

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dragana R. Jovanović

**Značaj određivanja specifičnih IgE antitela na
rekombinantne alergene u planiranju venom
imunoterapije**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Dragana R. Jovanovic

**The significance of determining specific IgE
antibodies to recombinant allergens in
planning venom immunotherapy**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentor:

Dr Aleksandra Perić-Popadić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Klinika za alergologiju u imunologiju, Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd

Članovi komisije:

Dr Branka Bonači-Nikolić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Klinika za alergologiju u imunologiju, Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd

Dr Vladimir Perović, docent

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Institut za mikrobiologiju i imunologiju

Dr Goran Marjanović, redovni profesor

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Klinika za hematologiju, alergologiju i kliničku imunologiju, Univerzitetski klinički centar Niš

Datum odbrane:

Zahvalnica

Istraživanje iz kojeg je proistekla ova doktorska disertacija je urađeno na Odeljenju za visokospecijalizovanu in vitro dijagnostiku imunoloskih i alergijskih oboljenja Klinike za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS) u Beogradu.

Zahvaljujem se:

Svom mentoru, profesoru dr Aleksandri Perić-Popadić na korisnim savetima, podršci i poverenju da svoje ideje realizujem;

Poštovanim članovima komisije profesoru dr Branki Bonači-Nikolić na svemu čemu me je naučila proteklih godina, motivaciji i podršci tokom svih naučno-istraživačkih koraka. Profesoru dr Goranu Marjanoviću i docentu dr Vladimiru Peroviću na sugestijama i uloženom trudu pri oblikovanju konačne verzije disertacije i na njihovom razumevanju;

Mojim dragim koleginicama Kl.Ass.dr Maji Stojanović i Doc.dr Slađani Andrejević, na izuzetnoj podršci i konstruktivnim savetima tokom izrade disertacije i naših zajedničkih publikacija i kolegi Prof.dr Vojislavu Đuriću na pomoći oko prikupljanja podataka, kao i u kliničkom praćenju pacijenata;

Ass.dr Ognjenu Milićeviću sa Instituta za medicinsku statistiku i informatiku Medicinskog fakulteta u Beogradu na statističkoj analizi i tumačenu dobijenih rezultata i Kl.Ass.dr Branislavu Lekiću sa Klinike za dermatovenerologiju UKCS koji je takođe doprineo statističkoj obradi podataka;

Svim lekarima i medicinskom osoblju sa Klinike za alergologiju i imunologiju UKCS na dugogodišnjoj saradnji, kolegijalnosti i razumevanju;

Laborantima Odeljenja za visokospecijalizovanu in vitro dijagnostiku imunoloskih i alergijskih oboljenja Klinike za alergologiju i imunologiju UKCS na nesebičnom trudu i strpljenju za svaku urađenu analizu i vedrom duhu tokom svih godina zajedničkog rada;

Svojoj porodici koja me je tokom svih ovih godina bodrila, pružala безусловnu ljubav i snagu. Hvala na apsolutno svemu!

Ovaj rad posvećujem mojoj deci, Leni i Dušanu

Značaj određivanja specifičnih IgE antitela na rekombinantne alergene u planiranju venom imunoterapije

SAŽETAK

Uvod: Pacijenti sa sistemskom alergijskom reakcijom (SAR) na ubod insekta često pokazuju višestruku pozitivnost serumskog specifičnog IgE (sIgE) na venome Hymenoptera. Nepotrebna dugotrajna imunoterapija specifična za venom (VIT) kod lažno-pozitivnih pacijenata povećava rizik od ponovne SAR. Prisustvo sIgE na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (engl. *cross-reactive carbohydrate determinants*-CCD) (CCD-sIgE) komplikuje tumačenje sIgE-testa, posebno kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću na venome Hymenoptera.

Ciljevi: Ovo iztraživanje je imalo za cilj da analizira dijagnostički značaj sIgE-testiranja na rekombinantne alergene kod pacijenata sa SAR na venome Hymenoptera. Takođe je analiziran klinički značaj molekularne alergološke dijagnostike koja koristi pojedinačne rekombinantne komponente (engl. *component-resolved diagnostics*-CRD) i test CCD-inhibicije za selekciju uzročnog venoma koji će biti korišćeni za VIT.

