrijkomen van histamine

flowcytometrisch bepaald kan worden. Met deze techniek, genaamd HistaFlow®, wordt de intracellulaire inhoud van histamine en het vrijkomen ervan gekwantificeerd dankzij een enzymaffiniteitsmethode waarbij gebruikgemaakt wordt van het histaminasediamineoxidase (DAO).^{6,7} *Figuur 1* toont een HistaFlow® dotplot van een patiënt die reageert op cefazoline.

BAT EN HISTAFLOW® BIJ ACUTE GENEESMIDDELENALLERGIE

Ongeveer 15 jaar geleden werd de BAT geïntroduceerd in de diagnostiek van AGA, vooral bij AGA voor NMBA (zie *Tabel 1*), antibiotica (vooral β -lactamantibiotica en quinolonen, zie *Tabel 2* op pagina 74), aspirine en andere NSAID's (zie *Tabel 3* op pagina 75), en geïodideerde radiocontrastmedia (zie *Tabel 4* op pagina 76). Uit deze tabellen blijkt dat de gevoeligheid van de BAT globaal varieert tussen 50 en 60%, terwijl de specificiteit 80% bereikt. Voor quinolonen en NSAID's scoort de BAT doorgaans minder goed. Uit enkele studies blijkt bovendien dat het met de BAT/HistaFlow® mogelijk is om simultaan zowel het actieve bestanddeel als de hulpstoffen te testen, zoals chremofloor EL in een intraveneuze vorm van ciclosporine en clavulaanzuur in een amoxicilline/clavulaanzuurformulering.^{50,51} Verder is het in toenemende mate gebleken dat de BAT niet alleen zinvol kan zijn voor AGA, maar ook kan bij

TABEL 2. BAT bij acute allergie door β -lactamantibiotica en quinolonen.¹⁷⁻³²

Stimulus	Referentietest	Activatiemarker	Gevoeligheid (%)	Specificiteit (%)	n	Referentie
β-lactamantibiotica						
β -lactams	A	CD63	50	93	88	(17)
β -lactams	A + GPT	CD63	39	93	53	(18)
β -lactams	A \pm HT \pm IgE \pm GPT	CD63	49	91	110	(19)
Amoxicilline	A \pm HT	CD203c CD63	52 22	100 79	41	(20)
β -lactams	A	CD63	50	89-97	262	(21)
β -lactams	A \pm HT \pm IgE	CD63-CCR3* CD63-IgE*	55 53	100	39	(22)
Amoxicilline	A	CD63	29	/	14 patiënten, geen controles	(23)
Amoxicilline	A \pm HT \pm GPT	CD63	50	/	61 patiënten, aantal controles niet vermeld	(24)
Amoxicilline	A \pm HT	CD63	50	/	30 patiënten	(25)
Cefazoline	A \pm HT	CD63 CD203c	33 67	94 94	16 patiënten, 17 controles	(26)
Quinolonen						
Diverse quinolonen	A + GPT	CD63	0	/	4	(27)
Diverse quinolonen	A + HT \pm GPT	CD63	0	100	18	(28)
Diverse quinolonen	A	CD203c	100	100	5	(29)
Diverse quinolonen	A \pm GPT	CD63	71	/	73	(30)
Diverse quinolonen	A \pm GPT	CD203c	NA	100	34	(3 ¹)
Ciprofloxacin	A	CD63 ²	83	89	35	(32)
Moxifloxacin		CD203c ²	36	95		
A = anamnese, HT = huidtest, GPT = geneesmiddelenprovocatietest, n = aantallen patiënten en controle-individen						
¹ GPT met moxifloxacin werd enkel uitgevoerd bij controle-individen om tolerantie te bewijzen. De moxifloxacin-huidtest is echter weinig specifiek. ⁶¹						
² Het feit dat deze studie aantoont dat de uitkomst van de BAT geneesmiddelen-specifiek is, is een absoluut argument om in de toekomst heterogeen samengestelde studies te vermijden.						
* Andere selectiemarker.						

dragen aan de correcte diagnostiek van acute allergie als gevolg van aanverwante producten zoals chloorhexidine, patentblauw en plasmaexpanders zoals gelatine en gemodificeerde zetmeelpreparaten.⁵²⁻⁵⁵ Met de BAT kan daarbij niet enkel de boosdoener(s) worden geïdentificeerd, maar kan ook de onderlinge kruisreactiviteit worden bestudeerd en veilige alternatieven voor de toekomst geïdentificeerd.^{12,14,56} Hoewel de HistaFlow[®] op het eerste gezicht geen diag-

nostische meerwaarde biedt ten opzichte van de BAT, kan de techniek toch bijdragen aan het verwerven van nieuwe inzichten in de pathogenese van AGA.⁷ Zo werd aangetoond dat de BAT/HistaFlow[®] waarschijnlijk de enige methode is om een specifieke opiaatallergie aan te tonen en niet IgE morfine en IgE papaverzaad.^{57,58} De diagnostiek van AGA ten gevolge van β -lactamantibiotica berust doorgaans op huidpriktests en de waarde van geneesmiddelen-sIgE. Bij moeilijk te diagnos-

