

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

## **Praca doktorska**

Przydatność diagnostyki molekularnej w ocenie klinicznej, kwalifikacji i monitorowaniu immunoterapii pacjentów z IgE-zależną nadwrażliwością na jad os i pszczoł.

Lek. Marta Rosiek-Biegus

Promotor: dr hab. n.med Marita Nittner-Marszalska, profesor nadzwyczajny

Promotor pomocniczy: dr n.med. Robert Pawłowicz

Wrocław, 2020

## Spis treści

Wykaz ważniejszych skrótów . . . . .	7
Rozdział 1. Wstęp . . . . .	8
1.1 Epidemiologia alergii na jad owadów . . . . .	9
1.2 Obraz kliniczny alergii na jad owadów. . . . .	10
1.2.1 Reakcje miejscowe. . . . .	10
1.2.2 Systemowe reakcje anafilaktyczne po użądleniu przez owady. . . . .	11
1.2.3 Czynniki ryzyka ciężkiego przebiegu anafilaksji. . . . .	14
1.3 Jad owadów błonkoskrzydłych. . . . .	15
1.3.1 Charakterystyka alergenów Jadu pszczoły i znaczenia klinicznego uczuleń na poszczególne z nich . . . . .	15
1.3.2 Jad osy. . . . .	18
1.4 Diagnostyka alergii na jad owadów. . . . .	19
1.4.1 Wywiad. . . . .	19
1.4.2 Wskazania do diagnostyki. . . . .	20
1.4.3 Testy skórne. . . . .	20
1.4.4 Specyficzne IgE. . . . .	21
1.4.5 Problemy diagnostyczne związane z „podwójnym uczuleniem” tj uczuleniem na jad osy i pszczoły . . . . .	22
1.4.6 Inne procedury diagnostyczne. . . . .	24
1.4.7 Tryptaza. . . . .	25
1.5 Immunoterapia jadem owadów (VIT – venom immunotherapy). . . . .	26

1.5.1 Wskazania do VIT.....	27
1.5.2 Przeciwwskazania do VIT.....	28
1.5.3 Procedura VIT.....	29
1.5.4 Powikłania VIT.....	31
1.6 Diagnostyka komponentowa (CRD) a diagnostyka i leczenie HVA.....	31
1.6.1 CRD a diagnostyka uczulenia na jad owadów.....	32
1.6.2 CRD a immunoterapia jadem.....	35
Rozdział 2. Cele pracy .....	36
Rozdział 3. Materiał i metody .....	37
3.1 Grupa badana .....	37
3.2 Metody.....	38
3.2.1 Kryteria kliniczne klasyfikacji ciężkości reakcji klinicznej.....	38
3.2.2 Opis procedur wykonywanych w poszczególnych grupach.....	38
3.2.2.1 Testy śródskórne (IDT) z ekstraktem jadu owadów .....	39
3.2.2.2 Oznaczanie w surowicy stężenia specyficznych przeciwciał klasy IgE przeciwko ekstraktowi jadu osy i pszczoły (ssIgE).....	39
3.2.2.3 Oznaczanie w surowicy stężenia specyficznych przeciwciał klasy IgE (ssIgE) przeciwko poszczególnym molekułom alergenowym jadu osy i pszczoły.....	39
3.2.2.4 Oznaczanie stężenia tryptazy w surowicy (sBT).....	40
3.2.3 Immunoterapia swoista jadem (VIT).....	41
3.2.4 Analiza statystyczna.....	42

Rozdział 4. Wyniki .....	43
4.1 Grupa A: pacjenci z alergią na jad osy.....	43
4.1.1 Analiza uczuleń na ekstrakt alergenowy i molekuly alergenowe jadu osy Ves v 1 i Ves v 5.....	43
4.1.2 Zależność pomiędzy uczuleniem na Ves v 1 i Ves v 5, a ciężkością reakcji alergicznej (reakcje z zajęciem i bez zajęcia układu krążenia). ....	48
4.1.3 Zależność pomiędzy uczuleniem na Ves v 1 i Ves v 5, a niepowodzenia immunoterapii jadem osy .....	50
4.1.4 Uczulenie na Ves v 1 i Ves v 5 w grupie pacjentów z alergią na jad i podwyższonym stężeniem tryptazy.....	53
4.2 Grupa B pacjenci z alergią na jad pszczoły.....	54
4.2.1 Analiza uczuleń na ekstrakt alergenowy i molekuly alergenowe jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5 i 10.....	55
4.2.2 Zależność pomiędzy uczuleniem na molekuly Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, Api m 10, a ciężkością reakcji alergicznej (reakcje z zajęciem i bez zajęcia układu krążenia).....	60
4.2.3 Zależność pomiędzy uczuleniem na molekuly Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, Api m 10, a niepowodzenia immunoterapii jadem osy.....	63
4.2.3.1 Powikłania VIT-UR.....	63
4.2.3.2 Powikłanie podczas całego okresu VIT.....	65
4.2.4 Uczulenie na molekuly alergenowe jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5 i 10 w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły i z podwyższonym stężeniem tryptazy.....	67
4.2.5 Ocena stężeń sIgE przeciwko alergenom głównym w trakcie terapii jadem pszczoły.....	68

4.3 Grupa C.....	69
Rozdział 5. Dyskusja.....	71
5.1 Charakterystyka profili uczuleń na molekuly jadu osy.....	72
5.2. Wartość diagnostyczna ekstraktów jadu osy i komponent alergenowych Ves v 1 i Ves v 5 w alergii na jad osy. ....	74
5.3 Przeciwciała sIgE przeciwko molekułom Ves v 1 i Ves v 5 a stężenie cIgE.....	76
5.4 Profile uczuleń molekularnych a ciężkość reakcji w alergii na jad osy.....	77
5.5 Profile uczuleń a immunoterapia w alergii na jad osy.....	78
5.6 Charakterystyka profili uczuleń na molekuly jadu pszczoły.....	79
5.7 Wartość diagnostyczna ekstraktów jadu pszczoły i komponent alergenowych w alergii na jad pszczoły.....	80
5.8 Profile uczuleń molekularnych a ciężkość reakcji w alergii na jad pszczoły.....	81
5.9 Profile uczuleń a immunoterapia w alergii na jad pszczoły.....	82
5.10 Profil uczuleń a czas trwania immunoterapii.....	83
5.11 Tryptaza.....	84
5.12 Podsumowanie.....	84
Rozdział 6. Wnioski .....	85
Streszczenie .....	86
Wstęp .....	86
Cele pracy .....	87
Metoda i materiał .....	87

Wyniki .....	89
Wnioski .....	91
Summary .....	91
Introduction.....	91
Objectives .....	92
Methods .....	93
Results .....	94
Conclusion .....	96
Piśmiennictwo .....	97

Wykaz skrótów:

EAACI European Academy of Allergology and Clinical Immunology

HVA (hymenoptera venom allergy) - alergia na jad owadów błonkoskrzydłych

ICD (intradermal test) - test śródskórny

HVA-LL (large local reaction) - miejscowa reakcja alergiczna w przebiegu użądlenia

HVA-SYS (systemic reaction) - systemowa reakcja alergiczna w przebiegu użądlenia

SYS I°- IV° systemowa reakcja alergiczna I°-IV° wg klasyfikacji Muellera

VIT (venom immunotherapy) - immunoterapia jadem owadów

VIT-UR (ultra-rush venom immunotherapy) - VIT metodą ultra-szybką

CRD (component resolved diagnostic) – diagnostyka komponentowa

sBT (serum Basal tryptase) - tryptaza bazalna

sIgE (specific Immunoglobulin E) - IgE specyficzne

Ves v 1, Ves v 5 ( *Vespula vulgaris* 1, *Vespula vulgaris* 5) - alergeny jadu osy

Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, Api m 10 (*Apis mellifera*) alergeny jadu pszczoły

BAT (basophil activation test) - test aktywacji bazofila

## 1. Wstęp

Obok biologów, szczególnie entomologów, owady są obiektem zainteresowania także alergologów. Znane od dewonu, badane od stuleci, od kilkudziesięciu lat, niektóre gatunki owadów błonkoskrzydłych są kojarzone z ciężkimi reakcjami alergicznymi u ludzi. Pomimo, że biologia owadów została dobrze poznana, wiele aspektów alergii wywoływanej przez ich jad jest niepoznanych.

Na całym świecie występuje ponad 125 tysięcy gatunków owadów błonkoskrzydłych. Rząd ten charakteryzuje się obecnością dwóch par błoniastych skrzydeł, z których jedna para jest większa od drugiej. Owady błonkoskrzydłe występują najczęściej w krajach tropikalnych, nie pojawiają się w rejonach polarnych. Niezależnie jednak od miejsca ich egzystencji, żądłące błonkówki są odpowiedzialne za odczyny alergiczne u ludzi uczulonych na ich jad, a precyzyjniej na poszczególne składniki jadu. W Europie środkowej i północnej reakcje alergiczne po użądleniu przez owady błonkoskrzydłe są niemal wyłącznie wynikiem uczulenia na jad pszczoły miodnej (*Apis mellifera*), osy (*Vespula* spp.), szerszenia (*Vespa*), a także choć, rzadziej trzmieła (*Bombus* spp.). W Europie południowej dodatkowo są często obserwowane uczulenia i alergia na jad klecane (Polistes spp.), które ze względu na ocieplenie klimatu zaczynają również zasiedlać środkową Europę co zmienia profil uczuleń na jad osowatych u mieszkańców tego rejonu Europy. Pszczoły i trzmiele należą do rodziny pszczół (*Apidae*), a osy, szerszenie i klecanki do rodziny osowatych (*Vespidae*). W Europie, najbardziej popularnym gatunkiem osowatych są *Vespula vulgaris* i *Vespula germanica*, w Ameryce Północnej te gatunki są potocznie określane jako „yellow jacket” ze względu na charakterystyczne żółto-czarne ubarwienie. W Amerykach i Australii występuje również alergia na jad mrówek: w Ameryce Północnej są to najczęściej mrówki ogniste, które trafiły tam z Ameryki Południowej w XX wieku, a w Australii mrówki z rodzaju *Myrmecia*. W Europie, w tym i w Polsce, jedynym



gatunkiem mrówki, który potencjalnie może wywołać reakcje alergiczne jest mrówka rudnica (*Formica rufa*).

## 1.1 Epidemiologia alergii na jad owadów

Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych (Hymenoptera Venom Allergy - HVA) jest jedną z najczęstszych, obok alergii na leki i pokarmy, przyczyn anafilaksji na świecie, zarówno wśród dzieci i osób dorosłych. Wyniki Europejskiego Rejestru Anafilaksji wskazują, że alergia na jad owadów oraz alergia na leki są najczęstszymi przyczynami anafilaksji u dorosłych<sup>1,2</sup> i drugą po pokarmach przyczyną anafilaksji u dzieci w środkowej Europie. Częstość występowania HVA jest funkcją ekspozycji na użądlenia. Użądlenia przez owady są u ludzi bardzo częste. Co najmniej jeden raz w ogólnej populacji jest żądlnych aż 56.6 %-94.5%<sup>3</sup>. Częstość żądlenia zależy od wielu czynników takich jak płeć, wiek, rejon geograficzny zamieszkania, zawód czy też aktywności pozazawodowe. Z wielu obserwacji wynika, że częściej żądleni są mężczyźni, co można wiązać z częstszą ekspozycją zawodową podczas prac w ogrodnictwie, budownictwie, rolnictwie i leśnictwie<sup>4-6</sup>. Wśród dzieci również częściej żądleni są chłopcy<sup>4,7</sup>. Na częstość żądleń wpływa w dużej mierze rejon geograficzny miejsca zamieszkania, co ilustrują liczne badania epidemiologiczne, między innymi te dowodzące, że w Irlandii żądlnych jest przynajmniej raz w życiu 37.5% dzieci, natomiast w strefie klimatu śródziemnomorskiego w Izraelu, gdzie sezon lotu owadów jest zdecydowanie dłuższy, żądlnych jest aż 56.3% dzieci<sup>4,8</sup>. Mieszkańcy miast są częściej żądleni przez osy, natomiast prawdopodobieństwo użądlenia przez pszczołę wzrasta w populacjach wiejskich<sup>9,10</sup>.

Częstość występowania alergii na jad owadów błonkoskrzydłych jest większa u pszczelarzy niż wśród innych grup zawodowych i jest większa u dorosłych niż u dzieci, a według niektórych autorów także większa u mężczyzn. Miejscowe manifestacje HVA, nazywane rozległymi reakcjami miejscowymi (HVA-LL) raportowane są u kilkunastu procent populacji (2.4%-26.4%)<sup>11</sup>. Częstość reakcji

systemowych (HVA-SYS), 10-krotnie rzadszych niż te łagodne<sup>12</sup> wynosi kilka procent (0.3 do 7.5%)<sup>13</sup> u dorosłych i dzieci (0.4 - 3.4%-6.5%)<sup>8,13</sup>. Pomimo stosunkowo częstego występowania ciężkich reakcji alergicznych, udokumentowane przypadki śmierci w przebiegu HVA są bardzo rzadkie (0.03 do 0.48 przypadków/1000000 mieszkańców/rok)<sup>3</sup>, chociaż uważa się, że wartości te mogą być niedoszacowane, ponieważ w niektórych przypadkach niewyjaśnionej nagłej śmierci, nie uwzględnia się HVA jako jej przyczyny. W krajach europejskich (Szwecja, Niemcy) najczęstszą przyczyną zgonów było użądlenie przez osę, natomiast w Stanach Zjednoczonych przez pszczołę<sup>14,15</sup>. Czynnikiem ryzyka ciężkiego przebiegu reakcji i zgonu w przebiegu HVA są klonalne choroby mastocytów; częstość alergii na jad owadów wśród pacjentów z mastocytozą i innymi pierwotnymi zespołami aktywacji mastocytów (MCAD) jest dużo wyższa niż w pozostałej populacji i szacuje się, że wynosi od 22-53%<sup>16,17</sup>. Wzajemne zależności pomiędzy HVA i mastocytozą ilustruje również fakt, iż częstość mastocytozy wśród pacjentów z HVA wynosi od 1 do 7.9% podczas gdy częstość występowania mastocytozy w całej populacji wynosi od 0.00125 do 0.07%<sup>18-20</sup>. Wśród objawów klinicznych w tej grupie pacjentów przeważają ciężkie reakcje systemowe przebiegające niejednokrotnie z objawami wstrząsu anafilaktycznego czy zatrzymaniem krążenia .

## **1.2 Obraz kliniczny alergii na jad owadów**

### **1.2.1 Reakcje lokalne**

Przebieg reakcji poużądleniowej może być różny zależnie od lokalizacji użądlenia, ilości wprowadzonego jadu oraz osobniczej wrażliwości na użądlenia. U osób nie wykazujących cech alergii na jad owadów błonkoskrzydłych po użądleniu występuje niewielki odczyn miejscowy, charakteryzujący się bólem, obrzękiem i

zaczerwienieniem w miejscu użądlenia; objawy te ustępują samoistnie po kilku godzinach.

U pacjentów z nadwrażliwością na jad owadów mogą występować reakcje alergiczne typu miejscowego (HVA-LL) i systemowego (HVA-SYS). Reakcja miejscowa to utrzymywanie się przez ponad 24 godziny, rozległego (>10 cm) obrzęku w miejscu użądlenia. W przypadku kończyn obrzęk z reguły obejmuje dwa sąsiednie stawy powodując ich unieruchomienie. Zwykle jest to reakcja niezagrożająca życiu, wyjątkiem są sytuacje, gdy dojdzie do użądlenia w okolicy dróg oddechowych. Dotychczas uważano, że prognoza kliniczna dla pacjentów z grupy HVA-LL jest korzystna, większość pacjentów zareaguje w ten sam sposób na kolejne użądlenie<sup>21</sup>, a częstość występowania u nich reakcji systemowych jest niska (4-10%)<sup>22</sup>. Najnowsze, prospektywne badania przeprowadzone na dużej grupie pacjentów, wskazują jednak, że przy ponownym użądleniu reakcje systemowe w tej grupie chorych mogą wystąpić nawet w 24% przypadków<sup>23</sup>. O ile wyniki te znajdą potwierdzenia w kolejnych badaniach, prognoza kliniczna dla tej grupy pacjentów ulegnie radykalnej zmianie.

### **1.2.2 Systemowe reakcje anafilaktyczne po użądleniu przez owady**

Dużo większym problemem i zagrożeniem są reakcje alergiczne typu systemowego. Przebieg reakcji systemowej, obok bezpośrednich zagrożeń zdrowotnych jakie stwarza, wpływa na jakość życia pacjentów, wiąże się z koniecznością zmiany zainteresowań, a niekiedy i pracy<sup>24,25</sup>.

Objawy reakcji HVA-SYS po użądleniu przez owady są zbliżone do tych, które występują w przebiegu alergii wywołanej innymi przyczynami. Najłagodniejsze objawy dotyczą skóry; dość charakterystyczny jest świąd po użądleniu zwłaszcza dłoni, stóp, uszu oraz okolic zgięć i miejsc intymnych. Może wystąpić również pokrzywka i obrzęk naczynioruchowy. W cięższych przypadkach pojawiają się bóle brzucha, nudności, wymioty i biegunka, które wynikają ze skurczu

mięśni gładkich przewodu pokarmowego, natomiast konsekwencją skurczu mięśni gładkich oskrzeli może być duszność bronchospastyczna. Najcięższe reakcje wiążą się z wystąpieniem objawów sercowo-naczyniowych, których najpoważniejszą manifestacją jest wstrząs anafilaktyczny.

Istnieje kilka klasyfikacji reakcji systemowej ze względu na ich ciężkość. Najbardziej popularne skale ciężkości HVA zostały opracowane przez Muellera i Ringa-Messmera<sup>26,27</sup>. Skala ciężkości reakcji systemowych wg Muellera jest czterostopniowa. Najbardziej łagodną, jest reakcja systemowa pierwszego stopnia (SYS I°), gdzie występują jedynie zmiany ze strony skóry: pokrzywka, świąd oraz łęk i złe samopoczucie. W reakcji systemowej drugiego stopnia (SYS II°) oprócz wyżej wymienionych objawów pojawia się również m.in.: obrzęk naczynioruchowy, ucisk w klatce piersiowej, objawy ze strony przewodu pokarmowego. Objawy ze strony górnych dróg oddechowych (stridor krtaniowy) i dolnych (duszność, świszczący oddech) pozwalają zakwalifikować reakcję jako trzeciego stopnia (SYS III°), a objawy ze strony układu krążenia (omdlenie, spadek RR) jako reakcję IV-ego stopnia (SYS IV°) (Tabela 1.1). Z kolei w klasyfikacji Ringa reakcja SYS pierwszego stopnia to reakcja ograniczona do skóry i błon śluzowych (obrzęk naczynioruchowy), reakcja SYS drugiego stopnia dotyczy niezagrażających życiu objawów ze strony przewodu pokarmowego, łagodnych/umiarkowanych objawów ze strony układu oddechowego i krążenia. W reakcji systemowej stopnia trzeciego objawy stanowią zagrożenie życia, występuje wstrząs anafilaktyczny, ciężkie reakcje ze strony układu oddechowego oraz skurcze macicy, a w SYS stopnia czwartego dochodzi do zatrzymania oddechu i krążenia. Według niektórych opracowań skala Ringa może być również pięciostopniowa, gdzie stopień piąty oznacza zgon pacjenta. (Tabela 1.2)

Tabela 1.1 Klasyfikacja reakcji anafilaktycznej po użądleniu przez owady wg HL Muellera<sup>26</sup>

Stopień	Objawy
I	Pokrzywka, świąd, złe samopoczucie, lęk,
II	Każdy z wyżej wymienionych objawów oraz co najmniej dwa poniższe: uogólniony obrzęk, ucisk w klatce, nudności, wymioty, bóle brzucha, zawroty głowy
III	Każdy z wyżej wymienionych objawów oraz co najmniej dwa poniższe: dysfagia, duszność, chrypka, osłabienie, niepokoje
IV	Każdy z wyżej wymienionych objawów oraz co najmniej dwa poniższe: sinica, spadek RR, zaburzenie świadomości, utrata przytomności

Tabela 1.2 Klasyfikacja reakcji anafilaktycznej wg Ringa i Messmera<sup>27</sup>

Stopień	Objawy
I	Uogólnione zmiany skórne: rumień, obrzęk naczynioruchowy, pokrzywka
II	Łagodne i umiarkowane objawy ze strony układu krążenia i oddechowego (tachykardia, spadek ciśnienia, zawroty głowy) i lub objawy ze strony układu pokarmowego (nudności)
III	Wstrząs anafilaktyczny, utrata przytomności, skurcz mięśni gładkich (macica, oskrzela)
IV	Zatrzymanie oddechu lub krążenia
V	Zgon

Większość alergicznych reakcji systemowych po użądleniu rozwija się w przeciągu 5-20 minut, jednak zdarzają się również sytuacje, w których pierwsze objawy mogą się rozwijać nawet w przeciągu 2 godzin. Przebieg reakcji anafilaktycznej może być również dwufazowy, wtedy późne objawy reakcji anafilaktycznej występują 6-8 godzin, a w niektórych skrajnych przypadkach nawet 48-72 h, po użądleniu. W obawie przed fazą późną reakcji anafilaktycznej pacjenci z reakcją anafilaktyczną po użądleniu powinni być obserwowani co najmniej 24h<sup>28,29</sup>.

### 1.2.3 Czynniki ryzyka ciężkiego przebiegu anafilaksji

Do pacjentów zagrożonych cięższym przebiegiem reakcji anafilaktycznej należą osoby powyżej 60 r.ż, ze współwystępującymi chorobami układu sercowo-naczyniowego, zdaniem niektórych autorów także osoby ze schorzeniami atopowymi i astmą, pacjenci z mastocytozą, innymi chorobami związanymi z rozrostem klonalnym mastocytów, osoby z podwyższonym stężeniem tryptazy w surowicy<sup>30</sup>. Wykazano, że ciężkie reakcje systemowe stwierdzane były u 50% pacjentów ze stężeniem tryptazy pomiędzy 20.4 a 29.9 ng/ml. Najmniejsze ryzyko anafilaksji, bo około 10% mają pacjenci ze stężeniem tryptazy poniżej 6.1 ng/ml, a ryzyko paradoksalnie zmniejsza się również przy stężeniu tryptazy powyżej 191 ng/ml, pozostaje jednak nadal większe niż w populacji z prawidłowym stężeniem tryptazy<sup>31</sup>. Na ciężkość reakcji ma również wpływ przebieg poprzednich reakcji poużądleniowych. Prawdopodobieństwo wystąpienia ciężkiej reakcji (SYS III<sup>o</sup> i IV<sup>o</sup> wg Muellera) po poprzedniej ciężkiej reakcji wynosi od 40 do 60%, jest natomiast niższe jeśli poprzednia reakcja miała mniejsze nasilenie (I<sup>o</sup> lub II<sup>o</sup> wg Muellera) i wynosi wówczas około 20%<sup>32,33</sup>. Prognozowanie ciężkości kolejnej reakcji na podstawie intensywności objawów przebytych reakcji ma ograniczoną wartość ponieważ ilość jadu dostarczana podczas kolejnych ekspozycji może być różna. Ponadto objawy alergii mogą być potęgowane przez czynniki takie jak stres, leki, alkohol czy choroby towarzyszące<sup>34-36</sup>. Na podstawie uprzednio przeprowadzonych badań epidemiologicznych uważano, że owadem wywołującym częściej ciężkie reakcje alergiczne jest pszczoła<sup>12</sup> jednak owadem, którego jadem jest częściej stosowany w immunoterapii HVA jest jad osy, co jest pośrednim dowodem na częstsze wywoływanie ciężkich reakcji systemowych przez jad osy a nie pszczoły<sup>37</sup>. Potwierdzają to ostatnio publikowane wyniki europejskiego rejestru anafilaksji według których to osa była odpowiedzialna za 70.4% reakcji systemowych po użądleniu przez owady natomiast reakcja na jad pszczoły wystąpiła w 19.9%, szerszenia 4.5% a trzmiela 0.2% przypadków<sup>1</sup>.

### **1.3 Jad owadów błonkoskrzydłych**

Ilość jadu wstrzyknięta podczas użądlenia różni się w zależności od gatunku owada; pszczoły wstrzykują ok 140 mcg jadu, w tym 59 mcg białek<sup>38</sup>, natomiast ilość białek wstrzyknięta przez osę waha się od 1.7 mcg do 3.1 mcg<sup>39</sup>. Jad owadów błonkoskrzydłych zawiera mieszaninę wielu różnych składników, w tym substancji o niskiej masie cząsteczkowej, którymi są: aminy biogenne, lipidy, węglowodany, kationowe peptydy oraz z substancji o wysokiej masie cząsteczkowej, do których należą białka<sup>40</sup>. Związki o małej masie cząsteczkowej odpowiadają za lokalne odczyny toksyczne, podczas gdy za reakcje alergiczne odpowiadają przede wszystkim alergeny białkowe. Dotychczas zidentyfikowano i scharakteryzowano kilkanaście alergenów jadu owadów błonkoskrzydłych, większość z nich jest enzymami np. hialuronidaza, kwaśna fosfataza, fosfolipaza i proteaza serynowa<sup>41,42</sup>.

#### **1.3.1 Charakterystyka alergenów Jadu pszczoły i znaczenia klinicznego uczuleń na poszczególne z nich**

Najlepiej poznany jest skład alergenowy jadu pszczoły. Opisano 113 białek i peptydów jadu pszczoły<sup>43</sup>, w tym 12 alergenów. W największym stężeniu w jadzie pszczoł występują: fosfolipaza A2 (Api m 1), hialuronidaza (Api m 2), kwaśna fosfataza (Api m 3), dipeptydylopeptydaza IV (Api m 5) i icarpina (Api m 10)<sup>44</sup>. Specyficzne przeciwciała klasy IgE (sIgE) przeciwko kompletni wymienionych składników jadu są stwierdzane u ponad 94% pacjentów z alergią na jad pszczoły. Alergenami o mniejszym znaczeniu klinicznym są melittyna (Api m 4)<sup>45</sup>, inhibitor proteazy serynowej (Api m 6)<sup>46</sup>, proteaza serynowa 1 (Api m 7), karboksysteraza (Api m 8)<sup>47</sup>, karboksypeptydaza serynowa (Api m 9)<sup>48</sup>, białka MRJP 8 i 9 (izoalergeny Api m 11.0101 i Api m 11.0201)<sup>49</sup> i witalogenina (Api m 12)<sup>50</sup>.

Alergeny Api m 1, Api m 3 i Api m 10 nie mają swoich odpowiedników w jadzie osy i w związku z tym są markerami pierwotnego uczulenia na jad pszczoły<sup>51</sup>. Wyłącznie w jadzie pszczoły występuje też melittyna (Api m 4), ale

w przeciwieństwie do poprzednio wymienionych jest to tzw. alergen mniejszy, rzadziej odpowiedzialny za uczulenie w populacji pacjentów z HVA. Druga grupa alergenów jadu pszczoły, Api m 2, 5, 12, to związki występujące zarówno w jadu pszczoły jak osy, o dużej homologii budowy chemicznej, będące powodem reaktywności krzyżowej pomiędzy jadami i przyczyną tzw. „podwójnych uczuleń” stwarzających istotny problem interpretacyjny w diagnostyce HVA.

Api m 1, fosfolipaza A2, została wyodrębniona z jadu pszczoły już w 1976 roku i jest nadal uważana za jeden z głównych alergenów jadu. Api m 1 jest enzymem przeprowadzającym hydrolizę fosfolipidów błon komórkowych, przez co powoduje uwolnienie z nich kwasu arachidonowego i eikozanoidów. Związki te odpowiadają za zwiększenie przepuszczalności naczyń, wydzielanie śluzu i skurcz oskrzeli<sup>52</sup>. Uczulenie na natywny alergen Api m 1 wykryto (według różnych doniesień i przy użyciu różnych technik) u 61.8-97% pacjentów z alergią na jad pszczoły. Porównywalna jest częstość występowania sIgE przeciwko rekombinowanej Api m 1 szacowana na 83.1%<sup>46,53-56</sup>. Przeciwciała przeciwko Api m 3, kwaśnej fosfatazie, stwierdza się aż w 60% przypadków pacjentów uczulonych na jad pszczoły, a w przypadku użycia rekombinowanego białka, u 37-50% z nich<sup>46,57</sup>. Api m 10, icarpina, jest uważana za kolejny główny alergen jadu pszczoły. Z dotychczasowych doniesień wynika, że uczulenie na Api m 10 może być czynnikiem niepowodzenia immunoterapii<sup>58</sup>. W interpretacji tych danych należy jednak pamiętać, że w przeszłości, w niektórych preparatach do immunoterapii zawartość Api m 10 mogła być niedostateczna, co byłoby rzeczywistym czynnikiem odpowiedzialnym za niepowodzenie immunoterapii swoistej jadem pszczoły u pacjentów uczulonych na ten składnik jadu<sup>46,58,59</sup>. Kolejny główny alergen jadu pszczoły to melittyna (Api m 4), substancja o małej masie cząsteczkowej i będąca wraz z Api m 1 (12%) głównym wagowo składnikiem suchego jadu (50%). Nadwrażliwość na melittynę stwierdza się u 22.9-29% osób uczulonych na jad pszczoły<sup>46,60</sup>, jednak obserwuje się częstsze występowanie



nadwrażliwości na Api m 4 np. w populacji hiszpańskich pacjentów, w której sIgE przeciwko Api m 4 zostało wykryte w 56% przypadków uczulenia na jad pszczoły. Według doniesień badaczy hiszpańskich, sIgE przeciwko Api m 4 występuje częściej u osób z niskim wyjściowym stężeniem sIgE i złą tolerancją fazy indukcji immunoterapii jadem<sup>61</sup>. W cytowanym badaniu, pacjenci, u których stężenie Api m 4 było wyższe lub równe 0.98 kU/L doznawali cięższych reakcji po użądleniu niż pacjenci ze stężeniem Api m 4 poniżej 0.98 kU/L<sup>61</sup>, a systemowe powikłania podczas fazy indukcji immunoterapii jadem stwierdzano aż u 41% tych pacjentów, u których miano sIgE przeciwko Api m 4 było wysokie<sup>62</sup>. Przeciwciała przeciwko naturalnemu Api m 6 występują u 40% pacjentów, natomiast ilość ta spada przy użyciu rekombinowanego alergenu do 26%<sup>63,64</sup>.

Trzy główne białka występujące zarówno w jadzie pszczoły jak osy to: Api m 2, Api m 5 i Api m 12. Api m 2, hialuronidaza, została wylizolowana z jadu pszczoły w roku 1984<sup>65</sup>. Funkcja biologiczna Api m 2 polega na hydrolizie kwasu hialuronowego przez co ułatwiona jest penetracja składników jadu w tkankach osoby użądłonej. Hialuronidaza jadu pszczoły wykazuje 55% homologii budowy z hialuronidazą jadu osy co jest przyczyną reaktywności krzyżowej pomiędzy oboma jadami<sup>66</sup>. Uczulenie na Api m 5, dipeptydylopeptydazę 4, białko o wysokiej masie cząsteczkowej, wykryto u 58.3% pacjentów uczulonych na jad pszczoły<sup>67</sup>. Należy podkreślić, że białko o bardzo zbliżonej budowie występuje również w jadzie Polistes (Pol d 3) potencjalnie powodując reakcje krzyżowe z epitopami Api m 5 jak i Ves v 3 jadu osy. Największą masę cząsteczkową wśród białek jadu pszczoły ma witalogenina (Api m 12). Uczulenie na rekombinowaną witalogeninę stwierdza się nawet u 40% pacjentów. Api m 12 wykazuje duże podobieństwo budowy do Ves v 6 (witalogenina jadu osy), co może być przyczyną reakcji krzyżowych między tymi jadami<sup>50</sup>.

Bardzo często, bo aż w 80%, w surowicy pacjentów występują sIgE przeciwko Api m 7. Api m 7 jest proteazą o dotychczas niepoznanej funkcji

biologicznej<sup>68</sup>. Przeciwciała przeciwko Api m 8 – karboksyesterazie w danych pochodzących z jednego badania przeprowadzonego na małej grupie pacjentów. stwierdzono u 46% osób, natomiast brakuje danych o częstości występowania uczulenia na karboksypeptydazę (Api m 9). Również mało jest prac oceniających obecność sIgE przeciwko Api m 11, alergen występujący jako dwa izoalergeny MRJP 8 i MRJP 9 (major royal jelly protein). Częstość uczulenia na naturalne alergeny wynosi odpowiednio 50% (MRJP8) i 60% (MRJP9) i znacznie spada po zastosowaniu rekombinowanych alergenów, odpowiednio do 15 i 34%. Może to świadczyć o dużym udziale reszt CCD w tych alergenach<sup>49</sup>.

Należy podkreślić, że jad pszczoły uzyskiwany jest do celów diagnostyki i leczenia albo metodą elektrostymulacji (owad żądli przez membranę pod wpływem impulsu elektrycznego, albo przez wyizolowanie gruczołu i woreczka jadowego (mniejsza czystość jadu)<sup>69</sup>. Niewiele jest danych o dalszym procesie przetwarzania jadu przez poszczególnych producentów szczepionek jadowych, który może potencjalnie prowadzić do braku pełnej reprezentacji składników jadu, a szczególnie tych których zawartość wagowa w liofilizowanym ekstrakcie jadu jest bardzo niska, podczas gdy częstość uczulenia na nie jest wysoka (m.in. Api m 3, Api m 10).

