



**FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA
TRABALLO DE FIN DE GRADO EN MEDICINA CON
NIVEL DE MÁSTER**

Activación de basófilos en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera*: revisión sistemática de la evidencia científica

Activación de basófilos no seguimento da inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera*: revisión sistemática da evidencia científica

Basophil activation in the follow-up of immunotherapy with *Apis mellifera* venom: systematic review of the scientific evidence

Autor: Cristian Hernández Pérez

Tutora: Carmen Vidal Pan

Departamento: Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina

Curso académico: 2020-2021

Convocatoria: junio

Dña. Carmen Vidal Pan, Doctora en Medicina y Ciruga, Jefe del Servicio de Alergología de la EOXI de Santiago de Compostela y Profesora Titular en el Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina. Área de conocimiento de Medicina. Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela.

HACE CONSTAR que la memoria del trabajo Fin de Grado-Master, titulado “**Activación de basófilos en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera*: revisión sistemática de la evidencia científica**”, presentado por Don Cristian Hernández Pérez, ha sido realizado en el área de conocimiento de Medicina, Servicio de Alergología del Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina bajo su dirección y cumple los requisitos legales para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para aspirar a la titulación de Grado-Master en Medicina.

Lo que firmo a los efectos oportunos en Santiago de Compostela a 18 de mayo de 2021

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas y terminología empleada	1
Resumen	2
Resumo	3
Abstract	4
1. Introducción: la alergia al veneno de los himenópteros.	5
1.1. Epidemiología y generalidades	5
1.2. Manifestaciones clínicas	7
1.3. Diagnóstico	7
1.4. La inmunoterapia específica es el tratamiento de elección en la anafilaxia al veneno de los himenópteros	9
1.4.1. La prueba de repicadura	9
1.4.2. Cambios humorales	10
1.4.3. La prueba de activación de basófilos	11
2. Objetivos	12
3. Metodología empleada	12
4. Resultados	16
5. Discusión	25
6. Recomendaciones	28
7. Conclusiones	28
8. Referencias	29
9. Agradecimientos	34

Abreviaturas y terminología empleada

Abreviatura	Significado
APC	Células presentadoras de antígenos
BAT	Prueba de activación de basófilos
cm	centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgG4	Inmunoglobulina G4
IL	Interleucina
kDa	kilo-Dalton
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ml	mililitro
n	Tamaño muestral
ng	nanogramo
OCEBM	Centro de Oxford de Medicina basada en la evidencia
PAF	Factor de activación plaquetaria
pg	picogramo
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
TCR	Receptor de células T
Th	Linfocitos T helper (colaboradores)
TNF	Factor de necrosis tumoral
VIT	Inmunoterapia con veneno de himenópteros
µg	microgramos

Resumen

Introducción. La inmunoterapia es el único tratamiento etiológico de la alergia al veneno de himenópteros. Su objetivo es disminuir la respuesta de las células efectoras y evitar reacciones sistémicas graves. Los marcadores propuestos en el seguimiento, como la evolución de la IgE específica o la aparición de IgG4, no reflejan bien esta disminución de la respuesta, y la prueba de repicadura puede causar reacciones anafilácticas. La prueba de activación de basófilos (BAT) mide “ex vivo” la activación de dichas células mediante la expresión de marcadores de superficie como el CD63, por lo que, de resultar útil, supondría una técnica segura en el seguimiento de la inmunoterapia.

Objetivos. Realizar una revisión sistemática de la evidencia publicada sobre la utilidad del BAT como marcador de eficacia de la inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera* en pacientes con alergia sistémica frente al veneno de este himenóptero.

Métodos. Revisión sistemática de los estudios publicados en las bases de datos MEDLINE, Cochrane, y Clinical Trials Databases.

Resultados. Solo dos artículos se centran de una manera exclusiva en la utilidad del BAT en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera*. En 4 artículos adicionales se incluye algún paciente con alergia al veneno de este himenóptero. Dos estudios realizan prueba de repicadura (sobre un total de 14 pacientes) como patrón oro para demostrar la eficacia de la inmunoterapia, y en ambos se demuestra que la activación de basófilos disminuye al final del tratamiento, coincidiendo con la buena tolerancia a la exposición al veneno. La dosis de alérgeno con la que se observan los mejores resultados es de 0.1 µg/mL. Los tiempos en los que se realizan los análisis son muy variables en los estudios publicados.

Conclusiones. La prueba del BAT puede ser útil en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera* como marcador de tolerancia a la exposición a este veneno. No obstante, el número de estudios y pacientes analizados es muy bajo, la técnica es compleja y poco estandarizada como para recomendar de una forma generalizada su uso.

Palabras clave: Prueba de activación de basófilos, inmunoterapia, *Apis mellifera*.

Resumo

Introdución. A inmunoterapia é o único tratamento etiolóxico da alerxia ao veneno de himenópteros. O seu obxectivo é diminuír a resposta das células efectoras e evitar reaccións sistémicas graves. Os marcadores propostos no seguimento, como a evolución da IgE específica ou a aparición de IgG4, non reflicten ben esta diminución da resposta, e a proba de repicadura pode causar reaccións anafilácticas. A proba de activación de basófilos (BAT) mide “ex vivo” a activación das devanditas células mediante a expresión de marcadores de superficie como o CD63, polo que de resultar útil supoñería unha técnica segura no seguimento da inmunoterapia.

Obxectivos. Realizar unha revisión sistemática da evidencia publicada sobre a utilidade do BAT como marcador de eficacia da inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera* en pacientes con alerxia sistémica fronte ao veneno deste himenóptero.

Métodos. Revisión sistemática dos estudos publicados nas bases de datos MEDLINE, Cochrane, e Clinical Trials Databases.

Resultados. Só dous artigos céntranse dunha maneira exclusiva na utilidade do BAT no seguimento da inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera*. En 4 artigos adicionais inclúese algún paciente con alerxia ao veneno deste himenóptero. Dous estudos realizan proba de repicadura (sobre un total de 14 pacientes) como patrón oro para demostrar a eficacia da inmunoterapia e en ambos se demostra que a activación de basófilos diminúe ao final do tratamento, coincidindo coa boa tolerancia á exposición ao veneno. A dose de alérxeno coa que se observan os mellores resultados é de 0.1 µg/mL. Os tempos nos que se realizan as análises son moi variables nos estudos publicados.

Conclusións. A proba do BAT poder ser útil no seguimento da inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera* como marcador de tolerancia á exposición a este veneno. Con todo, o número de estudos e pacientes analizados é moi baixo, a técnica complexa e pouco estandarizada como para recomendar dunha forma xeneralizada o seu uso.

Palabras Chave. Proba de activación de basófilos, inmunoterapia, *Apis mellifera*.

Abstract

Introduction. The only existing etiological treatment for Hymenoptera venom allergy is immunotherapy. This treatment's objective is to reduce the effector cells' response and to avoid severe systemic reactions. The markers proposed to monitor the treatment, such as the evolution of specific IgE or the appearance of IgG4, don't properly reflect this decrease of the response, and the re-sting test can cause anaphylactic reactions. The basophil activation test (BAT) measures "in vivo" the activation of those cells through the expression of surface markers such as CD63, so if proven useful it would entail a safe technique in the monitoring of immunotherapy.

Aim of the study. To perform a systematic review of the evidence published about the usefulness of BAT as a marker of effectiveness of immunotherapy with *Apis mellifera* venom on patients with a systemic allergy to this hymenopter.

Methods. Systematic review of the results published on the databases MEDLINE, Cochrane and Clinical Trials Databases.

Results. Only two articles focus exclusively on the utility of BAT on the follow up of the immunotherapy with *Apis mellifera* venom. Four additional articles include cases of some patients with allergy to this hymenopter's venom. Two studies perform the re-sting test (on a total of 14 patients) as the gold standard to show the efficiency of immunotherapy. Both show a decrease in the activation of basophils at the end of the treatment, corresponding with the patients' good tolerance to the exposure to the poison. The dose of the allergen with which the best results are observed is 0.1 µg/mL. The times in which the analyses are carried out vary broadly in published studies.