Pacijenti i metode: ImmunoCAP metodom kod 82 pacijenta merili smo nivoe sIgE na ekstrakte venoma: venom pčele (PV), venom ose (OV), venom stršljena (SV) i rekombinantne alergene: fosfolipazu A2 (rApi m 1), antigena 5 (rVes v 5) i CCD-bromelain. Analizirali smo korelaciju metoda ImmunoCAP i Imunoblot za detekciju sIgE na PV i OV ekstrakte, i rekombinantne alergene rApi m 1 i rVes v 5 kod 39/82 pacijenata. Prema podacima o alergiji na ubod insekta, uporedili smo sensitivnost i specifičnost između dve metode. Imunoblot metodom kod 71 pacijenta merili smo sIgE na PV, OV, SV, CCD i rekombinantne alergene: rApi m 1, hijaluronidazu (rApi m 2), ikarapin (rApi m 10), rVes v 5 i fosfolipazu A1 (rVes v 1). Kod 29/71 PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata izvršena je CCD-inhibicija. Prema CRD i CCD-inhibiciji identifikovali smo pravu senzibilizaciju i definisali grupe višestruko pozitivnih pacijenata kojima je bila potrebna CCD-inhibicija pre početka VIT.

Rezultati: Težina SAR nije zavisila od nivoa sIgE u ekstrakte venoma i rekombinantne alergene. Ukupno 51% pacijenata je imao višestruku pozitivnost na ekstrakte PV/OV ili PV/OV/SV. Teška SAR i CCD-sIgE bili su češći kod višestruko pozitivnih nego kod jednostruko pozitivnih pacijenata ($P < 0,001$). Serumaska CCD-sIgE antitela su bila češća kod pacijenata sa alergijom na venom pčele u odnosu na pacijente sa alergijom na venom ose ($P < 0,0001$) i venom stršljena ($P = 0,049$). Postojala je značajna korelacija između nivoa sIgE na ekstrakte venoma ($P < 0,0001$) i rekombinantne alergene ($P < 0,05$) merenih ImmunoCAP i Imunoblot metodama. ImmunoCAP metoda je imala veću senzitivnost i specifičnost od

Imunoblot metode za dijagnozu SAR na venome Hymenoptera. Serumski sIgE na rApi m 1, rApi m 2 i rApi m 10 detektovani su kod 65,7%, 68,4% i 58% pacijenata. Kod pacijenata sa alergijom na venom pčele, senzitivnost CRD bila je 86,8%. Kod pacijenata sa alergijom na venom ose, senzitivnost sIgE-rVes v5 bila je 94%. Prava višestruka senzibilizacija je detektovana kod 13/29 (44,8%) PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata nakon CCD-inhibicije. Pacijenti sa višestrukom- i CCD-pozitivnošću imali su češće tešku SAR ($P < 0,001$). Test CCD-inhibicije bio je koristan kod pacijenata pozitivnih na PV/OV/SV/CCD koji su bili negativni na sve testirane rekombinantne alergene pčele. Perzistiranje pozitivnosti na ekstrakt venomata pčele nakon CCD-inhibicije zahteva CRD sa proširenim panelom rekombinantnih alergena.

Zaključak: Specifično IgE-testiranje na rekombinantne alergene bez CCD je neophodno za adekvatan odabir venomata za dugotrajnu VIT, posebno kod pacijenata sa višestrukom senzibilizacijom na ekstrakte venomata. Takozvana CRD, sa profilom od pet najvažnijih rekombinantnih alergena i CCD ima visoku senzitivnost za dijagnozu alergije na venome, posebno kod pacijenata pozitivnih na nekoliko ekstrakta venomata. Zajedno, CRD i CCD-inhibicija pomažu da se otkrije klinički relevantna, prava senzibilizacija i da se poboljša selekcija alergena za dugotrajnu specifičnu imunoterapiju.