### **1.3.2 Jad osy**

W jadzie osy głównymi alergenami są Ves v 1 (fosfolipaza A 1) oraz Ves v 5 (antygen 5). Alergenami o mniejszym znaczeniu są Ves v 2 (hialuronidaza), która występuje w dwóch izoformach Ves v 2.01 i Ves v 2.02<sup>70,71</sup>, Ves v 3 (dipeptydylopeptydaza IV) i Ves v 6 (witalogenina). U 94% pacjentów uczulonych na jad osy wykazano występowanie sIgE przeciwko Ves v 1 i Ves v 5<sup>72</sup>. Dodanie rekombinowanego Ves v 5 do preparatu diagnostycznego ekstraktu jadu osy, zwiększa czułość badania i pozwala na wykrycie sIgE aż u 96.8% pacjentów z HVA po użądleniu przez osę<sup>73,74</sup>. Zastosowanie rekombinowanego Ves v 5 pozwala

wykazać sIgE przeciwko temu alergenowi u osób z ujemnych wynikach oceny sIgE przeciwko ekstraktowi jadu.

## **1.4 Diagnostyka alergii na jad owadów**

### **1.4.1 Wywiad**

Diagnostyka alergii na jad owadów błonkoskrzydłych opiera się na szczegółowo zebranych wywiadzie, testach skórnych z ekstraktem jadu, oznaczaniu specyficznych IgE przeciwko ekstraktom jadów owadów oraz w ostatnich latach na diagnostyce komponentowej. Prawidłowo zebrany wywiad pozwala na ustalenie ciężkości reakcji poużądleniowej, czasu, po którym ona wystąpiła, ekspozycji na ewentualne kolejne użądlenia, przebiegu poprzednich żądleń oraz niejednokrotnie pomaga ustalić „owada sprawcę”. To ostatnie zależy przede wszystkim od tego, czy pacjent identyfikuje owady i czy widział żądłającego owada. Istotne są informacje o wyglądzie owada: osa jest większa od pszczoły z żółto-czarnymi paskami na tułowiu, z kolei pszczoła jest mniejsza, bardziej owłosiona i raczej o ciemniejszym zabarwieniu. W przypadku braku pewności posiłkujemy się pytaniem o obecność żądła, co może sugerować użądlenie przez pszczołę, jednak z doświadczenia klinicznego wynika, że pacjenci rzadko pamiętają fakt wyjmowania żądła i rzadko identyfikują owady. Czasami okoliczności zdarzenia i znajomość zachowań owadów mogą nam pomóc go zidentyfikować: pora roku - loty pszczoł zaczynają się wcześniej niż osy, dlatego użądlenia wczesną wiosną sugerują pszczołę, natomiast użądlenia późnym latem i jesienią raczej osę<sup>75</sup>. Pszczoły częściej żądła na wsi, szczególnie w okolicy pasiek, osy natomiast w sąsiedztwie piekarni, cukierni, pojemników na śmieci. W przypadku braku możliwości identyfikacji owada, którego jad odpowiada za reakcję anafilaktyczną musimy się opierać na badaniach diagnostycznych in vivo i in vitro, aby ustalić rodzaj jadu do immunoterapii. Dalsza część rozdziału wykaże jak trudnym zadaniem bywa odpowiedź na pytanie o gatunek owada odpowiedzialnego za reakcję alergiczną.

### **1.4.2 Wskazania do diagnostyki**

Diagnostykę alergii na jad owadów błonkoskrzydłych należy przeprowadzać tylko u pacjentów, u których po użądleniu wystąpiła reakcja systemowa (HVA-SYS). Pacjenci z reakcją miejscową (HVA-LL) w świetle obowiązujących wytycznych EAACI z 2017 roku nie powinni być poddani diagnostyce ponieważ nie są kandydatami do immunoterapii jadem. Podobnie nie powinno się wykonywać badań diagnostycznych u pacjentów, którzy nie mieli żadnej reakcji po użądleniu, ponieważ bezobjawowe uczulenie na jad owadów występuje u 25-40% populacji i nie ma ono znaczenia klinicznego<sup>21</sup>.

### **1.4.3 Testy skórne**

W chwili obecnej testy skórne i/lub oznaczenie sIgE z ekstraktem jadu są uważane za złoty standard w diagnostyce HVA. U 70-90% pacjentów z HVA-SYS stwierdza się dodatnie testy skórne z ekstraktem jadu<sup>76</sup>. Zasady wykonywania SPT z jadami owadów są określone przez standardy EAACI i Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. Wykonywanie testów punktowych rozpoczyna się od najniższego stężenia (0,01 mcg/ml), kontynuując do najwyższego (100 mcg/ml) lub uzyskania wyniku dodatniego, równocześnie wykonuje się test z kontrolą dodatnią (histamina) i ujemną (roztwór do rozcieńczania jadu - roztwór albuminy ludzkiej i chlorku fenolu). Za dodatni wynik przyjmuje się wystąpienie bąbla o średnicy równej lub większej niż 3 mm<sup>75,77</sup>. W praktyce klinicznej wykonywanie testu punktowego bywa pomijane wobec ujemnych jego wyników w większości przypadków HVA i wobec bezpieczeństwa, wysokiej czułości i swoistości testów śródskórnych z jadem<sup>78</sup>. Testy śródskórne z ekstraktem jadu wykonuje się zgodnie z wytycznymi EAACI rozpoczynając od najniższego stężenia jadu (0,001 mcg/ml a nawet 0,0001 mcg/ml). Test śródskórny wykonuje się poprzez wstrzyknięcie śródskórnie 0,02 ml alergenu z wytworzeniem bąbla o średnicy 3mm. Odczytu dokonuje się po 15-20 minutach, a test uznaje się za dodatni jeśli bąbel

zwiększy swoją średnicę o więcej niż 3 mm i wystąpi rumień wokół bąbla. Jeśli test jest ujemny, wykonuje się test z kolejnym rozcieńczeniem jadu, aż do uzyskania wyniku dodatniego. Jeśli z maksymalnym, granicznym stężeniem jadu (1mcg/ml) nie stwierdza się wyniku dodatniego, testy skórne z ekstraktem jadu uznaje się za negatywne<sup>75,77</sup>. Jeżeli u pacjenta stwierdzany jest negatywny wynik testów skórnych przy granicznym rozcieńczeniu jadu (1mcg/ml), a pacjent prezentuje typowe objawy alergii na jad, testy powinny zostać powtórzone po 2 miesiącach.

Przyczyną ujemnego wyniku testów skórnych przy typowych objawach alergii mogą być m.in. nie przestrzeganie wymaganego okresu odstawienia leków p/histaminowych, antydepresyjnych, GKS systemowych, stosowanie miejscowych GKS lub zbyt wczesne wykonanie testów po przebytej reakcji poużądleniowej. Teoretycznie nie można wykluczyć, że ujemny wynik testu wynika z braku lub niskiego stężenia w ekstrakcie jadu tego składnika na który jest uczulony pacjent. Przy wykonywaniu testów śródskórnych z granicznym stężeniem jadu 1 mcg/ml w kilku procentach przypadków wyników dodatnich mogą mieć miejsce wyniki fałszywie dodatnie, które wynikają z miejscowo drażniących właściwości jadu<sup>75-77,79</sup>.

#### **1.4.4 Specyficzne IgE**

Równoległą metodą stosowaną w diagnostyce alergii na jad owadów błonkoskrzydłych jest oznaczenie specyficznych IgE przeciwko ekstraktowi jadu osy i pszczoły. W chwili obecnej wiele firm oferuje możliwość oznaczania sIgE przeciwko jadom owadów, a wyniki są podawane w kU/l. Za wynik dodatni uznaje się zazwyczaj wartość  $\geq 0.35$  kU/l, jak w oznaczeniach sIgE dla innych alergenów, jednak w odniesieniu do diagnostyki alergii na jad owadów niektórzy autorzy uważają, że punkt odcięcia dla wyniku dodatniego powinien być przesunięty i interpretowany w zależności od objawów klinicznych. Dotyczy to zwłaszcza pacjentów z rozpoznana mastocytozą, u których wartości sIgE są zazwyczaj niskie,

przy bardzo ciężkim przebiegu reakcji anafilaktycznej, a także pacjentów z wyjściowo niskim całkowitym IgE<sup>31,80,81</sup>. Stężenia IgE plasują się w kilku klasach 0.35-0.69 kU/l (klasa I), klasa II- 0.7-3.49 kU/l, klasa III -3.50-17.49 kU/l, klasa IV 17.5-49.9 kU/l, klasa V 50-100kU/l, klasa VI>100 kU/l<sup>77,79</sup>. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że przy punkcie odcięcia 0.35 kU/l udaje się uzyskać od 90-100% wyników dodatnich przeciwciał u pacjentów z alergią na jad pszczoły<sup>82,83</sup>, natomiast w przypadku jadu osy udaje się potwierdzić alergię w 83-97% przypadków.

Należy zaznaczyć, że w świetle dotychczasowych badań wartość sIgE nie koreluje z ciężkością reakcji anafilaktycznej, czego dowodem są niskie lub negatywne wyniki sIgE u pacjentów z mastocytozą po przebytych wstrząsach po użądleniu oraz wysokie stężenia sIgE, niekiedy w VI klasie u pacjentów z objawami lokalnymi.

#### **1.4.5 Problemy diagnostyczne związane z „podwójnym uczuleniem” tj uczuleniem na jad osy i pszczoły**

Termin „podwójne uczulenie” oznacza obecność sIgE przeciwko jadom zarówno pszczoły jak osy. Według danych niemieckich nawet u 45% przypadków pacjentów z przebytą reakcją alergiczną po użądleniu występują sIgE zarówno wobec ekstraktu jadu osy jak i pszczoły<sup>84</sup>. W praktyce możemy się spotkać również z „potrójnym uczuleniem” tj uczuleniem na jad osy, pszczoły i Polistes.

Podwójne lub potrójne uczulenie może być wynikiem:

a/ rzeczywistej alergii na jady kilku gatunków, co zdarza się bardzo rzadko, u kilku procent pacjentów z HVA udokumentowano rzeczywiste uczulenie na jad osy i pszczoły,

b/ obecności przeciwciał sIgE skierowanych przeciwko alergenom o homologicznej budowie obecnym w jadach osy, pszczoły i Polistes: hialuronidazie (Api m 2/Ves v 2/ Pol d 2), dipeptylopetydazie 4 (Api m 5/Ves v 3/Pol d 3) i

witalogeninie (Api m 12/Ves v 6) jak i fosfolipazie A1 (Ves v 1/ Pol d 1) oraz antygenowi 5 (Ves v 5/Pol d 5),

c/ wytwarzania nieistotnych klinicznie przeciwciał przeciwko resztom węglowodanowym (determinantom węglowodanowym - CCD -cross reactive carbohydrate determinants) obecnym na niektórych molekułach alergenowych obu jadów (Api m 1, Api m 2, Ves v 1 i Ves v 3). Występowanie przeciwciał anti-CCD nie wyklucza innych przyczyn „podwójnego uczulenia”.

W jadzie osy i pszczoły występują alergeny o podobnej budowie (homologicznej sekwencji); należą do nich w jadzie pszczoły hialuronidazy, Api m 2, i jej odpowiednik w jadzie osy Ves v 2; dipeptydylopeptydazy Api m 5 i Ves v 3 i witalogeniny Api m 12 i Ves v 6<sup>50,67,85,86</sup>. Biorąc pod uwagę rzadkie przypadki alergii na *Polistes* w naszym rejonie geograficznym, w dalszych rozważaniach reaktywność krzyżowa z gatunkami *Polistes* nie będzie szczegółowo omawiana. Obecność sIgE przeciwko składnikom ekstraktu jadu o podobnej budowie może dawać wyniki fałszywie dodatnie zarówno przeciwko ekstraktowi jadu osy i pszczoły. Należy także zaznaczyć, że podwójne uczulenie na hialuronidazę wiąże się nie tyle z homologią budowy (co nie jest równoznaczne z podobieństwem powierzchniowych epitopów obu składników) ale przede wszystkim z obecnością reszt CCD. Alergeny Api m 2 i Ves v 2 pozbawione epitopów CCD wykazują się bardzo małą reaktywnością krzyżową<sup>86</sup>.

Kilkanaście alergenów obecnych w jadzie pszczelim to glikoproteiny (Api m 1, 2, 5, 7, 8, 10, 11) i co najmniej dwa w jadzie osy (Ves v 2, Ves v 3), gdzie białko połączone jest wiązaniem N-glikozydowym z glikanem. N-glikany zawierają rdzeń alfa-1, 3-fukozy, który jest wysoce immunogeny i stymuluje produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko epitopom węglowodanowym. Na podstawie badań Flemisha można wnioskować, że reaktywność z resztami CCD wykrywana jest u 20% pacjentów z HVA, zwłaszcza osób uczulonych na jad pszczoły<sup>87,88</sup>. W rzeczywistości nawet 75% wyników „podwójnie dodatnich”

może wynikać z obecności reakcji przeciwciał i reszt CCD, a nie z faktycznego uczulenia na oba jady<sup>89</sup>. Pomimo częstego występowania, rola biologiczna tych przeciwciał jest nieistotna. Natomiast fakt występowania przeciwciał anti-CCD komplikuje przede wszystkim diagnostykę alergii na jad owadów będąc przyczyną wyników fałszywie dodatnich. Ciekawy jest fakt, że alergeny jadu owadów gatunków *Polistes* nie wykazują reaktywności CCD<sup>90</sup>. Rozwiązaniem problemu reakcji z udziałem przeciwciał anti-CCD jadu pszczoły i osy jest wykorzystanie do diagnostyki rekombinowanych molekuł alergenowych, które są wolne od reszt węglowodanowych.

#### **1.4.6 Inne procedury diagnostyczne.**

Badaniem znajdującym zastosowanie w diagnostyce alergii na jad owadów błonkoskrzydłych jest również test aktywacji bazofilów (BAT-basophil activation test). Badanie to polega na ocenie markerów aktywacji na powierzchni bazofila (CD63, CD203c) po inkubacji krwi chorego z alergenem. Do przeprowadzenia oznaczenia niezbędny jest dostęp do cytometru przepływowego. Czułość i swoistość metody w diagnostyce alergii na jad owadów jest wysoka i wynosi od 83 do 100% dla CD63 i 83 do 100% dla CD203c<sup>81,91,92</sup>. Ze względu na wysoki koszt procedury, ograniczona dostępność badania oraz wymagania sprzętowe test ten jest w chwili obecnej zalecany w przypadkach ujemnych wyników po przeprowadzeniu rutynowej diagnostyki oraz dodatniego obrazu klinicznego. W badaniach Kosnika i Ebo pozytywnym wynikiem badania BAT udało się potwierdzić alergię na jad owadów nawet odpowiednio w 75 i 100% przypadków<sup>93,94</sup>. Grupa Koroseca również wykazała wysoką skuteczność BAT w identyfikacji alergii na jad u pacjentów, u których oznaczenia sIgE w surowicy były „podwójnie ujemne”<sup>95</sup>. W tej populacji chorych wynik dodatni uzyskano w 81% przypadków, ponadto w przypadku wyników „podwójnie dodatnich” wytypowanie „owada sprawcy” było możliwe na podstawie wyższej aktywności bazofili.



### 1.4.7 Tryptaza

Stężenie tryptazy w surowicy jest ważnym biomarkerem aktywacji mastocytów. Enzym ten jest proteazą serynową produkowaną głównie przez mastocyty oraz w niewielkiej ilości przez bazofile. Wyróżnia się 4 izoformy tryptazy, ale tylko izoforma beta może być aktywowana wewnątrzkomórkowo i magazynowana w ziarnistościach mastocytów<sup>96</sup>. Podwyższone bazalne stężenie tryptazy stwierdza się m.in. w mastocytozie, zespołach aktywacji mastocytów, białaczkach szpikowych, skrajnej niewydolności nerek czy też przewlekłej pokrzywce<sup>97</sup>. Podczas anafilaksji stężenie tryptazy wzrasta w ciągu 60 do 90 minut od wystąpienia reakcji, a wzrost stężenia tryptazy powyżej 11.4 ng/ml lub o 20%+ 2 ng/ml względem wartości wyjściowej wskazuje na aktywację mastocytów<sup>98-100</sup>. Podwyższone stężenie tryptazy (> 11.4 ng/ml) jest uważane za jeden z najbardziej specyficznych markerów aktywacji mastocyta<sup>101,102</sup>, natomiast stężenie powyżej 20 ng/ml jest jednym z kryteriów mniejszych rozpoznania mastocytozy<sup>103</sup>.

Uważa się, że podczas kwalifikacji do immunoterapii jadem owadów oznaczenie bazalnego stężenia tryptazy pomaga w oszacowaniu ryzyka wystąpienia powikłań i niepowodzeń VIT. Wobec tego każdy pacjent kwalifikowany do immunoterapii jadem powinien mieć oznaczone bazalne stężenie tryptazy. Podwyższone stężenie tryptazy stwierdza się nawet u 25% przypadków chorych z HVA, którzy przebyli wstrząs anafilaktyczny i u 5% z łagodną i umiarkowaną reakcją poużądleniową<sup>104</sup>. Niektórzy badacze kwalifikują ryzyko anafilaksji u pacjentów z HVA w zależności od stężenia bazalnej tryptazy, gdzie niskie ryzyko występuje przy stężeniu poniżej 4 ng/ml, 4-7.5 ng/ml określa się jako ryzyko umiarkowane, a powyżej 7,5 ng/ml przyjmuje się za wysokie ryzyko anafilaksji<sup>105</sup>. Z badań wynika, że nawet u 7% dorosłych pacjentów z HVA występują klonalne choroby mastocytów (CMD-clonal mast cell disease)<sup>106</sup>. Występowanie HVA wśród pacjentów z mastocytozą jest znacznie wyższe niż w populacji ogólnej i sięga nawet 20-30%<sup>97,107</sup>. Ponadto u dorosłych pacjentów z mastocytozą uządlenia przez

owady są najczęstszym triggerem anafilaksji (22-60%)<sup>108,109</sup>. Podwyższone stężenie tryptazy u pacjentów z HVA powinno być monitorowane, a chorzy poddawani obserwacji i diagnostyce (w tym oznaczeniu mutacji w genie c-kit oraz biopsji szpiku) w kierunku mastocytozy i innych chorób z rozrostem klonalnym i zwiększoną aktywnością mastocytów<sup>19,110-112</sup>.

### **1.5 Immunoterapia jadem owadów (VIT – venom immunotherapy)**

Jedyną skuteczną metodą leczenia alergii na jad owadów błonkoskrzydłych jest immunoterapia (VIT –venom immunotherapy). VIT jest skuteczna u większości pacjentów z HVA, jej skuteczność ocenia się na 77-84% dla poddanych VIT jadem pszczoły i 91-96% jadem osy<sup>113</sup>. Wyjaśnienie większej skuteczności VIT w alergii na jad osy nie jest do końca zrozumiałe. Jedną z hipotez zakłada, że dawka podtrzymująca jadu osy podawana podczas VIT jest relatywnie wyższa niż jadu pszczoły, bo stanowi pięciokrotność dawki otrzymanej podczas użądlenia przez osę podczas gdy dawka jadu pszczoły w szczepionce, odpowiada dwóm użądleniom przez pszczoły. Zgodnie z obecnymi poglądami skuteczność immunoterapii jest funkcją dawki szczepionki, co sprawia, że szczepienie jadem osy może być bardziej efektywne. Poza tym jad pszczoły jest również bardziej różnorodny alergenowo (12 opisanych alergenów) w porównaniu do jadu osy, co może mieć co najmniej dwie konsekwencje. Po pierwsze implikuje większą różnorodność profili uczuleniowych pacjentów z alergią na jad pszczoły i trudności w „dopasowaniu” do nich składu jakościowego i ilościowego szczepionki. Opublikowano dane dowodzące, że brak jednego ze składników alergenowych w szczepionkach jadu pszczoły, był przyczyną niepowodzenia VIT w grupie pacjentów wykazujących uczulenie na ten składnik<sup>58</sup>.

Uważa się, że skuteczność VIT może być mniejsza u dorosłych niż u dzieci<sup>114</sup>. Immunoterapia jadem jest również nieco częściej zawodna również w grupach pacjentów z mastocytozą i innymi chorobami z grupy MCAD chociaż doniesienia na ten temat są sprzeczne. W części prac potwierdzono taki związek,

w innych nie wykazano korelacji<sup>51,115-118</sup>. W jednym wieloośrodkowym badaniu nie wykazano związku pomiędzy nieskutecznością VIT a podwyższonym stężeniem tryptazy<sup>119</sup>, natomiast w innym badaniu stwierdzono, że pacjenci ze stężeniem tryptazy powyżej 20 ng/ml i /lub postacią skórną mastocytozy mają 2.7 razy wyższe ryzyko niepowodzenia VIT.

Czynnikiem predykcyjnym niepowodzenia są powikłania w postaci alergicznej reakcji systemowej w trakcie VIT. U pacjentów, którzy przebyli powikłania podczas VIT ryzyko niepowodzenia VIT może sięgać aż 38%<sup>117</sup>.

Jak wykazano na skuteczność immunoterapii nie ma wpływu również ani schemat VIT ani wybór preparatu handlowego szczepionki<sup>116,120</sup>.

### **1.5.1 Wskazania do VIT**

Aby zakwalifikować pacjenta do VIT należy rozważyć wskazania, przeciwwskazania oraz wybrać odpowiedni jad do immunoterapii. Warunkiem niezbędnym i koniecznym do rozpoczęcia VIT jest stwierdzenie objawów systemowych HVA w wywiadzie i potwierdzenie IgE-zależnej nadwrażliwości na jad owadów błonkoskrzydłych w testach skórnych i/lub sIgE. Kwalifikując pacjenta do VIT w chwili obecnej opieramy się na wytycznych EAACI z 2018r<sup>113</sup>. W świetle obowiązujących wytycznych do immunoterapii jadem owadów kwalifikowani są pacjenci, zarówno dorośli jak i dzieci, którzy przebyli reakcję systemową po użądleniu. Reakcja systemowa kwalifikowana do VIT według klasyfikacji Muellera jest reakcją SYS III° lub SYS IV°, ewentualnie reakcją SYS II° z zajęciem górnych dróg oddechowych. Podział wprowadzony przez autorów ostatnich wytycznych EAACI w zasadzie pokrywa się z podziałem Muellera i upraszcza go, zakładając dwie klasy reakcji systemowych: ograniczone do skóry i z dodatkowymi objawami nadwrażliwości poza skórnymi. W zasadzie do immunoterapii nie powinni być kwalifikowani pacjenci z łagodną reakcją systemową, jednak i takich dorosłych pacjentów w kwestii kwalifikacji do VIT należy rozważyć, jeśli z powodu

alergii na jad demonstrują znacznie ograniczoną jakość życia, zwłaszcza w przypadku nadmiernej ekspozycji na kolejne użądlenia. Podczas dyskwalifikacji pacjentów z łagodnymi reakcjami systemowymi także w świetle wytycznych amerykańskich powinno się wziąć również pod uwagę: wiek pacjenta, współistnienie mastocytozy oraz innych chorób mastocytarnych, bazalne stężenie tryptazy oraz możliwość uzyskania pomocy lekarskiej w razie użądlenia. Jak już wspomniano powyżej nie kwalifikuje się pacjentów z bezobjawowym uczuleniem na jad, ale wytyczne dopuszczają kwalifikację pacjentów z dużymi odczynami lokalnymi, jeśli są one wyjątkowo uciążliwe dla pacjenta (klasa dowodu II B)<sup>32,113</sup>.

### **1.5.2 Przeciwwskazania do VIT**

W zdecydowanej większości przypadków VIT jest przeprowadzane ze wskazań życiowych (reakcje SYS III<sup>o</sup> i IV<sup>o</sup>), dlatego istnieje bardzo niewiele czynników będących bezwzględными przeciwwskazaniami do VIT, a część z nich ma charakter przemijający.

Bezwzględnym przeciwwskazaniem do VIT jest aktywny proces autoimmunologiczny, jednak VIT można rozważać u pacjentów ze stabilną postacią choroby. Podobnie jak uważa się VIT za bezpieczne u chorych ze stabilnym procesem nowotworowym. Immunoterapii jadem nie powinno rozpoczynać się w ciąży, nie ma natomiast przeciwwskazań do kontynuacji terapii w trakcie ciąży i karmienia piersią. Nie powinno się rozpoczynać VIT u pacjentów z niestabilną chorobą towarzyszącą: niekontrolowana astmą czy też niestabilną chorobą niedokrwienną serca, są to jednak zazwyczaj przeciwwskazania czasowe. Bezwzględnym przeciwwskazaniem do VIT nie jest również leczenie beta-blokerami, ACE-inhibitorami ani inhibitorami MAO<sup>121</sup>. Za przeciwwskazanie względne należy uważać wiek dziecka poniżej 5 lat, a immunoterapię jadem należy rozważać tylko u tych dzieci poniżej 5 roku życia, u których wystąpiły bardzo ciężkie objawy po użądleniu<sup>113</sup>.

### 1.5.3 Procedura VIT

Immunoterapia jadem owadów przebiega w dwóch etapach na które składa się: faza wstępna (indukcji) i faza podtrzymująca. W fazie wstępnej następuje stopniowe zwiększanie dawki jadu, aż do osiągnięcia dawki podtrzymującej. Istnieje kilka schematów przeprowadzania fazy wstępnej VIT, w zależności od czasu do uzyskania dawki podtrzymującej. Można wyodrębnić kilka metod o różnym czasie trwania okresu do osiągnięcia dawki podtrzymującej trwającym odpowiednio: w metodzie konwencjonalnej 16-20 tygodni, w metodzie dawek zsumowanych (cluster) 7 tygodni oraz w metodach szybkich: szybkiej (rush) 3 dni i ultraszybkiej (ultra rush - UR) 3.5 godziny. Dwie ostatnie metody umożliwiają uzyskanie dawki podtrzymującej w bardzo krótkim czasie, dzięki czemu pacjent już w pierwszym dniu VIT (w przypadku schematu UR) uzyskuje protekcję. Metoda UR powinna być rozważana w szczególności u pacjentów, którzy zgłaszają się do VIT tuż przed rozpoczęciem/w trakcie trwania sezonu lotu owadów. Schemat UR wydaje się być również mniej uciążliwy i bardziej ekonomiczny dla pacjenta, oszczędza czas chorego niwelując konieczność cotygodniowych przyjazdów w celu budowania dawki podtrzymującej. Z porównań metod wynika, że schemat UR może być uznawany za mniej bezpieczny w porównaniu ze schematem konwencjonalnym lub cluster<sup>122-125</sup>, dlatego procedura powinna być wykonywana w warunkach szpitalnych, w sali wzmożonego nadzoru, w pełnym zabezpieczeniu antywstrząsowym. W zależności od protokołu VIT-UR uzyskujemy dawkę sumaryczną jadu, w protokole Muellera 111.1 mcg, w protokole Birnbauma 101.1 mcg<sup>124</sup>. Docelowa dawka jadu w terapii podtrzymującej to 100 mcg, co odpowiada mniej więcej dwóm użądleniom przez pszczołę i pięciu użądleniom przez osę<sup>38</sup>. W niektórych przypadkach należy rozważyć zwiększenie dawki podtrzymującej jadu do 200 mcg. Są to sytuacje szczególne i dotyczą kilku grup pacjentów. Pierwsza z nich to pacjenci, u których wykazano brak tolerancji użądlenia polnego lub użądlenia prowokowanego (próba prowokacji żywym owadem)<sup>126</sup>. Wytyczne

EAACI sugerują zwiększenie dawki docelowej jadu również u pacjentów narażonych na wielokrotne żądlenia (np. pszczelarzy) i w przypadku kumulacji czynników ryzyka niepowodzenia VIT<sup>127</sup>. Do tej pory nie ma jednoznacznych wytycznych odnośnie wysokości dawki podtrzymującej u pacjentów z mastocytozą, w niektórych ośrodkach dawka zwiększana jest do 200 mcg zgodnie z wynikami badania Rueff wskazujących na wyższy stopień protekcji VIT u chorych z mastocytozą stosujących wyższą dawkę podtrzymującą szczepionki jadu<sup>128</sup>.

Aby zapewnić efekt długoterminowy VIT powinna trwać od 3-5 lat, dawki podtrzymujące powinny być podawane w odstępach 4 tygodniowych w pierwszym roku szczepień, 6 tygodniowych w drugim roku, a w przypadku preparatów depot nawet 8 tygodniowych od 3 roku VIT<sup>113</sup>. W niektórych przypadkach należy rozważyć prowadzenie VIT przez całe życie. Jest to sytuacja szczególna, zazwyczaj dotyczy pacjentów z mastocytozą, ale należy ją również rozważyć u pacjentów z wyjściowo ciężką reakcją systemową, z systemowymi powikłaniami podczas VIT oraz u pacjentów uczulonych na jad pszczoły z bardzo wysoką ekspozycją na kolejne użądlenia<sup>19,115,119</sup>.

Do immunoterapii jadem w Europie używane są oczyszczone roztwory wodne jadu oraz oczyszczone preparaty jadu z adjuwantem, którym są związki aluminium (tzw. forma depot). Roztwory wodne jadu mogą być używane do wszystkich protokołów VIT zarówno w fazie indukcji jak i podtrzymującej, natomiast formy depot używane są w fazie podtrzymującej oraz w fazie wstępnej jedynie w schemacie konwencjonalnym i metodą cluster. Ze względu na potencjalną możliwość kumulowania soli glinu w organizmie podczas immunoterapii jadem trwającej dłużej niż 5 lat lub podczas immunoterapii jadem dwóch owa-  
dów, ostatnie wytyczne EAACI sugerują w tych przypadkach prowadzenie immunoterapii roztworem wodnym jadu<sup>113</sup>.

#### 1.5.4 VIT powikłania

Immunoterapia jadem owadów niesie ze sobą ryzyko powikłań systemowych. Na podstawie wielośrodkowych badań oszacowano, że ryzyko to wynosi od 8 do 20%<sup>129,130</sup>. Opisano kilka czynników predykcyjnych wystąpienia systemowych powikłań podczas VIT. Niekwestionowanym czynnikiem ryzyka jest immunoterapia jadem pszczoły. Powikłania w tych przypadkach zdarzały się 3.1 do 6 razy częściej niż podczas VIT jadem osy<sup>129,131</sup>. Dotychczas nie ustalono przyczyny tego zjawiska. Ryzyko powikłań systemowych podczas VIT jest również większe podczas VIT z zastosowaniem w fazie indukcji schematów "szybkich".

Za czynniki istotne dla wystąpienia powikłań podczas VIT nie zostały uznane: mastocytoza i podwyższone stężenie tryptazy<sup>16,111,132</sup>, leczenie ACE-inhibitorami i beta-blokerami<sup>133</sup>. Nie ma również związku między występowaniem reakcji systemowych nadwrażliwości podczas VIT, a wyjściową ciężkością reakcji anafilaktycznej, stężeniem w surowicy sIgE i wynikiem testów skórnych<sup>56,129,134</sup>.

#### 1.6 Diagnostyka komponentowa a diagnostyka i leczenie HVA

Tradycyjna diagnostyka alergii opiera się na wykorzystywaniu ekstraktu jadu zarówno do testów skórnych jak i oznaczania sIgE w surowicy. Zaletą takiego postępowania jest posługiwanie się materiałem potencjalnie zawierającym pełen panel alergenów jadu. Wadą ekstraktu alergenowego jako materiału diagnostycznego są potencjalne braki zarówno ilościowe jak jakościowe poszczególnych molekuł alergenowych oraz domieszka substancji niealergenowych o właściwościach drażniących. Rozwój technik biologicznych umożliwił uzyskanie z ekstraktu i produkcję oczyszczonych komponent alergenowych, natywnych jego składników jak i produkcję rekombinowanych molekuł<sup>135</sup>. Nazwy tych molekuł alergenowych pochodzą od ich nazw łacińskich oznaczających rodzaj i gatunek. Na przykład alergeny tymotki łąkowej oznacza się jako Phl p (od *Phleum pratense*), a liczba

dodana na końcu oznacza kolejność odkrycia alergenu np. Phl p 1. Nomenklatura molekuł jadów błonkoskrzydłych opiera się na tych samych zasadach: Api m 1 (Apis mellifera), Ves v 1 (Vespula vulgaris).

Diagnostyka molekularna HVA, oparta o analizę reaktywności immunologicznej wobec poszczególnych molekuł (komponent) alergenowych jadu albo wobec panelom tych molekuł, odgrywa coraz większą rolę w diagnostyce i leczeniu HVA. Technika ta daje nadzieje na zwiększenie precyzji diagnostycznej poprzez zwiększenie czułości i swoistości detekcji sIgE oraz umożliwienie różnicowanie występowania sIgE przeciwko alergenom pierwotnym tj. specyficznym gatunkowo i alergenom reagujących z krzyżowo. Tym samym CRD potencjalnie może ułatwić interpretację wyników wskazujących m.in. na podwójne uczulenie i pozwolić na wybór właściwego jadu do immunoterapii. Diagnostyka molekularna daje też potencjalnie możliwość wykazania uczulenia u tych pacjentów z HVA, którzy mają ujemne wyniki testów diagnostycznych z ekstraktem jadu. Wreszcie zastosowanie rekombinowanych molekuł alergenowych wyeliminuje problem „fałszywie dodatnich” wyników oznaczeń wynikających z obecności przeciwciała anty-CCD.