Conclusions. The BAT test is useful in the monitoring of immunotherapy with *Apis mellifera* venom as marker of tolerance to the exposure to this venom. However, the number of studies and patients analyzed is very low and the technique is complex and not sufficiently standardized to recommend it's use in a generalized way.

Key Words. Basophil activation test, allergen immunotherapy, *Apis mellifera*.

1. INTRODUCCIÓN: LA ALERGIA AL VENENO DE LOS HIMENÓPTEROS

1.1 Epidemiología y generalidades

Los himenópteros son un tipo de insecto caracterizado por tener alas membranosas y capacidad para inyectar veneno con una finalidad defensiva. Dentro del orden de los himenópteros hay dos familias que destacan desde el punto de vista alergológico, la familia *Vespidae* (donde se encuentran las avispas) y *Apidae* (familia a la que pertenecen las abejas) (1).

El veneno de himenóptero constituye una fuente alergénica importante y una de las principales causas de anafilaxia. El veneno de abeja (*Apis mellifera*) es el mejor conocido debido a la secuenciación de su genoma y el estudio de su composición, convirtiéndose en el modelo para el estudio de estos insectos. La alergia al veneno de himenópteros se produce como consecuencia de una reacción de hipersensibilidad dependiente de IgE a algún componente del veneno de dichos insectos (2).

Se trata de una patología cada vez más frecuente en nuestro medio, alrededor de un 9-28% de la población presenta pruebas positivas pese a no haber presentado nunca sintomatología. Factores como realizar diversas actividades al aire libre o la aparición de especies invasoras como la *Vespa velutina*, que pese a ser originaria del sudeste asiático, se ha asentado en zonas del norte y noroeste peninsular, han contribuido a este aumento de la prevalencia (3).

Las manifestaciones clínicas de la alergia al veneno de los himenópteros pueden variar desde una reacción local, que puede afectar en torno al 5-26% de la población general, hasta manifestaciones sistémicas. Las manifestaciones generales son menos frecuentes, en torno a un 2% de la población, aunque mucho más graves, pudiendo llegar incluso a

comprometer la vida del paciente. La mortalidad se encuentra en torno a las 0,03 y 0,48 muertes por 1.000.000 de personas al año. Por lo tanto, la alergia al veneno de himenópteros es una causa importante de morbi-mortalidad (3).

En la respuesta inmune al veneno de himenópteros intervienen varias células conocidas como células efectoras, entre las que se encuentran los linfocitos Th2 efectores, mastocitos, eosinófilos y basófilos (4,5).

Cuando el alérgeno entra en contacto por primera vez con el organismo, en nuestro caso a través de la inoculación por una picadura, es captado por la célula presentadora de antígenos (APC), la cual lo presenta a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHCII) que se une al receptor TCR del linfocito T cooperador (Th0), lo que hace que el linfocito se transforme en un Th2 y libere varias citoquinas (IL-4, IL-5, IL 9 e IL13) responsables de aumentar la síntesis de IgE específica, entre otras funciones. Dicha inmunoglobulina se une a través del receptor Fc a la superficie de los basófilos y mastocitos (4,5).

Cuando el alérgeno entra en contacto de nuevo con el paciente alérgico, se une a la inmunoglobulina fijada previamente en la superficie de los basófilos y mastocitos, lo que provoca su activación y la liberación de mediadores químicos como la histamina, citoquinas proinflamatorias, IL-4 e IL-5 y leucotrienos, o la síntesis del factor activador de plaquetas (PAF) (5).

Además, los mastocitos favorecen la formación y la respuesta de los linfocitos Th2, mediante la IL-3, IL-5 y la prostaglandina D2 (PGD2). La IL-4 e IL-13 produce la síntesis de IgE mediante la activación de los linfocitos B. La IL-3 e IL-5 activa a los eosinófilos, así como la IL-8 y el TNF- α que activa a los neutrófilos. La activación de los eosinófilos y basófilos produce su desgranulación (5).

1.2 Manifestaciones clínicas

Desde un punto de vista académico, las manifestaciones clínicas se dividen en locales y sistémicas. Las reacciones locales se caracterizan por la aparición de dolor, rubor, prurito o una tumefacción en la zona de la picadura, la cual es menor de 10 cm y se suele resolver en las primeras 24 horas. Las reacciones locales extensas son parecidas a las locales normales, pero en este caso la tumefacción es mayor de 10 cm y pueden persistir más de 24 horas. Si la picadura tiene lugar en una región de la cavidad respiratoria podría comprometer la vía aérea superior (2).

Las reacciones anafilácticas se encuentran dentro de las manifestaciones generales o sistémicas. Son una expresión clínica de gravedad, se caracterizan por ser mediadas por IgE y producir una liberación masiva de los mediadores de las células efectoras, aparecen en un período relativamente corto de tiempo tras la picadura del himenóptero, generalmente durante la primera hora. Pueden producir la afectación de varios sistemas, como la piel, el sistema respiratorio, circulatorio o digestivo, entre otros (2,6).

Puede cursar con síntomas como urticaria generalizada, angioedema, náuseas, vómitos, diarreas, mareos, o síntomas respiratorios como la obstrucción bronquial que puede obstruir la vía aérea. Dichos síntomas respiratorios junto a las manifestaciones cardiovasculares como la hipotensión, las arritmias o incluso la parada cardiorrespiratoria son una potencial causa de muerte (2,6), de ahí la necesidad de un correcto diagnóstico y tratamiento de esta patología.

1.3 Diagnóstico

La historia clínica juega un papel fundamental en el diagnóstico de la alergia al veneno de himenópteros, ya que una historia clínica compatible junto a la demostración de IgE específica, es suficiente para establecer el diagnóstico. La mayoría de las técnicas

diagnósticas deberán ser realizadas por un especialista en un medio hospitalario, debido al elevado riesgo de que puedan producirse manifestaciones sistémicas que puedan causar la muerte del paciente (1).

En la historia clínica deben quedar reflejados aspectos básicos como el insecto implicado, el tipo de sintomatología, el tiempo transcurrido desde la picadura hasta la aparición de la clínica, la presencia de otras enfermedades que puedan agravar el cuadro clínico como por ejemplo el asma o las enfermedades cardiovasculares, así como el riesgo de repicadura y por lo tanto reacciones en el futuro (1).

Entre las pruebas *in vivo* se destacan las pruebas intradérmicas que tienen una sensibilidad mayor que las pruebas intraepidérmicas o pruebas de *prick*. Con la llegada del diagnóstico molecular *in vitro*, las pruebas cutáneas han sido relegadas a un segundo plano pues suele ser precisa la confirmación del insecto responsable mediante la demostración del reconocimiento de la IgE de las distintas proteínas presentes en el veneno. Las pruebas *in vitro* permiten no solo confirmar la existencia de la IgE específica frente a la fuente alérgica completa (veneno completo del insecto implicado), si no también identificar el sensibilizante primario y los componentes dominantes (7). Así, para el caso de *Apis mellifera*, los componentes moleculares identificados se recogen en la Tabla 1 (2).

Tabla 1. Componentes moleculares del veneno de <i>Apis mellifera</i> (2)		
Alérgeno	Peso molecular (kDa)	Función
Api m 1	16	Fosfolipasa A2
Api m 2	39	Hialuronidasa
Api m 3	43	Fosfatasa ácida
Api m 4	3	Melitina
Api m 5	100	Dipeptidilpeptidasa IV (alérgeno C)
Api m 6	8	Inhibidor de proteasa
Api m 7	39	Proteasa
Api m 8	70	Carboxilesterasa
Api m 9	60	Carboxipeptidasa
Api m 10	50-55	Icarapina
Api m 11	50	Proteína principal de la jalea real
Api m 12	200	Vitelogenina

1.4 La inmunoterapia específica es el tratamiento de elección en la anafilaxia al veneno de los himenópteros

El empleo de extractos alérgicos o vacunas para la alergia con el veneno puro del himenóptero responsable es el tratamiento etiológico de elección con el que se consigue la protección frente a una nueva picadura, evitando la reproducción de la reacción anafiláctica (8). Para ello se administran dosis repetidas del alérgeno con una periodicidad mensual o bimensual y durante un período que oscila entre 3 y 5 años. El objetivo de la inmunoterapia es producir un cambio de isotipo en las inmunoglobulinas, dando lugar a la producción de IgG4 específica y un cambio en el patrón de producción de citocinas a través de la estimulación de las células reguladoras (9).