TABEL 3. BAT bij acute allergie door NSAID's.³³⁻⁴⁶

Stimulus	Referentietest	Activatiemarker	Gevoeligheid (%)	Specificiteit (%)	n	Referentie
Metamizol	A ± GPT	CD63	42	100	56	(33)
Diverse NSAID's	A ± GPT	CD63	15-55	74-100	90	(34)
Diclofenac	A	CD63	Geen significant verschil in CD63-expressie tussen patiënten en controles (IgE-onafhankelijke degranulatie)		26	(35)
Diverse NSAID's	A	CD63	43	100	72	(36)
Pyrazolonen	A ± HT ± GPT	CD63	55	86	107	(37)
ASA	A ±	CD63	34	79	42	(38)
Diclofenac	GPT	CD203c	17	100		
		CD63	17	92		
		CD203c	22	100		
ASA	A ± GPT	CD63	30	40	20	(39)
		CD203c	70	45		
Diclofenac	A ± GPT	CD63	0	/	22	(40)
ASA	A + GPT	CD63	80* 78**	83* 50**	59	(41)
Diverse NSAID's	A + GPT	CD63	61	91	29	(42)
Diverse NSAID's	A	CD63	37	90	80	(43)
Metamizol	A	CD63	0	/	6 patiënten, geen controles	(44)
Metamizol	A ± HT	CD63	70	100	30	(45)
Diverse NSAID's	A ± GPT	CD63	100	20	91	(46)

A = anamnese, HT = huidtest, GPT = geneesmiddelenprovocatietest, n = aantallen patiënten en controle-individuen, ASA= aspirine.

* = voor anafylaxie, ** = voor astma/rhinoconjunctivitis

ticeren patiënten kan de BAT echter een meerwaarde hebben.⁵⁹ In 10 studies werd de diagnostische waarde van de BAT bij AGA ten gevolge van β -lactamantibiotica geëvalueerd. Het betrof vaak amoxicilline. Vergeleken met de geneesmiddelen-sIgE-waarde vertoont de BAT een hogere gevoeligheid (ongeveer 50%) en specificiteit (ongeveer 90%).^{17-19,21,24,25} De BAT met β -lactamantibiotica lijkt dus zeker potentieel te hebben bij patiënten bij wie de diagnose niet bevestigd wordt met huidtests en geneesmiddelen-sIgE, en wanneer gezocht wordt naar veilige alternatieven.

De quinolonen vormen een ander voorbeeld dat het potentieel van de BAT ondersteunt. Vooral moxifloxacine kan ernstige AGA veroorzaken.⁶⁰ De correcte diagnose van deze reacties is echter niet eenvoudig. Enerzijds zijn geen geneesmiddelen-sIgE-tests beschikbaar

en anderzijds lijken huidtests weinig of niet specifiek (positief voorspellende waarde 36%, negatief voorspellende waarde 25%).⁶¹ Studies betreffende de BAT met quinolonen (zie Tabel 2) zijn doorgaans zeer heterogeen met vaak inclusie van kleine groepen, maar lijken toch aan te geven dat CD63 misschien niet de ideale maat is om basofielenactivering/degranulatie door quinolonen te meten. De juiste verklaring hiervoor blijft onduidelijk, maar kan te maken hebben met het klinische fenotype en type quinolon.³² Maar ook het onderliggende mechanisme van de reacties dat mogelijk berust op een activatie van mestcellen (en misschien ook basofielen) via MRGPRX2, en dus niet via vorming van geneesmiddelen-sIgE/Fc ϵ RI-complexen, kan een rol spelen.⁶² Een soortgelijke verklaring geldt trouwens mogelijk ook voor de lage gevoeligheid van de BAT bij AGA door as-

TABEL 4. BAT bij acute allergie door geïodeerde radiocontrastmedia.⁴⁷⁻⁴⁹

Stimulus	Referentietest	Activatiemarker	Gevoeligheid (%)	Specificiteit (%)	n	Referentie
Diverse RCM	A + HT	CD63	100	100	3 patiënten, aantal controles onbekend	(47)
Diverse RCM	A ± HT	CD63	46-62*	89-100*	40	(48)
Diverse RCM	A ± HT ± GPT	CD63	63	100	28	(49)