### **1.6.1 CRD – diagnostyka uczulenia na jad owadów**

Na podstawie przeprowadzonych badań za alergeny odpowiadające za pierwotne uczulenie na jad pszczoły uważa się Api m 1, Api m 3, Api m 4 i Api m 10, a na jad osy Ves v 1 i Ves v 5. Stąd pierwsze badania oceniały czy oznaczenie sIgE przeciwko głównym molekułom jadów lub ich zestawom zwiększa czułość diagnostyki HVA wobec detekcji sIgE przy wykorzystaniu ekstraktu.

W pierwszych badaniach przy użyciu izolowanych alergenów jadu pszczoły potwierdzono uczulenie na Api m 1 aż u 97% pacjentów z alergią na jad pszczoły<sup>83</sup>, ale w kolejnych pracach częstość uczulenia na Api m 1 była niższa (58-80%), co może wyrażać różnice regionalne w uczuleniu na Api m 1 lub być



efektem zróżnicowanej czułości metod laboratoryjnych<sup>46,54,136-139</sup>. Poszerzenie diagnostyki o wykorzystanie całej grupy molekuł: Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 4, Api m 5 i Api m 10 pozwoliło na identyfikację sIgE przeciwko temu zestawowi molekuł u 94% pacjentów z alergią na jad pszczoły, co byłoby znaczącym sukcesem diagnostycznym<sup>46</sup>. Jednakże wyniki innych autorów przy użyciu tego samego zestawu komponent, wykazały uczulenie na jad pszczoły tylko u 79% przypadków osób z HVA na jad pszczoły<sup>46,140</sup>. Niezależnie od powyższych wyników stwierdzono, że poszerzenie diagnostyki o Api m 3 i Api m 10 pozwala wykazać uczulenie na nie, aż u ponad 60% pacjentów, u których oznaczenie Api m 1 było negatywne<sup>141</sup>. Pomimo wykorzystania wszystkich dostępnych obecnie molekuł alergenów nie udaje się potwierdzić alergii na jad pszczoły nawet w 5-20% przypadków pacjentów z HVA użądlnych przez pszczołę<sup>46,140</sup>. Badania te dowodzą, że użycie wszystkich obecnie dostępnych komercyjnie komponent jadu pszczoły są niewystarczające do zdiagnozowania wszystkich przypadków alergii na jad pszczoły. Jest prawdopodobne, że w grupie pacjentów z ujemnym wynikiem oznaczenia sIgE przeciwko komponentom Api m 1, 2, 3, 4, 5, 10, powodem uczulenia są inne molekuły alergenowe, dotychczas niedostępne komercyjnie. Nie można wreszcie wykluczyć, że w etiologii takich przypadków odgrywają rolę inne mechanizmy niż reakcja IgE-zależna.

Pierwsze eksperymenty badawcze wśród pacjentów z HVA na jad osy wykazały, że u 87% pacjentów można wykazać uczulenie na Ves v 5<sup>83</sup>. Kolejne prace udokumentowały obecność sIgE odpowiednio wobec Ves v 1 i Ves v 5 aż u 33-54% i 84-90% osób z alergią na jad osy, co dało możliwość potwierdzenia uczulenia na jad osy u około 92-98% pacjentów z alergią na jad osy<sup>72,73,142,143</sup>. Po zastosowaniu CRD nie potwierdzono uczulenia na jad osy w 2-8% przypadków<sup>73,82,83</sup>. Część z tych przypadków można zdiagnozować wykorzystując ekstrakt jadu osy z dodatkiem molekuły Ves v 5, co zwiększyło skuteczność diagnostyki z 83 do 96%<sup>144</sup>. Wyniki powyższe wskazują, że wykorzystanie molekuł Ves v 1

i Ves v 5 ma porównywalną czułość diagnostyczną jak diagnostyka tradycyjna z ekstraktem jadu oraz że u 2-8% pacjentów z ewidentnym wywiadem reakcji nadwrażliwości na jad osy nie udaje się wykazać obecności sIgE. Wydaje się, że aby uzyskać optymalny wynik konieczne jest oznaczanie sIgE przeciwko większej ilości molekuł jadu osy. Należy podkreślić, że na podstawie ujemnych sIgE z Ves v 1 i Ves v 5 w większości przypadków można wykluczyć alergię na jad osy, ale ostateczne wykluczenie alergii na jad osy wymagałoby oznaczenia przeciwciał IgE wobec wszystkich alergenów jadu osy co w chwili obecnej nie jest możliwe. Niektórzy autorzy postulują, że obniżenie dolnej granicy dodatniego oznaczenia do 0.1 kU/l zmniejszy ilość pacjentów, u których nie udało się potwierdzić alergii na jad owadów. Ilustracją prawidłowości tego postulatu mogą być wyniki badania przeprowadzone w grupie pacjentów z HVA i z mastocytozą lub podwyższonym stężeniem tryptazy. Zastosowanie w tej grupie pacjentów diagnostyki molekularnej z wykorzystaniem Ves v 1, Ves v 5 oraz Api m 1, 4, 10 oraz obniżenie dolnej granicy normy dla sIgE do 0.1 kU/l umożliwiło wykazanie sIgE u 8% pacjentów u których zastosowanie ekstraktu nie umożliwiło wykazania sIgE przeciwko jadom<sup>145-147</sup>. Wydaje się zatem, że użycie diagnostyki komponentowej poprawia możliwości diagnostyczne w alergii na jad owadów nawet u pacjentów z niskimi wartościami sIgE, jednak badania te przeprowadzane na małych grupach chorych wymagają dalszego opracowania.

Duże nadzieje wiązano z zastosowaniem technik CRD, u pacjentów z udokumentowaną reakcją systemową na jad, ale z ujemnymi wynikami testów skórnych i sIgE z ekstraktem jadu. U pacjentów uczulonych na alergeny główne Api m 3 i Api m 10, w związku z małym stężeniem tych alergenów w ekstrakcie jadu standardowe metody diagnostyczne mogą nie potwierdzać uczulenia, co rzeczywiście udaje się dzięki CRD z wykorzystaniem tych dwóch molekuł alergenowych<sup>148,149</sup>.

### 1.6.2 CRD a immunoterapia jadem

Nasuwa się również pytanie o możliwości kwalifikacji do VIT tylko na podstawie wyników badań CRD (co nie jest ujęte w obowiązujących europejskich i amerykańskich wytycznych). Polska grupa ekspertów dopuszcza rozpoczęcie VIT na podstawie CRD. Dotyczy to pacjentów, którzy przy jednoznacznym wywiadzie i z ujemnymi wynikami badań z ekstraktem, mają jednoznaczny wynik testu CRD z alergenami głównymi osy lub pszczoły. Oznacza to możliwość rozpoczęcia VIT jadem pszczoły u pacjenta z jednoznacznym wywiadem, u którego potwierdzono obecność sIgE na jeden z alergenów głównych: Api m 1, Api m 3, Api m 4, Api m 10 lub jadem osy w przypadku użądlenia przez osę i wykazania sIgE na Ves v 1 lub Ves v 5. O kwalifikacji nie powinno się decydować na podstawie dodatnich jedynie komponent o budowie homologicznej Api m 2/Ves v 2, Api m 5/Ves v 3 czy Api m 12/Ves v 6. Potwierdzeniem uczulenia jedynie na jad osy jest obecność sIgE przeciwko Ves v 1 i Ves v 5 przy nieobecności przeciwciał przeciwko któremukolwiek alergenowi głównemu pszczoły. Aby potwierdzić alergię jedynie na jad pszczoły i wykluczyć na jad osy należy wykazać brak sIgE przeciwko Ves v 1 i Ves v 5 i potwierdzić obecność sIgE przeciwko co najmniej jednemu alergenowi głównemu jadu pszczoły. Podwójne uczulenie możemy potwierdzić w przypadku obecności sIgE zarówno przeciwko alergenom głównym jadu osy jak i pszczoły<sup>150</sup>.

W niektórych badaniach skupiano się również na oszacowaniu ryzyka podczas immunoterapii jadem na podstawie profilów alergenowych oznaczanych przy wykorzystaniu CRD. Ze względu na większą różnorodność alergenów, badania te dotyczą głównie jadu pszczoły. W jednej pracy stwierdzono, że pacjenci uczuleni na Api m 10 mieli największe ryzyko niepowodzenia VIT, podobnej zależności nie stwierdzono dla innych alergenów<sup>58</sup>. Krytyczne podejście do powyższych wyników nakazuje uwzględnienie faktu, że związek ten może być wynikiem braku w szczepionkach niektórych producentów tej molekuly lub

wstępowania Api m 10 w niewystarczającym stężeniu<sup>59</sup>. Podnoszony jest też problem niestabilności i zwiększonej degradacji Api m 10 w ekstrakcie jadu<sup>151</sup>. Zatem u pacjentów uczulonych na Api m 10, zmienne w poszczególnych partiach szczepionki lub niedostateczne, stężenie Api m 10 może być powodem częstszych powikłań i/lub niepowodzenia immunoterapii.

W prospektywnym badaniu oceniano też wpływ uczulenia na Api m 4 u pacjentów poddawanych VIT jadem pszczoły. Wykazano częstszą ilość powikłań podczas fazy indukcji w grupie pacjentów ze stężeniem Api m 4 powyżej 0.98 kU/l. Równocześnie chorzy ci mieli zwiększoną reaktywność skóry w testach, większe wyjściowe stężenie sIgE z jadem pszczoły, dłużej mieli też dodatnie testy śródskórne z jadem podczas VIT<sup>138</sup>. Niestety badania te były prowadzone na małej grupie pacjentów i nie brano pod uwagę innych czynników ryzyka powikłań. W świetle tych doniesień można mieć nadzieję, że w przyszłości będziemy mogli stratyfikować ryzyko VIT na podstawie profilu alergenowego pacjentów z HVA, jednak na chwilę obecną potrzebnych jest więcej badań w tym kierunku.

## **2. Cele pracy**

Cel główny:

Przydatność diagnostyki komponentowej w kwalifikacji i monitorowaniu immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych

Cele szczegółowe:

1. Ocena profili uczuleń na jad osy i pszczoły u pacjentów z systemowymi reakcjami alergicznymi na jad owadów
2. Ocena korelacji pomiędzy wynikami testów z ekstraktem jadu a wynikami testów z komponentami molekularnymi jadu owadów

3. Ocena zależności między ciężkością reakcji poużądleniowej u pacjentów uczulonych na jad osy i pszczoły a profilem uczulenia na poszczególne molekuly jadów.

4. Analiza związku pomiędzy uczuleniem na molekuly jadu osy i pszczoły a bezpieczeństwem immunoterapii

5. Analiza związku pomiędzy uczuleniem na molekuly jadu osy i pszczoły a skutecznością immunoterapii

### **3. Materiał i metody**

#### **3.1 Grupa badana**

Do badania zakwalifikowano 167 pacjentów z systemowymi objawami alergii na jad owadów (HVA-SYS), objętych immunoterapią alergenową jadem owadów (VIT) w Klinice Chorób Wewnętrznych i Alergologii. Wszyscy pacjenci grupy badanej spełniali kryteria kwalifikacji do immunoterapii jadem osy i/lub pszczoły zdefiniowane w wytycznych EAACI tzn. rozpoznano u nich reakcję systemową I<sup>o</sup> - IV<sup>o</sup> wg klasyfikacji Muellera w przebiegu alergii na jad osy i/lub pszczoły<sup>26</sup>. Rozpoznanie alergii na jad osy i/lub pszczoły ustalono na podstawie szczegółowego wywiadu i dodatnich testów skórnych z ekstraktem jadu i/lub dodatnich wyników oznaczenia sIgE przeciwko ekstraktowi jadu w surowicy. Grupą referencyjną było 816 pacjentów z alergią na jad owadów, hospitalizowanych w Klinice w okresie 2012-2019 spełniających te same kryteria.

Do badania nie włączano pacjentów z alergią na jad Polistes.

Wyłoniono 3 podgrupy, pacjentów:

- podgrupę A (N = 91), pacjentów z alergią na jad osy poddanych immunoterapii jadem osy. U pacjentów tej grupy przeprowadzono obok klasycznej diagnostyki HVA z ekstraktem jadu, także badanie stężenia sIgE przeciwko głównym molekułom alergenowym jadu osy,

- podgrupę B (N = 64), pacjentów z alergią na jad pszczoły poddanych immunoterapii jadem pszczoły. U wszystkich pacjentów tej grupy przeprowadzono obok klasycznej diagnostyki HVA z ekstraktem jadu, także badanie stężenia sIgE przeciwko molekułom alergenowym jadu pszczoły,

- podgrupę C (N = 12), pacjentów zakwalifikowani do immunoterapii dwoma jadami, zarówno jadem osy jak pszczoły, u których występowała albo alergii na jad obu owadów albo brak było jednoznacznych podstaw do wykluczenia alergii zarówno na jad osy i pszczoły. U wszystkich pacjentów tej podgrupy wykonano oznaczenia sIgE przeciwko ekstraktom obu jadów i molekułom alergenowym jadu pszczoły i osy.

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Kryteria kliniczne klasyfikacji ciężkości reakcji klinicznej**

Objawy HVA oceniano na podstawie szczegółowego wywiadu zebranego lub zweryfikowanego przez Autora. Podstawą oceny klinicznej obok wywiadu z pacjentem była analiza przedstawionej dokumentacji medycznej (karty wypisowe z SOR, Pogotowia Ratunkowego lub szpitala). Do klasyfikacji ciężkości reakcji klinicznej po uzgodnieniu wykorzystano czterostopniową skalę HL Muellera<sup>26</sup>.

### **3.2.2 Opis procedur wykonywanych w poszczególnych grupach**

U wszystkich pacjentów z HVA-SYS wykonywano testy śródskórne (IDT, intradermal test) z ekstraktem obu jadów, oznaczono stężenie specyficznych przeciwciała klasy IgE w surowicy (sIgE) przeciwko ekstraktowi obu jadów oraz oznaczenie stężenia tryptazy w surowicy (sBT). W podgrupie A, pacjentów z alergią na jad osy wykonywano dodatkowo oznaczenia stężenia przeciwciał przeciwko molekułom Ves v 1 i Ves v 5, a w podgrupie B, pacjentów z alergią na jad pszczoły oznaczano stężenia przeciwciał przeciwko molekułom Api m 1, 2, 3, 5 i 10.

### **3.2.2.1 Testy śródskórne (IDT) z ekstraktem jadu owadów**

Testy śródskórne wykonywano z objętością 0.02 ml roztworu wodnego ekstraktu jadu osy i pszczoły (Pharmalgen ALK-Abello, Dania). Test rozpoczynano z rozcieńczeniem jadu  $10^{-6}$  mcg/ml, stężenia jadu zwiększano 10-krotnie co 15-20 minut, aż do uzyskania pozytywnego wyniku testu lub osiągnięcia granicznego stężenia jadu tj  $10^{-3}$  mcg/ml. Technika przeprowadzania testów była zgodna z zaleceniami ENDA/EAACI<sup>152</sup>. Za wynik dodatni przyjmowano zgodnie z wytycznymi zwiększenie się średnicy bąbla co najmniej o 3 mm z obecnością rumienia. Kontrolę ujemną stanowił test z 0.9% NaCl i test z albuminami rozpuszczalnika jadu, kontrolę dodatnią test z histaminą. Do analiz statystycznych brano pod uwagę tylko testy przeprowadzone przez personel Kliniki (dwie przeszkolone osoby wykonywały wszystkie testy poddane analizom w tym badaniu).

### **3.2.2.2 Oznaczanie w surowicy stężenia specyficznych przeciwciał klasy IgE przeciwko ekstraktowi jadu osy i pszczoły (sIgE)**

Oznaczenia sIgE przeciwko ekstraktowi jadu osy i pszczoły było wykonywane w centralnym laboratorium diagnostycznym USK (Uniwersytecki Szpital Kliniczny) metodą ELISA Klasy IgE były identyczne z klasami oznaczeń przeciwciał przeciw molekułom alergenowym jadów. Za punkt odcięcia wyniku dodatniego przyjmowano wartość 0.35 kUA/l.

### **3.2.2.3 Oznaczanie w surowicy stężenia specyficznych przeciwciał klasy IgE (sIgE) przeciwko poszczególnym molekułom alergenowym jadu osy i pszczoły**

Oznaczenie sIgE przeciw komponentom alergenowym jadu osy i pszczoły było wykonywane w Laboratorium Naukowym Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii metodą ImmunoCAP System (Thermo Fisher Scientific Inc., Szwecja) na aparacie Phadia 100 (Thermo Fisher Scientific Inc., Szwecja) metodą ELISA. Oprócz standardowo wykonanej krzywej wzorcowej

(ImmunoCAP Specific IgE Calibrators No: 10-9460-01), podczas każdej analizy wykonywano kontrole (ImmunoCAP Specific IgE No: 10-9462-01). Oznaczono następujące komponenty wjadzie pszczoły i osy:

- Api m 1 *Phospholipase A2*, Honey bee; No: 10 14-4987-01,
- Api m 2 *Hyaluronidase*, Honey bee; No: 14-6014-01,
- Api m 3 *Acid phosphatase*, Honey bee; No: 14-6015-01,
- Api m 5 *Dipeptidyl peptidase*, Honey bee; No: 14-6016-01,
- Api m 10 *Icarapin*, Honey bee; No: 14-6004-01;
- Ves v 1 *Phospholipase A1*, Common wasp; No: 14-4995-01,
- Ves v 5 Common wasp; No: 14-4992-01

Tabela 3.1. Zakresy oznaczeń poszczególnych klas przeciwciał [kUA/l]

Klasa przeciwciał	[kUA/l]
0	< 0.35
1	0.35 – 0.70
2	0.71 – 3.50
3	3.51 – 17.50
4	17,51 – 50,00
5	50.01 – 100.0
6	> 100

#### 3.2.2.4 Oznaczanie stężenia tryptazy w surowicy (sBT)

Tryptaza była oznaczana w laboratorium centralnym USK metodą ImmunoCAP System (Thermo Fisher Scientific Inc., Szwecja). Testy były przeprowadzone zgodnie z instrukcją i zaleceniami producenta. Za prawidłowy przyjmowano wynik sBT < 11.4 ng/ml.



### 3.2.3 Immunoterapia swoista jadem (VIT)

Do immunoterapii kwalifikowano pacjentów zgodnie z aktualnymi wytycznymi EAACI<sup>113</sup>. Podstawą kwalifikacji była przebyta reakcja systemowa zagrażająca życiu lub reakcja systemowa niezagrażająca życiu jeśli w znaczny sposób pogarszała jakość życia pacjenta bądź stwarzała dla niego ryzyko związane z ponadprzeciętną ekspozycją na użądlenia. Drugim kryterium kwalifikującym do VIT była obecność sIgE przeciwko ekstraktowi jadu owada wykazana w testach skórnych i/lub serologicznych. Do VIT nie kwalifikowano pacjentów z bezwzględными przeciwwskazaniami do immunoterapii zdefiniowanymi w dokumencie EAACI z 2015 i 2018 roku<sup>113</sup>. Wszyscy pacjenci uczestniczący w badaniu poddani zostali immunoterapii swoistej jadem według protokołu ultraszybkiego *modo U*. Muller, w którym dawka sumaryczna wynosiła 111.1 mcg jadu (tabela 3.2). W fazie wstępnej szczepień stosowano roztwór wodny jadu Pharmalgen ALK-Abello, a w fazie podtrzymującej szczepień szczepionkę jadu depot Alutard SQ ALK-Abello.

Tabela 3.2. Schemat VIT-UR wg protokołu Muellera

Czas		Dawka	Preparat
Dzień I	0'	0.1 mcg	Pharmalgen
	30'	1.0 mcg	Pharmalgen
	60'	10 mcg	Pharmalgen
	90'	20 mcg	Pharmalgen
	150'	30 mcg	Pharmalgen
	210'	50 mcg	Pharmalgen
1 tydzień	0'	50 mcg	Pharmalgen
	30'	50 mcg	Pharmalgen
3 tygodnie	0'	50 mcg	Alutard SQ
	30'	50 mcg	Alutard SQ
7 tygodni		100 mcg	Alutard SQ

Przez niepowodzenie immunoterapii jadem uznawano występowanie powikłań w każdej z jej faz jak również występowanie objawów reakcji systemowej podczas

użądlenia polnego, które miało miejsce po zakończeniu fazy wstępnej VIT metodą ultra-rush.

### **3.2.4 Analiza statystyczna**

W prezentowanej pracy dane o charakterze zmiennych ciągłych o normalnym rozkładzie przedstawione zostały jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe ( $\pm$ SD) natomiast zmienne ciągłe o rozkładzie skośnym zaprezentowano jako mediany [dolny i górny kwartył]. Zmienne kategoryzowane zostały zaprezentowane jako liczebności i odpowiadający im odsetek całej grupy (% danej populacji). Normalność rozkładów zmiennych ciągłych została sprawdzona testem Shapiro-Wilk'a. Zmienne ciągłe o rozkładzie skośnym poddano transformacji logarytmicznej w celu normalizacji rozkładu. Różnice pomiędzy grupami były testowane za pomocą testu t-Studenta (w przypadku zmiennych ciągłych o rozkładzie normalnym), testu U Mann-Whitney'a (w przypadku pozostałych zmiennych ciągłych) oraz chi kwadrat w przypadku zmiennych kategoryzowanych. Do wykazania zależności pomiędzy zmiennymi ciągłymi wykorzystano analizy korelacji: dla zmiennych o rozkładzie ciągłym obliczono współczynniki korelacji Pearsona, natomiast dla zmiennych ciągłych o rozkładzie skośnym obliczono współczynniki korelacji Spearmana.

Wartość  $p < 0.05$  przyjęto za istotną statystycznie.

Do analizy statystycznej wykorzystano program STATISTICA 12.

Wszyscy pacjenci, a w przypadku osób małoletnich, również oboje rodzice podpisali pisemną zgodę na udział w badaniu.

Projekt pracy został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (zgoda KBE nr 251/2014).

## 4. Wyniki

### 4.1 Grupa A: pacjenci z alergią na jad osy

Charakterystykę tej grupy zawarto w Tabeli 4.1. Pacjenci tej grupy nie różnili się p/w cech demograficznych i klinicznych od pacjentów z alergią na jad osy grupy referencyjnej.

Tabela 4.1. Cechy demograficzne i kliniczne pacjentów z alergią na jad osy w porównaniu z grupą referencyjną

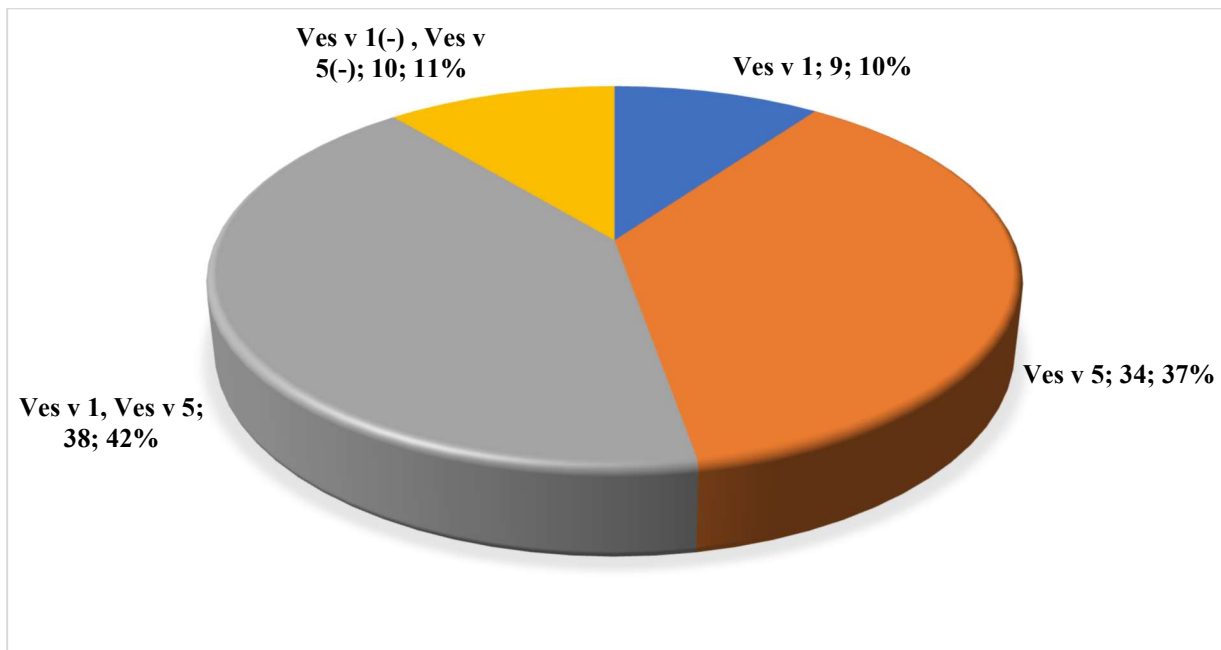
Grupa	Płeć k/m	Wiek X±SD	Klasa ciężkości (średnia)		sIgE Me[Q25-Q75]
Grupa A N = 91	50/41	40.7±14.3	3.41	SYS I 1 (1.1%),	2.8 [0.6-9.8]
				SYS II 5 (5.49%),	
				SYS III 41 (45.05%),	
				SYS IV 44 (48.35%).	
Pacjenci z aler- gią na jad osy grupy referen- cyjnej N = 584;	333/251	43.83±14.81	3.0	SYS I 10 (1.71%),	3.50 [1.09-12.40]
				SYS II 55 (9.42%),	
				SYS III 244 (41.78%),	
				SYS IV 274 (46.91%).	
p	p = 0.71	p = 0.057		p = 0.55	p = 0.2

Zgodność wywiadu (typowany owad) z wynikami IDT i/lub sIgE z ekstraktem wykazano u 58 chorych, czyli wszystkich, którzy identyfikowali owada. Zgodność wywiadu z wynikami CRD wykazano u 51 z 58 tzn 87.93% pacjentów.

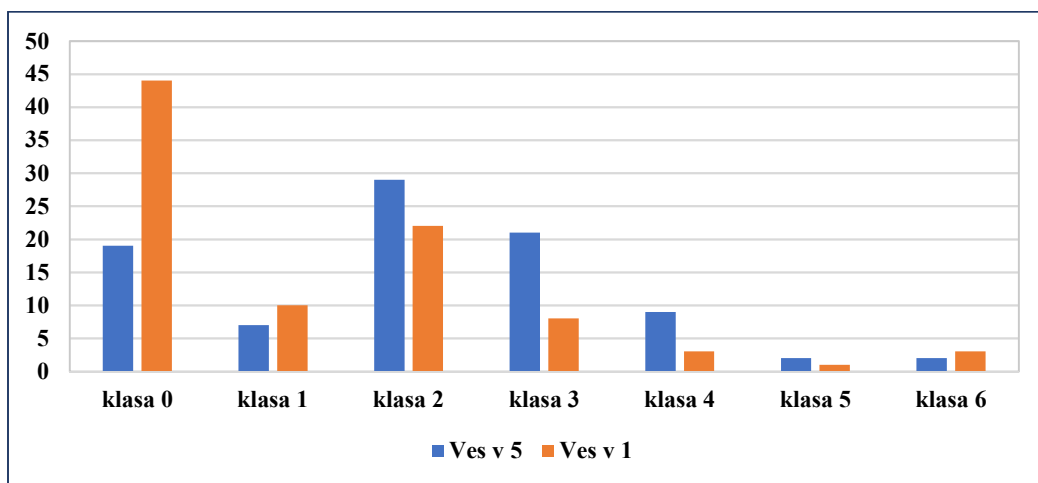
#### 4.1.1 Analiza uczuleń na ekstrakt alergenowy i molekuly alergenowe jadu osy Ves v 1 i Ves v 5

Większość pacjentów z alergią na jad osy wykazywała uczulenie na Ves v 5 (79.12%). Uczulenie na Ves v 1 wykazano u 51.65%. Uczulenie na obie główne molekuly jadu osy wykazywało 40.65% pacjentów, a brak uczulenia na obie wykazano u 10.99% badanych z alergią na jad osy. Stężenia przeciwciał przeciwko Ves v 5 były wyższe niż przeciwko Ves v 1 i wynosiły odpowiednio Me[Q25-

Q75]: 2.23 [0.46-7.24] i 0.37 [0.03-1.8]( $p < 0.00001$ ). Częstość uczuleń i rozkład klas ssIgE wobec Ves v 1 i Ves v 5 przedstawiono na rysunku 4.1 i 4.2.



Rysunek 4.1. Częstość uczuleń na alergeny główne jadu osy: Ves v 1 i Ves v 5 u pacjentów z alergią na jad osy (grupa A). (liczba pacjentów; %)



Rysunek 4.2. Częstość występowania klas (0-6) stężeń sIgE przeciwko Ves v 1 i Ves v 5 w grupie chorych z alergią na jad osy.

Przy przyjęciu wartości 0.1 kU/L jako punktu odcięcia dla testu dodatniego, potwierdzono uczulenie na molekuly Ves v 1 i Ves v 5 dodatkowo u 8 pacjentów: 2 pacjentów wykazało uczulenie na Ves v 1, 7 na Ves v 5, 1 pacjent zarówno na Ves v 1 jak i Ves v 5. U 2 (2.19%) pacjentów po przyjęciu 0.1 kU/L za punkt odcięcia nie potwierdzono uczulenia na alergeny główne jadu osy.

Nr pacjenta	Testy skórne z ekstraktem jadu osy	sIgE z ekstraktem jadu osy	sIgE Ves v 1	sIgE Ves v 5
1.	1	1	1	1
2.	1	1	1	1
3.	1	1	1	1
4.	1	1	0	1
5.	1	1	1	1
6.	1	1	0	1
7.	1	0	0	1
8.	1	1	1	0
9.	1	1	1	1
10.	1	1	1	1
11.	1	1	1	1
12.	0	1	0	0
13.	1	0	0	0
14.	1	1	1	1
15.	1	1	1	1
16.	1	1	1	0
17.	1	1	1	1
18.	1	1	0	1
19.	1	0	1	1
20.	1	1	0	1
21.	1	0	1	0
22.	1	1	0	1
23.	1	1	0	0
24.	1	1	1	0
25.	1	1	0	0
26.	1	1	0	1
27.	1	1	1	1
28.	1	1	1	1
29.	1	1	0	1
30.	1	0	0	0
31.	1	1	1	1
32.	1	1	1	0
33.	1	1	1	1
34.	1	0	0	0
35.	1	1	1	1
36.	1	1	1	1
37.	1	1	0	1
38.	1	1	0	1
39.	1	0	0	1

40.	1	1	1	1
41.	1	1	1	1
42.	1	1	0	1
43.	1	1	0	0
44.	1	1	1	0
45.	1	1	1	1
46.	1	1	0	1
47.	1	1	0	1
48.	1	1	0	1
49.	1	1	1	1
50.	1	1	1	1
51.	1	1	1	1
52.	1	1	1	1
53.	1	1	0	1
54.	1	1	1	1
55.	1	1	0	1
56.	1	1	1	1
57.	1	1	0	1
58.	1	1	1	1
59.	1	0	0	1
60.	1	1	1	0
61.	1	1	1	1
62.	1	1	0	1
63.	1	1	0	1
64.	1	1	1	1
65.	1	1	1	1
66.	1	1	1	1
67.	1	0	1	0
68.	1	0	0	0
69.	1	1	0	1
70.	1	1	1	1
71.	1	0	0	1
72.	1	0	0	1
73.	1	1	1	0
74.	1	1	0	1
75.	1	1	0	1
76.	1	1	0	1
77.	1	0	0	0
78.	1	1	1	1
79.	1	0	0	1
80.	1	1	1	1
81.	1	1	0	1
82.	1	1	1	1

83.	1	1	0	1
84.	1	1	1	1
85.	1	1	0	1
86.	1	0	0	0
87.	1	1	0	1
88.	1	1	1	1
89.	1	1	0	1
90.	1	1	0	1
91.	1	1	0	1
92.	1	1	1	1

Rysunek 4.3. Profil uczuleń na ekstrakt i molekuly jadu osy Ves v 1 i Ves v 5 w grupie pacjentów z alergią na jad osy; 1 – występowanie uczulenia, 0 – brak uczulenia

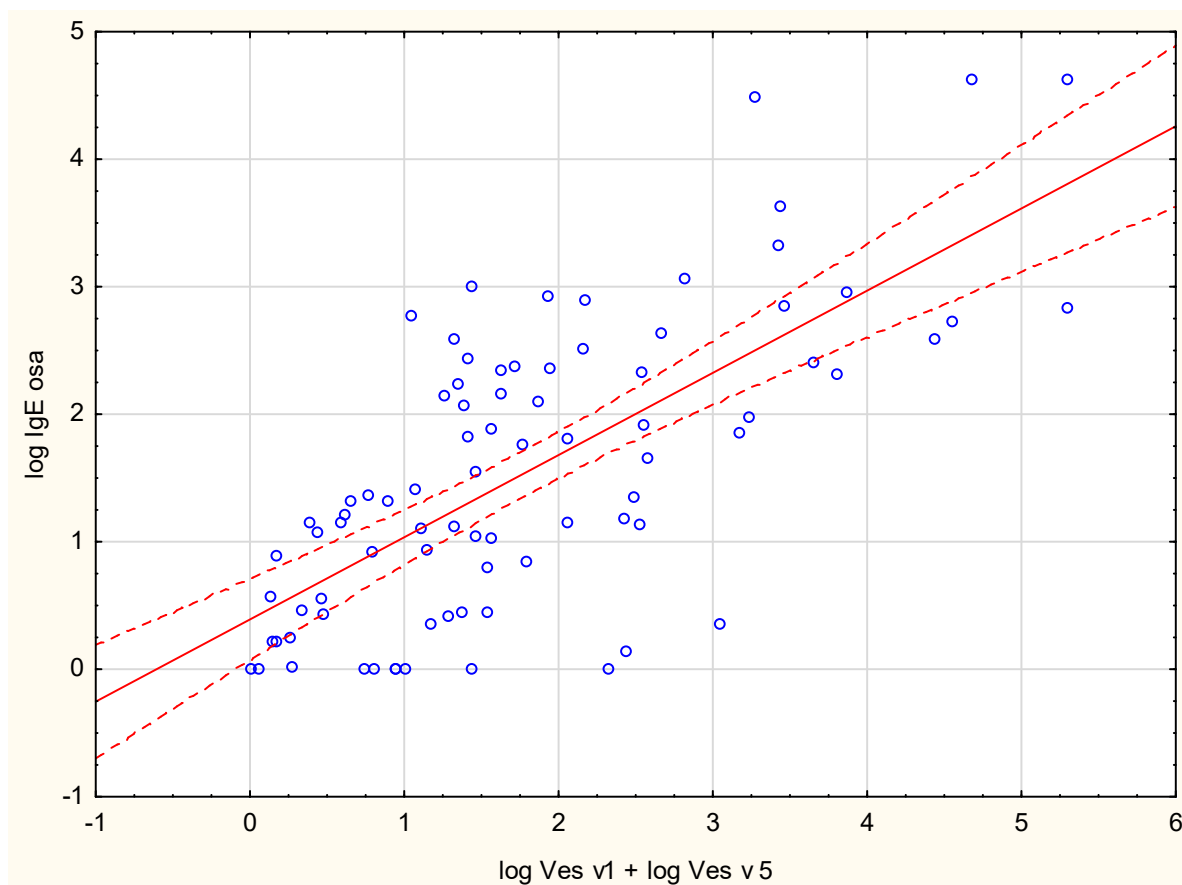
Diagnostyka uczulenia na jad osy przy pomocy testów skórnych i testów serologicznych z ekstraktem jadu oraz testów z serologicznych z molekułami Ves v 1 i Ves v 5 wykazała:

- 89.1 % pacjentów było uczulonych zarówno na ekstrakt jadu jak i jedną z molekuł jadu osy: Ves v1 lub Ves v 5
- 10.99 % pacjentów było uczulonych na ekstrakt jadu, ale nie wykazano uczulenia na żadną z badanych molekuł (przy stężeniu granicznym 0.35 kU/ml)
- 2.19% pacjentów było uczulonych na ekstrakt jadu, ale nie wykazano uczulenia na żadną z badanych molekuł (przy stężeniu granicznym 0.1 kU/ml)

Tabela 4.2. Częstość występowania sIgE w surowicy wobec ekstraktu jadu osy i co najmniej jednej molekuly (Ves v 1 i/lub Ves v 5) jadu osy w grupie pacjentów z alergią na jad osy przy przyjęciu punktu odcięcia wyniku dodatniego 0.35 kU/ml

Jad osy	Ekstrakt (+)	Ekstrakt (-)
Molekuły (+)	72 (79.12%)	9 (9.89%)
Molekuły (-)	4 (4.4%)	6 (6.69%)

W grupie pacjentów z brakiem uczulenia na Ves v 1 i Ves v 5 stwierdzono istotnie statystycznie niższe mediany stężeń IgE całkowitego: Me [Q25-Q75]: 25.9 [10.6-37.8] vs 85.4 [38.6-199.0] p = 0.0007.