Para valorar los cambios inmunológicos que provoca la inmunoterapia y la posible tolerancia a picaduras posteriores se disponen de varias técnicas:

1.4.1 *La prueba de repicadura.*

Consiste en exponer al paciente de forma controlada a la picadura del himenóptero. El paciente se encuentra monitorizado y se pretende comprobar si se reproduce o no la reacción que motivó el tratamiento, con la idea de reproducir una picadura espontánea ambiental, y poder orientar al paciente sobre la necesidad de llevar o no adrenalina para su autoadministración, e incluso valorar la suspensión del tratamiento.

Desde un punto de vista teórico, se considera el patrón oro como forma de controlar la eficacia de la inmunoterapia, pero estas pruebas no están exentas de riesgo, pudiendo desencadenar reacciones adversas graves. Esta metodología depende, además, de la posibilidad de conseguir ejemplares para la prueba y de asegurar que la inyección del veneno es total y no parcial lo que puede variar por la situación de estrés en la que se encuentra el insecto al que, previamente, se le han de cortar las alas y se anestesia

ligeramente con CO₂. La prueba de la repicadura no está indicada durante la fase de diagnóstico, solamente en el seguimiento de la eficacia del tratamiento.

1.4.2 *Cambios humorales.*

El aumento de IgG y particularmente de IgG4 tienden a asociarse al tratamiento con inmunoterapia, dichos anticuerpos podrían tener un efecto bloqueante al competir con la IgE, de esta forma al unirse el alérgeno con la IgG4, no habría activación de mastocitos y basófilos evitando la liberación de mediadores inflamatorios. Sin embargo, pese a que la inmunoterapia con veneno de himenópteros aumenta los niveles de IgG4, parece que no se correlaciona bien con la respuesta clínica. La tabla 2 recoge alguno de los cambios inmunológicos producidos en el tratamiento con la inmunoterapia (9).

Tabla 2: Cambios producidos en el tratamiento con inmunoterapia (9)
Cambios de anticuerpos
Aumento de IgG, particularmente de IgG4
Aumento inicial de IgE específica contra el alérgeno y posteriormente una disminución gradual
Cambios celulares
Aumento de células B reguladoras específicas
Aumento de la secreción de IL-10
Aumento de las células T reguladoras específicas
Supresión de la proliferación de células Th2
Disminución en la liberación de mediadores de mastocitos, basófilos y eosinófilos
Disminución de los factores liberadores de histamina

El estudio de la evolución de los niveles de IgE específicas frente al veneno de himenóptero implicado forma parte de la práctica clínica habitual, si bien no está clara la relación entre los mismos y la tolerancia a la exposición. Así, pese a que se considera que los niveles altos de IgE específica podrían justificar una peor tolerancia a la exposición, unos niveles bajos no descartan reactividad clínica.

La ausencia de una prueba diagnóstica fiable y sin riesgos, ha llevado a la búsqueda de marcadores alternativos entre los que se encuentra la prueba de activación de basófilos.

1.4.3 La prueba de activación de basófilos.

La prueba de activación de basófilos (BAT) es una técnica “in vitro” específica para las reacciones de hipersensibilidad tipo I. Se fundamenta en la expresión o sobreexpresión de las moléculas CD63 y CD203c en la superficie del basófilo una vez se ha activado. Cuando el alérgeno se une a la IgE de la superficie del basófilo, este se activa, lo que hace que los gránulos se fusionen con la membrana de la célula y liberen su contenido, es en esta fusión cuando moléculas que se encontraban en el interior del citoplasma se expresan en la superficie del basófilo, siendo por lo tanto las moléculas CD63 y CD203c marcadores de activación del basófilo (7,10). Mientras el CD203c se encuentra ya en la superficie de los basófilos, CD63 se localiza en la membrana de los gránulos intracitoplasmáticos y solo aparece en la superficie del basófilo cuando los gránulos se abren al exterior en el proceso de activación (7). Este marcador, no obstante, puede aparecer en la superficie de otras células como monocitos, plaquetas o macrófagos por lo que no se puede considerar como exclusivo de los basófilos (10).

La principal ventaja de la BAT es que, en cierta forma, reproducen “ex vivo” una reacción de hipersensibilidad mediada por IgE, evitando así el riesgo de una prueba de exposición no solo con el veneno de los himenópteros, también con alimentos o medicamentos en los que sí tiene una finalidad diagnóstica (7).

Si bien esta prueba se ha utilizado como parámetro de seguimiento en la inmunoterapia con aeroalérgenos y con alimentos, los estudios realizados con veneno de himenópteros son escasos y con una metodología no siempre uniforme. No existen revisiones sistemáticas que analicen la utilidad de esta prueba en el seguimiento de los pacientes tratados con veneno de *Apis mellifera*.

2. OBJETIVO

El principal objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado es el de realizar una revisión sistemática sobre los estudios publicados con el empleo de la BAT, con la finalidad de comprobar su utilidad como marcador de eficacia en el seguimiento de los pacientes diagnosticados de anafilaxia por veneno de *Apis mellifera* que reciben inmunoterapia específica con este veneno.

3. METODOLOGÍA EMPLEADA

Para la realización de la presente revisión sistemática, conté con el apoyo de cuatro médicos especialistas en Alergología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago que reprodujeron la búsqueda sistemática y ayudaron a analizar las inconsistencias.

Las palabras clave empleadas para la búsqueda bibliográfica fueron “basophil activation test” OR “basophil reactivity” AND “hymenoptera venom immunotherapy”. Se utilizaron los operadores booleanos “AND” y “OR” para limitar la búsqueda a aquellos artículos específicamente dirigidos al objetivo a evaluar en el presente TFG. No se limitó la búsqueda por veneno específico de himenóptero para evitar la pérdida de estudios en los que se hubiesen empleado venenos de distintas especies no claramente especificadas en título, abstract o palabras clave. La revisión se realizó en MEDLINE, Cochrane y Clinical Trials Databases con límite temporal establecido entre 1990, año en que se desarrolló la técnica,

y el 8 de enero de 2021. No se limitó la búsqueda por idioma, pero se descartaron aquellos artículos escritos en un idioma diferente a inglés o español. Se investigó la presencia de referencias adicionales en los propios artículos resultado de la búsqueda. El Flowchart de la búsqueda se representa en la Figura 1.