RCM = radiocontrastmedia, A = anamnese, HT = huidtest, GPT = geneesmiddelenprovocatietest, n = aantallen patiënten en controle-individueen.
* = afhankelijk van de grenswaarde

pirine en NSAID's. Deze reacties zijn veelal evenmin toe te schrijven aan een vorming van geneesmiddelen-sIgE/FcεRI-complexen, maar wel aan een niet-selectieve inhibitie van COX-1 en COX-2, waarbij de AGA berust op een overproductie van cysteinylleukotriënen. Uitzondering hierop vormen mogelijk de AGA ten gevolge van pyrazolonen, die mogelijk wel IgE-afhankelijk zijn en waarbij de BAT mogelijk toch zinvol kan zijn (zie Tabel 3 op pagina 75). De waarde van de BAT bij AGA door radiocontrastmedia is tot nu toe in een drietal studies geëvalueerd en is samengevat in Tabel 4.

PERSPECTIEF

De BAT/HistaFlow[®] vormt een belangrijke aanwinst in de diagnostiek van AGA. De techniek kan niet alleen helpen bij de diagnosestelling, maar ook in het ontfaan van de mechanismen die leiden tot de activering en degranulatie van basofielen en mestcellen. Onder tusschen werd de technologie aangepast om de activatie/degranulatie van gekweekte mestcellen te bestuderen.⁶³ De klinische toepassing van de BAT/HistaFlow[®] moet vooral gezocht worden als diagnostisch hulpmiddel wanneer andere tests ontbreken, of wanneer de resultaten twijfelachtig of negatief zijn.⁶⁴ Grotere multicenterstudies zijn echter absoluut noodzakelijk om na te gaan of de techniek zijn beloftes kan waarmaken, om onduidelijkheden en controversen op te helderen en om de protocollen te standaardiseren. Pas wanneer hieraan voldaan wordt, kan de technologie mogelijk een basisplaats verwerven in de dagelijkse, maar gespecialiseerde, allergologische praktijkvoering.

REFERENTIES

- Knol EF, Mul FP, Jansen H, et al. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:328-38.
- Bridts CH, Sabato V, Mertens C, et al. Flow cytometric allergy diagnosis: basophil activation techniques. *Methods Mol Biol* 2014;1192:147-59.

- Sabato V, Verweij MM, Bridts CH, et al. CD300a is expressed on human basophils and seems to inhibit IgE/FcεRI-dependent anaphylactic degranulation. *Cytometry B Clin Cytom* 2012;82:132-8.
- Ebo DG, Dombrecht EJ, Bridts CH, et al. Combined analysis of intracellular signalling and immunophenotype of human peripheral blood basophils by flow cytometry: a proof of concept. *Clin Exp Allergy* 2007;37:1668-75.
- Verweij MM, Sabato V, Nullens S, et al. STAT5 in human basophils: IL-3 is required for its FcεRI-mediated phosphorylation. *Cytometry B Clin Cytom* 2012;82:101-6.
- Ebo DG, Bridts CH, Mertens CH, et al. Analyzing histamine release by flow cytometry (HistaFlow): a novel instrument to study the degranulation patterns of basophils. *J Immunol Methods* 2012;375:30-8.
- Cop N, Uytendaele AP, Sabato V, et al. Flow cytometric analysis of drug-induced basophil histamine release. *Cytometry B Clin Cytom* 2016;90:285-8.
- Abuaf N, Rajoeli B, Ghazouani E, 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.
- Monneret G, Benoit Y, Debard AL, et al. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol* 2002;102:192-9.
- Sudheer PS, Hall JE, Read GF, et al. Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia* 2005;60:251-6.
- Kvedariene V, Kamey S, Ryckwaert Y, et al. Diagnosis of neuromuscular blocking agent hypersensitivity reactions using cytofluorimetric analysis of basophils. *Allergy* 2006;61:311-5.
- Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, et al. Flow-assisted diagnostic management of anaphylaxis from rocuronium bromide. *Allergy* 2006;61:935-9.
- Sainte-Laudy J, Orsel I. Interest of a new flow cytometric protocol applied to diagnosis and prevention of per anaesthetic accidents induced by neuromuscular blockers. *Rev Fr Allergol* 2008;48:5.
- Leysen J, Bridts CH, De Clerck LS, et al. Allergy to rocuronium: from clinical suspicion to correct diagnosis. *Allergy* 2011;66:1014-9.
- Hagau N, Gherman-Ionica N, Stichi M, et al. Threshold for basophil activation test positivity in neuromuscular blocking agents hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2013;9:42.
- Uytendaele AP, Sabato V, Bridts CH, et al. Immunoglobulin E antibodies to atracurium: a new diagnostic tool? *Clin Exp Allergy* 2015;45:485-7.