Rysunek 4.4. Korelacja między logarytmem stężenia sIgE przeciwko ekstraktowi jadu i logarytmem sumy stężeń sIgE przeciwko molekułom Ves v 1 i Ves v 5.

#### 4.1.2 Zależność pomiędzy uczuleniem na Ves v 1 i Ves v 5, a ciężkością reakcji alergicznej (reakcje z zajęciem i bez zajęcia układu krążenia)

Nie wykazano związku pomiędzy występowaniem reakcji systemowych z zajęciem i bez zajęcia układu krążenia a profilem uczuleń: częstość uczuleń na Ves v 1 i Ves v 5 oraz łącznie Ves v 1 z Ves v 5 nie różniła się pomiędzy grupami SYS IV<sup>o</sup> a SYS I<sup>o</sup>+II<sup>o</sup>+III<sup>o</sup> (tabela 4.3. i rysunek 4.5 i 4.6). Natomiast stężenia sIgE przeciwko Ves v 5, były niższe w grupie pacjentów z zajęciem układu krążenia (SYS IV<sup>o</sup>) niż w pozostałych reakcjach (SYS I<sup>o</sup>+II<sup>o</sup>+III<sup>o</sup>) ( $p=0.048$ ). Skośność rozkładu wynika z faktu iż pojedynczy pacjenci mieli skrajne wartości Ves v 5 (zbliżone do 100) (tabela 4.4.). W grupie pacjentów z reakcją systemową SYS IV<sup>o</sup> wykazano wyższe stężenie tryptazy niż u pozostałych pacjentów (SYS I<sup>o</sup>+II<sup>o</sup>+III<sup>o</sup>) ( $p = 0.02$ ).

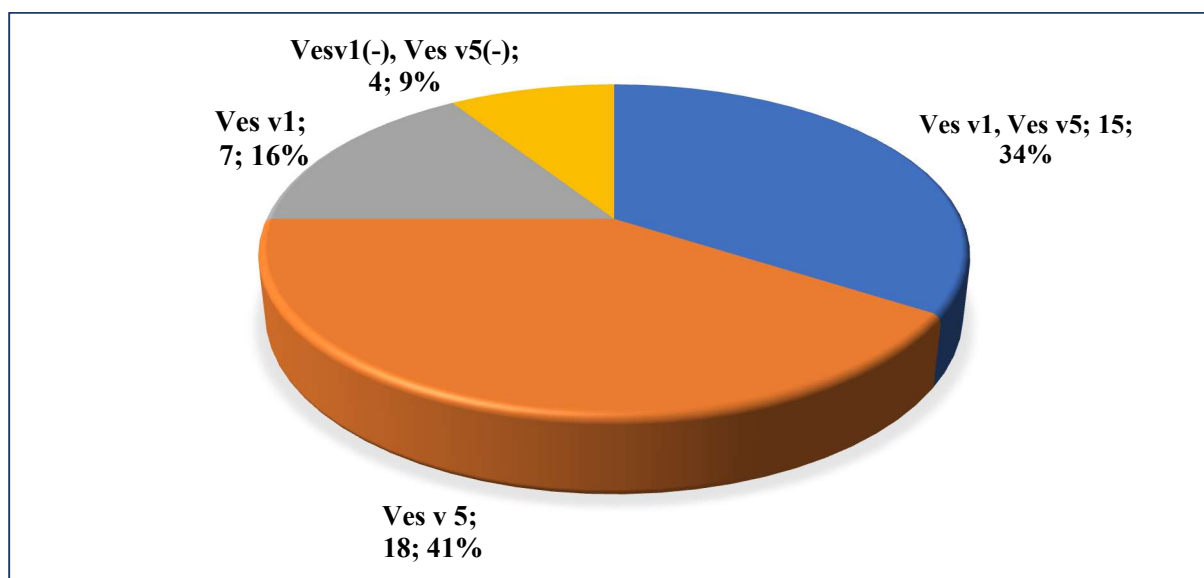


Tabela 4.3. Częstość uczuleń na Ves v 1 i Ves v 5 w grupach pacjentów z reakcjami systemowymi klasy I<sup>o</sup>, II<sup>o</sup>, III<sup>o</sup> oraz IV<sup>o</sup>.

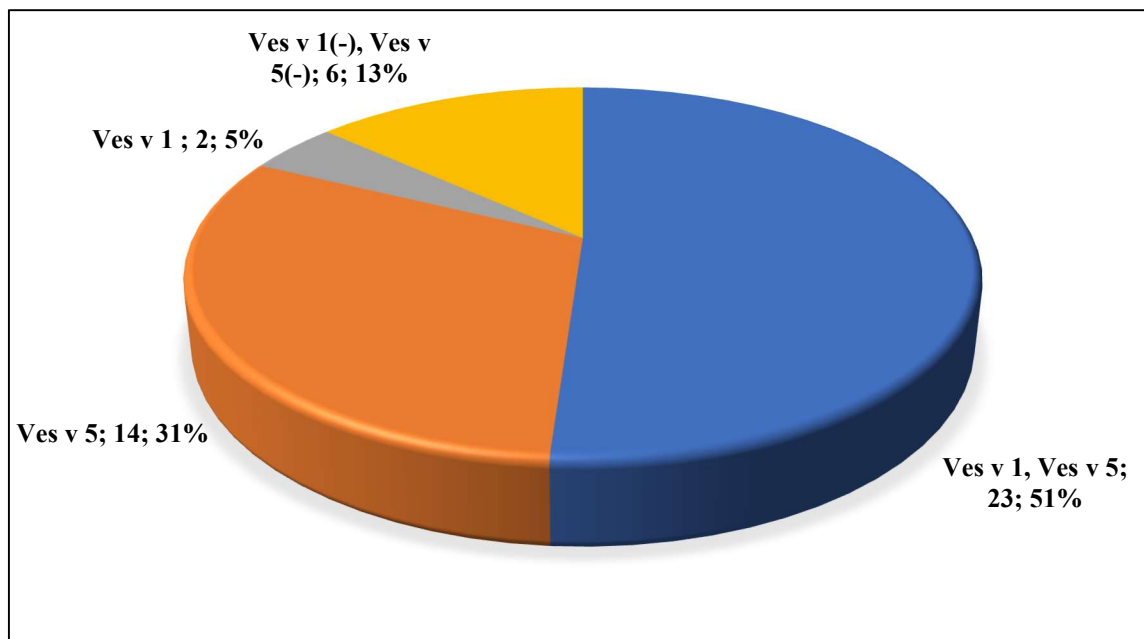
Zmienna	SYS I <sup>o</sup> +II <sup>o</sup> +III <sup>o</sup>	SYS IV <sup>o</sup>	p
sIgE Ves v 1 +	25 (53.19%)	22 (50%)	0.76
sIgE Ves v 5+	38 (80.85%)	33 (75.00%)	0.5
sIgE Ves v 1 +Ves v 5	23 (48.94%)	15 (34.09%)	0.15

Tabela 4.4 Stężenia sIgE przeciwko molekułom Ves v 5, Ves v 1 oraz stężenie tryptazy w grupach pacjentów z alergią na jad osy i reakcjami systemowymi klas: I<sup>o</sup>, II<sup>o</sup>, III<sup>o</sup> i IV<sup>o</sup>.

Zmienna	Grupa chorych z reakcją SYS IV X±SD, Me [Q25-Q75]	Grupa chorych z reakcją SYS III, II, I X±SD, Me [Q25-Q75]	p
sIgE Ves v 5	4.09±5.61	12.25±24.47	0.048
sIgE Ves v 1	0.34 [0.04-1.74]	0.37 [0.03-2.20]	0.85
tryptaza	7.4±8.09	4.9±2.41	0.02



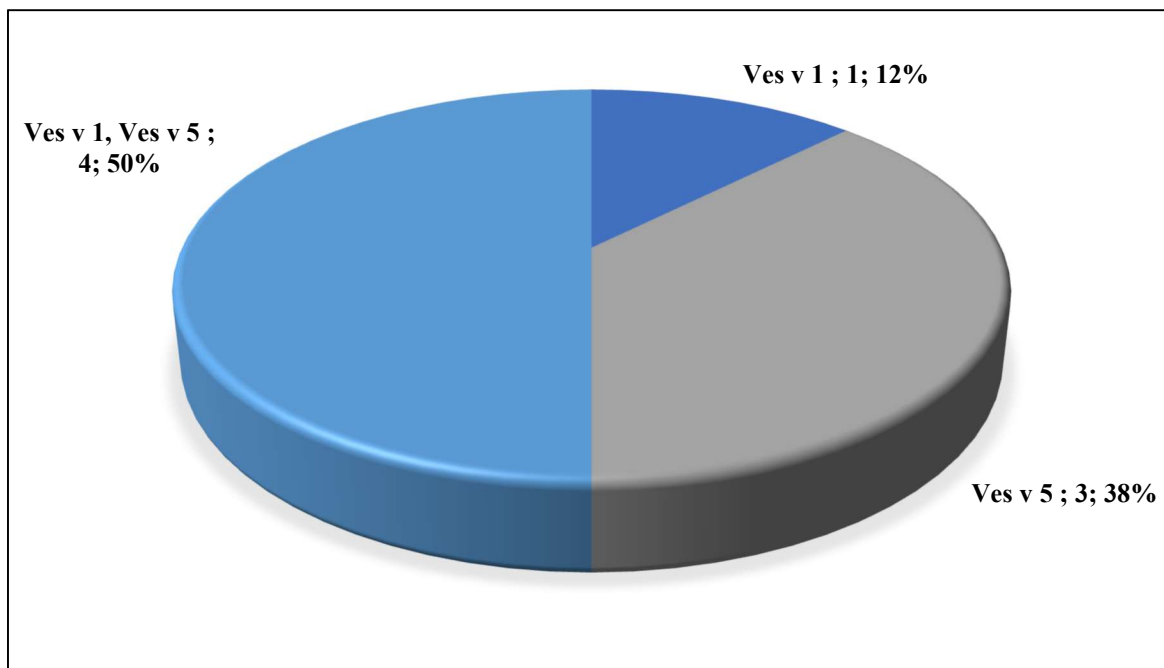
Rysunek 4.5. Częstość uczuleń na alergeny główne jadu osy Ves v 1 i Ves v 5 w grupie pacjentów z alergią na jad osy z zajęciem układu krążenia (SYS IV<sup>o</sup>). (liczba pacjentów; %)



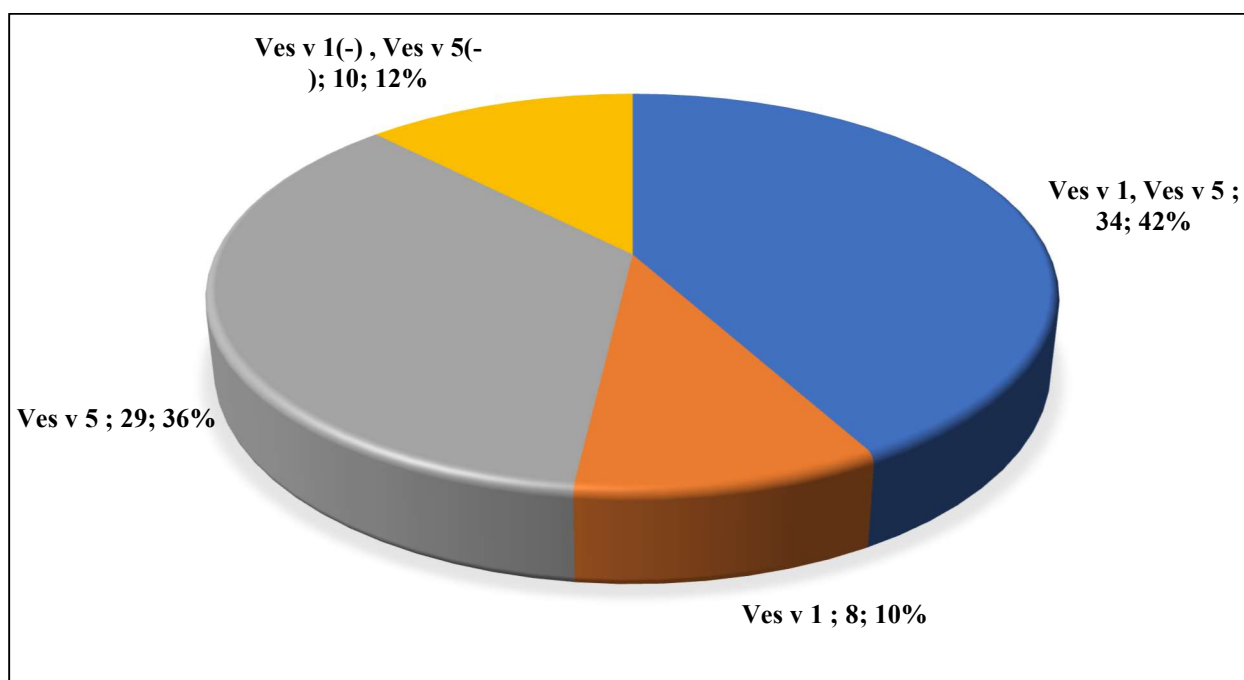
Rysunek 4.6. Częstość uczuleń na alergeny główne jadu osy Ves v 1 i Ves v 5 w grupie pacjentów z alergią na jad osy bez zajęcia układu krążenia (reakcje SYS I, II i III). (liczba pacjentów; %)

#### **4.1.3 Zależność pomiędzy uczuleniem na Ves v 1 i Ves v 5, a niepowodzenia immunoterapii jadem osy**

Niepowodzenie VIT wystąpiło u 6 pacjentów poddanych VIT jadem osy. Nie wykazano różnicy pomiędzy częstością uczuleń i stężeniami sIgE wobec Ves v 1 i Ves v 5 w grupie pacjentów z niepowodzeniem VIT i skutecznym VIT (rysunek 4.7. - 4.8.; tabela 4.5), ani pomiędzy grupą pacjentów z powikłaniami podczas VIT-UR, a grupą niepowikłanych pacjentów podczas VIT-UR (tabela 4.6., rysunek 4.9.). Nie wykazano też różnicy w stężeniach sIgE przeciwko Ves v 5 ani Ves v 1 pomiędzy oboma grupami. Obie grupy nie różniły się między sobą stężeniem tryptazy w surowicy (tabela 4.5.).



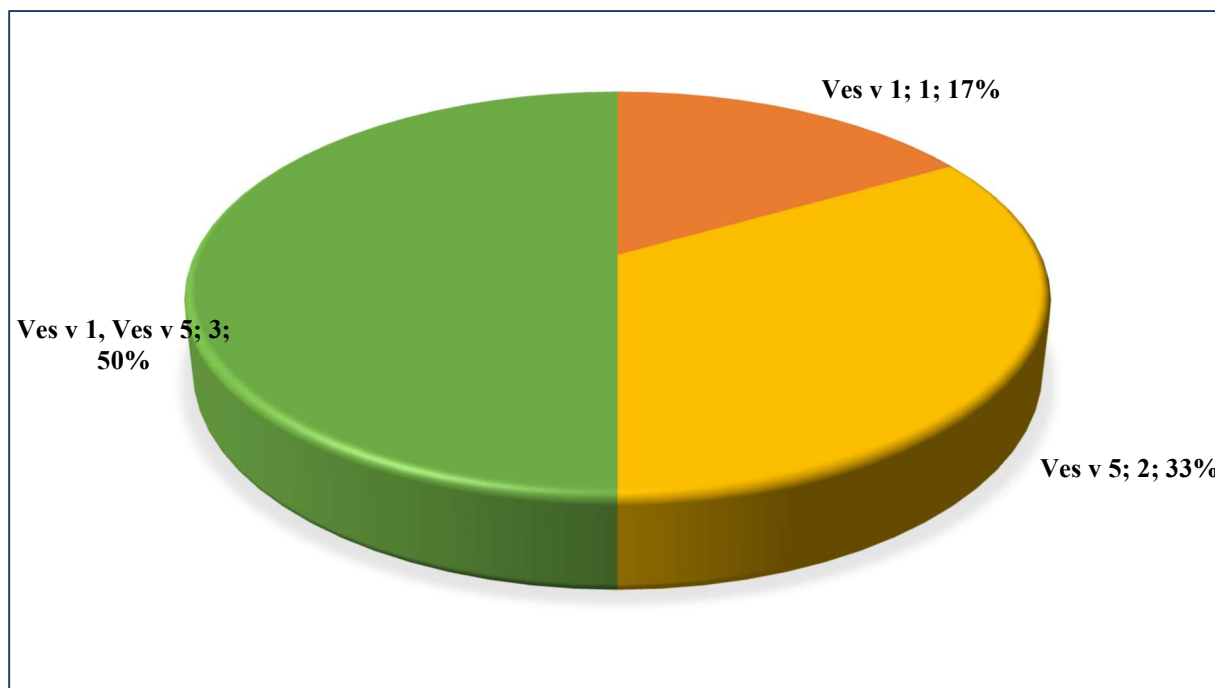
Rysunek 4.7. Częstość uczuleń na alergeny główne jadu osy Ves v 1 i Ves v 5 w grupie pacjentów z alergią na jad osy (grupa A) z niepowodzeniami immunoterapii jadem osy. (liczba pacjentów; %)



Rysunek 4.8. Częstość uczuleń na alergeny główne jadu osy w grupie pacjentów z alergią na jad osy i skuteczną immunoterapią jadem osy. (liczba pacjentów; %)

Tabela 4.5. Mediany stężeń sIgE przeciwko Ves v 1, Ves v 5 oraz stężenie tryptazy w grupie pacjentów z alergią na jad osy (grupa A) z niepowodzeniami VIT vs bez niepowodzeń.

Zmienna Me[Q25-Q75]	Grupa A z niepowodzeniami VIT	Grupa A bez niepowodzeń VIT	p
sIgE Ves v 1	1.16 [0.14-29.90]	0.37 [0.03-1.79]	0.15
sIgE Ves v 5	1.91 [1.38-29.0]	2.7 [0.44-7.03]	0.73
Tryptaza	3.74 [3.06-4.52]	4.3 [2.90-6.64]	0.37



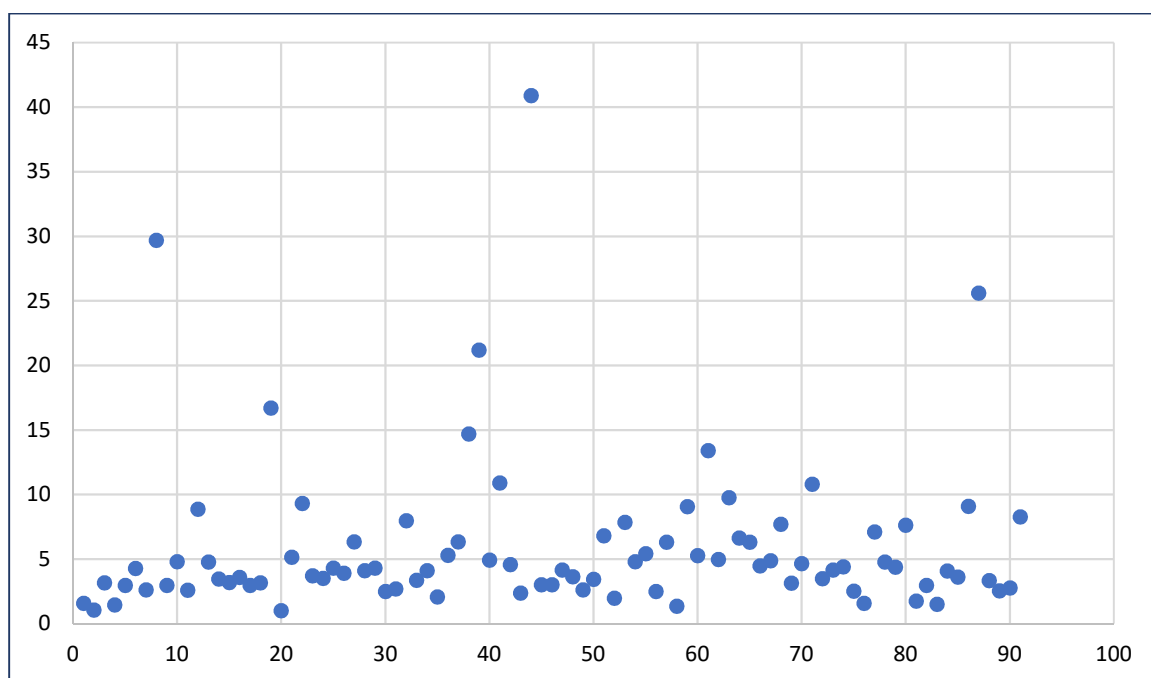
Rysunek 4.9. Częstość uczuleń na alergeny główne jadu osy w grupie pacjentów z alergią na jad osy i z powikłaniami w fazie indukcji VIT-UR. (liczba pacjentów; %)

Tabela 4.6. Mediany stężeń sIgE przeciwko molekułom Ves v 1 i Ves v 5 oraz stężenie tryptazy w grupie pacjentów z alergią na jad osy z powikłaniami w fazie UR vs bez powikłań.

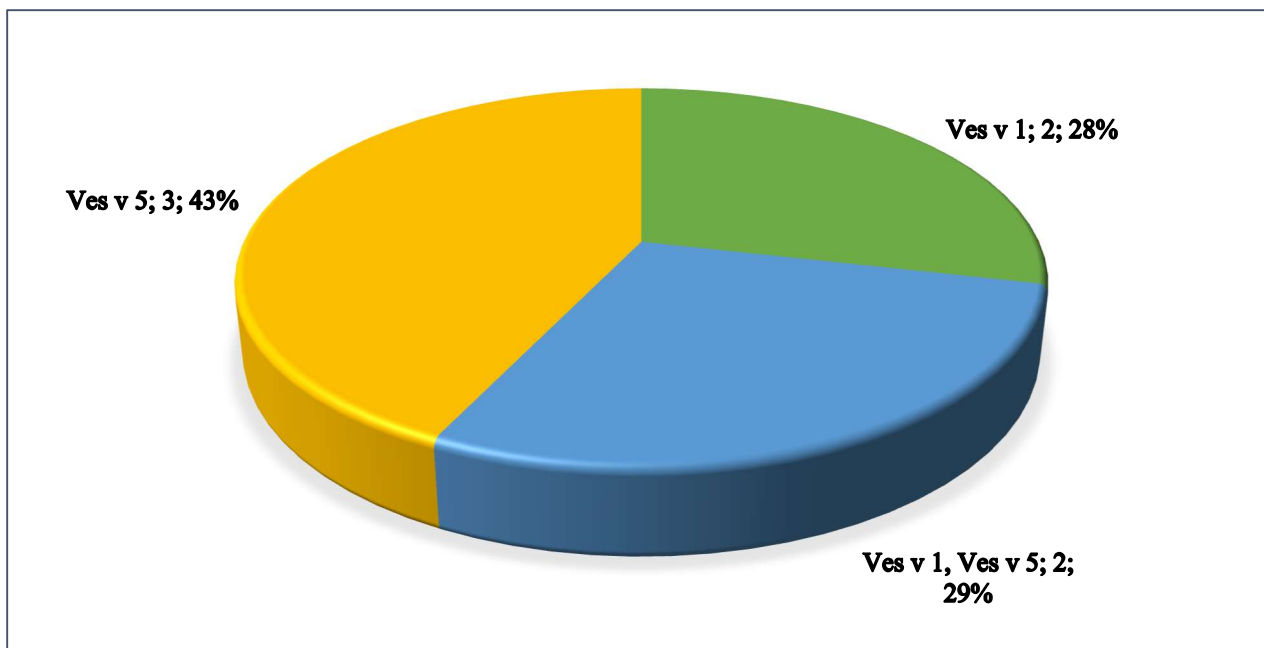
Zmienna Me[Q25-Q75]	Grupa z powikłaniami UR	Grupa bez powikłań UR	p
sIgE Ves v 1	2.35 [0.14-29.90]	0.37 [0.03-1.78]	0.1
sIgE Ves v 5	2.01 [1.38-29.0]	2.62 [0.46-6.82]	0.6
Tryptaza	3.24 [2.97-4.15]	4.31 [2.98-6.82]	0.13

#### 4.1.4 Uczulenie na Ves v 1 i Ves v 5 w grupie pacjentów z alergią na jad i podwyższonym stężeniem tryptazy

Podwyższone stężenie tryptazy ( $> 11.4$  ng/ml) stwierdzono u 7 (7.69%) pacjentów z alergią na jad osy. U wszystkich z nich wykazano uczulenie na co najmniej jeden z alergenów głównych jadu osy Ves v 1 i/lub Ves v 5. U żadnego z nich nie występowały powikłania podczas immunoterapii.



Rysunek 4.10. Stężenie tryptazy w grupie pacjentów z alergią na jad osy (grupa A).



Rysunek 4.11. Częstość uczuleń na alergeny główne jadu osy Ves v 1 i Ves v 5 w grupie chorych z podwyższonym stężeniem tryptazy. (liczba pacjentów; %)

Nie wykazano różnicy pomiędzy stężeniami przeciwciał sIgE przeciwko alergenom głównym jadu osy Ves v 1 i Ves v 5 w grupie pacjentów z podwyższonym a prawidłowym stężeniem tryptazy (tabela 4.7.).

Tabela 4.7. Stężenie przeciwciał sIgE przeciwko Ves v 1 i Ves v 5 u pacjentów z alergią na jad osy z prawidłowym i podwyższonym stężeniem tryptazy.

sIgE w surowicy Me[Q25-Q75]	grupa pacjentów z podwyższonym stężeniem tryptazy	grupa pacjentów z prawidłowym stężeniem tryptazy	p
sIgE Ves v 1	1.55 [0.01-7.4]	0.36 [0.03-1.78]	0.52
sIgE Ves v 5	0.47 [0.3-1.2]	2.82 [0.61-7.49]	0.09

## 4.2 Grupa B pacjenci z alergią na jad pszczoły

Charakterystykę demograficzną tej grupy zawarto w tabeli 4.8. Pacjenci tej grupy nie różnili się p/w cech demograficznych i klinicznych od pacjentów z alergią na jad pszczoły grupy referencyjnej. Wśród pacjentów tej grupy 40 było uczulonych na oba jady: zarówno jad pszczoły jak jad osy.

87.5% pacjentów rozpoznawało owada sprawcę uządlenia. Zgodność wywiadu (typowany owad) z wynikami IDT i/lub sIgE z ekstraktem wykazano u 59 chorych czyli wszystkich, którzy identyfikowali owada. Zgodność wywiadu z wynikami badania sIgE przeciwko molekułom jadu pszczoły wykazano: u 59.38% (38/64) u których oceniano sIgE przeciwko Api m 1 oraz 84.78% (39/ 46) pacjentów, u których oznaczono sIgE przeciwko Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 i Api m 10.

Tabela 4.8. Cechy demograficzne i kliniczne pacjentów z alergią na jad pszczoły w porównaniu z grupą referencyjną

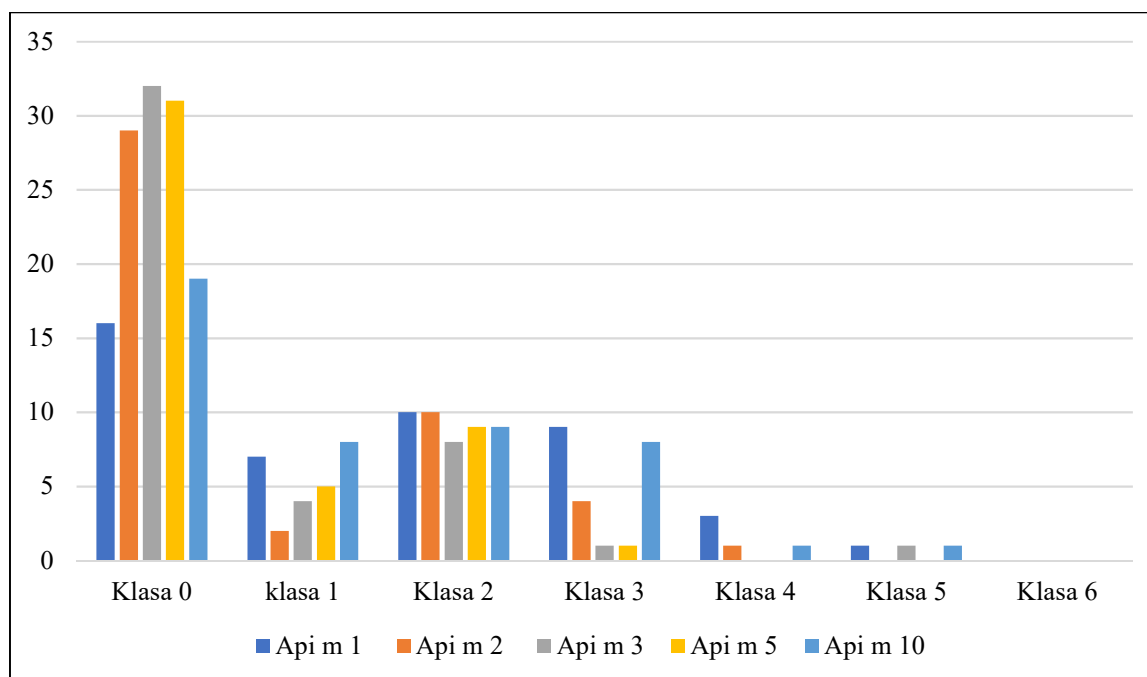
Alergia (N)	Płeć k/m	Wiek X±SD	Klasa ciężkości (średnia)		ssIgE Me [Q25-Q75]
Grupa B N = 64	32/32	43.4±17.2	3.34	SYS I-2 (3.13%)	5.3 [1.5-26.5]
				SYS II- 4 (6.25%)	
				SYS III-28 (43.75%)	
				SYS IV-30 (46.88%)	
Grupa B vs wszyscy pa- cjenci z aler- gią na jad pszczoły N = 232	111/121	40.3±16.55	3.34	SYS I-3 (0.6%)	5.53 [1.6-18.6]
				SYS II- 16 (6.9%)	
				SYS III-129 (55.60%)	
				SYS IV-85 (36.64%)	
p =	p = 0.73	p = 0.19	p = 0.31		p = 0.92

#### 4.2.1 Analiza uczuleń na ekstrakt alergenowy i molekuly alergenowe jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5 ,10

U 64 pacjentów z alergią na jad pszczoły wykonano oznaczenie sIgE przeciwko Api m 1, a u 46 dodatkowo przeciwko panelowi molekuł Api m 2, 3, 5 i 10. Najczęściej występowało uczulenie na molekułę Api m 1, wykazywało je u 62.5% badanych. Uczulenie na co najmniej jedną molekułę badanego panelu stwierdzono u 82.61% (38/46) pacjentów, w tym uczulonych na Api m 10 było 58.7%, na Api m 2 36.96%, na, na Api m 5 32.61%, a na Api m 3 30.43%.