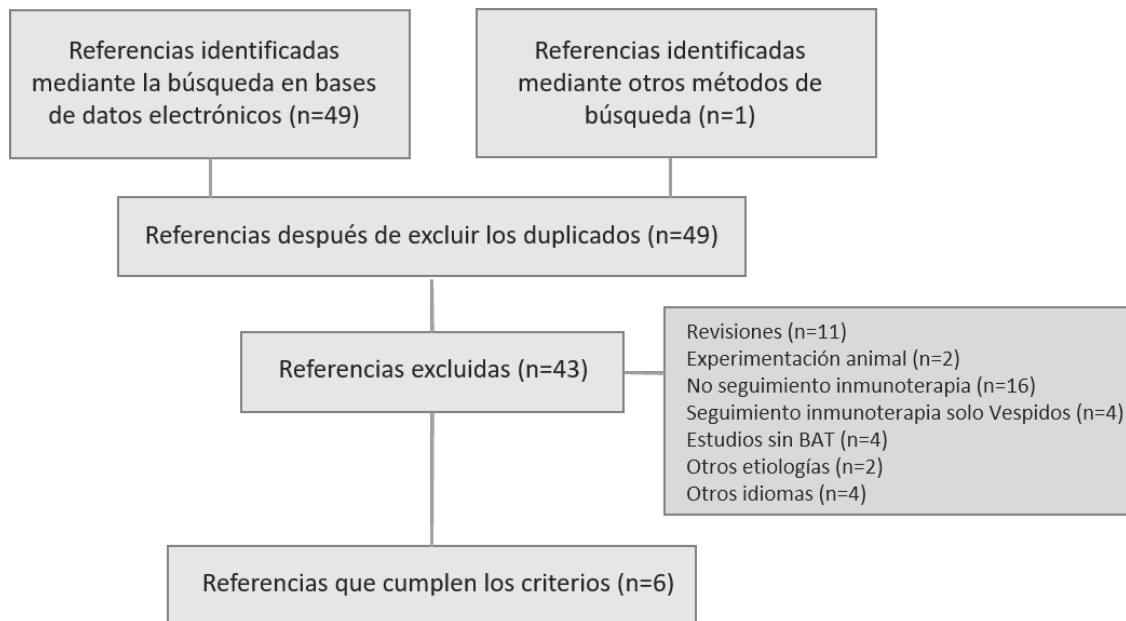


Figura 1. *Flowchart* de la búsqueda y selección de artículos en la presente revisión. Fuente: elaboración propia.

Los niveles de evidencia y grado de recomendación del Oxford Centre for Evidence-Based Medicine (OCEBM) se recogen en la Tabla 3.

Para cada artículo se analizó:

- a. Número de pacientes incluidos en el estudio y su edad (expresada como edad media o mediana y rango, según se detalle en los mismos).
- b. Método empleado para la realización del BAT.

- c. Punto de corte seleccionado para definir un resultado positivo en el BAT.
- d. Dosis del alérgeno (veneno de *Apis mellifera*) con los que se realizaron los estudios del BAT.
- e. Momento en que se realizó el análisis respecto al tratamiento.
- f. La realización o no de prueba de repicadura o análisis de picaduras espontáneas.

Tabla 3. Niveles de evidencia y grados de recomendación de la OCEBM (2009) (11,12)

Nivel de evidencia	Tipo de estudio	Grado de recomendación	Significado
1a	Revisión sistemática de ensayos clínicos aleatorizados (con homogeneidad).	A	Muy recomendable
1b	Ensayo clínico aleatorizado con intervalo de confianza estrecho.		
1c	Práctica clínica ("todos o ninguno": cuando todos los pacientes mueren antes de que el tratamiento esté disponible, y con él algunos sobreviven; o cuando algunos pacientes morirían antes de que el tratamiento esté disponible, pero con él no muere ninguno).		
2a	Revisión sistemática de estudios de cohortes (con homogeneidad).	B	Favorable
2b	Estudio de cohortes o ensayo clínico aleatorizado de baja calidad (por ejemplo, seguimiento <80%).		
2c	Outcomes research (estudios de cohortes de pacientes con el mismo diagnóstico en los que se relacionan los eventos que suceden con la terapia administrada), estudios ecológicos.		
3a	Revisión sistemática de estudios de casos y controles (con homogeneidad).		
3b	Estudios de casos y controles.	C	Favorable pero no concluyente
4	Serie de casos o estudios de cohortes de baja calidad que no logran definir claramente los grupos de comparación y/o no miden de manera objetiva las exposiciones y los resultados (preferiblemente cegados) y/o sin identificar o controlar adecuadamente variables de confusión conocidas y/o sin seguimiento completo y suficientemente prolongado.		
5	Opinión de expertos sin valoración crítica explícita o basada en principios fisiológicos o fisiopatológicos.	D	Ni se recomienda ni se desaprueba

OCEBM: Centro de Oxford de Medicina basada en la evidencia

4. RESULTADOS

Tan solo dos artículos centran su atención de forma exclusiva en la alergia al veneno de *Apis mellifera* y la utilidad del BAT en el seguimiento de la inmunoterapia específica (13,14) pero en ambos casos se trata de trabajos realizados en la edad pediátrica y no se realiza prueba de la repicadura, aunque sí se analiza si los pacientes han padecido picaduras espontáneas.

Los cuatro artículos restantes estudian la prueba del BAT en la alergia al veneno de los himenópteros e incluyen a pacientes con alergia y vacunación frente a distintas especies. En el caso de estos artículos se ha analizado la utilidad del BAT en el seguimiento de los que se vacunaron frente a *Apis mellifera*, siempre que se aporte esta información de forma específica frente a este veneno. En los casos en los que esto no fue posible, por falta de detalle en la publicación, se especifica en el análisis. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 4. Dado el reducido número de artículos encontrados que cumplen estos criterios se explicarán de forma individual con unas conclusiones y discusión conjunta.

Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. Zitnik S et al. Pediatr Allergy Immunol 2012;33:166-172 (13).

Edad y número de pacientes. Estudio realizado en 31 pacientes con edades comprendidas entre los 4 y 18 años. Los pacientes recibieron veneno de *Apis mellifera* con una dosis de mantenimiento cada 4 semanas.

Prueba de BAT. Se realizó con anticuerpo monoclonal anti-CD63 y el punto de corte se estableció en un 15% de basófilos activados tras la estimulación con el alérgeno.

Se emplearon 2 concentraciones del veneno: 0.1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La activación se realizó en 4 momentos:

Basal (T0), antes del inicio de la inmunoterapia.

A los 5 días tras haber alcanzado la dosis de mantenimiento de 100 μg en una pauta rush (T1)

A los 6 meses del inicio de la inmunoterapia (T2)

A los 2-4 años de tratamiento (T3). Esta última determinación solo se realizó en 26 de los pacientes pues en 5 casos se abandonó el tratamiento y no fue posible hacer el seguimiento.

Prueba de repicadura. No, pero sí hacen seguimiento de picaduras espontáneas durante el período del estudio y observaron buena tolerancia en 14 niños que padecieron este tipo de picaduras de forma natural.

Resultados obtenidos y análisis. Cuando la concentración de veneno que se emplea es la de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se observan cambios relevantes a lo largo del tiempo. En la determinación realizada a los 6 meses sí se observa un descenso de la activación de los basófilos pero que se recupera en la siguiente determinación realizada a los 2 o 4 años. Por el contrario, con la concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los pacientes muestran una menor activación basal que con la concentración más alta pero, aún así, positiva. Tras 6 meses de tratamiento la activación se reduce hasta 4 veces y esta reducción se mantiene a los 2-4 años de inmunoterapia.

En este estudio analizan el cociente entre la activación a 0.1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y comprueban que disminuye de forma significativa con el tratamiento lo que es lógico puesto que, como ya se ha comentado la activación disminuye con la dosis más baja y se mantiene con la más alta por lo que la disminución del cociente refleja esta diferente respuesta en función de la dosis.

Laboratory markers of mast cell and basophil activation in monitoring rush immunotherapy in bee venom-allergic children. Cichocka-Jarosz E et al. Immunotherapy 2011;3:1013-1017 (14).

Edad y número de pacientes. En el estudio se incluyen 5 pacientes con edades comprendidas entre los 9,5 y los 18 años. Los pacientes recibieron inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera* con dos dosis de mantenimiento posteriores a la dosis acumulada de 100 µg en las semanas 2 y 4.

Prueba de BAT. Se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-CD63 estableciendo el punto de corte en un aumento de basófilos del 10%.

Se emplearon 5 concentraciones comprendidas entre 11.5 ng/mL y 1.15 µg/mL.

La activación se realizó en tres momentos:

Basal (T0) antes del inicio de la inmunoterapia.

A los 15 días (T1) del inicio del estudio y antes de la administración de la primera dosis de mantenimiento.

A los 40 días (T2) del inicio de la inmunoterapia.

Prueba de repicadura. No realizan la prueba de repicadura.