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1 Acute geneesmiddelenallergie (AGA) berust doorgaans op een activatie van basofielen en/of mestcellen. De degranulatie die daarbij tot stand komt is niet per se het gevolg van een vorming van IgE/Fc ϵ RI-complexen.**
- 2 Het correct diagnosticeren van een AGA is niet altijd eenvoudig.**
- 3 De basofielenactiveringstest (BAT/HistaFlow[®]) vormt een veilige in-vitrotest waarmee het mogelijk is om simultaan verschillende geneesmiddelen te testen. Daarbij is de toepassing niet beperkt tot de studie van actieve componenten, maar kunnen ook hulpstoffen bestudeerd worden.**
- 4 De BAT is tot nu toe vooral bestudeerd bij 'neuromuscular blocking agents', β -lactamantibiotica, quinolonen en NSAID's. Rond de toepassing van de BAT in de diagnostische aanpak van NSAID-allergie bestaan heel wat controversen. De waarde van de BAT bij AGA door quinolonen staat nog niet vast.**
- 5 Verdere geneesmiddelenspecifieke studies zijn noodzakelijk alvorens de BAT zijn intrede kan doen in de dagelijkse gespecialiseerde allergologische praktijk.**

17. 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.

18. Gamboa PM, Garcia-Aviles MC, Urrutia I, et al. Basophil activation and sulfidoleukotriene production in patients with immediate allergy to betalactam antibiotics and negative skin tests. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004;14:278-83.

19. Torres MJ, Padial A, Mayorga C, et al. The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1768-75.

20. Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy* 2008;38:921-8.

21. De Week AL, Sanz ML, Gamboa PM, et al. Diagnosis of immediate-type beta-lactam allergy in vitro by flow-cytometric basophil activation test and sulfidoleukotriene production: a multicenter study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009;19:91-109.

22. Eberlein B, Leon Suarez I, Darsow U, et al. A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2010;40:411-8.

23. Garcia-Ortega P, Marin A. Usefulness of the basophil activation test (BAT) in the diagnosis of life-threatening drug anaphylaxis. *Allergy* 2010;65:1204.

24. Torres MJ, Ariza A, Fernandez J, et al. Role of minor determinants of amoxicillin in the diagnosis of immediate allergic reactions to amoxicillin. *Allergy* 2010;65:590-6.

25. Torres MJ, Romano A, Blanca-Lopez N, et al. Immunoglobulin E-mediated hypersensitivity to amoxicillin: in vivo and in vitro comparative studies between an injectable therapeutic compound and a new commercial compound. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1595-601.

26. Uyttebroek AP, Sabato V, Cop N, et al. Diagnosing cefazolin hypersensitivity: Lessons from dual-labeling flow cytometry. *J Allergy Clin Immunol Practice* 2016;4:1243-5.

27. Seitz CS, Brocker EB, Trautmann A. Diagnostic testing in suspected fluoroquinolone hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1738-45.

28. Lobera T, Audicana MT, Alarcon E, et al. Allergy to quinolones: low cross-reactivity to levofloxacin. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:607-11.

29. Ben Said B, Berard F, Bienvenu J, et al. Usefulness of basophil activation tests for the diagnosis of IgE-mediated allergy to quinolones. *Allergy* 2010;65:535-6.

30. Aranda A, Mayorga C, Ariza A, et al. In vitro evaluation of IgE-mediated hypersensitivity reactions to quinolones. *Allergy* 2011;66:247-54.

31. Rouzair P, Nosbaum A, Denis L, et al. Negativity of the basophil activation test in quinolone hypersensitivity: a breakthrough for provocation test decision-making. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157:299-302.

32. Fernandez TD, Ariza A, Palomares F, et al. Hypersensitivity to fluoroquinolones: The expression of basophil activation markers depends on the clinical entity and the culprit fluoroquinolone. *Medicine* 2016;95:e3679.

33. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy* 2003;58:312-7.

34. Gamboa P, Sanz ML, Caballero MR, et al. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1448-57.

35. Malbran A, Yeyati E, Rey GL, et al. Diclofenac induces basophil degranulation without increasing CD63 expression in sensitive patients. *Clin Exp Immunol* 2007;147:99-105.

36. Rodríguez-Trabado A, Camara-Hijon C, Ramos-Cantarino A, et al. Basophil activation test for the in vitro diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Allergy Asthma Proc* 2008;29:241-9.

37. Gomez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, et al. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the