U 17.39% (8/46) badanych nie wykazano uczuleń na żadną z badanych molekuł. Przesunięcie punktu odcięcia wyniku dodatniego do 0.1 kUA/l potwierdzało

uczulenie u dodatkowych 3 pacjentów: 3 na Api m 1, a u jednego z tych pacjentów również na Api m 10.



Rysunek 4.12. Częstość występowania klas (0-5) stężeń ssIgE przeciwko Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 i Api m 10. w grupie chorych z alergią na jad pszczoły.

Indywidualne profile uczuleń u uczulonych na jad pszczoły przedstawiono na rysunku 4.13. i 4.14.

Nr pacjenta	IDT pszczoła	sIgE pszczoła	Api m 1
1.	1	1	1
2.	1	0	0
3.	0	1	0
4.	1	1	0
5.	1	1	1
6.	1	0	0
7.	1	1	1
8.	1	1	0
9.	1	1	1
10.	1	0	0
11.	1	1	1
12.	0	1	1
13.	1	1	0
14.	1	1	1
15.	1	1	1



16.	1	1	1
17.	1	0	0
18.	1	0	1

Rysunek 4.13. Profil uczuleń na molekuly jadu pszczoły Api m 1, w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły (N=18, w grupie tej oznaczano jedynie sIgE-Api m 1); 1 – występowanie uczulenia, 0 – brak uczulenia

Nr pacjenta	sIgE pszczoła	Api m 1	Api m 10	Api m 2	Api m 3	Api m 5
1.	1	1	0	0	1	1
2.	1	0	1	0	1	0
3.	1	1	1	0	0	1
4.	1	0	1	1	0	0
5.	1	0	1	1	0	0
6.	0	0	0	0	0	0
7.	1	0	0	0	0	0
8.	1	0	0	0	0	0
9.	0	1	0	1	0	1
10.	1	1	1	0	0	1
11.	1	1	1	0	0	1
12.	1	1	1	0	0	0
13.	1	1	1	1	1	1
14.	1	1	1	1	0	1
15.	1	1	1	1	1	0
16.	1	0	1	1	1	0
17.	1	1	1	1	1	0
18.	1	1	0	0	0	0
19.	0	0	0	0	0	0
20.	1	1	0	0	0	1
21.	1	1	0	0	0	0
22.	1	1	1	1	1	0
23.	1	1	1	1	1	0
24.	1	1	1	0	0	1
25.	1	1	1	0	1	1
26.	1	1	0	1	0	0
27.	1	1	1	1	1	1
28.	1	1	0	0	0	0
29.	1	1	1	0	0	0
30.	1	1	1	1	0	1
31.	1	0	0	1	0	0
32.	1	0	1	0	0	0
33.	1	0	0	0	0	0

34.	0	1	1	0	0	1
35.	1	1	0	1	0	0
36.	1	1	0	0	1	0
37.	1	1	1	1	1	1
38.	1	1	1	0	1	0
39.	1	0	1	0	0	0
40.	0	0	0	0	0	0
41.	1	1	1	0	0	0
42.	1	1	1	1	1	0
43.	1	0	1	0	0	1
44.	1	1	0	0	0	0
45.	1	0	0	0	0	0
46.	0	0	0	0	0	0

Rysunek 4.14. Profil uczuleń na molekuly jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5 i 10 w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły (N=46), 1 – występowanie uczulenia, 0 – brak uczulenia

Diagnostyka uczulenia na jad pszczoły przy pomocy testów skórnych i testów serologicznych z ekstraktem jadu oraz testów z serologicznych z molekułami Api m 1, 2, 3, 5 i 10 jadu pszczoły wykazała:

- 62.5% badanych wykazało zgodność wyników uczuleń oznaczanych przy pomocy IDT lub sIgE z ekstraktem i wynikiem oznaczeń sIgE przeciwko Api m 1, a 82.61% (38/46) przeciwko co najmniej jednej molekułce alergenowej Api m 2, 3, 5 lub 10.
- 17.39% badanych (8/46) wykazało uczulenie na ekstrakt jadu, podczas gdy nie wykazano uczulenia na żadną z oznaczanych molekuł.
- 4.35% badanych wykazało obecność uczulenia przeciwko co najmniej jednej z badanych molekuł, ale nie wykazano uczulenia na ekstrakt jadu.

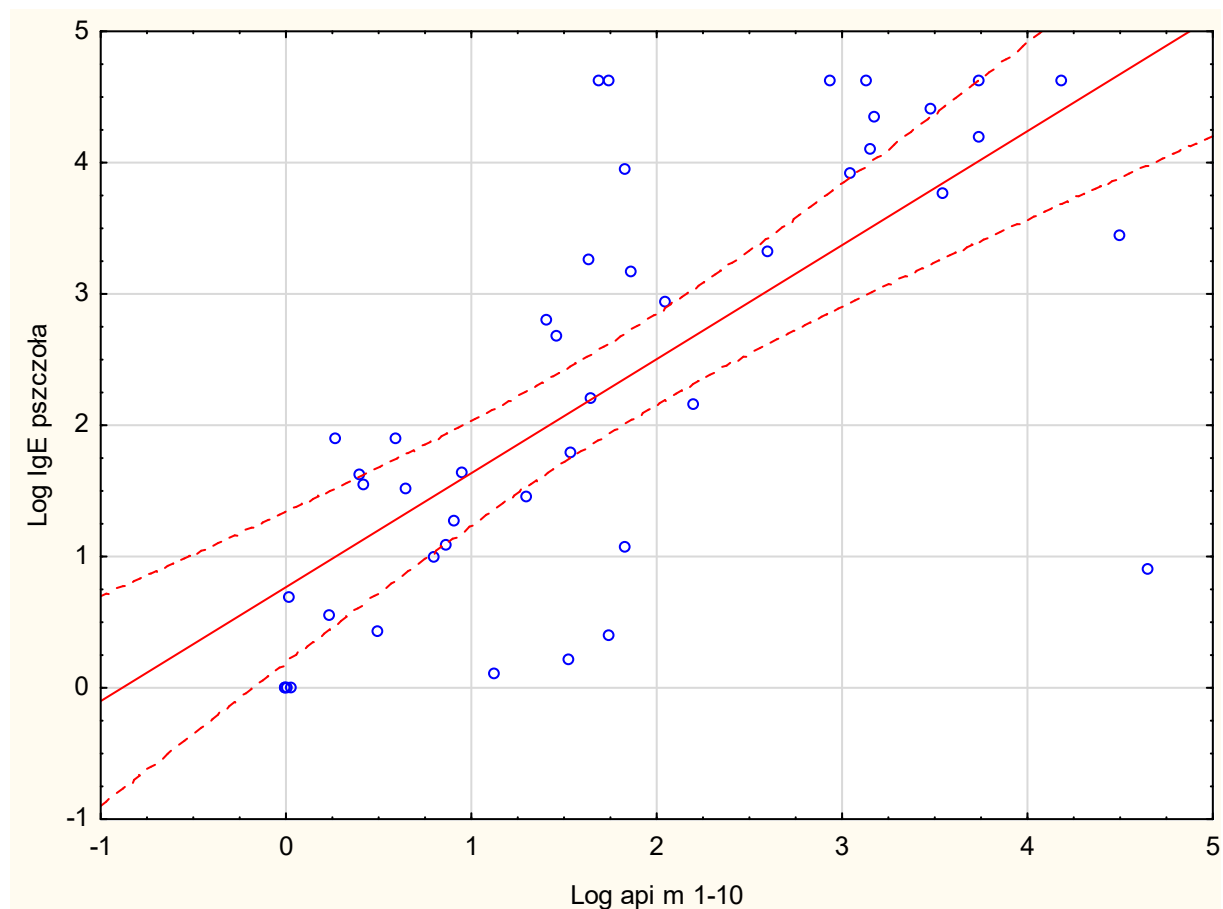
Obserwowano wyraźny trend w kierunku niższych wartości median stężeń cIgE w grupie pacjentów z brakiem uczulenia na wszystkie badane komponenty (38.6 [18.4- 65.4] vs 83.55 [33.0-204.0] p = 0.09).

Nie wykazano różnicy statystycznej pomiędzy medianami stężeń tryptazy w grupie chorych z brakiem uczulenia na wszystkie badane komponenty (5.7 [4.7-

11.95] vs 4.85 [3.8-7.9] p=0.27) a pacjentami z przeciwciałami IgE przeciwko co najmniej jednej z nich.

Tabela 4.9 Częstość występowania sIgE w surowicy wobec ekstraktu jadu pszczoły i co najmniej jednej molekule (Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, Api m 10) jadu pszczoły w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły.

Jad pszczoły	Ekstrakt (+)	Ekstrakt (-)
Molekuly (+)	36 (78.26%)	2 (4.35%)
Molekuly (-)	4 (8.7%)	4 (8.7%)



Rysunek 4.15. Korelacja między logarytmem stężenia sIgE przeciwko ekstraktowi jadu i logarytmem sumy stężeń sIgE przeciwko molekułom Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, Api m 10.

Wykazano korelację pomiędzy stężeniami sIgE przeciwko Api m 1 i Api m 3, Api m 1 i Api m 5, a także pomiędzy Api m 10 i Api m 3 oraz Api m 10 i Api m 5, a także Api m 1 i Api m 10, Api m 3 i Api m 5 oraz Api m 2 i Api m 1, 10, 3, 5 (tabela 4.10).

Tabela 4.10. Korelacja pomiędzy stężeniami przeciwciał sIgE przeciwko molekułom alergenowym jadu pszczoły: Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 i Api m 10 w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły.

Para zmiennych sIgE	R Spearman	p
Api m 1 & Api m 2	0.4	< 0.005
Api m 1 & Api m 3	0.65	< 0.00001
Api m 1 & Api m 5	0.47	< 0.001
Api m 1 & Api m 10	0.46	< 0.01
Api m 2 & Api m 3	0.4	< 0.01
Api m 2 & Api m 5	0.35	< 0.02
Api m 2 & Api m 10	0.47	< 0.0005
Api m 3 & Api m 5	0.48	< 0.001
Api m 10 & Api m 3	0.63	< 0.00001
Api m 10 & Api m 5	0.49	< 0.001

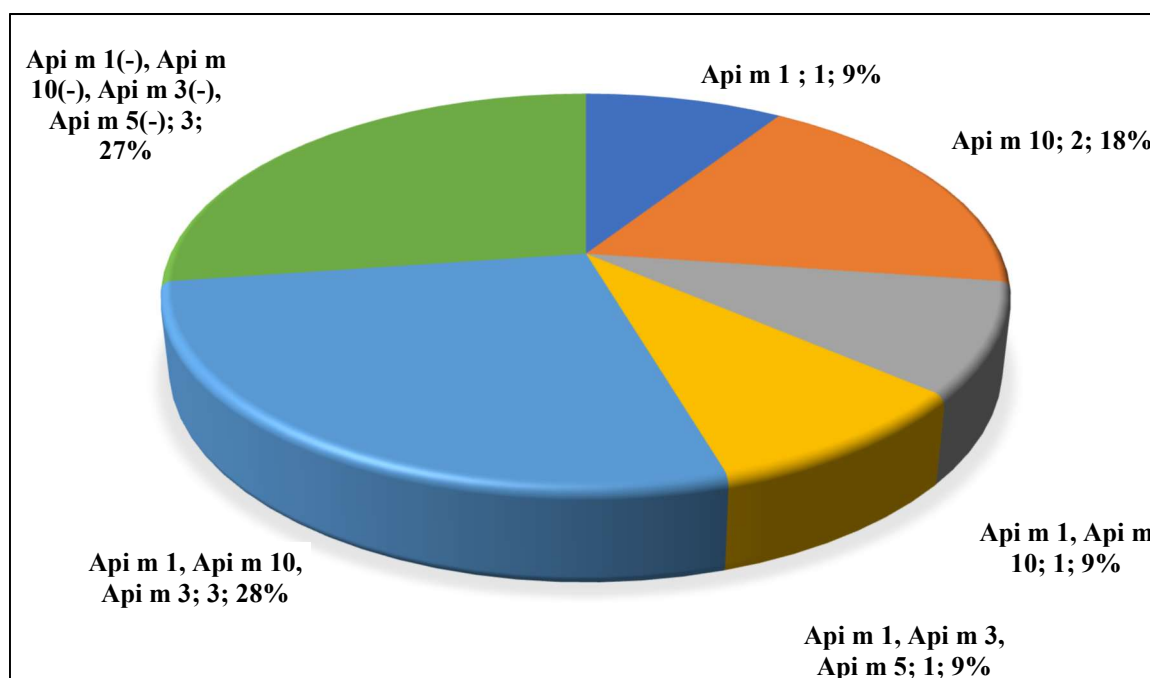
#### **4.2.2 Zależność pomiędzy uczuleniem na molekuly Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, Api m 10, a ciężkością reakcji alergicznej (reakcje z zajęciem i bez zajęcia układu krążenia)**

Pacjenci z reakcją systemową SYS IV<sup>o</sup> mieli wyższe mediany stężeń przeciwciał sIgE przeciwko molekułom Api m 5 (Me[Q25-Q75]: 0,50 [0,01-1,24] vs 0,04 [0,0-0,12], p=0,03) niż pacjenci z reakcjami bez zajęcia układu krążenia. Nie wykazano związku pomiędzy ciężkością reakcji systemowej z zajęciem układu krążenia (SYS IV<sup>o</sup>), a stężeniami przeciwciał przeciwko pozostałym badanym molekułom: Api m 1, Api m 2, Api m 3 ani Api m 10 (tabela 4.11.).

Pacjenci z reakcjami SYS IV<sup>o</sup> mieli również wyższe stężenia surowiczej tryptazy X±SD (8.7±5.0 vs 5.2±3.0, p=0.007) w porównaniu z pacjentami doświadczającymi łagodniejszych stopni ciężkości reakcji (tabela 4.11).

Tabela 4.11. Stężenia przeciwciał sIgE przeciwko molekułom alergenowym jadu pszczoły oraz stężenie tryptazy w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły i reakcją SYS IV<sup>o</sup> oraz SYS I<sup>o</sup>, II<sup>o</sup> lub III<sup>o</sup>.

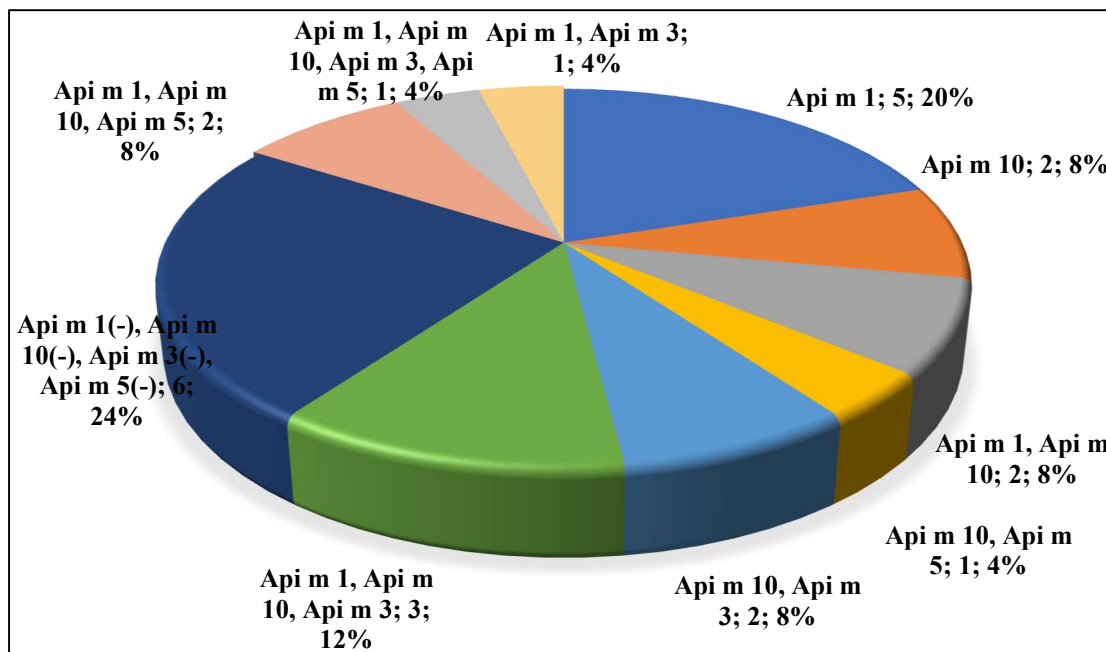
Zmienna Me [Q25-Q75]; X±SD	Grupa chorych z reakcją SYS IV <sup>o</sup> N=21	Grupa chorych z reakcją SYS I <sup>o</sup> , II <sup>o</sup> lub III <sup>o</sup> N=25	p
sIgE Api m 1	1.66 [0.38-4.13]	0.43 [0.12-3.67]	0.44
sIgE Api m 2	0.13 [0.02-1.8]	0.1 [0.01-0.94]	0.83
sIgE Api m 3	0.2 [0.001-1.11]	0.15 [0.01-0.47]	0.62
sIgE Api m 5	0.5 [0.01-1.24]	0.04 [0.0-0.12]	0.03
sIgE Api m 10	1.01 [0.11-3.71]	0.5 [0.06-1.4]	0.28
tryptaza	8.7 ±5.0	5.2 ±3.0	0.007



Rysunek 4.16. Częstość uczuleń na główne molekuły alergenowe Api m 1, 3, 5, 10 jadu pszczoły u pacjentów z alergią na jad pszczoły i reakcją SYS IV<sup>o</sup>. (liczba pacjentów; %)

Tabela 4.12. Profil uczuleń na molekuly alergenowe jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5 i 10 u pacjentów z alergią na jad pszczoły i reakcją SYS IV.

Testy skórne z jadem pszczoły	sIgE z ekstraktem jadu pszczoły	sIgE Api m 1	sIgE Api m 2	sIgE Api m 3	sIgE Api m 5	sIgE Api m 10
1	1	1	0	1	1	0
1	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	1	0
1	1	1	0	0	1	1
1	1	1	0	0	1	1
1	1	1	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1
1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	0	0	1	0
1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	0	0	1	1
1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	0	0	0	1
1	1	1	0	1	0	1
1	1	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	0	1
1	1	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0



Rysunek 4.17. Częstość uczuleń na molekuly alergenowe jadu pszczoły Api m 1, 3, i 10 u pacjentów z alergią na jad pszczoły i reakcją SYS I°+SYS II°+SYS III°. (liczba pacjentów; %)

#### 4.2.3 Zależność pomiędzy uczuleniem na molekuly Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, Api m 10, a niepowodzenia immunoterapii jadem osy

##### 4.2.3.1. Powikłania VIT-UR

Podczas VIT-UR w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły poddanych immunoterapii jadem pszczoły wystąpiło 13 powikłań.

W grupie chorych z powikłaniami w czasie indukcji immunoterapii wykazano, że stężenie przeciwciał przeciwko Api m 1 było wyższe niż u pacjentów bez powikłań w tej fazie leczenia. Stężenia sIgE przeciwko Api m 1 wynosiły odpowiednio: Me [Q25-Q75]: 3.9 [0.93-9.43] vs 0.43 [0.07-2.86] p = 0.009.

W grupie pacjentów z powikłaniami podczas fazy indukcji immunoterapii jadem pszczoły, w której dodatkowo oznaczano przeciwciała przeciwko molekułom Api m 2, 3, 5 i 10 wykazano wyższe stężenia przeciwciał sIgE przeciwko Api m 5:  $X \pm SD$  (1.65±2.8 vs 0.39± 0.72; p=0.02) oraz trend w kierunku wyższych median stężeń przeciwciał IgE przeciwko Api m 10: Me [Q25-Q75](1.54 [0.76-4.61] vs

0.45 [0.04-1.74]; p=0.06) niż u pacjentów bez powikłań w tej fazie leczenia. Nie wykazano różnic stężeń Api m 2 i Api m 3 w grupie pacjentów z powikłaniami w trakcie UR i bez powikłań w tej fazie VIT (tabela 4.13).

Pacjenci z alergią na jad pszczoły i powikłaniami podczas VIT-UR mieli wyższe stężenie tryptazy  $8.51 \pm 5.62$  vs  $5.55 \pm 3.42$  p=0.019 niż pacjenci z niepowikłanym VIT-UR.

Tabela 4.13. Stężenia przeciwciał sIgE przeciwko molekułom alergenowym jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5, 10 w grupie pacjentów z powikłaniami oraz bez powikłań w fazie indukcji immunoterapii jadem pszczoły (VIT-UR).

Zmienna	Grupa chorych z powikłaniami podczas VIT-UR jadem pszczoły Me [Q25-Q75] X±SD	Grupa chorych bez powikłań podczas VIT-UR jadem pszczoły Me [Q25-Q75] X±SD	p
sIgE Api m 1	3.9 [0.93-9.43]	0.43 [0.07-2.86]	0.009
sIgE Api m 2	0.3 [0.03-2.74]	0.08 [0.01-1.94]	0.24
sIgE Api m 3	0.6 [0.2-1.52]	0.08 [0.001-0.37]	0.09
sIgE Api m 5	1.65±2.8	0.39± 0.72	0.02
sIgE Api m 10	1.54 [0.76-4.61]	0.45 [0.04-1.74]	0.06

Tabela 4.14. Profil uczuleń na molekuly alergenowe jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5, 10 u pacjentów z powikłaniami w trakcie VIT-UR jadem pszczoły. 1-wynik dodatni, 0 wynik ujemny.

Testy skórne z jadem pszczoły	sIgE z ekstraktem jadu pszczoły	sIgE Api m 1	sIgE Api m 2	sIgE Api m 3	sIgE Api m 5	sIgE Api m 10
1	1	1	0	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1
1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	0	1	0	1
1	1	0	0	0	0	0



#### 4.2.3.2 Powikłanie podczas całego okresu VIT

U pacjentów z powikłaniami podczas całego przebiegu immunoterapii stwierdzono trend w kierunku wyższych wartości Api m 5 w porównaniu z grupą bez powikłań, odpowiednio: Me[Q25-Q75] 0.41 [0.01-1.12] vs 0.04 [0-0.50] p=0.07 (tabela 4.15.). Ponadto obie grupy różniły się rozkładem klas przeciwciał sIgE przeciwko Api m5 (tabela 4.16.).

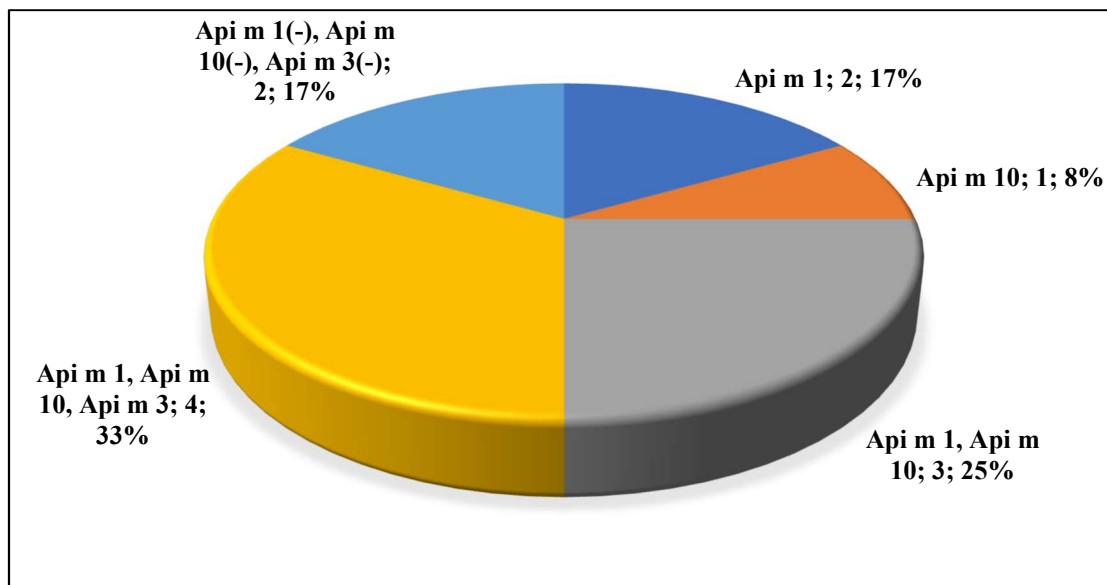
Nie wykazano różnic między stężeniem sIgE przeciwko Api m 1, 2, 3 ani Api m 10 pomiędzy grupą z powikłaniami oraz grupą bez powikłań w trakcie VIT.

Tabela 4.15. Stężenie przeciwciał sIgE przeciwko molekułom alergenowym jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5, 10 w grupie pacjentów z powikłaniami i bez powikłań podczas immunoterapii jadem pszczoły (VIT).

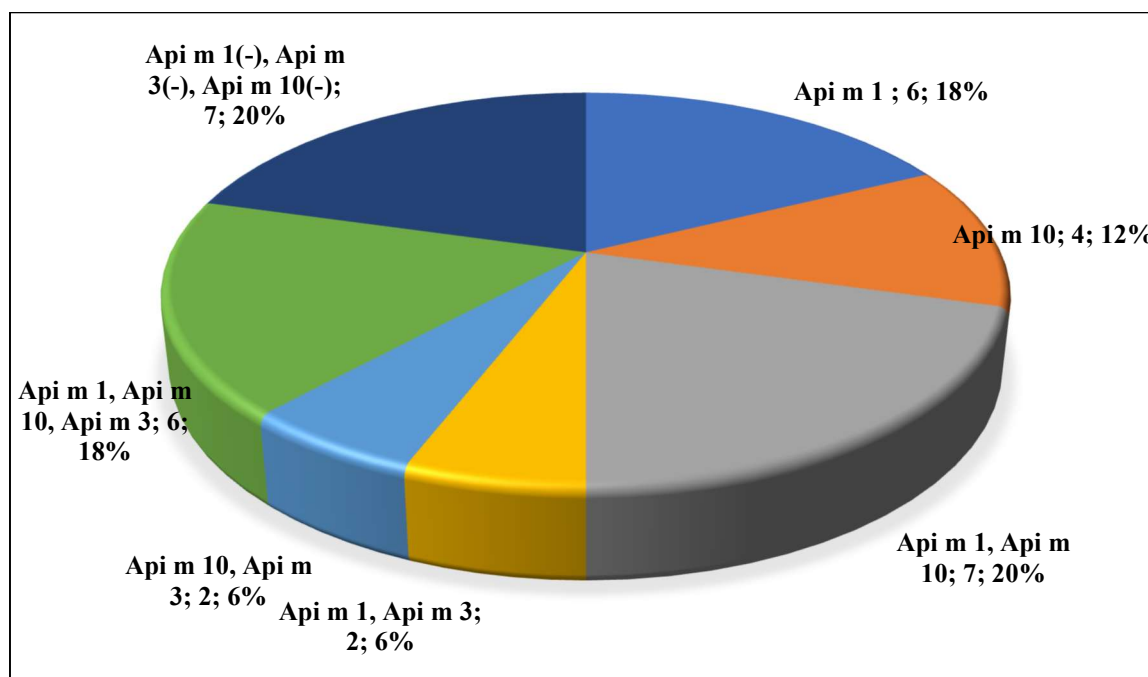
Zmienna	Grupa chorych bez powikłań podczas VIT jadem pszczoły sIgE Me[Q25-Q75]; X±SD	Grupa chorych z powikłaniami podczas VIT jadem pszczoły sIgE Me [Q25-Q75]; X±SD	p
sIgE Api m 1	0.64 [0.12-3.67]	2.25 [0.32-6.02]	0.42
sIgE Api m 2	0.09 [0.01-0.94]	0.14 [0.01-1.63]	0.94
sIgE Api m 3	0.15 [0.01-0.47]	0.14 [0.01-0.86]	0.89
sIgE Api m 5	0.04 [0.00-0.50]	0.41 [0.01-1.12]	0.07
sIgE Api m 10	0.52 [0.06-1.74]	1.11 [0.07-3.29]	0.55
tryptaza	5.35±3.23	7.68±5.12	0.03

Tabela 4.16. Rozkład klas stężeń sIgE przeciwko Api m 5 w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły z powikłaniami i bez powikłań podczas immunoterapii jadem pszczoły.

Klasa Api m 5	Pacjenci z powikłaniami podczas VIT	Pacjenci bez powikłań podczas VIT	p
0	6 (50%)	25 (73.5%)	0.02
1	0	5 (14.7%)	
2	5 (41.6%)	4 (11.7)	
3	1 (8.33%)	0	



Rysunek 4.18. Częstość uczuleń na główne molekuly alergenowe jadu pszczoły: Api m 1, 3, 10 u pacjentów z alergią na jad pszczoły i powikłaniami w trakcie VIT. (liczba pacjentów, %)

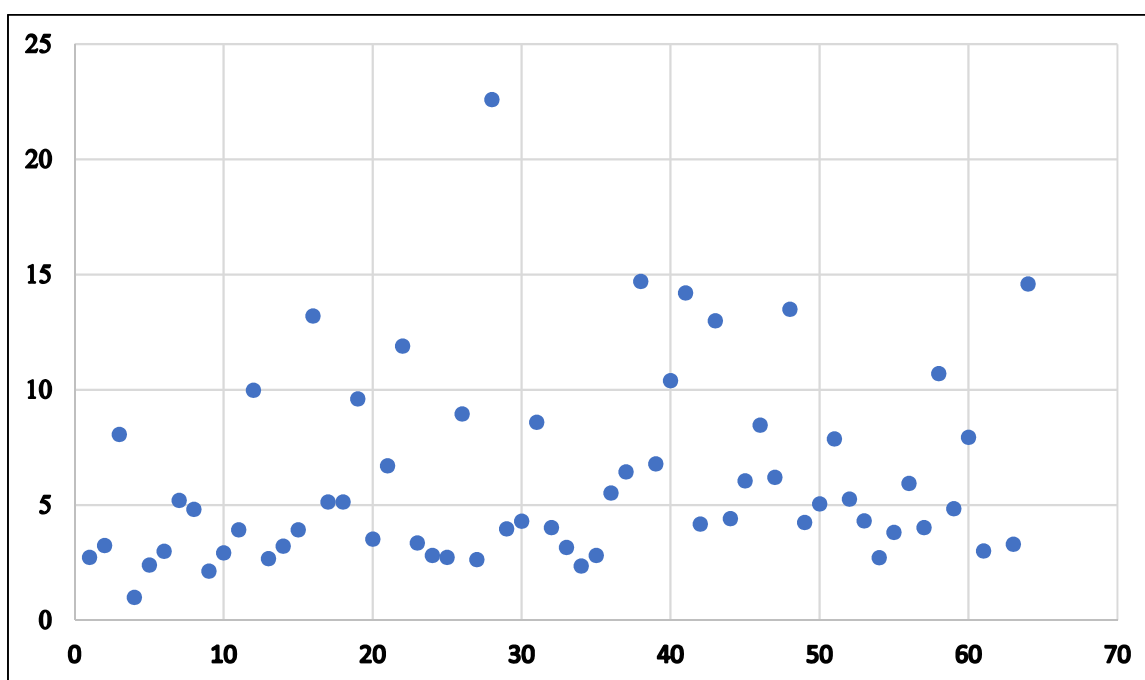


Rysunek 4.19. Profil uczuleń na główne molekuly alergenowe jadu pszczoły: Api m 1, 3, 10 u pacjentów z alergią na jad pszczoły bez powikłań w trakcie VIT. (liczba pacjentów, %)

U pacjentów z powikłaniami podczas całego okresu VIT stwierdzono również istotnie statystycznie wyższe stężenie tryptazy, w porównaniu do grupy chorych bez tego powikłania:  $7.68 \pm 5.12$  vs  $5.35 \pm 3.23$ ,  $p=0.03$  (tabela 4.15).