Resultados obtenidos y análisis. Los resultados de la prueba de activación de basófilos permanecieron positivos en cuatro pacientes durante todo el periodo de observación, todos ellos reaccionaron a la concentración de 11.5 ng/mL y dos a la concentración de 1.15 ng/mL. No se aporta información sobre los resultados con las concentraciones inferiores. El niño de 9,5 años (paciente 5) permaneció negativo en las tres mediciones, las explicaciones a este hallazgo podrían ser una doble sensibilización o una reacción cruzada al veneno de abeja y avispa.

Los resultados en la prueba de activación de basófilos se mantuvieron constantes e interpretables durante la realización del estudio, lo que reforzó la opinión de que la BAT es

una prueba útil en el para la detección de la alergia al veneno de *Apis mellifera* pero no en el seguimiento de la inmunoterapia en los momentos estudiados. Por otra parte, y teniendo en cuenta que solo se determina la activación hasta 40 días después de iniciado el tratamiento, los resultados no son muy valorables para analizar la técnica como medida de seguimiento a largo plazo de un tratamiento que requiere años para conseguir su efecto.

Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge. Erzen R et al. Allergy 2012;67:822-839 (15).

Edad y número de pacientes. En este estudio se incluyó a un total de 33 pacientes pero se analizan los datos de los 23 que finalizaron el estudio. De ellos, 12 recibieron veneno de *Apis mellifera* (los 11 restantes eran alérgicos al veneno de vespídos). El rango de edades de los 12 pacientes con alergia a veneno de *Apis mellifera* fue de 25 a 63.

Prueba de BAT. Se realizó con anticuerpo monoclonal anti-CD63 y el punto de corte se estableció en un 15% de basófilos activados tras la estimulación con el alérgeno.

Se emplearon 2 concentraciones del veneno: 0.1 y 1 µg/mL.

La activación se realizó en 4 momentos:

Basal (T0), antes del inicio de la inmunoterapia.

Tras un año de inmunoterapia con 100 µg de veneno en 10 pacientes y 150 y 180 µg en los 2 pacientes restantes (T1)

Tras finalizar el período de tratamiento que se mantuvo un total de entre 4 y 5 años (T2).

A los 2-6 meses de realizar la prueba de la repicadura una vez finalizado el tratamiento (T3).

Prueba de repicadura. Se realizó a los 12 pacientes con resultado negativo en 11 de ellos. El único paciente que presentó una prueba positiva desarrolló una reacción sistémica de grado II tras la repicadura.

Resultados obtenidos y análisis. Cuando la concentración de veneno que se emplea es la de 1 µg/mL no se observan cambios relevantes a lo largo del tiempo. Por el contrario, con la concentración de 0.1 µg/mL, los pacientes muestran una disminución de la actividad de los basófilos de hasta 4 veces en las determinaciones realizadas en T2 y T3, esto es, tras finalizar la inmunoterapia y tras la realización de la prueba de la repicadura. El único paciente que presentó una prueba de repicadura positiva tuvo un comportamiento diferente en la prueba de activación de basófilos que no disminuyó en ningún momento, siendo incluso más marcada la activación de los basófilos en los últimos análisis.

Estos resultados apoyan el efecto de bloqueo de la respuesta de las células efectoras que consigue la inmunoterapia específica y que no parece alterarse por la picadura con el insecto, favoreciendo un estado de protección elevado para la mayoría de los pacientes.

Los resultados presentados por este grupo indican que el BAT es una prueba diagnóstica útil para comprobar la tolerancia a la repicadura tras la inmunoterapia específica a los 4-5 años.

Short-, intermediate-, and long-term changes in basophil reactivity induced by venom immunotherapy. Rodríguez-Trabado et al. Allergy Asthma Immunol Res 2016;8:412-420 (16).

Edad y número de pacientes. En este estudio se incluyó a un total de 10 pacientes de los cuales, 2 recibieron veneno de *Apis mellifera* (los 8 restantes eran alérgicos al veneno de vespídos). La edad de los 2 pacientes fue de 14 y 77 años. En este estudio se incluyó, además, a 4 y 7 pacientes que habían recibido inmunoterapia con *Apis mellifera* durante 3 y 5 años, respectivamente, pero sin determinación basal por lo que no se incluyeron en el presente análisis.

Prueba de BAT. Se realizó con anticuerpo monoclonal anti-CD63 y anti-CD203 y el punto de corte se estableció en un 15% de basófilos activados tras la estimulación con el alérgeno en la expresión de CD63.

Se emplearon 4 concentraciones del veneno: 25 ng, 0.1, 0.5 y 1 µg/mL.

La activación se realizó en 7 momentos:

Basal (T0), antes del inicio de la inmunoterapia.

A las 10 semanas de iniciado el tratamiento (T1).

A los 3 meses de tratamiento (T2).

A los 6 meses de tratamiento (T3).

A los 12 meses de tratamiento (T4).

A los 18 meses de tratamiento (T5).

Tras finalizar la vacunación, a los 60 meses (T6).

Prueba de repicadura. No se realizó prueba de repicadura pero sí seguimiento de las picaduras espontáneas. El paciente de 14 años padeció una picadura espontánea a los 12 meses de tratamiento que fue bien tolerada, sin reacción.

Resultados obtenidos y análisis. Se observa un descenso inicial en la activación de basófilos que ocurre en las mediciones realizadas 1 y 3 meses tras el inicio de la inmunoterapia, siendo más marcado el descenso en la segunda determinación. Curiosamente, este descenso no se mantiene en las determinaciones realizadas después a los 6 y 12 meses pero vuelve a disminuir, especialmente, en la determinación realizada al final del tratamiento. En relación a las concentraciones del veneno, los hallazgos fueron con todas las concentraciones si bien los autores apuntan a una mejor discriminación con las dosis inferiores: los primeros descensos de la activación de basófilos se observaron con las dosis más bajas. En el análisis realizado a 18 y 60 meses, la activación desaparece en el 85 y 100% de los casos, respectivamente.

Follow-up of venom immunotherapy on flow cytometry and definition of a protective index. Sainte-Laudy et al. Int Arch Allergy Immunol 2016;170:243-250 (17).

Edad y número de pacientes. En este estudio se incluyó a un total de 45 pacientes de los cuales, 7 recibieron veneno de *Apis mellifera* (los 38 restantes eran alérgicos al veneno de vespídos) si bien tan solo 15 pudieron completar el estudio, 2 de ellos alérgicos a *Apis mellifera* por lo que el análisis se centrará en estos 2 pacientes. No se aporta información detallada de las edades de estos 2 sujetos si bien todos fueron adultos (una edad media de 51 años con un rango entre 20 y 76 años para el total de la muestra).

Prueba de BAT. Se realizó con anticuerpo monoclonal anti-CD63 en su estuche comercial Flow2CAST y el punto de corte se definió en el 15% de basófilos activados tras la estimulación con el alérgeno en la expresión de CD63.

Se emplearon 4 concentraciones del veneno: 9, 28 y 83 ng/mL y 0.25 µg/mL.

La activación se realizó en 3 momentos:

Basal (T0), antes del inicio de la inmunoterapia.

A las 21 semanas de tratamiento (T1).

A los 3-5 años de tratamiento (T2).

Prueba de repicadura. Se realizó prueba de repicadura tras finalizar el tratamiento.

Resultados obtenidos y análisis. Se observa una respuesta basal muy intensa frente al veneno de *Apis mellifera* en los 2 pacientes. A las 21 semanas observa un descenso de la actividad de hasta 7 veces en ambos. En el análisis realizado a los 3-5 años de inmunoterapia el descenso del porcentaje de activación de basófilos aumenta llegando a ser 13 veces en un paciente y 24 veces menor en el otro paciente estudiado. A pesar de realizar el estudio con varias concentraciones no especifican cuál es la concentración que produce una mayor discriminación en la respuesta. La prueba de la repicadura fue negativa en los dos pacientes.

Agreement of skin test with IL-4 production and CD40L expression by T cells upon immunotherapy of subjects with systemic reactions to Hymenoptera stings. Urra JM et al. Molecular Immunol 2016;70:134-139 (18).