Ključne reči: Anafilaksa, Ugljenohidratne determinante, Insekt-venom alergija, Hymenoptera; Venomi pčele; Imunoblot, ImmunoCAP, Molekularna dijagnostika, Venomi ose

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna medicina

UDK: _____

The significance of determining specific IgE antibodies to recombinant allergens in planning venom immunotherapy

ABSTRACT

Introduction: Adults with systemic allergic reactions (SAR) to insect sting show often multiple-positivity of serum specific IgE (sIgE) to Hymenoptera venoms. Unnecessary long-lasting venom-specific immunotherapy (VIT) in false-positive patients increase the risk of recurrent SAR. The presence of IgE to cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) complicates the interpretation of sIgE to Hymenoptera venoms, especially in patients with multiple-positivity.

Objectives: This report aims to analyze the diagnostic importance of recombinant allergen IgE-testing in patients with SAR to Hymenoptera sting. Also we analyzed the clinical importance of the component-resolved diagnostics (CRD) and CCD-inhibition test for selection of the causative venom for VIT.

Patients and methods: In 82 patients we measured levels of sIgE to honeybee venom (HBV), wasp venom (WV), hornet venom (HV) extracts, recombinant phospholipase A2 from HBV (rApi m 1), recombinant antigen 5 from WV (rVes v 5), and CCD-bromelain by ImmunoCAP. We analyzed the correlation of ImmunoCAP and Immunoblot for HBV and WV extracts, rApi m 1, and rVes v 5 in 39/82 patients. According to the history of insect sting allergy, we compared sensitivity and specificity between the two methods. In 71 patients we measured sIgE to HBV WV, HV, CCD and recombinant allergens: rApi m 1, hyaluronidase (rApi m 2), icarapin (rApi m 10), rVes v 5 and phospholipase A1 (rVes v 1) by Immunoblot. In 29/71 HBV/WV/HV/CCD-positive patients CCD-inhibition was performed. According to CRD and CCD-inhibition we identified true sensitization and defined groups of multiple-positive patients who needed CCD-inhibition before starting VIT.

Results: The severity of the SAR does not depend on the sIgE level to venom extracts and recombinant allergens. Fifty-one percent of the patients had a multiple-positivity to HBV/WV or HBV/WV/HV extracts. Severe SAR and serum CCD-sIgE were more frequent in multiple-positive than single-positive patients ($P < 0.001$). Serum CCD-sIgE were more frequent in HBV allergic patients than WV ($P < 0.0001$) and HV allergic patients ($P = 0.049$). There was a significant correlation between levels of sIgE to venom extracts ($P < 0.0001$) and recombinant allergens ($P < 0.05$) measured by ImmunoCAP and Immunoblot. ImmunoCAP had higher sensitivity and specificity than Immunoblot for diagnosis of SAR to Hymenoptera venoms. Specific IgE to rApi m 1, rApi m 2 and rApi m 10 were detected in 65.7%, 68.4% and 58%, respectively. In HBV allergic patients, CRD sensitivity was 86.8%. In WV allergic patients, sensitivity of sIgE-rVes v5 was 94%. True multiple-sensitization was found in

13/29 (44.8%) of HBV/WV/HV/CCD-positive patients after CCD-inhibition. Patients with multiple-venom and CCD-positivity had more frequent severe allergic reactions ($P < 0.001$). CCD-inhibition was helpful in HBV/WV/HV/CCD-positive patients who were negative to all tested recombinant honeybee allergens. Persistence of HBV-positivity after CCD-inhibition requires CRD to other honeybee recombinant allergens.

Conclusion: IgE-testing to recombinant CCD-free allergens is necessary for the adequate selection of long-lasting VIT, especially in patients with multiple sensitivities to venom extracts. CRD, using profile of the five most important recombinant allergens and CCD, has a high sensitivity for the diagnosis of venom allergy, especially in patients positive to several venom-extracts. CRD and CCD-inhibition are helpful to reveal the clinical relevant, true sensitization and improve the selection of allergens for long-lasting VIT.