#### 4.2.4 Uczulenie na molekuly alergenowe jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5 i 10 w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły i z podwyższonym stężeniem tryptazy

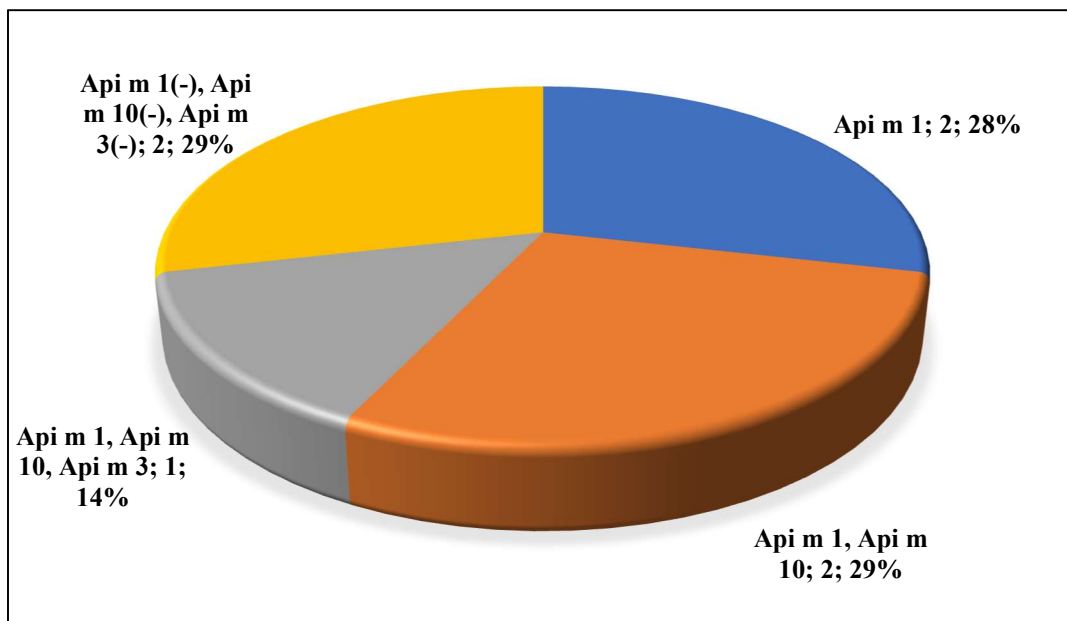
Średnie stężenie sIgE przeciwko Api m 10 było niższe u pacjentów z alergią na jad pszczoły i podwyższonym stężeniem sBT niż u pacjentów z alergią na jad pszczoły i prawidłowymi wartościami sBT i wynosiło odpowiednio (średnia±SD):  $0.4\pm 0.58$  i  $4.97\pm 15.44$ .(tabela 4.17).



Rysunek 4.20. Stężenie tryptazy w grupie pacjentów z alergią na jad pszczoły (n=64).

Tabela 4.17. Stężenie przeciwciał sIgE przeciwko molekułom alergenowym jadu pszczoły Api m 1, 2, 3, 5, 10 w grupie pacjentów ze stężeniem tryptazy powyżej 11.4 ng/ml oraz w grupie pacjentów z prawidłowym stężeniem tryptazy.

Zmienna	Pacjenci z alergią na jad pszczoły i podwyższonym stężeniem sBT sIgE X±SD	Pacjenci z alergią na jad pszczoły i prawidłową tryptazą sIgE X±SD	p
sIgE Api m 1	9.98±24.23	4.25±7.57	0.65
sIgE Api m 2	0.97±1.74	1.56±4.08	0.84
sIgE Api m 3	0.25±0.39	2.03±8.94	0.58
sIgE Api m 5	0.50±0.80	0.59±1.38	0.84
sIgE Api m 10	0.4±0.58	4.97±15.44	0.048



Rysunek 4.21. Profil uczuleń na alergeny główne jadu pszczoły Api m 1, Api m 3, Api m 10 u pacjentów z alergią na jad pszczoły i podwyższonym stężeniem tryptazy. (liczba pacjentów, %)

Tabela 4.18. Profil uczuleń na alergeny jadu pszczoły u pacjentów z alergią na jad pszczoły i podwyższonym stężeniem tryptazy w surowicy. 1-wynik dodatni, 0 wynik ujemny.

Testy skórne z jadem pszczoły	sIgE pszczoła	sIgE Api m 1	sIgE Api m 2	sIgE Api m 3	sIgE Api m 5	sIgE Api m 10
1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	1	1
1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	0	1	1
1	1	1	1	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0

#### 4.2.5 Ocena stężeń sIgE przeciwko alergenom głównym w trakcie terapii jadem pszczoły

U 15 pacjentów z alergią na jad pszczoły oznaczono wszystkie komponenty jadu pszczoły przed rozpoczęciem immunoterapii oraz po co najmniej 6 miesiącach trwania VIT. Stwierdzono trend do zmniejszania się stężeń Api m 1 po 6 miesiącach VIT ( $p = 0.06$ ). Nie wykazano różnic statystycznych stężeń pozostałych alergenów jadu pszczoły (tabela 4.19).

Tabela 4.19. Zmiana stężeń sIgE przeciwko alergenom jadu pszczoły w trakcie immunoterapii jadem pszczoły pacjentów z alergią na jad pszczoły.

Zmienna	stężenie sIgE przed VIT (Me) [Q25-Q75]	stężenie sIgE > 6 miesięcy VIT (Me) [Q25-Q75]	p
Api m 1	2.56 [0.34-9.19]	1.6 [0.38-10.7]	0.06
Api m 2	0.08 [0.01-1.19]	0.19 [0.02-2.26]	0.79
Api m 3	0.16 [0.01-0.6]	0.1 [0.0-0.47]	0.55
Api m 5	0.01 [0.00-0.7]	0.32 [0.0-0.47]	0.95
Api m 10	0.69 [0.02-3.71]	0.75 [0.04-1.89]	0.42

### 4.3 Grupa C

U 12 osób immunoterapię przeprowadzono jadem osy i pszczoły. Wszyscy pacjenci zostali zakwalifikowani do VIT dwoma jadami z powodu reakcji systemowej zagrażającej życiu z uczuleniem na oba jady i brakiem możliwości ustalenia „owada sprawcy”.

Tabela 4.20. Cechy demograficzne i kliniczne pacjentów z alergią na jad owadów i uczuleniem na oba jady w porównaniu z grupą referencyjną.

Grupa	Płeć k/m	Wiek SD ±	Klasa ciężkości (średnia) N/%
Grupa C N= 12	9/3	43±14	SYS I 0/(0%),
			SYS II 1(8.33%),
			SYS III 4(33.33%),
			SYS IV 7(58.33%).
Pacjenci z alergią na jad owadów i uczuleniem na oba jady grupy referencyjnej N= 29	18/11	48±14	SYS I 0 (0%)
			SYS II 1(3.45%)
			SYS III 10(34.48%)
			SYS IV 18(62.07%)
(p =)	p = 0.42	p = 0.32	p = 0.81

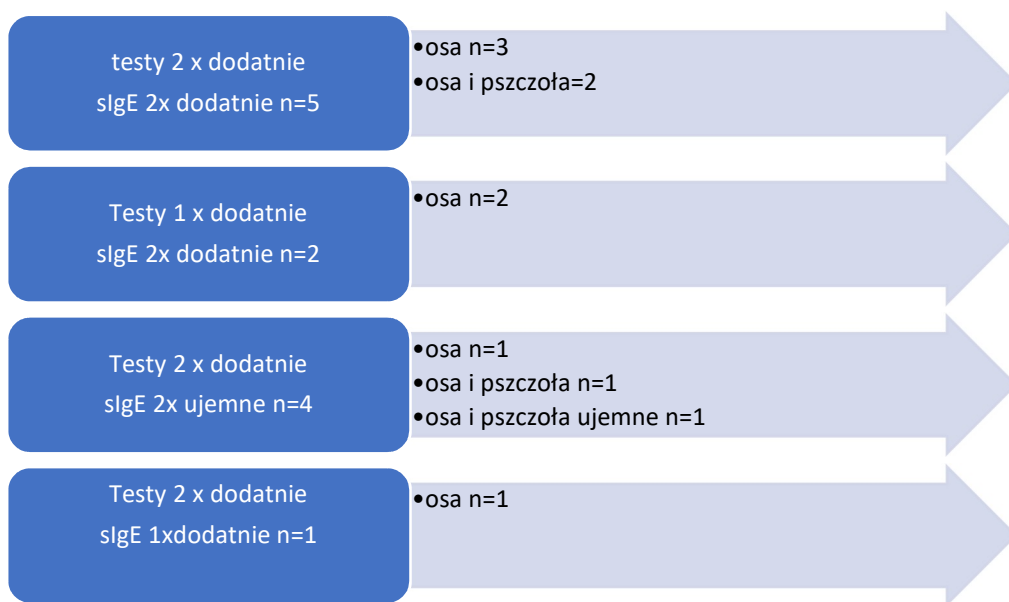
Nr pacjenta	Testy skórne z jadem osy	Testy skórne z jadem pszczoły	sIgE osa-ekstrakt	sIgE pszczoła-ekstrakt
1.	1	0	1	1
2.	1	1	0	0
3.	1	1	1	0
4.	1	1	1	1
5.	1	1	1	1
6.	1	1	1	1
7.	1	1	0	0
8.	1	1	0	0
9.	1	1	1	1
10.	1	1	1	1
11.	1	1	0	0
12.	1	0	1	1

Rysunek 4.22. Wyniki badań kwalifikujących do VIT w grupie pacjentów z alergią na jad owadów i uczuleniem na oba jady, 1- występowanie uczulenia, 0- brak uczulenia.

Po oznaczeniu alergenów głównych jadu osy (Ves v 1, Ves V 5) oraz jednego z alergenów głównych jadu pszczoły (Api m 1) uczulenie na oba jady potwierdzono u trzech osób. U jednego pacjenta zakwalifikowanego do VIT na podstawie dodatnich testów skórnych oznaczenia Ves v 1, Ves v 5 i Api m 1 wypadły ujemnie. U pozostałych 8 osób potwierdzono uczulenie na co najmniej jeden z głównych alergenów jadu osy.

Nr pacjenta	Ves v 1	Ves v 5	Api m 1
1.	1	1	0
2.	1	0	1
3.	0	1	0
4.	1	1	0
5.	0	1	0
6.	1	0	0
7.	0	1	0
8.	0	1	0
9.	0	1	1
10.	1	1	1
11.	0	0	0
12.	0	1	0

Rysunek 4.23. Profil uczuleń na alergeny główne jadu osy i Api m 1 u pacjentów odczulanych dwoma jadami. 1-potwierdzone uczulenie, 0-brak uczulenia.



Rysunek 4.24. Uczulenie na alergeny główne jadu pszczoły i osy w grupie chorych kwalifikowanych do VIT dwoma jadami.

## 5. Dyskusja

Pomimo intensywnych badań wiele zagadnień dotyczących historii naturalnej, diagnostyki i leczenia HVA pozostaje niewyjaśnionych. Intensyfikacja badań nad tą alergią w ostatnich latach ma związek z nowymi osiągnięciami biologii molekularnej, szczególnie proteomiki i transkryptomiki, których efektem jest wytypowanie i charakterystyka molekularna poszczególnych składników alergenowych jadu osy i pszczoły. W konsekwencji tych odkryć powstała możliwość oceny indywidualnych profili uczuleń na składniki alergenowe jadu, oceny cech klinicznych poszczególnych z nich, precyzyjnej diagnostyki i indywidualizowanej terapii. Do tej pory diagnostyka molekularna okazała się pomocna w ustalaniu właściwego jadu do immunoterapii u pacjentów „podwójnie uczulonych”, a także w potwierdzeniu uczulenia na jad owadów u pacjentów z ujemnymi oznaczeniami badań diagnostycznych z ekstraktem jadu.

W przedstawionej pracy podjęto się analizy przydatności CRD w rutynowej diagnostyce HVA, ocenie związku uczuleń na dostępne obecnie molekuly alergenowe jadu z cechami klinicznymi HVA i związku profili uczuleń z przebiegiem

immunoterapii u pacjentów z systemowymi objawami alergii na jad. W konstrukcji dyskusji nad wynikami pracy założono odrębne omówienie wyników badań u osób z alergią na jad osy i pszczoły. Oba typy alergii, podobnie jak oba jady, różnią się od siebie istotnie, głównie przebiegiem i odpowiedzią na immunoterapię stąd zasadne wydaje się ich wyodrębnienie. Z uwagi na praktyczny aspekt wyniki omawiane będą w takiej kolejności jaką narzuca praktyka postępowania z pacjentem, począwszy od diagnostyki po leczenie. Dodatkowo Autorka chciałaby podkreślić, że wprowadzone wyniki przeprowadzone zostały tylko u części pacjentów, którzy pozostają w opiece naszego ośrodka, ale grupa poddana analizie nie różniła się ani pod względem demograficznym, klinicznym ani immunologicznym od całej kilkuset osobowej grupy pacjentów z HVA leczonej w Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii we Wrocławiu, co daje teoretycznie możliwość uogólnienia uzyskanych rezultatów do całej grupy pacjentów z HVA.

### **5.1 Charakterystyka profili uczuleń na molekuły jadu osy**

Badania uczuleń na główne alergeny jadu osy wykazało, że najczęstszym profilem u osób z alergią na ten jad jest uczulenie oligowalentne na Ves v 1 i Ves v 5 a drugim w kolejności wariant monowalentny związany z uczuleniem na Ves v 5. Dysponując możliwością oceny sIgE-Ves v 1 i sIgE-Ves v 5 potwierdzono uczulenie u blisko 90% pacjentów z alergią na jad osy natomiast obniżenie punktu odcięcia wyniku dodatniego do wartości 0.1 kU/l zwiększyło czułość metody i pozwoliło na wykrycie sIgE na co najmniej jedną z dwóch badanych molekuł u około 98% osób. W konsekwencji różne warianty uczuleń wyłącznie na mniejsze alergeny jadu osy, Ves v 2, Ves v 3 i Ves v 6, mieszczą się w granicach 2%. Ten wynik prowadzi do dwóch konkluzji: zasadności obniżenia progu wyniku dodatniego dla oceny sIgE do 0.1 kU/l w miejsce przyjętego za istotny klinicznie stężenia 0.35 kU/l oraz rzuca światło na przyczynę niezwykle wysokiej skuteczności immunoterapii jadem osy.



Obniżenie progu wyniku dodatniego zwiększa precyzję diagnostyczną alergii na jad osy przeprowadzaną przy pomocy CRD. W badaniu autorki znaczący odsetek pacjentów z systemową reakcją na jad osy miał wykrywalne sIgE w przedziale 0.1 – 0.35 kU/l. Fakt stosunkowo częstego występowania niskich stężeń sIgE w grupie pacjentów z alergią na jad osy jest znany i był opisywany przede wszystkim w podgrupie z alergią na jad osy i mastocytozą. Wśród tych pacjentów stężenia ssIgE przeciwko ekstraktowi jadu i przeciwko jego molekułom alergenowym są niskie, a u około 8% nieobecne<sup>31,80,81,119,147</sup>. W badaniu Michela i wsp. w grupie pacjentów z alergią na jad osy i podwyższonymi stężeniami sBT przesunięcie granicy wyniku dodatniego do 0.1 kU/l pozwoliło na wykazanie obecności sIgE przeciwko molekułom Ves v 1 i Ves v 5 odpowiednio u 81.6% i 98% z nich<sup>147</sup>. Michel i wsp. wykazali również, że w grupie pacjentów z alergią na jad osy i podwyższonym stężeniem sBT i/lub udokumentowaną chorobą z kręgu aktywacji mastocytów odsetek pacjentów wykazujących obecność sIgE w przedziale stężeń 0.1-0.35 kU/l był wyższy niż w grupie osób z alergią na jad osy i prawidłowym stężeniem sBT<sup>147</sup>. Fakt niższych stężeń sIgE w grupie z HVA z towarzyszącą mastocytozą może wynikać z wiązania przeciwciał IgE z receptorem FcRI na powierzchni dużej puli nowotworowych, monoklonalnych mastocytów przez co „unieruchomione” na nich przeciwciała nie są obecne i dostępne do badania w surowicy<sup>18</sup>. W badaniu Autorki pacjenci z sIgE wykazanymi w przedziale 0.1-0.35 kU/l mieli prawidłowe wartości tryptazy dlatego postulat obniżenia punktu odcięcia wydaje się być zasadny do pacjentów z HVA na jad osy i prawidłowymi stężeniami sBT.

Uzyskany wynik rzuca też światło na „niezrozumiałe” wysoką, bo aż 90-100% skuteczność VIT pacjentów w alergii na jad osy. Występowanie w badanej grupie u 98% pacjentów uczulenia na jeden z głównych, „źródłowych”, alergenów, przy założeniu, że oba te stanowią podstawę składu szczepionek jadu osy, „pokrywa” niemal wszystkie profile występujące u pacjentów z alergią na jad osy, a procent profili „niezwiązanych” z obecnością uczuleń na główne alergeny jadu

jest bardzo niski. Biorąc pod uwagę, że dawka podtrzymująca jadu osy (100 mcg) jest ekwiwalentem kilku użądleń osy, zarówno dawka jednorazowa jak sumaryczna każdego z głównych alergenów jadu osy jest wysoka dla każdego z 98% pacjentów. Hipoteza związku skuteczności immunoterapii alergenowej z indywidualnym profilem uczuleń jest podnoszona od dawna m.in. przez grupę Valenty<sup>153</sup>. Problem ten był szczegółowo analizowany u pacjentów z alergią na pyłki traw jak i alergią na roztocze<sup>154-156</sup>. Tripodi i wsp. wykazali wysoką heterogenność profili uczuleń molekularnych na badane 8 alergenów *Phleum pratense* u 176 dzieci z objawami alergii wziewnej i uczuleniem na pyłki tymotki<sup>156</sup>. Analiza potencjalnego „dopasowania” składu szczepionki do wykazanych 39 różnorodnych profili uczuleniowych u tych dzieci wykazała wysoki odsetek uczuleń potencjalnie niedostosowanych do składu szczepionki, co może implikować nieoptymalną skuteczność SIT w tej grupie pacjentów. Analogiczne badania na liczniejszej grupie dzieci dowodzą, że liczba profili uczuleń molekularnych sięga nawet ponad 80<sup>154</sup>. Te same obserwacje dotyczą immunoterapii w alergii na roztocza<sup>157</sup>. Chen i wsp. podobnie jak Rodriguez i Vrtala wykazali, że skuteczność immunoterapii roztoczami była większa u pacjentów uczulonych na dwa z głównych alergenów, D pter 1 i D pter 2 niż u pozostałych pacjentów z szerszym spektrum uczuleń molekularnych. Ponownie, skład alergenowy szczepionki może nie pokrywać szerokich i różnorodnych indywidualnych profili uczuleń na główne alergeny roztoczy (D pter 1, D pter 2, D pter 5, 7, 21 i 23). Dostosowanie profilu uczuleń na główne alergeny jadu osy u naszych pacjentów może być jednym z powodów większej skuteczności VIT jadem osy niż immunoterapii innymi alergenami.

## **5.2 Wartość diagnostyczna ekstraktów jadu osy i komponent alergenowych Ves v 1 i Ves v 5 w alergii na jad osy**

U pacjentów z HVA na jad osy wykazano bardzo wysoką zgodność dodatnich wyników diagnostycznych „klasycznych” procedur wykorzystujących ekstrakt jadu (testy skórne oraz sIgE z ekstraktem) z wynikami oznaczeń sIgE przeciwko

dwóm molekułom (łącznie Ves v 1 i Ves v 5). Ponownie, zgodność wyników dodatnich była wyższa dla oznaczeń sIgE przy punkcie odcięcia wyniku dodatniego 0.1 kU/l niż 0.35 kU/l. Pośrednio wynik ten wskazuje zarówno na obecność molekuł Ves v 1 i Ves v 5 w preparatach ekstraktu jadu jak i na znikomy odsetek fałszywie dodatnich wyników testów skórnych wynikających z obecności w ekstraktach substancji niealergenowych i/lub drażniących.

Wyniki autorki wykazały również dużą zgodność oceny sIgE w surowicy (punkt odcięcia 0.35 kU/l) w ocenie klasycznej (ekstrakt) i molekularnej (Ves v 1 i Ves v 5). Zgodność wyników dodatnich dla obu procedur wynosi 79.12%, a ujemnych 6.69%. Stosując przyjętą dotychczas interpretację dodatniego wyniku testu (0.35 kU/l) nadal blisko 7% pacjentów z klinicznymi objawami HVA jest serologicznie ujemnych (zarówno na ekstrakt jak obie molekuły), a uczulenie potwierdzał u nich wynik testu skórniego z ekstraktem. Ten wynik wskazuje na słuszość protokołu diagnostycznego przyznającego pierwszeństwo w diagnostyce HVA na jad osy testom skórnym łącznie z testami serologicznymi z ekstraktem nad testami serologicznymi z rekombinowanymi molekułami alergenowymi, które są testami drugiej kolejności. Dane na temat precyzji wyników serologicznych i wykazania p/ciał przeciwko ekstraktowi jadu osy i jego głównym molekułom u pacjentów z HVA na jad osy są rozbieżne. W badaniu Vos i wsp. czułość testów in vitro z ekstraktem była niższa niż z Ves v 5 i niższa niż z Ves v 1 + Ves v 5<sup>73</sup>. U 308 pacjentów badanej grupy uczulenie na ekstrakt jadu osy wykazało 83.4% pacjentów, a na molekułę Ves v 1 + Ves v 5 aż 96%<sup>73</sup>. To prowadziło autorów do dwóch wniosków. Pierwszy z nich to, że ekstrakt jadu osy zawiera niedostateczną ilość Ves v 5. Potwierdzeniem tej tezy było potwierdzenie uczulenia na jad osy u 84.4% pacjentów z wywiadem HVA i negatywnymi wynikami sIgE wobec ekstraktu (N=19) po suplementacji ekstraktu jadu osy o Ves v 5<sup>73</sup>. I drugi wniosek płynący z wyników Vos i wsp., że testowanie in vitro przy pomocy molekuł jest bardziej czule niż przy pomocy ekstraktu. W konsekwencji tych

doniesień od 2012 roku wprowadzono test *in vitro* z ekstraktem suplementowanym o Ves v 5. Obserwacji Vos i wsp. nie potwierdziły wyniki grupy niemieckiej Rafei-Shamsabadi i wsp. W tym badaniu na licznej grupie pacjentów z wywiadem alergii na jad osy nie potwierdzono tezy, o wyższej czułości testów z molekułami Ves v 1 i Ves v 5 niż testów serologicznych z ekstraktem jadu osy<sup>148</sup>. W 2014 roku Bokanovic opublikował swoje badania, które również nie wykazały istotnie większej czułości diagnostycznej testu ekstraktu wzbogaconego o Ves v 5 od konwencjonalnego testu z ekstraktem<sup>54,144</sup>. Wyniki dwóch ostatnich cytowanych badań potwierdzają zatem konkluzję autorki o wartości diagnostycznej testów z ekstraktem.

### **5.3 Przeciwciała sIgE przeciwko molekułom Ves v1 i Ves v 5 a stężenie cIgE**

Kolejnym wnioskiem praktycznym wynikającym z tego badania jest wykazanie celowości wykonywania oznaczenia cIgE u pacjentów z HVA. Wyniki autorki wykazały częstsze występowanie ujemnych wyników sIgE przeciwko molekułom Ves v 1 i Ves v 5 (< 0.35 kU/l) u pacjentów z niskimi wartościami cIgE. Zatem u pacjentów ujemnymi oznaczeniami sIgE-Ves v 1 i sIgE- Ves v 5 i niskimi stężeniami cIgE konieczne jest poszukiwanie przeciwciał sIgE-Ves v 1 i sIgE-Ves v 5 w przedziale 0.1- 0.35 kU/l.

Rolę cIgE w diagnostyce alergii na jad oraz przewidywanie ciężkości reakcji opisano już w 2007r. Sturm i wsp. zwrócili uwagę na odwrotną korelację między ciężkością reakcji poużądleniowej, a stężeniem cIgE<sup>158</sup>. Ze względu na niskie stężenia sIgE i cIgE u pacjentów z mastocytozą, w tej grupie chorych za potwierdzenie nadwrażliwości IgE-zależnej przyjmuje się wynik sIgE powyżej 0.17 kU/l<sup>20</sup>. Biorąc po uwagę fakt, że chorzy z potencjalnie najcięższymi reakcjami w przebiegu uządlenia mają predyspozycje do niższych wartości cIgE, a niższe stężenia sIgE i cIgE występują u pacjentów z mastocytozą, również narażonych na najcięższy przebieg reakcji, należy rozważyć czy nie przyjąć punktu odcięcia dodatniego wyniku testu poniżej 0.35 kU/l dla wszystkich pacjentów z ciężkimi

reakcjami systemowymi. W prezentowanej pracy modyfikacja ta umożliwia potwierdzenie uczulenia na alergen główny u kolejnych 9 chorych (9.89% pacjentów uczulonych na jad osy) z niskim cIgE. Podobnie w pracy opublikowanej w 2019 r. Sturm i współ. sugerują rozważanie wyników 0.1- 0.35 kU/l jako dodatnich w grupie pacjentów z przebytą ciężką reakcją systemową i ujemnymi wynikami standardowych testów i niskim stężeniem IgE całkowitego (IDT, sIgE z ekstraktem)<sup>159</sup>.

#### **5.4 Profile uczuleń molekularnych a ciężkość reakcji w alergii na jad osy**

W prezentowanej pracy wykazano niższe stężenia sIgE-Ves v 5 w grupie pacjentów z najcięższymi reakcjami systemowymi (SYS IV<sup>o</sup>). W opinii autorki dla oceny znaczenia tego wyniku konieczne są badania na szerszej grupie pacjentów. Do tej pory nie wykazywano związku pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko molekułom alergenowym jadu osy a ciężkością reakcji poużądleniowej<sup>139</sup>. W najnowszych analizach<sup>160</sup> ani obecność sIgE-Ves v 1 i sIgE- Ves v 5, ani ich stężenia nie są brane pod uwagę jako czynniki ryzyka ciężkiej reakcji systemowej. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że w dotychczasowych badaniach liczebność grup pacjentów z reakcjami SYS IV<sup>o</sup> mogła nie być wystarczająco wysoka dla uzyskania istotności statystycznej wyników.

Diagnostyka komponentowa może mieć znaczenie w przewidywaniu ciężkości reakcji alergicznej między innymi na pyłki traw. Istnieją doniesienia o wyższych stężeniach przeciwciał przeciwko rekombinantom alergenowym pyłku traw u pacjentów z astmą w porównaniu z tym, u których zdiagnozowano alergiczny nieżyt nosa<sup>161</sup>. W alergii na pyłki traw wykazano również związek pomiędzy częstością uczuleń na poszczególne alergeny, a dodatnim wynikiem klinicznej próby prowokacyjnej<sup>162</sup>. Najlepiej jest udokumentowana zależność pomiędzy profilem uczulenia na pokarmowe molekuly alergenowe a ciężkością reakcji alergicznej na pokarmy. Uczulenie na białka spichrzeniowe orzeszków ziemnych Ara h 1, 2 i 3 wiąże się z ryzykiem najcięższych reakcji systemowych<sup>163-165</sup>. Podobnie do

ciężkich reakcji anafilaktycznych są predysponowane dzieci uczulone na alergeny orzechów włoskich Cor a 8 (białko transportujące lipidy), Cor a 9 (białko spi-chrzeniowe) i Cor a 11 (białko z rodziny kupin)<sup>166</sup> podczas gdy u dorosłych uczu-lonych na Cor a 1 występują jedynie łagodne objawy pod postacią OAS<sup>167,168</sup>. W alergii na owoce cięższe reakcje systemowe występują u pacjentów uczulonych na białka transportujące lipidy (LTP), m.in. Pru p 3 (brzoskwinia), Mus a 4 (ba-nan)<sup>169,170</sup>. Pacjenci z przetrwałą alergią na jajo kurze wykazują wyższe stężenia przeciwciał przeciwko Gal d 1 (ovomukoid) i Gal d 2 (ovalbumina) niż chorzy, którzy osiągnęli tolerancję tych alergenów<sup>171</sup>. Jak wspomniano już powyżej po-dobnego związku między uczuleniem na poszczególne molekuly a ciężkością re-akcji nie wykazano dotychczas w pracach dotyczących alergii na jad owadów błonkoskrzydłych. Wnioski z prezentowanej pracy należy również wyciągać ostrożnie, ponieważ na przedstawiony wynik mają wpływ skrajne wartości sIgE-Ves v 5 (zbliżone do 100) u niektórych pacjentów.

### **5.5 Profile uczuleń a immunoterapia w alergii na jad osy**

W prezentowanej pracy nie potwierdzono zależności między profilami uczuleń oraz stężeniami alergenów głównych jadu osy a bezpieczeństwem immunoterapii. W kontekście wyników autorki, ani na podstawie występowania uczulenia na mo-lekuly pierwotnego uczulenia na jad osy: Ves v 1 i Ves v 5, ani na podstawie stopnia tego uczulenia nie można prognozować bezpieczeństwa immunoterapii jadem osy. Podobnie jak dla obu molekuł, takiej zależności nie wykazano dotych-czas pomiędzy wykładnikami uczulenia na ekstrakt jadu, zarówno tymi ocenia-nymi in vivo jak in vitro. Za uznane czynniki bezpieczeństwa VIT uznaje się po-wszechnie mastocytozę, podwyższone stężenie tryptazy, schemat „rush i ultra-rush” przeprowadzania fazy indukcji<sup>16,132</sup>, a zdaniem niektórych autorów także leczenie ACE-inhibitorami i beta-blokerami<sup>15</sup>.

## 5.6 Charakterystyka profili uczuleń na molekuly jadu pszczoły

Wyniki badania wykazały, że 82.61% pacjentów z alergią na jad pszczoły wykazało uczulenie na co najmniej jedną z panelu badanych molekuł jadu pszczoły wśród których najczęstsze było uczulenie na molekułę Api m 1. Przydatność diagnostyczna oceny sIgE przeciwko pojedynczym molekułom jadu pszczoły jest zatem mniejsza niż w wypadku jadu osy. Wpływa na to wykazana w badaniu złożoności i różnorodności profilów uczuleń molekularnych w populacji pacjentów z HVA na jad pszczoły. Oznaczenie sIgE przeciwko każdej kolejnej molekułce zwiększa wartość diagnostyczną procedury.

W badaniu autorki obecność sIgE-Api m 1 wykazało 62.5% badanych z HVA na jad pszczoły. Odnosząc te wyniki do doniesień literaturowych: w niektórych pracach częstość uczuleń na ten alergen wahała się od 61.8-97% w przypadku natywnego alergenu i 54.5-83.1% w przypadku rekombinowanego<sup>39,46,137,140</sup>, w innych sięgała nawet 100%<sup>62</sup>. Jak wynika z tego zestawienia, analizując częstość uczuleń na Api m 1 należy zwrócić uwagę na rodzaj molekuly (rekombinowany versus natywny alergen), ale też rodzaj testu diagnostycznego i punkt odcięcia wyniku dodatniego: przy użyciu techniki Immulite sIgE sIgE-rApi m 1 występowały u 76.9% badanych, techniki ImmunoCap u 54.5% badanych, a po obniżeniu punktu odcięcia dla wyniku dodatniego w teście ImmunoCAP do 0.1 kU/l u 76.1% badanych<sup>140</sup>.

Porównanie wyników częstości uczuleń na poszczególne alergeny jadu pszczoły uzyskane w tym badaniu może wskazywać również na odmienności ich rozkładu wśród pacjentów z alergią na jad pszczoły w populacji: polskiej (grupa badana), austriackiej<sup>140</sup> i hiszpańskiej<sup>61,62</sup>. W badaniu autorki uczulenie na co najmniej jedną molekułę alergenową jadu pszczoły (panelu: Api m 1, 2, 3, 5, 10) wykazano u 82.61% chorych z HVA na jad pszczoły, co stanowiło wyższy procent niż przy oznaczeniu tych samych molekuł (stosowania tej samej metody i punktu odcięcia) w populacji austriackiej (71.6%)<sup>140</sup>. Najczęściej badani przez

autorke wykazywali uczulenie na molekułę Api m 1 ponownie częściej niż w populacji austriackiej<sup>140</sup>. Z kolei uczulenie na Api m 1 w grupie badanej było zdecydowanie rzadsze niż w pracach autorów hiszpańskich<sup>61,62</sup>, gdzie stwierdzono je w 100% przypadków<sup>61</sup>. W populacji badanej stwierdzono również wyższy odsetek uczuleń na Api m 10 (58.7% vs 35.1%) oraz zbliżone odsetki uczuleń na Api m 3 (30.43% vs 31.3%) oraz Api m 5 (32.61% vs 26.1%) oraz niższy odsetek uczuleń na Api m 2 (36.96%) niż w populacji austriackiej (54.5%)<sup>140</sup>.

### **5.7 Wartość diagnostyczna ekstraktów jadu pszczoły i komponent alergicznych w alergii na jad pszczoły**

U pacjentów z HVA na jad pszczoły, podobnie jak na jad osy, wykazano wysoką zgodność dodatnich wyników diagnostycznych „klasycznej” procedury wykorzystujących ekstrakt jadu (sIgE z ekstraktem) z wynikami oznaczeń sIgE przeciwko molekułom (łącznie: Api m1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 i Api m 10). Ponownie, zgodność wyników dodatnich była wyższa dla oznaczeń sIgE przy punkcie odcięcia wyniku dodatniego 0.1 kU/l niż 0.35 kU/l, w przypadku jadu pszczoły umożliwiało to wykazane przeciwciał przeciwko molekułom jadu pszczoły dodatkowo u 3 pacjentów.