Edad y número de pacientes. Se realiza seguimiento de inmunoterapia a 14 pacientes de los que uno realizó tratamiento con veneno de *Apis mellifera*, siendo 13 alérgicos a vespídos y un paciente que no reconoce el insecto implicado en la reacción. La paciente incluida en el estudio tenía 33 años en el momento de su inclusión.

Prueba de BAT. Se realizó con anticuerpo monoclonal anti-CD63 mediante el estuche comercial BASOTEST. No se especifica el punto de corte por encima del cual se considera que la activación es positiva.

Se emplearon 2 concentraciones del veneno: 0.1 y 1 µg/mL.

La activación se realizó en 2 momentos:

Basal (T0), antes del inicio de la inmunoterapia.

A los 6 meses de tratamiento (T1).

Prueba de repicadura. No se realizó prueba de repicadura.

Resultados obtenidos y análisis. De la información recogida en la tabla de la publicación se comprueba que el único paciente que no presentó ningún grado de activación basal fue precisamente el paciente alérgico al veneno de *Apis mellifera* y tampoco se observa una modificación significativa a los 6 meses.

Autor y año	n	Edad	Dosis	Corte activación	Determinaciones	Resultado	Repicadura
Cichočka-Jarosz 2011	5	9.5-18 años	1.15 pg - 11.5 pg 0.115 ng - 1.15 ng 11.5 ng	10%	Basal (T0) - 15 días (T1) - 40 días (T2)	No diferencias en T0, T1 y T2	No
Zitnik 2012	31	4-18 años	0.1 µg - 1 µg	15%	Basal (T0) - 5 días (T1) - 6 m (T2) - 2-4 años (T3)	0.1/1µg disminuye a T2 y T3	No
Erzen 2012	12	25-68	0.1 µg - 1 µg	15%	Basal (T0) - 1 año (T1) Fin de la ITE (T2) -Tras repicadura (T3)	0.1 µg disminuye X4 en T2 y T3 1 µg no marca diferencias	Si
Rodríguez Trabado 2016	2	14-76	25 ng - 0.1 µg 0.5 µg - 1 µg	15%	Basal (T0) - 10 sem (T1) - 3 m (T2) - 6 m (T3) - 12 m (T4) - 18 m (T5) - 60 m (T6)	Descenso en T1 y en T2 para las concentraciones más bajas. Ascenso posterior y descenso en T6 para todas las dosis.	No
Sainte-Laudy 2016	2	20-76	9 ng - 28 ng -83 ng - 0.25 µg	15%	Basal (T0) - 21 sem (T1) - 3-5 años (T2)	Descenso en T1 y T2 sin especificar concentraciones a las que sucede	Si
Urra 2016	1	33 años	0.1 µg - 1 µg	No especifica	Basal (T0) - 6 m (T1)	Sin activación basal ni a los 6 meses*	No

Tabla 4. Resumen de la información obtenida en los artículos que cumplen los criterios de la búsqueda: pacientes con alergia a veneno de *Apis mellifera* que se someten a inmunoterapia específica y se realiza prueba de activación de basófilos en el seguimiento de los pacientes.

5. DISCUSIÓN

La técnica de BAT se posiciona como un método que trataría de reproducir *in vitro* la reacción que los pacientes podrían manifestar *in vivo*. Mediante el BAT se pretende identificar la respuesta alérgica específica de los basófilos ante el estímulo alérgico frente al que el paciente tiene IgE específica. De forma similar a lo que ocurre en una prueba cutánea en la que el contacto en la piel con el alérgeno es capaz de desencadenar una reacción inflamatoria local, el BAT mediría la expresión del CD63 situado en la superficie de los gránulos intracitoplasmáticos cuando estos alcanzan la superficie del basófilo tras su degranulación o activación. Se trataría, por tanto, desde un punto de vista teórico, de un método funcional que mediría la capacidad de activación tras el contacto con el alérgeno mediado por IgE.

Los estudios realizados en edad pediátrica no permiten hacer extensivos los resultados a la edad adulta.

Los dos únicos estudios en los que la población diana son los alérgicos al veneno de *Apis mellifera* se han realizado en la edad pediátrica. Este dato llama la atención porque, de acuerdo con las series publicadas, la historia natural de la alergia al veneno de los himenópteros en la infancia lleva parejo un buen pronóstico de forma que en solo el 5% de los casos se llega a repetir una reacción sistémica con picaduras posteriores (19) al contrario de lo que sucede en los adultos (20). Por esta razón se indica que, en los menores de 16 años, la inmunoterapia solo está indicada en casos de reacciones graves y, especialmente, en hijos de apicultores que estarían altamente expuestos. No disponemos de información sobre la indicación de la inmunoterapia en los pacientes incluidos en estos dos estudios o sus circunstancias epidemiológicas. Por esta razón, si bien el estudio de Cichocka-Jarosz y cols no muestra diferencias en la activación en los 3 momentos en los que se analiza (14) sí se observa en el estudio de Zitnik y cols (13). En cualquier caso, los dos estudios se realizan

en tiempos muy diferentes lo que puede, en sí mismo, justificar las diferencias, como se indicará en el apartado correspondiente.

Respecto al resto de estudios que sí se hacen en población adulta, el número de pacientes es muy pequeño, excepción del estudio de Erzen y cols que incluye a 12 pacientes y en los que sí parece que el BAT sigue un curso paralelo con la tolerancia a la picadura tras la inmunoterapia (15).

Las dosis de exposición al alérgeno no están bien definidas

Las concentraciones necesarias para producir una activación de basófilos son alérgeno-dependiente y no se encuentran bien definidas. En general, para alérgenos proteicos como los de los venenos de himenópteros, las concentraciones se suelen encontrar en el rango de $\mu\text{g}/\text{mL}$ pero concentraciones de ng/mL o incluso pg/mL pueden ser suficientes (Sabogal-Cuadro). Las concentraciones más frecuentemente empleadas en los estudios revisados son 0.1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (13,15,16,18) si bien parece que la concentración que más discrimina es 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (13,15,16) y se propone el empleo del cociente 0.1/1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como mejor marcador en uno de los estudios (13).

El momento en que se realiza el análisis determina la respuesta y su utilidad diagnóstica en el seguimiento de la inmunoterapia específica

Es bien sabido que la inmunoterapia específica actúa a diversos niveles y que su cinética varía a lo largo del tiempo. Los cambios inmunológicos que se producen con la inmunoterapia son bien conocidos y abarcan desde cambios humorales (inicial aumento de la IgE con posterior descenso, aumento lento y progresivo de la IgG4), aumento del umbral de respuesta de las células efectoras y cambios en las células reguladoras (9). Los distintos estudios analizan la activación de basófilos en períodos diferentes. Todos contienen una determinación basal, imprescindible para conocer la situación de partida antes del inicio de la inmunoterapia, pero la evaluación posterior va desde 5 días tras alcanzar en una pauta

rush la dosis de mantenimiento (13) hasta varios años al finalizar todo el proceso de vacunación (13,15-17). De los resultados de activación se deduce que las diferencias son significativas tras años de tratamiento (13,15-17), con un marcado descenso de la activación tras las dosis bajas, aunque en alguno de los estudios las dosis más altas también se acompañan de disminución de la activación (16,17). En los dos estudios que no realizan seguimiento a largo plazo, concretamente, el estudio de Cichocka-Jarosz y cols. (14) y Urra y cols. (18), no observan cambios relevantes a 40 días y 6 meses, respectivamente.

Por su parte, en los dos estudios en los que se realiza prueba de la repicadura al final del tratamiento (15,17), la tolerancia a la misma es la regla que afecta a todos menos un paciente del estudio de Erzen y cols (15). Se debe llamar la atención sobre este último puesto que es un paciente sin activación en el momento basal y sin modificación posterior.