Keywords: Anaphylaxis, Carbohydrate determinants, Insect Venom Allergy, Hymenoptera; Honeybee Venoms; Immunoblotting, Molecular diagnostics, Wasp Venoms

SCIENTIFIC FIELD: Medicine

SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD: Molecular medicine

UDK :

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Reakcije preosetljivosti na venome Hymenoptera	1
1.2. Prevalenca rane preosetljivosti na venome Hymenoptera	5
1.3. Faktori rizika za tešku sistemsku alergijsku reakciju.....	6
1.4. Dijagnoza i selekcija pacijenata za specifičnu VIT	8
1.5. Alergeni venoma Hymenoptera	13
1.7. Test aktivacije bazofila (BAT)	26
1.8. CCD-sIgE antitela i CCD-inhibicija	27
1.9. Venom-specifična imunoterapija (VIT)	29
1.9.1. Apsolutne i relativne kontraindikacije za VIT	30
1.9.2. Protokoli VIT	31
1.9.3. Imunski mehanizmi tokom specifične VIT.....	33
1.9.4. Buduće smernice za VIT	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	37
3. MATERIJAL I METODE	38
3.1. DIZAJN STUDIJE	38
3.2. ISPITANICI	38
3.3. LABORATORIJSKE ANALIZE	39
3.3.1. ImmunoCAP - IgE test	39
3.3.2. ImmunoCAP - IgG4 test	40
3.3.3. Imunoblot - IgE test.....	41
3.3.4. Test inhibicije unakrsno-reaktivnih ugljenohidratnih determinanti (CCD)	43
3.3.5. Bazalna serumska triptaza.....	45
3.4. STATISTIČKA ANALIZA.....	46
4. REZULTATI	47
4.1. Demografske karakteristike pacijenata sa višestrukom i jednostrukom IgE- pozitivnošću na ekstrakte venoma	47
4.2. Detekcija sIgE antitela ImmunoCAP metodom	48
4.2.1. Detekcija sIgE na rekombinantnu fosfolipazu A2 i rekombinantni antigen 5....	48
4.2.2. Detekcija sIgE na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (CCD)....	50

4.2.3. Određivanje koncentracije sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5	50
4.3. Poređenje ImmunoCAP i Imunoblot za detekciju sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5.....	51
4.3.1. Korelacija ImmunoCAP i Imunoblot za detekciju koncentracije sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5.....	51
4.3.2. Specifičnost i senzitivnost sIgE-testiranja za ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5	53
4.4. Demografske karakteristike CCD-sIgE pozitivnih i CCD-sIgE negativnih pacijenata	53
4.5. Detekcija sIgE antitela Imunoblot metodom	55
4.5.1. Detekcija sIgE antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2, hijaluronidazu, ikarapin, fosfolipazu A1 i antigen 5	55
4.5.2. Specifična IgE antitela na rekombinantne alergene fosfolipazu A2, hijaluronidazu, ikarapin, fosfolipazu A1 i antigen 5 pre i nakon CCD-inhibicije	57
4.6. Detekcija koncentracije sIgG4 ImmunoCAP metodom.....	67
5. DISKUSIJA	70
6. ZAKLJUČCI.....	82
7. LITERATURA	84

1. UVOD

1.1. Reakcije preosetljivosti na venome Hymenoptera

Alergija na venome insekata iz reda Hymenoptera (HVA) je jedna od najtežih alergijskih bolesti kod odraslih sa značajnom učestalošću sistemske alergijske reakcije (SAR) (1). Venomi su izvor glikoproteina i peptida (2) sa svojstvima koji mogu dovesti do različitih simptoma, od lokalnih neželjenih reakcija do SAR opasne po život, pa čak i smrti. Nakon uboda Hymenoptera insekta najčešće se javlja reakcija preosetljivosti I tipa (3) posredovana IgE antitelima. Kao primarna odbrana od patogena, imunski sistem domaćina koristi brojne mehanizme kako bi osigurao optimalnu zaštitu. Imunski sistem ima sposobnost da zaštiti organizam od stranih antigena razlikovanjem stranih i sopstvenih komponenti čime se postiže stanje samotolerancije. Alergijske reakcije nastaju zbog poremećaja regulacije imunskog sistema kada alergeni mogu prouzrokovati patološke reakcije u organizmu (4). Klinička slika varira od velike lokalne reakcije (VLR) na mestu uboda do SAR (5). Sistemske reakcije se veoma razlikuju po težini, od umerenih reakcija koje se sastoje od generalizovanih kožnih simptoma do teških po život opasnih anafilaktičkih reakcija koje utiču na srčani i respiratorni sistem.