W badanej grupie aż u 17.39% pacjentów wykazano uczulenie na ekstrakt jadu pszczoły, ale brak uczulenia na badane molekuły jadu pszczoły. Ten odsetek pacjentów jest mniejszy niż w badaniach Arzt i wsp., gdzie oznaczano te same molekuły, używano tej samej metody i punktu odcięcia wyniku dodatniego (0.35 kU/L)<sup>140</sup>. Natomiast przy przesunięciu punktu odcięcia do 0.1 kU/L odsetek uczulonych na ekstrakt, ale nieuczulonych na badane molekuły wynosił 10.87%, co stanowiło nadal mniejszy odsetek niż w grupie badanej przez Arzt i wsp (15.7%). Odsetek pacjentów, u których nie potwierdzono uczulenia na żadną z badanych komponent jadu pszczoły jest wyższy niż w przypadku jadu osy (10.87% vs 2.19%).



Wysoki odsetek pacjentów z potwierdzonym uczuleniem na ekstrakt i niepotwierdzonym uczuleniem na badane komponenty alergenowe jady może mieć dwa wytłumaczenia. Po pierwsze stężenia sIgE przeciwko komponentom jadu mogą być zbyt niskie w stosunku do czułości aktualnych metod ich detekcji. Potwierdzeniem tej hipotezy jest wykazany trend w kierunku niższych wartości median stężeń cIgE ( $p = 0.09$ ) w tej grupie pacjentów co jak omawiano już powyżej w wypadku uczulenia na jad osy może wiązać się z niższymi stężeniami sIgE niż mieszczącymi się w przedziale  $> 0.35$  kU/l. Po drugie, brak sIgE przeciwko badanym molekułom może odzwierciedlać uczulenie na „nowe” do tej pory niezidentyfikowane „mniejsze” alergeny jadu pszczoły (np. Api m 11 lub Api m 12). U tych pacjentów potencjalna skuteczność immunoterapii jadem pszczoły może być niższa z powodu braku w szczepionce wystarczającej ilości molekuły odpowiedzialnej za uczulenie.

Istnieje również niewielka grupa pacjentów, u której potwierdzono uczulenie na co najmniej jedną z molekuł a nie potwierdzono uczulenia na ekstrakt jadu. Dlatego u pacjentów z typową reakcją kliniczną i ujemnymi wynikami klasycznych badań diagnostycznych, cenne jest uzupełnienie diagnostyki o badania molekularne.

### **5.8 Profile uczuleń molekularnych a ciężkość reakcji w alergii na jad pszczoły**

W przedstawianej pracy stwierdzono wyższe mediany stężeń sIgE-Api m 5 ( $p = 0.03$ ) u pacjentów z przebytą reakcją poużądleniową z zajęciem układu krążenia (SYS IV<sup>o</sup>), co może sugerować związek tej molekuły z cięższymi reakcjami systemowymi. Nie wykazano natomiast związku między ciężkością reakcji a stężeniem sIgE przeciwko pozostałym molekułom.

Należy pamiętać, że w cytowanym już kilkakrotnie badaniu nad profilami uczuleń u osób z HVA, Arzt i wsp.<sup>140</sup> nie obserwowano zależności między uczuleniem na Api m 5 ani innymi molekułami, a ciężkością HVA. W pracy tej nie ma jednak danych o liczebności grupy pacjentów z najcięższą reakcją SYS IV<sup>o</sup>. W

badaniu Ruiz wykazano związek między ciężkością reakcji a stężeniami sIgE-Api m 4 i sIgE-Api m 1<sup>62</sup>. Uwagę zwraca fakt, że praca ta była przeprowadzona na niewielkiej grupie chorych, a reakcja SYS IV<sup>o</sup> wystąpiła jedynie u 5 pacjentów. Wskazane jest przeprowadzenie wielośrodkowych badań na większych grupach pacjentów.

## **5.9 Profile uczuleń a immunoterapia w alergii na jad pszczoły**

Profil uczuleń na poszczególne molekuly jadu pszczoły może mieć związek z częstością powikłań podczas VIT. Obserwując profil uczuleń na molekuly u pacjentów z powikłaniami podczas fazy indukcji immunoterapii (VIT-UR) wykazano wyższe stężenia sIgE-Api m 1 ( $p = 0.009$ ), sIgE-Api m 5 ( $p < 0.05$ ) i trend w kierunku wyższych stężeń sIgE-Api m 10 ( $p=0.06$ ) u pacjentów z powikłaniami podczas fazy indukcji VIT-UR. Natomiast analiza porównująca stężenia sIgE przeciwko komponentom jadu pszczoły w grupie pacjentów z powikłaniami podczas całego przebiegu immunoterapii i bez powikłań, wykazała trend w kierunku wyższych wartości sIgE-Api m 5 wśród chorych z powikłaniami immunoterapii ( $p = 0.07$ ). Ponadto obie grupy różniły się rozkładem klas przeciwko Api m 5 ( $p = 0.02$ ).

Autorce nie są znane wyniki badań oceniających związek pomiędzy profilem uczuleń a powikłaniami podczas fazy indukcji VIT UR. W badaniach Ruiz<sup>61</sup> oceniano sIgE-Api m 1, sIgE-Api m 2 i sIgE-Api m 4, jednak faza indukcji VIT w tym badaniu była przeprowadzana wg schematu clustered<sup>61,62</sup>. W badaniu tym sugerowany był związek między wyższym stężeniem sIgE-Api m 4 a częstością powikłań w tej fazie immunoterapii. Autorzy podkreślają jednak, że wnioski z tych doniesień należy wyciągać ostrożnie, ze względu na małą liczebność grupy badanej, niewielki odsetek uczuleń na Api m 4 oraz silną korelację uczuleń na Api m 4 z uczuleniami na Api m 1.

Wykazano trend w kierunku wyższych wartości sIgE-Api m 5 i odmienny rozkład klas przeciwko Api m 5 wśród chorych z powikłaniami podczas całego cyklu immunoterapii. Niestety brak jest dostępnych prac oceniających związek Api m 5 z częstością powikłań podczas całego przebiegu immunoterapii. Jedyna dostępna praca Ruiz i współ<sup>62</sup> wykazała związek między wyższymi stężeniami sIgE-Api m 4, a częstszymi powikłaniami podczas ocenianymi w trakcie dwóch lat VIT <sup>61,62</sup>. W ośrodku hiszpańskim nie badano sIgE-Api m 5, więc nie ma możliwości porównania tych wyników.

Większa częstość powikłań zarówno podczas fazy indukcji jak i podczas całego przebiegu immunoterapii w grupie pacjentów uczulonych na Api m 5 może teoretycznie mieć związek z niedostatecznym stężeniem tego alergenu w ekstrakcie jadu stosowanym podczas immunoterapii<sup>151</sup> analogicznie jak to wykazano dla Api m 10<sup>58</sup>. W badaniu Frick i wsp<sup>58</sup>. Wykazano wyższe stężenie sIgE-Api m 10 u pacjentów z niepowodzeniami immunoterapii (wyrażonymi jako brak tolerancji użądlenia w próbie prowokacyjnej), nie wykazano natomiast tej zależności w przypadku innych molekuł Api m 1, Api m 2, Api m 3 i Api m 5. W pracy tej wiązano nieskuteczność VIT właśnie z niedostateczną obecnością tego alergenu w preparatach do immunoterapii.

### **5.10 Profil uczuleń a czas trwania immunoterapii**

Stężenie sIgE-Api m 1 wykazuje tendencję do zmniejszania się podczas immunoterapii. U 15 pacjentów z alergią na jad pszczoły oznaczono wszystkie komponenty jadu pszczoły przed rozpoczęciem immunoterapii oraz po co najmniej 6 miesiącach trwania VIT. Stwierdzono trend do zmniejszania się stężeń sIgE-Api m 1 po 6 miesiącach VIT ( $p = 0.06$ ). W badaniach przeprowadzonych w Hiszpanii obserwowano po roku immunoterapii zmniejszenie stężenia sIgE-Api m 1 ponadto w tej grupie pacjentów stwierdzano również wzrost stężeń sIgG-Api m 1<sup>62</sup>. Wydaje się, że w grupie badanej brak istotnego statystycznie spadku stężenia sIgE-Api m 1 wynika ze zbyt krótkiego czasu obserwacji. W grupie badanej nie

obserwowano zmniejszenia stężeń sIgE przeciwko pozostałym molekułom, natomiast w ośrodku hiszpańskim odnotowano zmniejszenie sIgE-Api m 4 po roku VIT. Niestety tej molekule nie badano w prezentowanym badaniu.

### **5.11 Tryptaza**

Wysokie stężenie tryptazy jest znanym niemodyfikowanym czynnikiem ryzyka ciężkości reakcji poużądleniowej oraz niepowodzeń VIT<sup>119,129</sup>. Wyniki autorki są zgodne z tą zależnością. W prezentowanej grupie pacjentów, obserwowano dodatkowo wyższe stężenie tryptazy u pacjentów z reakcjami systemowymi SYS IV ( $p = 0.007$ ) oraz w grupie pacjentów z powikłaniami podczas fazy indukcji VIT - UR ( $p = 0.019$ ) i w przebiegu łącznie obu faz immunoterapii ( $p = 0.03$ ).

W grupie pacjentów z podwyższonym stężeniem tryptazy wykazano wyższe stężenie sIgE-Api m 10 ( $p = 0.048$ ). Trend w kierunku wyższych stężeń sIgE-Api m 10 wykazano również w grupie pacjentów z powikłaniami w fazie indukcji VIT-UR. Należy wziąć pod uwagę obserwację: czy wyższe stężenia sIgE-Api m 10 są niezależnym czynnikiem ryzyka powikłań, czy też większa częstość powikłań w tej grupie chorych wynika wyłącznie ze współwystępowania u nich wyższych stężeń tryptazy. Obserwacje wymagają dalszych badań wieloośrodkowych przeprowadzonych na większej grupie pacjentów.

### **5.12 Podsumowanie**

Podsumowując najistotniejsze wyniki u pacjentów z HVA-SYS na jad osy:

1. U 10.99% i 2.19% pacjentów z reakcją systemową HVA na jad osy i uczuleniem na ekstrakt nie potwierdzono uczulenia na Ves v 1 i/lub Ves v 5 odpowiednio w stężeniach:  $> 0.35$  i  $> 0.1$  kU/l.
2. U pacjentów z niskimi stężeniami cIgE w surowicy, wyniki oznaczeń sIgE-Ves v 1 i sIgE-Ves v 5 są częściej negatywne niż w pozostałych grupach pacjentów stężeniem cIgE.

3. U pacjentów z alergią na jad osy z objawami ze strony układu krążenia wykazano niższe stężenia sIgE-Ves v 5.
4. Nie wykazano związku pomiędzy stężeniami sIgE-Ves v 1 i sIgE-Ves v 5 a bezpieczeństwem oraz powodzeniem bądź niepowodzeniem immunoterapii jadem osy.

U pacjentów z HVA-SYS na jad pszczoły:

1. 17.39% i 10.87% pacjentów z reakcją systemową HVA na jad pszczoły i uczuleniem na ekstrakt jadu pszczoły nie potwierdzono uczulenia na żadną z panelu molekuł jadu pszczoły (Api m 1, 2, 3, 5, 10) w stężeniu  $> 0.35$  i  $> 0.1$  kU/l.
2. U 4.35% nie wykazano sIgE na ekstrakt w surowicy, ale wykazano uczulenie przeciwko co najmniej jednej zbadanych molekuł.
3. U pacjentów z HVA-SYS z zajęciem układu krążenia występują wyższe stężenie sIgE-Api m 5
4. U pacjentów z powikłaniami podczas fazy wstępnej immunoterapii przeprowadzonej wg schematu „ultra rush” występują wyższe stężenia sIgE-Api m 1 i sIgE-Api m 5.
5. U pacjentów z alergią na jad pszczoły i powikłaniami podczas VIT-UR występują wyższe stężenie tryptazy niż pacjenci z niepowikłanym przebiegiem VIT-UR.

## **6. Wnioski**

1. Diagnostyka molekularna alergii na jad owadów stanowi cenne uzupełnienie, ale nie zastępuje klasycznych metod diagnostycznych opartych o testy skórne z ekstraktem, testy serologiczne z ekstraktem i ocenę cIgE.
2. W diagnostyce alergii na jad owadów zasadne jest obniżenie progu odcięcia wyniku dodatniego do 0.1 kU/l szczególnie przydatne w grupie pacjentów z alergią na jad owadów i niskimi stężeniami cIgE w surowicy.

3. Oznaczenie stężenie sIgE-Api m 5 może być czynnikiem prognostycznym reakcji systemowej z zajęciem układu krążenia.
4. Oznaczenie stężenia sIgE-Api m 1 i sIgE-Api m 5 mogą być pomocne przy prognozowaniu występowania powikłań podczas VIT-UR.
5. Złożoność profili uczuleń molekularnych na jad pszczoły może mieć związek z gorszą skutecznością immunoterapii jadem pszczoły niż jadem osy.
6. Podwyższone stężenie tryptazy w surowicy zwiększa ryzyko powikłań podczas VIT-UR jadem pszczoły.

## **Streszczenie**

### **Wstęp**

Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych (HVA) jest najczęstszą przyczyną anafilaksji u osób dorosłych. Obraz reakcji alergicznej po użądleniu obejmuje reakcje lokalne, łagodne reakcje systemowe oraz ciężkie reakcje anafilaktyczne mogące prowadzić w skrajnych przypadkach do zgonu osoby uczulonej. Jedyną skuteczną metodą zapobiegania ciężkim reakcją anafilaktycznym jest immunoterapia jadem (VIT). Przed rozpoczęciem VIT konieczne jest potwierdzenie alergii na jad w mechanizmie IgE-zależnym. W tym celu wykonuje się testy skórne z ekstraktem jadu owadów oraz oznacza się sIgE przeciwko ekstraktowi jadu osy i pszczoły. W większości przypadków badania te są wystarczające do potwierdzenia alergii na jad osy jednak nadal u niewielkiej grupy chorych pomimo przeprowadzonej diagnostyki nie udaje się jednoznacznie potwierdzić owada sprawcy z powodu niewykazania przeciwciał przeciwko ekstraktowi jadu osy i pszczoły lub też obecności przeciwciał przeciwko obu jadom. Diagnostyka komponentowa stanowi w takich przypadkach cenne uzupełnienie tradycyjnych metod diagnostycznych wykorzystujących ekstrakt jadu. Drugim znanym zastosowaniem CRD jest wybór jadu do immunoterapii u osób „podwójnie uczulonych” tj uczulonych na oba jady.

Dostępność nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej w alergii i alergii na jad owadów rodzi pytanie o racjonalne ich wykorzystanie i możliwość zastąpienia nimi tradycyjnych metod takich jak testy śródskórne czy testy serologiczne z ekstraktem alergenowym jadu.

Dodatkowo poszukuje się innych obszarów zastosowania CRD, a najmniej znanym z nich jest przydatność CRD w identyfikacji pacjentów o zwiększonym ryzyku reakcji niepożądanych podczas VIT.

Innym potencjalną korzyścią z CRD może być jej przydatność w typowaniu profilu pacjentów, szczególnie wśród tych z alergią na jad pszczoły, rokujących powodzenie lub niepowodzenie klasycznej immunoterapii jadem.

Prezentowana praca przedstawia rolę diagnostyki komponentowej w diagnostyce alergii na jad oraz prowadzeniu immunoterapii jadem.

### **Cele pracy**

Głównym celem pracy była ocena przydatności diagnostyki komponentowej w kwalifikacji i monitorowaniu immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych. Kolejnymi celami pracy była ocena profilów uczuleń na jad owadów oraz ich związku z ciężkością reakcji poużądleniowej, bezpieczeństwem i skutecznością immunoterapii.

### **Metoda i materiał**

Grupę badaną stanowiło 167 pacjentów z HVA zakwalifikowanych do immunoterapii jadem owadów w Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii. Grupę referencyjną stanowiło 816 pacjentów z HVA poddanych immunoterapii alergenowej (VIT) w latach 2012-2018. Kwalifikacja do VIT w obu grupach odbywała się zgodnie z kryteriami EAACI i przy zastosowaniu tego samego protokołu.

167 Pacjentów grupy badanej podzielono na 3 podgrupy: A (N = 91 z alergią na jad osy i kwalifikowanych do VIT jadem osy w wieku od 11 do 74 lat), B (N = 58 z alergią na jad pszczoły i zakwalifikowanych do VIT jadem pszczoły w wieku od 13 do 71 lat) oraz C (N = 12 z alergią na oba jady i zakwalifikowanych do VIT dwoma jadami). U pacjentów zakwalifikowanych do immunoterapii jadem osy obok oceny IDT, sIgE przeciwko ekstraktowi jadu wykonanych w związku z kwalifikacją do VIT oznaczano dodatkowo sIgE przeciwko molekułom głównym jadu osy Ves v 1 i Ves v 5, natomiast w grupie chorych uczulonych na jad pszczoły oznaczono dodatkowo sIgE przeciwko molekułom jadu pszczoły Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 i Api m 10. W obu grupach oznaczano stężenie tryptazy w surowicy. U części pacjentów odczulanych jadem pszczoły oznaczono również sIgE przeciwko molekułom jadu po co najmniej 6 miesiącach trwania VIT. W ocenie stężenia sIgE w surowicy przeciwko ekstraktom jadu (ssIgE) stosowano metodę ELISA, przeciwko molekułom jadu osy i pszczoły oraz stężenie tryptazy w surowicy metodę ImmunoCAP System.

Immunoterapię jadem w fazie wstępnej prowadzono metodą „ultra-rush” zgodnie z protokołem Muellera osiągając w okresie 3.5 godziny dawkę sumaryczną 111.1 mcg jadu. W fazie wstępnej stosowano preparat jady osy i pszczoły Pharnalgen (Alk Abello). Leczenie w fazie podtrzymującej prowadzono zgodnie z protokołem EAACI i producenta szczepionka Alutard Alk Abello.

Informacje zgromadzono w postaci bazy danych, która była analizowana statystycznie z zastosowaniem oprogramowania STATISTICA12. Do analizy zmiennych zastosowano testy: Shapiro-Wilk’a, t-studenta, U Mann-Whitney’a oraz Chi kwadrat. Do wykazania zależności pomiędzy zmiennymi ciągłymi wykorzystano współczynniki korelacji Pearsona i Spearmana.



## Wyniki

Grupa pacjentów z alergią na jad osy (A) nie różniła się pod względem cech demograficznych, profilu ciężkości HVA oraz stężenia sIgE od grupy referencyjnej. Wśród pacjentów grupy A większość pacjentów prezentowała po użądleniu IgE-zależną reakcję alergiczną zagrażającą życiu (bez zajęcia układu krążenia tj. reakcję III stopnia 45.05% i reakcję z zajęciem układu krążenia tj. IV stopnia 48.35%).

U 89.1% pacjentów tej grupy, obok uczulenia na ekstrakt jadu osy za pomocą testu IDT i/lub sIgE wykazano uczulenie na co najmniej jedną z molekuł jadu osy: Ves v 1 i/lub Ves v 5, a u 10.99% na żadną z nich (punkt odcięcia wyniku dodatniego 0.35 kU/l. Zastosowanie progu detekcji 0.1 kU/l obniżyło odsetek ujemnych wyników sIgE na co najmniej jedną z molekuł do 2.19% badanych. Co więcej u pacjentów z niskimi (0.1-0.35 kU/l) stężeniami sIgE przeciwko molekułom jadu osy stwierdzano niższe stężenia cIgE ( $p = 0.0007$ ).

Analiza zgodności wyników dodatnich oznaczeń sIgE w surowicy wobec ekstraktu i wobec co najmniej jednej molekule, Ves v1 lub Ves v 5, wykazała, że u 9.89% badanych w surowicy nie występują przeciwciała sIgE przeciwko ekstraktowi jadu, ale występują przeciwko Ves v 1 i/lub Ves v 5. U 6.69% pacjentów grupy A, wykazano obecność sIgE tylko przy pomocy testów skórnych podczas gdy w surowicy nie występowały sIgE ani przeciwko ekstraktowi jadu ani przeciwko badanym molekułom (wyniki dla punktu odcięcia wyniku dodatniego 0.35 kU/l).

W grupie chorych na jad osy wykazano, że niższe stężenia sIgE-Ves v 5 mogą wiązać się z cięższym przebiegiem reakcji alergicznej ( $p = 0.048$ ) charakteryzującym się objawami ze strony układu krążenia (SYS IV<sup>o</sup>). Dodatkowo w tej grupie pacjentów wykazano znamienne wyższe stężenia tryptazy w surowicy (SYS

I°+II°+III° vs SYS IV°;  $p = 0.02$ ). Nie wykazano natomiast zależności między profilem uczuleń na alergeny główne jadu osy a przebiegiem VIT.

Grupa pacjentów z alergią na jad pszczoły (grupa B) nie różniła się pod względem cech demograficznych, profilu ciężkości HVA oraz stężenia sIgE od grupy referencyjnej. Wśród pacjentów grupy B większość pacjentów prezentowała po użądleniu IgE-zależną reakcję alergiczną zagrażającą życiu (bez zajęcia układu krążenia tj. reakcję III° 43.75%, a reakcję z zajęciem układu krążenia 46.88%).

W grupie pacjentów grupy, z alergią IgE-zależną na jad pszczoły, u 82.61% stwierdzono uczulenie na co najmniej jedną molekułę z badanego panelu tj. Api m 1, 2, 3, 5, lub 10. Najczęściej stwierdzano obecność przeciwciał przeciwko Api m 1 (60.94%) i Api m 10 (58.7%). W tej grupie chorych u 17.39% pacjentów uczulonych na ekstrakt jadu pszczoły nie wykazano uczulenia na żadną z oznaczanych molekuł (punkt odcięcia 0.35 kU/l), obniżenie punktu odcięcia dodatniego testy do 0.1kU/l obniżyło odsetek do pacjentów z ujemnym wynikiem sIgE przeciwko co najmniej jednej z badanych molekuł do 10.87%.

Analiza zgodności wyników dodatnich oznaczeń sIgE w surowicy wobec ekstraktu i wobec co najmniej jednej molekuły, wykazała u 8,7% badanych uczulenie na ekstrakt jadu, podczas gdy nie wykazano uczulenia na żadną z oznaczanych molekuł. U 4.35% badanych wykazano obecność uczulenia przeciwko co najmniej jednej z badanych molekuł, ale nie wykazano uczulenia na ekstrakt jadu.

Ponadto wykazano wyższe stężenia sIgE-Api m 5 u pacjentów z cięższym przebiegiem reakcji systemowej po użądleniu ( $p = 0.03$ ) oraz z częstszymi powikłaniami podczas fazy wstępnej immunoterapii prowadzonej wg schematu UR ( $p < 0.05$ ). Częstsze powikłania w tej fazie immunoterapii odnotowano również u chorych z wyższym stężeniem sIgE-Api m 1 ( $p = 0.009$ ). Po 6 miesiącach immunoterapii stwierdzano trend do niższych wartości sIgE-Api m 1 ( $p = 0.06$ ).

Pacjenci z alergią na jad pszczoły i powikłaniami podczas VIT-UR mieli wyższe stężenie tryptazy  $8.51 \pm 5.62$  vs  $5.55 \pm 3.42$   $p = 0.019$  niż pacjenci z niepowikłanym VIT-UR.

## **Wnioski**

1. Diagnostyka molekularna alergii na jad owadów stanowi cenne uzupełnienie, ale nie zastępuje klasycznych metod diagnostycznych opartych o testy skórne z ekstraktem, testy serologiczne z ekstraktem i ocenę cIgE.
2. W diagnostyce alergii na jad owadów zasadne jest obniżenie progu odcięcia wyniku dodatniego do 0.1 kU/l szczególnie przydatne w grupie pacjentów z alergią na jad owadów i niskimi stężeniami cIgE w surowicy.
3. Oznaczenie stężenie sIgE-Api m 5 może być czynnikiem prognostycznym reakcji systemowej z zajęciem układu krążenia.
4. Oznaczenie stężenia sIgE-Api m 1 i sIgE- Api m 5 mogą być pomocne przy prognozowaniu występowania powikłań podczas VIT-UR.
5. Złożoność profili uczuleń molekularnych na jad pszczoły może mieć związek z gorszą skutecznością immunoterapii jadem pszczoły niż jadem osy.
6. Podwyższone stężenie tryptazy w surowicy zwiększa ryzyko powikłań podczas VIT-UR jadem pszczoły.

## **Summary**

### **Introduction**

Hymenoptera venom (HVA) allergy is the most common cause of anaphylaxis in adults. The picture of an allergic reaction after a sting includes local reactions, mild systemic reactions and severe anaphylactic reactions which, in extreme cases, may lead to the death of an allergic person. The only effective method of

preventing a severe anaphylactic reaction is venom immunotherapy (VIT). Before starting VIT, it is necessary to confirm the allergy to the venom in the IgE-dependent mechanism. For this skin tests with insect venom extract are performed and the sIgE is determined against wasp and bee venom extracts. In most cases, these tests are sufficient to confirm wasp and bee venom allergy, however, in a small group of patients, despite the diagnostics, it is not possible to clearly confirm the insect due to lack of antibodies to the wasp and bee venom extract or the presence of antibodies to both venoms. Component diagnostics in such cases is a valuable supplement to traditional diagnostic methods using venom extract. The second known application of CRD is the selection of venom for immunotherapy in people with "double allergy", i.e. allergic to both venoms

The availability of modern methods of molecular diagnostics in allergy and particularly allergy to insect venoms raises the question of their rational use and the possibility of replacing traditional methods such as intradermal tests or serological tests with venom allergen extract.

Additionally, other areas of application of CRD are being considered, i.e usefulness of CRD in identifying patients at increased risk of adverse reactions during VIT.

Another potential benefit of CRD may be its usefulness in typing the profile of patients, especially among those allergic to bee venom, predicting success or failure of classical venom immunotherapy.

The presented work presents the role of component diagnostics in the diagnosis of venom allergy and in the safety of venom immunotherapy.

## **Objectives**

The main aim of the study was to assess the usefulness of component diagnostics in qualifying and monitoring immunotherapy with Hymenoptera venom. The next objectives of the study were to assess the profiles of insect venom allergies and

their relationship to the severity of the post-stinging reaction, as well as the safety and effectiveness of immunotherapy.

### **Method and material**

The study group consisted of 167 patients with HVA qualified for immunotherapy with insect venom at the Department of Internal Diseases, Pneumology and Allergology. The reference group consisted of 816 patients with HVA who underwent allergen immunotherapy (VIT) in 2012-2018. Qualification for VIT in both groups was carried out in accordance with the EAACI criteria and using the same protocol.

167 Patients from the study group were divided into 3 subgroups: A (N = 91 with wasp venom allergy and VIT- qualified wasp venom, aged 11 to 74), B (N = 58 with bee venom allergy and bee venom qualified for VIT aged 13 to 71) and C (N = 12 with allergy to both venoms and qualified for VIT with two venoms). In patients qualified for immunotherapy with wasp venom, apart from the IDT assessment, and sIgE against the venom extract, sIgE was additionally determined against the main wasp venom molecules: Ves v 1 and Ves v 5, while in the group of patients allergic to bee venom, sIgE was additionally determined against: Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 and Api m 10 bee venom molecules. Serum tryptase concentration was determined in both groups. In some bee venom allergic patients, sIgE was also determined against the venom molecules after at least 6 months of VIT. The ELISA method was used to assess the concentration of sIgE in the serum against the venom extracts (sIgE), the ImmunoCAP System method against the wasp and bee venom molecules and the serum tryptase concentration.

In the induction phase, venom immunotherapy was carried out using the "ultra-rush" method according to the Mueller protocol, reaching a total dose of 111.1 mcg of venom within 3.5 hours. In the induction phase, Pharmedgen (Alk Abello) wasp venom and bee venom were used. Treatment during the maintenance phase

was carried out according to the protocol of EAACI and the vaccine manufactured Alutard Alk Abello.

The information was collected in the form of a database which was statistically analyzed using the STATISTICA12 software. The following tests were used to analyze the variables: Shapiro-Wilk, t-student, U Mann-Whitney and Chi square. Pearson's and Spearman's correlation coefficients were used to demonstrate the relationship between continuous variables.

## **Results**

The group of patients with wasp venom allergy (A) did not differ from the reference group in terms of demographic characteristics, HVA severity profile and sIgE concentration. Among patients in group A, the majority of patients presented with an IgE-mediated life-threatening allergic reaction (without cardiovascular involvement,: III<sup>o</sup> reaction 45.05% and reaction with cardiovascular involvement : IV<sup>o</sup> 48.35%).

In 89.1% of patients in this group, apart from being allergic to wasp venom extract using the IDT and / or sIgE test, allergy to at least one of the wasp venom molecules: Ves v 1 and / or Ves v 5 was shown, and in 10.99% to none of them (the positive cut-off point of 0.35 kU /l). The use of a detection threshold of 0.1 kU/l lowered the percentage of negative ssIgE results on at least one of the molecules to 2.19%. Moreover, in patients with low (0.1-0.35 kU/l) concentrations of sIgE against the molecules wasp venom lower concentrations of cIgE were found ( $p = 0.0007$ ).

Analysis of positive serum sIgE results against the extract and against at least one molecule, Ves v1 or Ves v 5, showed that 9.89% of the subjects had no sIgE antibodies against the venom extract, but had against Ves v 1 and / or Ves v 5. In 6.69% of patients in group A, sIgE was demonstrated only by skin tests, while

serum sIgE was neither against the venom extract nor against the tested molecules (0.35 kU/l positive cut-off results).

In the group of patients with wasp venom, it was shown that lower concentrations of sIgE-Ves v 5 may be associated with a more severe course of an allergic reaction ( $p = 0.048$ ) characterized by symptoms from the circulatory system (SYS IV°). Additionally, in this group of patients, significantly higher serum tryptase levels were found (SYS I° + II° + III° vs SYS IV°;  $p = 0.02$ ). However, no correlation was found between the profile of sensitization to the main allergens of wasp venom and the course of VIT.

The group of patients with bee venom allergy (group B) did not differ from the reference group in terms of demographic characteristics, HVA severity profile and sIgE concentration. In group B patients, the majority of patients presented with an IgE-mediated life-threatening allergic reaction (no cardiovascular involvement, III° reaction of 43.75%, and a reaction with cardiovascular involvement 46.88%).

In the group of patients with an IgE-dependent allergy to bee venom, 82.61% were allergic to at least one molecule from the examined panel; Api m 1, 2, 3, 5, or 10. The presence of antibodies against Api m 1 was the most common (60.94%) and Api m 10 (58.7%). In this group of patients, 17.39% of patients allergic to bee venom extract were not allergic to any of the tested molecules (cut-off point 0.35 kU/l), lowering the positive cut-off point to 0.1 kU/l reduced the percentage of patients with negative sIgE results up to 10.87%.

The analysis of sIgE concentration in the serum for the extract and for at least one molecule, showed in 8.7% of the respondents allergy to the venom extract, while no allergy to any of the analyzed molecules was shown. 4.35% of the examined showed the presence of allergy to at least one of the molecules tested, but no allergy to the venom extract was found.

Moreover, higher levels of sIgE-Api m 5 were found in patients with more severe course of systemic reaction after stinging ( $p = 0.03$ ) and more frequent complications during the initial phase of immunotherapy according to the UR regimen ( $p < 0.05$ ). More frequent complications in this phase of immunotherapy were also noted in patients with higher levels of sIgE-Api m 1 ( $p = 0.009$ ). After 6 months of immunotherapy, there was a trend towards lower sIgE-Api m 1 values ( $p = 0.06$ ).

Patients with bee venom allergy and complications during VIT-UR had higher tryptase levels  $8.51 \pm 5.62$  vs  $5.55 \pm 3.42$   $p = 0.019$  than patients with uncomplicated VIT-UR.

### **Conclusions**

1. Molecular diagnostics of insect venom allergy is a valuable supplement, but not a substitute for classic diagnostic methods based on skin tests with the extract, serological tests with the extract and cIgE assessment.
2. In the diagnosis of insect venom allergy, it is reasonable to lower the positive cut-off threshold to 0.1kU/l, especially useful in the group of patients with insect venom allergy and low serum levels of cIgE.
3. Determination of the concentration of sIgE-Api m 5 may be a prognostic factor of a systemic reaction with cardiovascular involvement.
4. Determination of sIgE-Api m 1 and sIgE-Api m 5 concentrations may be helpful in predicting the occurrence of complications during VIT-UR.
5. The complexity of the molecular sensitization profiles to bee venom may be related to the lower effectiveness of bee venom immunotherapy vs wasp venom immunotherapy.
6. Increased serum tryptase concentration increases the risk of complications during VIT-UR with bee venom.