6. RECOMENDACIONES

1. La prueba del BAT se puede utilizar en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera* como marcador de eficacia del tratamiento con resultados consistentes con los obtenidos en la prueba de la repicadura (nivel de evidencia IV, grado de recomendación C).
2. La concentración del veneno de *Apis mellifera* recomendada para la realización del BAT es de 0.1 µg/mL (nivel de evidencia IV y grado de recomendación C).
3. El momento en el que el BAT es capaz de discriminar una evolución favorable de la no favorable en la inmunoterapia es a partir de un año de tratamiento por lo que no se recomienda realizar determinaciones de BAT de forma temprana si la finalidad es comprobar la eficacia del tratamiento (nivel de evidencia IV y grado de recomendación C).

7. CONCLUSIONES

1. Los estudios publicados que emplean la técnica de BAT en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera* son escasos y con un reducido número de pacientes.
2. Se trata de estudios de baja calidad que no incluyen un grupo placebo que no recibe el tratamiento.
3. El número de estudios en los que se utiliza una prueba patrón oro, repicadura con el insecto responsable, es muy bajo (tan solo dos trabajos emplean este método de confirmación de la buena tolerancia).

Por todo lo expuesto, sería recomendable realizar estudios en una población más amplia, con un diseño doble ciego y controlado con placebo o con una alternativa terapéutica en los que se confirme la tolerancia mediante prueba de repicadura.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Biló BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN; EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005 Nov;60(11):1339-49.
2. Marquès Amat L, Alfaya Arias T. Alergia al veneno de los himenópteros: aspectos básicos y clínica. En: *Tratado de Alergología*. 2a Edición. Madrid; 2015. p. 1241-8.
3. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC). Epidemiología de la alergia a himenópteros [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.seaic.org/alergia-abejas-y-avispas/sobre-la-alergia/que-es-la-alergia/epidemiologia-de-la-alergia-a-himenopteros> .
4. Abbas, Abul K., MBBS; Lichtman, Andrew H., MD, PhD; Pillai, Shiv, MBBS P. Alergia - Inmunología celular y molecular. En: *Inmunología celular y molecular*. 9º Edición. España; p. 437-57.
5. F.J. Monteseirín Mateo CMM. Células que participan en las enfermedades alérgicas (II): mastocitos, basófilos, eosinófilos, otras células. En: *Tratado de Alergología*. 2ª Edición. Madrid; 2015. p. 121-7.
6. Brown SGA, Turner PJ. Anafilaxia - Middleton. *Alergología esencial*. En: *Middleton Alergología esencial*. 2017. p. 345-60.
7. M.L. Sanz Larruga, B. García Figueroa, M. Labrador Horrillo JMQ. Técnicas de diagnóstico in vitro. 2ª Edición. *Tratado de Alergología*. Madrid; 2015. p. 211-230.
8. Moffitt JE, Golden DB, Reisman RE, Lee R, Nicklas R, Freeman T, deshazo R, Tracy J, Bernstein IL, Blessing-Moore J, Khan DA, Lang DM, Portnoy JM, Schuller DE, Spector SL, Tilles SA. Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;114(4):869-86.
9. Lei DK, Saltoun C. Allergen immunotherapy: definition, indications, and reactions. *Allergy Asthma Proc*. 2019 Nov 1;40(6):369-371.
10. Sabogal-Cuadro P, Zakzuk J. Prueba de activación de basófilos: aspectos técnicos, metodológicos y su utilidad clínica. *Rev la Fac Med*. 2018;66(3):447-57.
11. Bob Phillips, Chris Ball, Dave Sackett, Doug Badenoch, Sharon Straus, Brian Haynes MD. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine: Levels of Evidence (March 2009) [Internet]. 2009 [citado 1 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://www.cebm.ox.ac.uk/resources/levels-of-evidence/oxford-centre-for-evidence->

based-medicine-levels-of-evidence-march-2009 .

12. Dominguez-Ortega J, Delgado J, Blanco C, Prieto L, Arroabarren E, Cimarra M, Henriquez-Santana A, Iglesias-Souto J, Vega-Chicote JM, Tabar AI. Specific allergen immunotherapy for the treatment of allergic asthma: a review of current evidence. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017 Jun;27(Suppl. 1):1-35.
13. Žitnik SE, Vesel T, Avčin T, Šilar M, Košnik M, Korošec P. Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Mar;23(2):166-72.
14. Cichocka-Jarosz E, Dorynska A, Pietrzyk JJ, Spiewak R. Laboratory markers of mast cell and basophil activation in monitoring rush immunotherapy in bee venom-allergic children. *Immunotherapy*. 2011 Aug;3(8):1013-7.
15. Eržen R, Košnik M, Silar M, Korošec P. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy*. 2012 Jun;67(6):822-30.
16. Rodríguez Trabado A, Cámara Hijón C, Ramos Cantariño A, Romero-Chala S, García-Trujillo JA, Fernández Pereira LM. Short-, Intermediate-, and Long-Term Changes in Basophil Reactivity Induced by Venom Immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016 Sep;8(5):412-20.
17. Sainte-Laudy J, Touraine F, Cluzan D, Belle Moudourou F. Follow-Up of Venom Immunotherapy on Flow Cytometry and Definition of a Protective Index. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;170(4):243-250.
18. Urra JM, Cabrera CM, Alfaya T, Feo-Brito F. Agreement of skin test with IL-4 production and CD40L expression by T cells upon immunotherapy of subjects with systemic reactions to Hymenoptera stings. *Mol Immunol*. 2016 Feb;70:134-9.
19. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Outcomes of allergy to insect stings in children, with and without venom immunotherapy. *N Engl J Med*. 2004 Aug 12;351(7):668-74.
20. Golden DB, Marsh DG, Freidhoff LR, Kwitrovich KA, Addison B, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Dec;100(6 Pt 1):760-6.

Relación de artículos revisados pero descartados para su análisis (orden cronológico de publicación de más a menos reciente) y la razón por la que no son válidos para el análisis:

Eberlein B. Basophil Activation as Marker of Clinically Relevant Allergy and Therapy Outcome. *Front Immunol.* 2020;11:1815. (Revisión)

De Amici M, Barocci F, Caimmi S, Nespoli L, Licari A, Giuliani G, Marseglia G. Clinical use of basophil activation test in drug, food and hymenoptera venom allergies. *Minerva Pediatr.* 2019;71:209-217. (Revisión)

Arzt L, Bokanovic D, Schrautzer C, Laipold K, Möbs C, Pfützner W, Herzog SA, Vollmann J, Reider N, Bohle B, Aberer W, Sturm GJ. Immunological differences between insect venom-allergic patients with and without immunotherapy and asymptotically sensitized subjects. *Allergy.* 2018; 73:1223-1231. (No determinación basal de BAT comparativa)

Jakob T, Rafei-Shamsabadi D, Spillner E, Müller S. Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. *Allergo J Int.* 2017;26:93-105. (Revisión)

Schiener M, Eberlein B, Moreno-Aguilar C, Pietsch G, Serrano P, McIntyre M, Schwarze L, Russkamp D, Biedermann T, Spillner E, Darsow U, Ollert M, Schmidt-Weber CB, Blank S. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. *Allergy.* 2017;72:98-108. (BAT en diagnóstico de alergia a véspidos, no inmunoterapia)

Corthésy B, Lassus A, Terretaz J, Tranquart F, Bioley G. Efficacy of a therapeutic treatment using gas-filled microbubble-associated phospholipase A2 in a mouse model of honeybee venom allergy. *Allergy.* 2016;71:957-66. (Modelo experimental animal)

Nittner-Marszalska M, Cichocka-Jarosz E. Insect sting allergy in adults: key messages for clinicians. *Pol Arch Med Wewn.* 2015;125:929-37. (Revisión)

Tankersley MS, Ledford DK. Stinging insect allergy: state of the art 2015. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;3:315-22. (Revisión)

Leśniak M, Leśniak M, Czarnobilska E. Użyteczność testu aktywacji bazofilów diagnostyce alergii wziewnych [Usefulness of basophil activation test for the diagnosis of inhaled allergies]. *Przegl Lek.* 2015;72:773-8. (Artículo en polaco)