"Preosetljivost" je širok termin koji se koristi da opiše prekomerni, patološki imunski odgovor na strane ili sopstvene antigene. Gel i Kumbs su prvi koji su 1963. godine klasifikovali reakcije preosetljivosti u četiri različite grupe prema mehanizmima oštećenja tkiva: tip I (preosetljivost posredovana IgE antitelima), tip II (preosetljivost posredovana IgM i IgG antitelima), tip III (preosetljivost posredovana IgM i IgG antitelima sa formiranjem imunokompleksa) i tip IV (odloženi tip preosetljivosti posredovan T-ćelijama) (6). Reakcija preosetljivosti tip III koju karakteriše proizvodnja IgG antitela usmerenih protiv alergena venoma može rezultirati simptomima nalik na serumsku bolest i glomerulonefritis izazvan taloženjem imunskih kompleksa koji sadrže IgG i alergen venoma (7). U kliničkoj praksi, tipovi preosetljivosti se mogu preklapati i pacijenti mogu imati istovremeno simptome više vrsta reakcija preosetljivosti.

Postoje dokazi da komponenta komplemента C5a može igrati važnu ulogu u ispoljavanju anafilakse na venom pčele (8). Isto tako, ne postoji terapija koja efikasno sprečava reakcije posredovane IgE antitelima. U takvim situacijama, lekovi H1 antihistaminici i kortikosteroidi samo ublažavaju dejstvo takvih reakcija (4). Alergeni svih vrsta i veličina mogu izazvati reakcije preosetljivosti. Proteini velike molekulske težine mogu predstavljati alergene koji će biti prepoznati od strane T-ćelija ili imunoglobulina. Nasuprot tome, jedinjenja male molekulske težine do 1000 Daltona ne mogu izazvati imunski odgovor. Međutim, oni mogu stimulisati imunski odgovor kada se kao hapteni kovalentno vežu za druge strane ili sopstvene proteine i tako stvore nove epitope koji mogu postati antigeni (4).

Preosetljivost I tipa po Coombs-u i Gel-u na venome insekata je rana preosetljivost na određene antigene posredovana IgE antitelima i mastocitima, koja dovodi do brzog oslobađanja tečnosti iz krvnih sudova, sekrecije mukusa i zapaljenja (3). Reakcije rane preosetljivosti mogu zahvatiti različita tkiva i mogu da se razlikovati po intenzitetu kod različitih pacijenata. Reakcija rane preosetljivosti počinje aktivacijom subpopulacije pomoćničkih T-ćelija tip 2 (Th2) i folikularnih pomoćničkih T-ćelija (Tfh) koje sekretuju interleukin (IL)-4 i IL-13 u odgovoru na proteinske alergene ili hemijske supstance koje se vezuju za proteine. Th2 limfociti i citokini stimulišu B-limfocite da se diferenciraju u plazma ćelije koje proizvode IgE antitela. IgE antitela se vezuju za specifične Fc receptore visokog afiniteta (FcεRI) na površini mastocita. Veliki deo IgE ostaje vezan za FcεRI i prilikom ponovnog izlaganja, alergen unakrsno povezuje sIgE antitela na mastocitima (9).