Piśmiennictwo:

1. Worm M, Eckermann O, Dölle S, Aberer W, Beyer K, Hawranek T, Hompes S, Koehli A, Mahler V, Nemat K, Niggemann B, Pföhler C, Rabe U, Reissig A, Rietschel E, Scherer K, Treudler R, Ruëff F. Triggers and treatment of anaphylaxis: An analysis of 4000 cases from Germany, Austria and Switzerland. *Dtsch Arztebl Int* 2014;111:367–375.
2. Francuzik W, Ruëff F, Bauer A, Bilò MB, Cardona V, Christoff G, Dölle-Bierke S, Ensina L, Fernández Rivas M, Hawranek T, O’B Hourihane J, Jakob T, Papadopoulos NG, Pföhler C, Poziomkowska-Gęsicka I, Brempt X Van der, Scherer Hofmeier K, Treudler R, Wagner N, Wedi B, Worm M. Phenotype and risk factors of venom-induced anaphylaxis: A case-control study of the European Anaphylaxis Registry. *J Allergy Clin Immunol* 2020;in press.
3. Antonicelli L, Bilò MB, Bonifazi F. Epidemiology of hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2:341–346.
4. Graif Y, Romano-Zelekha O, Livne I, Green MS, Shohat T. Allergic reactions to insect stings: results from a national survey of 10,000 junior high school children in Israel. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1435–1439.
5. Richter AG, Nightingale P, Huissoon AP, Krishna MT. Risk factors for systemic reactions to bee venom in British beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;106:159–163.
6. Navarro LA, Peláez A, La Torre F De, Burillo JMT, Megías J, Martínez I. Epidemiological factors on Hymenoptera venom allergy in a Spanish adult population. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004;14:134–141.
7. Stritzke AI, Eng PA. Age-dependent sting recurrence and outcome in

- immunotherapy-treated children with anaphylaxis to Hymenoptera venom. *Clin Exp Allergy* 2013;43:950–955.
8. Jennings A, Duggan E, Perry IJ, Hourihane JOB. Epidemiology of allergic reactions to hymenoptera stings in Irish school children. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:1166–1170.
  9. Fernandez J, Soriano V, Mayorga L, Mayor M. Natural history of Hymenoptera venom allergy in Eastern Spain. *Clin Exp Allergy* 2005;35:179–185.
  10. Onbaşı K, Onbaşı O, Eminbeyli L, Kaynak C. Prevalence and alternative therapy methods for bee and wasp allergy in Van. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2008;63:246–247.
  11. Bilò MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: Clinical implications. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1467–1476.
  12. Nittner-Marszalska M, Liebhart J, Liebhart E, Dor A, Dobek R, Obojski A, Mędrala W. Prevalence of Hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland. *Med Sci Monit* 2004;10:324–329.
  13. Bilò BM, Bonifazi F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:330–337.
  14. McGain F, Harrison J, Winkel KD. Wasp sting mortality in Australia. *Med J Aust* 2000;173:198–200.
  15. Müller UR. Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:343–347.
  16. Bonadonna P, Bonifacio M, Lombardo C, Zanotti R. Hymenoptera Anaphylaxis and C-kit Mutations: An Unexpected Association. *Curr*

- Allergy Asthma Rep* 2015;15:1–8.
17. Brockow K, Jofer C, Behrendt H, Ring J. Anaphylaxis in patients with mastocytosis: A study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2008;63:226–232.
  18. Haerberli G, Brönnimann M, Hunziker T, Müller U. Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: Relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1216–1220.
  19. Ruëff F, Vos B, Oude Elberink J, Bender A, Chatelain R, Dugas-Breit S, Horny H-P, Küchenhoff H, Linhardt A, Mastnik S, Sotlar K, Stretz E, Vollrath R, Przybilla B, Flaig M. Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2014;44:736–746.
  20. Vos BJPR, Anrooij B van, Doormaal JJ van, Dubois AEJ, Oude Elberink JNG. Fatal Anaphylaxis to Yellow Jacket Stings in Mastocytosis: Options for Identification and Treatment of At-Risk Patients. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017;5:1264–1271.
  21. Sturm GJ, Kranzelbinder B, Schuster C, Sturm EM, Bokanovic D, Vollmann J, Crailsheim K, Hemmer W, Aberer W. Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1635-43.e1.
  22. Golden DBK, Kelly D, Hamilton RG, Craig TJ. Venom immunotherapy reduces large local reactions to insect stings. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1371–1375.
  23. Bilò MB, Martini M, Pravettoni V, Bignardi D, Bonadonna P, Cortellini G, Kosinska M, Macchia D, Mauro M, Meucci E, Nittner-Marszalska M, Patella V, Pio R, Quercia O, Reccardini F, Ridolo E, Rudenko M, Severino M. Large local reactions to Hymenoptera stings: Outcome of re-stings in

- real life. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2019;74:1969–1976.
24. Cichocka-Jarosz E, Brzyski P, Tarczoń I, Jedynak-Wąsowicz U, Tomasik T, Lis G. Quality of life in parents of children and adolescents after systemic sting reactions. *Ann Agric Environ Med* 2019;26:315–321.
  25. Oude Elberink JNG, Dubois AEJ. Quality of life in insect venom allergic patients. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:287–293.
  26. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma* 1966;3:331–333.
  27. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* 1977;309:466–469.
  28. Muraro A, Roberts G, Worm M, Bilò MB, Brockow K, Fernández Rivas M, Santos AF, Zolkipli ZQ, Bellou A, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Cardona V, Clark AT, Demoly P, Dubois AEJ, Dunngalvin A, Eigenmann P, Halken S, Harada L, Lack G, Jutel M, Niggemann B, Ruëff F, Timmermans F, Vlieg-Boerstra BJ, Werfel T, Dhimi S, Panesar S, Akdis CA, Sheikh A. Anaphylaxis: Guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2014;69:1026–1045.
  29. Sicherer SH, Leung DYM. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2014. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:357–367.
  30. Stoevesandt J, Hain J, Kerstan A, Trautmann A. Over- and underestimated parameters in severe Hymenoptera venom-induced anaphylaxis: Cardiovascular medication and absence of urticaria/angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:698-704.e1.
  31. Niedoszytko M, Bonadonna P, Elberink JNGO, Golden DBK.

- Epidemiology, diagnosis, and treatment of Hymenoptera venom allergy in mastocytosis patients. *Immunol Allergy Clin North Am* 2014;34:365–381.
32. Golden DBK, Demain J, Freeman T, Graft D, Tankersley M, Tracy J, Blessing-Moore J, Bernstein D, Dinakar C, Greenhawt M, Khan D, Lang D, Nicklas R, Oppenheimer J, Portnoy J, Randolph C, Schuller D, Wallace D. Stinging insect hypersensitivity: A practice parameter update 2016. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017;118:28–54.
  33. Górska A, Niedoszytko M, Lange M, Chełmińska M, Nedoszytko B, Wasąg B, Słomiński JM, Gruchała-Niedoszytko M, Nowicki R, Jassem E. Risk factors for anaphylaxis in patients with mastocytosis. *Pol Arch Med Wewn* 2015;125:46–53.
  34. Muñoz-Cano RM, Bartra J, Picado C, Valero A. Mechanisms of anaphylaxis beyond IgE. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2016;26:73–82.
  35. Nassiri M, Babina M, Dölle S, Edenharter G, Ruëff F, Worm M. Ramipril and metoprolol intake aggravate human and murine anaphylaxis: evidence for direct mast cell priming. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:491–499.
  36. Wölbing F, Fischer J, Köberle M, Kaesler S, Biedermann T. About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy* 2013;68:1085–1092.
  37. Nittner-Marszalska M, Liebhart J, Dor-Wojnarowska A. Sex-related clinical aspects in insect venom anaphylaxis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2015;28:187–193.
  38. Hoffman DR, Jacobson RS. Allergens in hymenoptera venom. XII: How much protein is in a sting. *Ann Allergy* 1984;52:276–278.
  39. Schumacher MJ, Tveten MS, Egen NB. Rate and quantity of delivery of venom from honeybee stings. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:831–835.

40. Müller UR. Hymenoptera venom proteins and peptides for diagnosis and treatment of venom allergic patients. *Inflamm Allergy - Drug Targets* 2011;10:420–428.
41. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1226–1234.
42. Spillner E, Blank S, Jakob T. Hymenoptera allergens: From venom to ‘venome’. *Front Immunol* 2014;5:77.
43. Vaerenbergh M Van, Debyser G, Devreese B, Graaf DC de. Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *J Proteomics* 2014;99:169–178.
44. Vaerenbergh M Van, Smet L De, Rafei-Shamsabadi D, Blank S, Spillner E, Ebo DG, Devreese B, Jakob T, Graaf DC de. IgE recognition of chimeric isoforms of the honeybee (*Apis mellifera*) venom allergen Api m 10 evaluated by protein array technology. *Mol Immunol* 2015;63:449–455.
45. King TP, Lu G, Agosto H. Antibody responses to bee melittin (Api m 4) and hornet antigen 5 (Dol m 5) in mice treated with the dominant T-cell epitope peptides. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:397–403.
46. Köhler J, Blank S, Müller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, Lidholm J, Spillner E, Jakob T. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133.
47. Elieh Ali Komi D, Shafaghat F, Zwiener RD. Immunology of Bee Venom. *Clin Rev Allergy Immunol* 2018;54:386–396.
48. Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to insect venom allergens: role of

- molecular diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015;15:26.
49. Blank S, Bantleon FI, McIntyre M, Ollert M, Spillner E. The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity. *Clin Exp Allergy* 2012;42:976–985.
  50. Blank S, Seismann H, McIntyre M, Ollert M, Wolf S, Bantleon FI, Spillner E. Vitellogenins Are New High Molecular Weight Components and Allergens (Api m 12 and Ves v 6) of *Apis mellifera* and *Vespa vulgaris* Venom. *PLoS One* 2013;8:e62009.
  51. Frick M, Müller S, Bantleon F, Huss-Marp J, Lidholm J, Spillner E, Jakob T. RApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket venom. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2015;70:1665–1668.
  52. Müller UR. Insect sting allergy : clinical picture, diagnosis, and treatment. 1990.
  53. Müller U, Schmid-Grendelmeier P, Hausmann O, Helbling A. IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. *Allergy* 2012;67:1069–1073.
  54. Sturm GJ, Hemmer W, Hawranek T, Lang R, Ollert M, Spillner E, Blank S, Bokanovic D, Aberer W. Detection of IgE to recombinant Api m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:247–248; author reply 248.
  55. Jakob T, Köhler J, Blank S, Magnusson U, Huss-Marp J, Spillner E, Lidholm J. Comparable IgE reactivity to natural and recombinant Api m 1 in cross-reactive carbohydrate determinant-negative patients with bee

- venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:276–278.
56. Korošec P, Žiberna K, Šilar M, Dežman M, Čelesnik Smodiš N, Rijavec M, Kopač P, Eržen R, Lalek N, Bajrović N, Košnik M, Zidarn M. 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.
  57. Grunwald T, Bockisch B, Spillner E, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW. Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:848–854.
  58. Frick M, Fischer J, Helbling A, Ruëff F, Wieczorek D, Ollert M, Pfützner W, Müller S, Huss-Marp J, Dorn B, Biedermann T, Lidholm J, Ruecker G, Bantleon F, Mieke M, Spillner E, Jakob T. Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1663-1671.e9.
  59. 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;66:1322–1329.
  60. Paull BR, Yunginger JW, Gleich GJ. Melittin: an allergen of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1977;59:334–338.
  61. Ruiz B, Serrano P, Verdú M, Moreno C. Sensitization to Api m 1, Api m 2, and Api m 4: Association with safety of bee venom immunotherapy. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2015;114:350–352.
  62. Ruiz B, Serrano P, Moreno C. IgE-Api m 4 is useful for identifying a particular phenotype of bee venom allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2016;26:355–361.



63. Kettner A, Hughes GJ, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, Corradin G. Api m 6: A new bee venom allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:914–920.
64. Michel Y, McIntyre M, Ginglinger H, Ollert M, Cifuentes L, Blank S, Spillner E. The putative serine protease inhibitor Api m 6 from *Apis mellifera* venom: recombinant and structural evaluation. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012;22:476–484.
65. Kemeny DM, Dalton N, Lawrence AJ, Pearce FL, Vernon CA. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *Eur J Biochem* 1984;139:217–223.
66. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:99–106.
67. Blank S, Seismann H, Bockisch B, Braren I, Cifuentes L, McIntyre M, Rühl D, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW, Grunwald T, Spillner E. Identification, Recombinant Expression, and Characterization of the 100 kDa High Molecular Weight Hymenoptera Venom Allergens Api m 5 and Ves v 3. *J Immunol* 2010;184:5403–5413.
68. Winningham KM, Fitch CD, Schmidt M, Hoffman DR. Hymenoptera venom protease allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:928–933.
69. Benton AW, Morse RA, Stewart JD. Venom collection from honey bees. *Science (80- )* 1963;142:228–230.
70. Seppälä U, Selby D, Monsalve R, King TP, Ebner C, Roepstorff P, Bohle B. Structural and immunological characterization of the N-glycans from the major yellow jacket allergen Ves v 2: the N-glycan structures are needed for the human antibody recognition. *Mol Immunol* 2009;46:2014–2021.

71. Skov LK, Seppälä U, Coen JJF, Crickmore N, King TP, Monsalve R, Kastrup JS, Spangfort MD, Gajhede M. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Å resolution: Structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 2006;62:595–604.
72. Ebo DG, Faber M, Sabato V, Leysen J, Bridts CH, Clerck LS De. Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy. *Clin Exp Allergy* 2013;43:255–261.
73. Vos B, Köhler J, Müller S, Stretz E, Ruëff F, Jakob T. Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to *Vespula* venom. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1225-1227.e1.
74. Monsalve RI, Vega A, Marqués L, Miranda A, Fernández J, Soriano V, Cruz S, Domínguez-Noche C, Sánchez-Morillas L, Armisen-Gil M, Guspí R, Barber D. Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization. *Allergy* 2012;67:528–536.
75. Nittner-Marszalska M, Bodzenta-Łukaszyk A, Mediton Oficyna Wydawnicza. Alergia na owady : praca zbiorowa. Mediton Oficyna Wydawnicza; 2016.
76. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Insect sting allergy with negative venom skin test responses. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:897–901.
77. Kruszewski J, Kowalski ML, Wydawnictwo Medycyna Praktyczna., Polskie Towarzystwo Alergologiczne. Standardy w alergologii : stanowiska panelów eksperckich Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. Cz. 1. Medycyna Praktyczna; 2010.
78. Cichocka-Jarosz E, Stobiecki M, Brzyski P, Rogatko I, Nittner-Marszalska M, Sztefko K, Czarnobilska E, Lis G, Nowak-Węgrzyn A. Simplification

- of intradermal skin testing in Hymenoptera venom allergic children. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2017;118:326–332.
79. Blum S, Gunzinger A, Müller UR, Helbling A. Influence of total and specific IgE, serum tryptase, and age on severity of allergic reactions to Hymenoptera stings. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2011;66:222–228.
  80. 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.
  81. Korosec P, Erzen R, Silar M, Bajrovic N, Kopac P, Kosnik M. 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.
  82. Leimgruber A, Lantin JP, Frei PC. Comparison of two in vitro assays, RAST and CAP, when applied to the diagnosis of anaphylactic reactions to honeybee or yellow jacket venoms. Correlation with history and skin tests. *Allergy* 1993;48:415–420.
  83. Müller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy* 2009;64:543–548.
  84. Jakob T, Rafei-Shamsabadi D, Spillner E, Müller S. Diagnostik der Hymenopteren-giftallergie: Aktuelle Konzepte und Entwicklungen mit besonderem Fokus auf die molekulare Allergiediagnostik. *Allergo J* 2017;26:33–48.
  85. Jin C, Focke M, Léonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W.

- Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:184-90.e1.
86. Seismann H, Blank S, Braren I, Greunke K, Cifuentes L, Grunwald T, Bredehorst R, Ollert M, Spillner E. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. *Mol Immunol* 2010;47:799–808.
87. Aalberse RC, Koshte V, Clemens JG. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol* 1981;68:356–364.
88. Brehler R, Grundmann S, Stöcker B. Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13:360–364.
89. Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, Burow G, Hübsch-Müller C, Enk A. In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006;61:1220–1229.
90. Blank S, Neu C, Hasche D, Bantleon FI, Jakob T, Spillner E. Polistes species venom is devoid of carbohydrate-based cross-reactivity and allows interference-free diagnostics. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1239–1242.
91. Mikkelsen S, Bibby BM, Dolberg MKB, Dahl R, Hoffmann HJ. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin Mol Allergy* 2010;8:8–12.
92. Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: Sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2004;59:1102–1109.

93. Kosnik M, Korosec P. Importance of basophil activation testing in insect venom allergy. *Allergy, Asthma Clin Immunol* 2009;5.
94. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Clerck LS De, Stevens WJ. Hymenoptera venom allergy: Taking the sting out of difficult cases. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:357–360.
95. 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;161:363–368.
96. Bonadonna P, Scaffidi L, Boni E. Tryptase values in anaphylaxis and insect allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2019;19:462–467.
97. Bonadonna P, Lombardo C, Zanotti R. Mastocytosis and allergic diseases. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2014;24:288–297.
98. Labella M, Garcia-Neuer M, Castells M. Application of precision medicine to the treatment of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2018;18:190–197.
99. Kabashima K, Nakashima C, Nonomura Y, Otsuka A, Cardamone C, Parente R, Feo G De, Triggiani M. Biomarkers for evaluation of mast cell and basophil activation. *Immunol Rev* 2018;282:114–120.
100. Sala-Cunill A, Guilarte M, Cardona V. Phenotypes, endotypes and biomarkers in anaphylaxis: current insights. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2018;18:370–376.
101. Valent P, Akin C, Arock M, Brockow K, Butterfield JH, Carter MC, Castells M, Escribano L, Hartmann K, Lieberman P, Nedoszytko B, Orfao A, Schwartz LB, Sotlar K, Sperr WR, Triggiani M, Valenta R, Horny HP,

- Metcalf DD. Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: A consensus proposal. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157:215–225.
102. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase Levels as an Indicator of Mast-Cell Activation in Systemic Anaphylaxis and Mastocytosis. *N Engl J Med* 1987;316:1622–1626.
103. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood* 2017;129:1420–1427.
104. Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, Caruso B, Colarossi S, Dal Fior D, Castellani L, Bonetto C, Frattini F, Dama A, Martinelli G, Chilosi M, Senna G, Pizzolo G, Zanotti R. Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:680–686.
105. Farioli L, Losappio LM, Schroeder JW, Preziosi D, Scibilia J, Caron L, Nichelatti M, Pastorello EA. Basal tryptase levels can predict clinical severity in hymenoptera venom anaphylaxis and ischemic cardiovascular disorders. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2019;29:162–164.
106. Bonadonna P, Scaffidi L. Hymenoptera Anaphylaxis as a Clonal Mast Cell Disorder. *Immunol Allergy Clin North Am* 2018;38:455–468.
107. Biló BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JNG, Birnbaum J, Bucher C, Forster J, Hemmer W, Incorvaia C, Kontou-Fili K, Gawlik R, Muller U, Fernandez J, Jarish R, Jutel M, Wuthrich B. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2005;60:1339–1349.
108. González De Olano D, La Hoz Caballer B De, Núñez López R, Sánchez Muñoz L, Cuevas Agustín M, Diéguez MC, Álvarez Twose I, Castells

- MC, Escribano Mora L. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: A study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy* 2007;37:1547–1555.
109. Pieri L, Bonadonna P, Elena C, Papayannidis C, Grifoni FI, Rondoni M, Girlanda S, Mauro M, Magliacane D, Elli EM, Iorno ML, Almerigogna F, Scarfi F, Salerno R, Fanelli T, Gesullo F, Corbizi Fattori G, Bonifacio M, Perbellini O, Artuso A, Soverini S, Benedittis C De, Muratori S, Pravettoni V, Cova V, Cortellini G, Ciceri F, Cortelezzi A, Martinelli G, Triggiani M, et al. Clinical presentation and management practice of systemic mastocytosis. A survey on 460 Italian patients. *Am J Hematol* 2016;91:692–699.
110. Niedoszytko M, Monchy J de, Doormaal JJ van, Jassem E, Oude Elberink JNG. Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy* 2009;64:1237–1245.
111. Bonadonna P, Gonzalez-de-Olano D, Zanotti R, Riccio A, Ferrari L De, Lombardo C, Rogkakou A, Escribano L, Alvarez-Twose I, Matito A, Vega A, Passalacqua G. Venom immunotherapy in patients with clonal mast cell disorders: efficacy, safety, and practical considerations. *J allergy Clin Immunol Pract* 1:474–478.
112. Stoevesandt J, Hosp C, Kerstan A, Trautmann A. Hymenoptera venom immunotherapy while maintaining cardiovascular medication: Safe and effective. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2015;114:411–416.
113. Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, Antolín-Amérigo D, Cichocka-Jarosz E, Gawlik R, Jakob T, Kosnik M, Lange J, Mingomataj E, Mitsias DI, Ollert M, Oude Elberink JNG, Pfaar O, Pitsios C, Pravettoni V, Ruëff F, Sin BA, Agache I, Angier E, Arasi S,

- Calderón MA, Fernandez-Rivas M, Halcken S, Jutel M, Lau S, Pajno GB, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2018;73:744–764.
114. Golden DBK, 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;351:668–674.
115. Reisman RE. Duration of venom immunotherapy: relationship to the severity of symptoms of initial insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:831–836.
116. Keating MU, Kagey-Sobotka A, Hamilton RG, Yunginger JW. Clinical and immunologic follow-up of patients who stop venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:339–348.
117. Müller U, Berchtold E, Helbling A. Honeybee venom allergy: results of a sting challenge 1 year after stopping successful venom immunotherapy in 86 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:702–709.
118. Halteren HK van, Linden PW van der, Burgers SA, Bartelink AK. Hymenoptera sting challenge of 348 patients: relation to subsequent field stings. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1058–1063.
119. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Seitz MJ, Aberer W, Bodzenta-Lukaszyk A, Bonifazi F, Campi P, Darsow U, Haeberli G, Hawranek T, Küchenhoff H, Lang R, Quercia O, Reider N, Schmid-Grendelmeier P, Severino M, Sturm GJ, Treudler R, Wüthrich B. Clinical Effectiveness of Hymenoptera Venom Immunotherapy: A Prospective Observational Multicenter Study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *PLoS One* 2013;8.
120. Ruëff F, Wolf H, Schnitker J, Ring J, Przybilla B. Specific immunotherapy



- in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy* 2004;59:589–595.
121. Pitsios C, Demoly P, Bilò MB, Gerth Van Wijk R, Pfaar O, Sturm GJ, Rodriguez Del Rio P, Tsoumani M, Gawlik R, Paraskevopoulos G, Ruëff F, Valovirta E, Papadopoulos NG, Calderõn MA. Clinical contraindications to allergen immunotherapy: An EAACI position paper. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2015;70:897–909.
  122. Zwan JC van der, Flinterman J, Jankowski IG, Kerckhaert JA. Hyposensitisation to wasp venom in six hours. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:1329–1331.
  123. Bernstein JA, Kagen SL, Bernstein DI, Bernstein IL. Rapid venom immunotherapy is safe for routine use in the treatment of patients with Hymenoptera anaphylaxis. *Ann Allergy* 1994;73:423–428.
  124. Birnbaum J, Charpin D, Vervloet D. Rapid Hymenoptera venom immunotherapy: comparative safety of three protocols. *Clin Exp Allergy* 1993;23:226–230.
  125. Roll A, Hofbauer G, Ballmer-Weber BK, Schmid-Grendelmeier P. Safety of specific immunotherapy using a four-hour ultra-rush induction scheme in bee and wasp allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:79–85.
  126. Ruëff F, Wenderoth A, Przybilla B. Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:1027–1032.
  127. Bousquet J, Ménardo JL, Velasquez G, Michel FB. Systemic reactions during maintenance immunotherapy with honey bee venom. *Ann Allergy* 1988;61:63–68.

128. Ruëff F, Przybilla B. Venom immunotherapy: Adverse reactions and treatment failure. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:307–311.
129. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, Birnbaum J, Bodzenta-Lukaszyk A, Bonifazi F, Bucher C, Campi P, Darsow U, Egger C, Haeberli G, Hawranek T, Kucharewicz I, Küchenhoff H, Lang R, Quercia O, Reider N, Severino M, Sticherling M, Sturm GJ, Wüthrich B, European Academy of Allergy and Clinical Immunology Interest Group. Predictors of side effects during the buildup phase of venom immunotherapy for Hymenoptera venom allergy: the importance of baseline serum tryptase. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:105-11.e5.
130. Mosbech H, Muller U. Side-effects of insect venom immunotherapy: Results from an EAACI multicenter study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2000;55:1005–1010.
131. Sturm G, Kränke B, Rudolph C, Aberer W. Rush Hymenoptera venom immunotherapy: a safe and practical protocol for high-risk patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:928–933.
132. Bonadonna P, Zanotti R, Caruso B, Castellani L, Perbellini O, Colarossi S, Chilosi M, Dama A, Schiappoli M, Pizzolo G, Senna G, Passalacqua G. Allergen specific immunotherapy is safe and effective in patients with systemic mastocytosis and Hymenoptera allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:256–257.
133. Müller UR, Haeberli G. Use of beta-blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:606–610.
134. Stoevesandt J, Hain J, Stolze I, Kerstan A, Trautmann A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors do not impair the safety of Hymenoptera venom immunotherapy build-up phase. *Clin Exp Allergy* 2014;44:747–755.

135. Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, Linhart B, Niederberger V, Swoboda I, Vrtala S. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu Rev Immunol* 2010;28:211–241.
136. Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S, Huss-Marp J, Jakob T. Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:265–267.
137. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Čelesnik N, Eržen R, Zidarn M, Košnik M. Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:671–673.
138. Schrautzer C, Bokanovic D, Hemmer W, Lang R, Hawranek T, Schwarz I, Aberer W, Sturm E, Sturm GJ. Sensitivity and specificity of Hymenoptera allergen components depend on the diagnostic assay employed. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1603–1605.
139. Šelb J, Kogovšek R, Šilar M, Košnik M, Korošec P. Improved recombinant Api m 1- and Ves v 5-based IgE testing to dissect bee and yellow jacket allergy and their correlation with the severity of the sting reaction. *Clin Exp Allergy* 2016;46:621–630.
140. Arzt L, Bokanovic D, Schrautzer C, Schwarz I, Laipold K, Aberer W, Sturm GJ. Questionable diagnostic benefit of the commercially available panel of bee venom components. *Allergy* 2017;72:1419–1422.
141. Frick M, Müller S, Bantleon F, Huss-Marp J, Lidholm J, Spillner E, Jakob T. RApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket venom. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2015;70:1665–1668.
142. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Čelesnik N, Šilar M, Zidarn M,

- Košnik M. High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1406–1408.
143. Seismann H, Blank S, Cifuentes L, Braren I, Bredehorst R, Grunwald T, Ollert M, Spillner E. Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity. *Clin Mol Allergy* 2010;8:7–13.
144. Bokanovic D, Schwarz I, Wutte N, Komericki P, Aberer W, Sturm GJ. Specificity of conventional and Ves v 5-spiked venom decreases with increasing total IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:739–741.
145. Müller U, Helbling A, Hunziker T, Wüthrich B, Péroud A, Gilardi S, Beretta E, Fasel J, Messerli W, Maurer P. Mastocytosis and atopy: a study of 33 patients with urticaria pigmentosa. *Allergy* 1990;45:597–603.
146. Potier A, Lavigne C, Chappard D, Verret JL, Chevailler A, Nicolie B, Drouet M. Cutaneous manifestations in Hymenoptera and Diptera anaphylaxis: relationship with basal serum tryptase. *Clin Exp Allergy* 2009;39:717–725.
147. Michel J, Brockow K, Darsow U, Ring J, Schmidt-Weber CB, Grunwald T, Blank S, Ollert M. Added sensitivity of component-resolved diagnosis in hymenoptera venom-allergic patients with elevated serum tryptase and/or mastocytosis. *Allergy* 2016;71:651–660.
148. Rafei-Shamsabadi D, Müller S, Pfützner W, Spillner E, Ruëff F, Jakob T. Recombinant allergens rarely allow identification of Hymenoptera venom-allergic patients with negative specific IgE to whole venom preparations. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:493–494.
149. Cifuentes L, Vosseler S, Blank S, Seismann H, Pennino D, Darsow U, Bredehorst R, Ring J, Mempel M, Spillner E, Ollert MW. Identification of

- Hymenoptera venom-allergic patients with negative specific IgE to venom extract by using recombinant allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:909–910.
150. Nittner-Marszalska M. Venom immunotherapy. *Alergol Pol - Polish J Allergol* 2018;5:85–93.
151. Blank S, Etzold S, Darsow U, Schiener M, Eberlein B, Russkamp D, Wolf S, Graessel A, Biedermann T, Ollert M, Schmidt-Weber CB. Component-resolved evaluation of the content of major allergens in therapeutic extracts for specific immunotherapy of honeybee venom allergy. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13:2482–2489.
152. Brockow K, Garvey LH, Aberer W, Atanaskovic-Markovic M, Barbaud A, Bilo MB, Bircher A, Blanca M, Bonadonna B, Campi P, Castro E, Cernadas JR, Chiriac AM, Demoly P, Grosber M, Gooi J, Lombardo C, Mertes PM, Mosbech H, Nasser S, Pagani M, Ring J, Romano A, Scherer K, Schnyder B, Testi S, Torres M, Trautmann A, Terreehorst I, ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group. Skin test concentrations for systemically administered drugs -- an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy* 2013;68:702–712.
153. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999;29:896–904.
154. Cipriani F, Mastrorilli C, Tripodi S, Ricci G, Perna S, Panetta V, Asero R, Dondi A, Bianchi A, Maiello N, Miraglia del Giudice M, Frediani T, Macrì F, Lucarelli S, Iacono I Dello, Patria MF, Varin E, Peroni D, Chini L, Moschese V, Bernardini R, Pingitore G, Pelosi U, Tosca M, Paravati F, Sfika I, Businco ADR, Povesi Dascola C, Comberiati P, Frediani S, et al.

- Diagnostic relevance of IgE sensitization profiles to eight recombinant Phleum pratense molecules. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2018;73:673–682.
155. Matricardi PM. Molecular profile clustering of IgE responses and potential implications for specific immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13:438–445.
156. Tripodi S, Frediani T, Lucarelli S, MacR F, Pingitore G, Rienzo Businco A Di, Dondi A, Pansa P, Ragusa G, Asero R, Faggian D, Plebani M, Matricardi PM, Macr 1 F, Pingitore G, Rienzo Businco A Di, Dondi A, Pansa P, Ragusa G, Asero R, Faggian D, Plebani M, Maria Matricardi P, Dugnano P, MacR F, Pingitore G, Rienzo Businco A Di, Dondi A, Pansa P, Ragusa G, et al. Molecular profiles of IgE to Phleum pratense in children with grass pollen allergy: Implications for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:834-839.e8.
157. Chen KW, Zieglmayer P, Zieglmayer R, Lemell P, Horak F, Bunu CP, Valenta R, Vrtala S. Selection of house dust mite–allergic patients by molecular diagnosis may enhance success of specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:1248-1252.e12.
158. Sturm GJ, Heinemann A, Schuster C, Wiednig M, Groselj-Strele A, Sturm EM, Aberer W. Influence of total IgE levels on the severity of sting reactions in Hymenoptera venom allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2007;62:884–889.
159. Sturm GJ, Arzt-Gradwohl L, Varga EM. Medical Algorithms: Diagnosis and treatment of Hymenoptera venom allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2019;74:2016–2018.
160. Stoevesandt J, Sturm GJ, Bonadonna P, Oude Elberink JNG, Trautmann A. Risk factors and indicators of severe systemic insect sting reactions.

*Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2020;75:535–545.

161. Amici M De, Alesina R, Moratti R, Ciprandi G. Component-resolved diagnosis for phleum allergy: The role of recombinants. *J Asthma J Asthma*; 2010;47:750–753.
162. Darsow U, Brockow K, Pfab F, Jakob T, Petersson CJ, Borres MP, Ring J, Behrendt H, Huss-Marp J. Heterogeneity of molecular sensitization profiles in grass pollen allergy - implications for immunotherapy? *Clin Exp Allergy* 2014;44:778–786.
163. Dang TD, Tang M, Choo S, Licciardi P V., Koplin JJ, Martin PE, Tan T, Gurrin LC, Ponsonby AL, Tey D, Robinson M, Dharmage SC, Allen KJ. Increasing the accuracy of peanut allergy diagnosis by using Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1056–1063.
164. Movérare R, Ahlstedt S, Bengtsson U, Borres MP, Hage M Van, Poorafshar M, Sjölander S, Åkerström J, Odijk J Van. Evaluation of IgE antibodies to recombinant peanut allergens in patients with reported reactions to peanut. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156:282–290.
165. Nicolaou N, Poorafshar M, Murray C, Simpson A, Winell H, Kerry G, Härlin A, Woodcock A, Ahlstedt S, Custovic A. Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: Prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:191-7.e1-13.
166. Knop KJ De, Verweij MM, Grimmelikhuijsen M, Philipse E, Hagendorens MM, Bridts CH, Clerck LS De, Stevens WJ, Ebo DG. Age-related sensitization profiles for hazelnut (*Corylus avellana*) in a birch-endemic region. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:e139–e149.
167. Ballmer-Weber BK, Hoffmann-Sommergruber K. Molecular diagnosis of fruit and vegetable allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:229–

235.

168. Rosenfeld L, Shreffler W, Bardina L, Niggemann B, Wahn U, Sampson HA, Beyer K. Walnut Allergy in Peanut-Allergic Patients: Significance of Sequential Epitopes of Walnut Homologous to Linear Epitopes of Ara h 1, 2 and 3 in Relation to Clinical Reactivity. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157:238–245.
169. Palacin A, Quirce S, Sanchez-Monge R, Bobolea I, Diaz-Perales A, Martin-Munoz F, Pascual C, Salcedo G. Sensitization profiles to purified plant food allergens among pediatric patients with allergy to banana. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:186–195.
170. Rodrigues-Alves R, Lopez A, Pereira-Santos MC, Lopes-Silva S, Spínola-Santos A, Costa C, Branco-Ferreira M, Lidholm J, Pereira-Barbosa M. Clinical, anamnestic and serological features of peach allergy in Portugal. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:65–73.
171. Järvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Sampson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2007;62:758–765.