Müller S, Rafei-Shamsabadi D, Jakob T. Problemfälle der In-vitro-Diagnostik bei Hymenopterengiftallergie [Tricky cases in in-vitro diagnostics of hymenoptera venom allergy]. *Hautarzt.* 2014;65:780-1, 784-90. (Artículo en alemán)

Uyttebroek AP, Sabato V, Faber MA, Cop N, Bridts CH, Lapeere H, De Clerck LS, Ebo DG. Basophil activation tests: time for a reconsideration. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10:1325-35 (Revisión)

Cabrera CM, Urrea JM, Alfaya T, Roca Fde L, Feo-Brito F. 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. (Duplicidad de pacientes con artículo de Urrea y cols)

Antolín-Américo D, Moreno Aguilar C, Vega A, Alvarez-Mon M. Venom immunotherapy: an updated review. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14:449. (Revisión)

Ebo DG, Van Vaerenbergh M, de Graaf DC, Bridts CH, De Clerck LS, Sabato V. In vitro diagnosis of Hymenoptera venom allergy and further development of component resolved diagnostics. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10:375-84. (Revisión)

Bidad K, Nawijn MC, van Oosterhout AJ, van der Heide S, Elberink JN. Basophil activation test in the diagnosis and monitoring of mastocytosis patients with wasp venom allergy on immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86:183-90. (Pacientes alérgicos a véspidos con mastocitosis)

- Korošec P, Šilar M, Eržen R, Čelesnik N, Bajrović N, Zidarn M, Košnik M. 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. (BAT para diagnóstico de alergia, sin seguimiento)
- Vinzón SE, Marino-Buslje C, Rivera E, Biscoglio de Jiménez Bonino M. A naturally occurring hypoallergenic variant of vespid Antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom as a candidate for allergen-specific immunotherapy. *PLoS One* 2012;7:e41351. (Alergia a vespídos)
- Bonadonna P, Zanotti R, Melioli G, Antonini F, Romano I, Lenzi L, Caruso B, Passalacqua G. The role of basophil activation test in special populations with mastocytosis and reactions to hymenoptera sting. *Allergy*. 2012;67:962-5. (No seguimiento de inmunoterapia con BAT)
- Jandus P, Hausmann O, Haeberli G, Gentinetta T, Mueller U, Helbling A. Unpredicted adverse reaction to omalizumab. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21:563-6. (No BAT en inmunoterapia)
- Neis MM, Merk HF. Value of component based diagnostics in IgE-mediated hymenoptera sting reactions. *Cutan Ocul Toxicol* 2012;31:117-23. (BAT en diagnóstico, sin seguimiento de inmunoterapia)
- Neis MM, Wurpts G, Wilbers L, Merk HF. In-vitro-Diagnostik und Monitoring bei Insektengiftyposensibilisierung [In vitro diagnosis and monitoring of Hymenoptera venom hyposensitization]. *Hautarzt* 2011;62:677-82. (Artículo en alemán)
- Borodina I, Jensen BM, Wagner T, Hachem MA, Søndergaard I, Poulsen LK. Expression of enzymatically inactive wasp venom phospholipase A1 in *Pichia pastoris*. *PLoS One*. 2011;6:e21267. (Diseño en *Vespula* spp)
- Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, Hemmer W, Sturm EM, Griesbacher A, Heinemann A, Vollmann J, Altmann F, Crailsheim K, Focke M, Aberer W. Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One* 2011;6:e20842. (BAT en diagnóstico, sin seguimiento de inmunoterapia)
- Tracy JM, Lewis EJ, Demain JG. Insect anaphylaxis: addressing clinical challenges. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011;11:332-6. (Revisión)
- Blank S, Seismann H, Michel Y, McIntyre M, Cifuentes L, Braren I, Grunwald T, Darsow U, Ring J, Bredehorst R, Ollert M, Spillner E. Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy* 2011;66:1322-9. (No seguimiento de inmunoterapia)
- González-de-Olano D, Alvarez-Twose I, Morgado JM, Esteban López MI, Vega Castro A, Díaz de Durana MD, Sánchez-Muñoz L, Matito A, de la Hoz Caballer B, Sanz ML, Orfao A, Escribano L. Evaluation of basophil activation in mastocytosis with Hymenoptera venom anaphylaxis. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80:167-75. (No BAT en situación basal en pacientes con mastocitosis)
- Demain JG, Minaei AA, Tracy JM. Anaphylaxis and insect allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:318-22. (Revisión)
- Verweij MM, De Knop KJ, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ, Ebo DG. P38 mitogen-activated protein kinase signal transduction in the diagnosis and follow up of immunotherapy of wasp venom allergy. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:302-7. (Estudio realizado en vespídos)
- Kucera P, Cvackova M, Hulikova K, Juzova O, Pachtl J. Basophil activation can predict clinical sensitivity in patients after venom immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:110-6. (No BAT en situación basal, tan solo al final de la inmunoterapia)
- Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Hymenoptera venom allergy: taking the sting out of difficult cases. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:357-60. (Estudio en vespídos)

- Johansen P, Senti G, Maria Martínez Gómez J, Kündig TM. Medication with antihistamines impairs allergen-specific immunotherapy in mice. *Clin Exp Allergy* 2008;38:512-9. (Modelo en experimentación animal)
- Dubois AE, van der Heide S. Basophil-activation tests in Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:346-9. (Revisión)
- Bauer C, Przybilla B, Eberlein B, Kolsouzidou S, Ruëff F. Changes in intracellular cyclic adenosine monophosphate levels in peripheral blood leukocytes during immunotherapy with vespid venom. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:281-5. (Estudio en véspidos)
- Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. 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. (Estudio en seguimiento de alergia a véspidos)
- Eberlein-König B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:5-10. (No seguimiento de la inmunoterapia)
- Kussebi F, Karamloo F, Rhyner C, Schmid-Grendelmeier P, Salagianni M, Mannhart C, Akdis M, Soldatova L, Markovic-Housley Z, Von Beust BR, Kündig T, Kemeny DM, Blaser K, Cramer R, Akdis CA. A major allergen gene-fusion protein for potential usage in allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:323-9. (No BAT en el seguimiento de inmunoterapia)
- Erdmann SM, Sachs B, Kwicien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 2004;59:1102-9. (Estudio con véspidos)
- Eberlein-König B, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004;14:10-6. (Utilidad del BAT en el diagnóstico, no en el seguimiento de la inmunoterapia)
- Brown SG, Haas MA, Black JA, Parameswaran A, Woods GM, Hedde RJ. In vitro testing to diagnose venom allergy and monitor immunotherapy: a placebo-controlled, crossover trial. *Clin Exp Allergy* 2004;34:792-800. (Estudio en alergia a hormiga)
- Pierkes M, Bellinghausen I, Hultsch T, Metz G, Knop J, Saloga J. Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:326-32. (No empleo de BAT)
- Sabbah A, Plassais R, Grenapin S, Drouet M, Lauret MG, Loiry M, Sainte-Laudy J. Le test d'activation des basophiles par cytométrie en flux dans le diagnostic de l'allergie aux venins d'hyménoptères [Testing basophil activation by flow cytometry in the diagnosis of allergy to hymenopteran venom]. *Allerg Immunol (Paris)* 1998;30:44-8. (Estudio en francés)
- Machado DC, Horton D, Harrop R, Peachell PT, Helm BA. 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. (No hay seguimiento de la inmunoterapia)
- McHugh SM, Deighton J, Stewart AG, Lachmann PJ, Ewan PW. Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1995;25:828-38. (No empleo de BAT)
- Eberlein-König B, Ullmann S, Thomas P, Przybilla B. 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. (No empleo de BAT)

9. AGRADECIMIENTOS

A mi tutora del trabajo de Fin de Grado, la Dra. Carmen Vidal Pan, jefa del Servicio de Alergología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, por su dedicación, trato, orientación y recomendaciones durante toda la realización del TFG.

A las Dras Sara López Freire, Paula Méndez Brea, Teresa González Fernández y Virginia Rodríguez Vázquez, médicos especialistas del Servicio de Alergología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago por su apoyo en la revisión crítica de estos artículos.