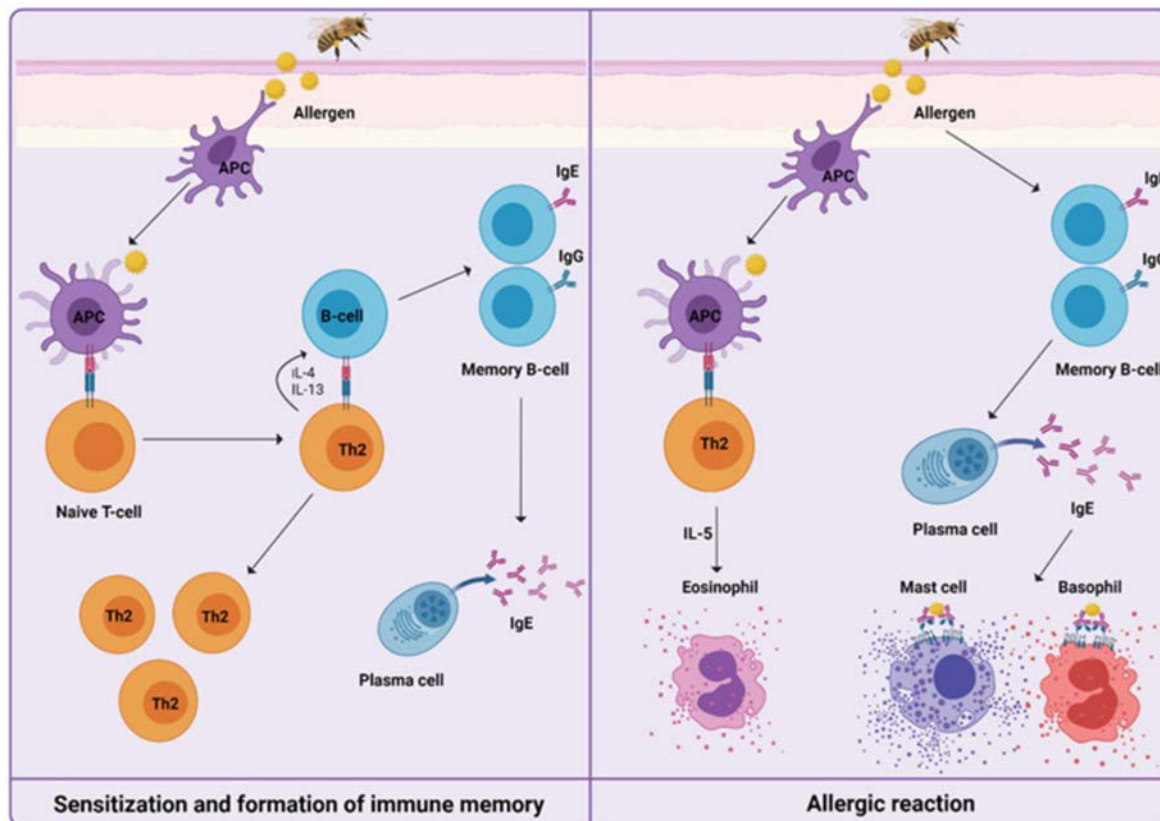
Unakrsno povezivanje sIgE alergenom na mastocitima stimuliše fosforilaciju imunoreceptorskih tirozinskih aktivacionih motiva (ITAM) u signalnim lancima FcεRI za IgE i pokretanje signalnih puteva što dovodi do oslobađanja medijatora iz mastocita u dve faze. Rana faza koja nastaje u roku od nekoliko minuta do petnaest minuta uzrokovana je histaminom, proteazama, leukotrijenima i prostaglandinima. Histamin dovodi do vazodilatacije krvnih sudova i kontrakcije glatke muskulature, proteaze do oštećenja tkiva, prostaglandini do vazodilatacije krvnih sudova, a leukotrijeni do kontrakcije glatke muskulature. U kasnoj fazi koja se javlja nakon četiri do osam sati nakon izloženosti alergenima, citokini kao što su IL-1, faktor nekroze tumora (TNF), IL-4, IL-5, IL-13 i faktor stimulacije

kolonije monocita i granulocita (GM-CSF) dovode do mobilizacije leukocita i zapaljenja. Kod većine osoba ne razvija se snažan Th2 odgovor na alergene (10,11).

Iz nepoznatog razloga kada neka osoba dođe u kontakt sa pojedinim alergenima dolazi do snažnog odgovora Th2 limfocita (**Slika 1**).

Kod normalnih osoba mastociti su neretko obloženi IgE antitelima raznih specifičnosti, jer mnogi alergeni mogu da pokrenu slabiji imunski odgovor posredovan sIgE i zato je koncentracija IgE antitela specifičnih za bilo koji alergen nedovoljna za izazivanje alergijske reakcije. Uglavnom, od puta ulaska alergena u organizam i količine medijatora koje stvaraju mastociti zavise patološke kliničke i promene koje će nastupiti.

Anafilaksa je akutna i po život opasana SAR I tipa preosetljivosti na alergene, kao što su hrana, lekovi ili venomi insekata. Hrana, lekovi i Hymenoptera venomi su najčešći izazivači anafilaktičkih reakcija (9). Anafilaksu karakteriše urtikarija, angioedem, bronhospazam, mučnina, povraćanje, dijareja, hipotenzija i anafilaktički šok (12). Definicija anafilakse sedamdesetih godina postala je sistemska, neposredna reakcija preosetljivosti izazvana IgE antitelima. Reakcije koje nisu posredovane IgE antitelima, a koje su prouzrokovale sličan klinički događaj se nazivaju „anafilaktoidne reakcije" (10). Simptomi anafilakse su veoma promenljivi. Podaci pacijenata koji doživljavaju anafilaksu otkrili su da se najčešće javljaju simptomi kože i sluzokože u preko 90% slučajeva praćeni simptomima koji uključuju respiratorni i kardiovaskularni sistem nakon izlaganja verovatnom alergenu za tog pacijenta (11,12).

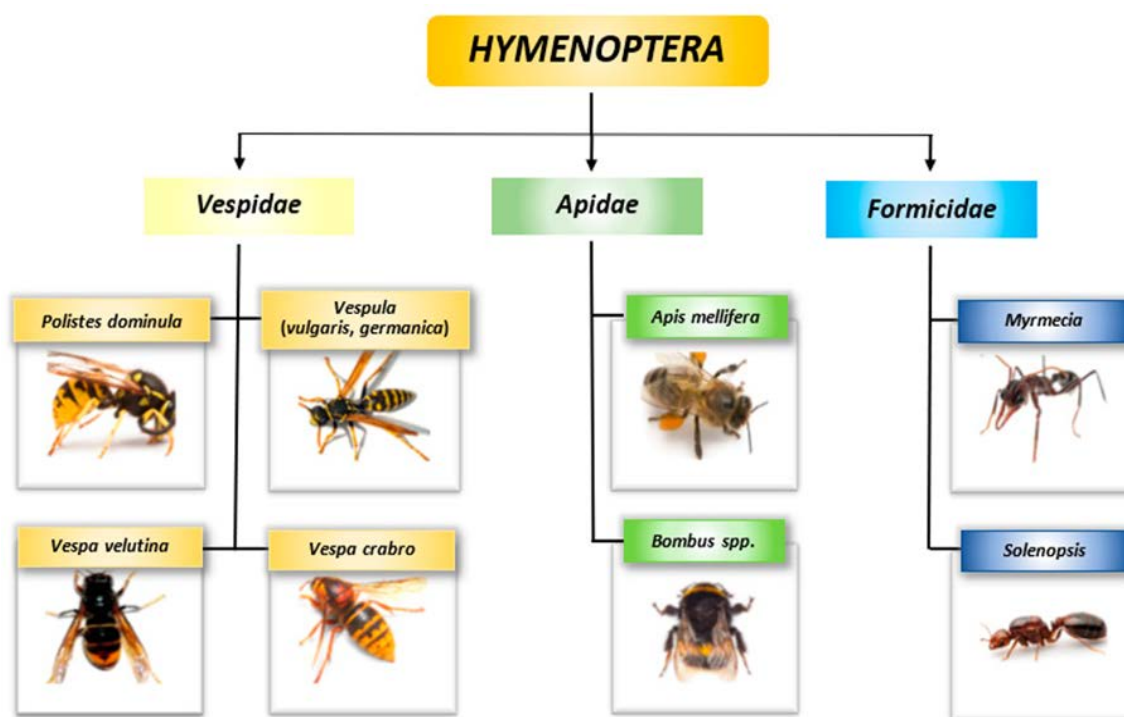


Slika 1. Senzibilizacija i alergijska reakcija na ubod Hymenoptera. Preuzeto od Demšar Luzar A i sar. *Cells*, 2021

SAR se dele u 4 stepena težine alergijskih reakcija od blagih do po život opasnih: I-urtikarija, II-angioedem, III-respiratorni poremećaji i IV-pad krvnog pritiska i gubitak svesti (13). Preosetljivost I tipa se konstantno povećava od šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog veka, tako da se danas procenjuje da je oko 40% stanovništva senzibilisano na neki alergen i zato preosteljivost I tipa predstavlja veliki klinički problem (10).

Iako je opšte poznato da Hymenoptera insekti izazivaju ubode kod ljudi, ovi insekti takođe igraju važnu ulogu u oprašivanju useva i smanjenju populacije štetnih insekata. U zemljama centralne Evrope postoje dve porodice Hymenoptera koje izazivaju alergijske reakcije: porodica *Vespidae* koja uključuju prave ose (*Vespula spp.*), vazdušne žute ose (*Dolichovespula*), stršljene (*Vespa crabo*) i papirne ose (*Polistes*) i porodica *Apidea* koja uključuje pčele (*Apis mellifera*) i bumbare (*Bombus spp.*) (14). Postoji i porodica mrava (*Formicidae*) koja izaziva alergijske reakcije (15) (**Slika 2**). Pravilno prepoznavanje insekta

odgovornog za ubod je važno za odgovarajuće lečenje, međutim većina osoba ne može da identifikuje vrstu insekta. Takođe, postoje značajne regionalne varijacije u vrstama Hymenoptera, kao i varijacije u raznim delovima sveta. Venom pčele najčešće izaziva alergijske reakcije kod dece. Dok je u centralnoj Evropi venom ose najčešći izazivač anafilakse, u drugim regionima kao što su Amerika, Azija i delovi Australije i drugi venomi su važan okidač anafilakse. Fatalni slučajevi anafilakse na Hymenoptera venom najviše se povezuju sa odraslim dobom (16, 17).



Slika 2. Taksonomija Hymenoptera. Preuzeto od Matysiak J i sar. Biomedicines, 2022

1.2. Prevalenca rane preosetljivosti na venome Hymenoptera

Tačna učestalost uboda Hymenoptera insekta kod ljudi nije poznata, ali se smatra da je između 56% i 94% odraslih širom sveta doživelo bar jedan ubod u životu (18). Prevalenca SAR nakon uboda insekta procenjuje se da je u rasponu od 0,15% do 0,8% kod dece i 0,3%

do 8,9% kod odraslih. Anafilaksa na venom Hymenoptera se javlja kod 3% odraslih i može biti fatalna čak i pri prvoj reakciji (19). Velika lokalna reakcija definisana kao bol, otok i crvenilo na mestu uboda koja može zahvatiti ceo ekstremitet, iako nije opasna po život, javlja se kod 2,4% do 26,4% opšte populacije i oko 40% pčelara. Šansa za SAR na venom Hymenoptera je niska kod osoba koje su imale VLR (5 do 10%) i kod dece sa blagim kožnim alergijskim reakcijama (19,20). Godišnji mortalitet zbog uboda insekta se kreće od 0,03 do 0,45 smrtnih slučajeva na milion stanovnika, ali ovaj broj bi mogao biti i veći zbog neotkrivenih smrtnih slučajeva (5). Mnogi smrtni slučajevi zbog uboda mogu biti neprepoznati. U nekim slučajevima neobjašnjive iznenadne smrti u postmortalnim uzorcima krvi moguće je dokazati prisustvo IgE antitela specifičnih za venom Hymenoptera, kao i povišenu bazalnu serumsku triptazu (BST), što ukazuje na moguću fatalnu reakciju zbog uboda (21). Podaci Evropske mreže za teške alergijske reakcije NORA (engl. *First European data from the network of severe allergic reactions*) utvrdila je da je 48,2% odraslih preko 18 godina i 20,2% dece imalo tešku anafilaksu usled uboda insekta (22).

1.3. Faktori rizika za tešku sistemsku alergijsku reakciju

Glavni faktor rizika za tešku SAR na venome Hymenoptera je povišen nivo BST koja ne zavisi od poremećaja mastocita i mastocitoza. Opterećenje mastocitima u telu može se odraziti na osnovnu koncentraciju triptaze u serumu. Primećeno da pacijenti sa HVA i povišenim nivoom BST doživljavaju više teške SAR na ubode od pacijenata sa normalnim nivoima BST. Povišen nivo BST zbog povećanog broj mastocita ili aktivnosti se takođe može naći kod pacijenata sa drugim bolestima ili patološkim stanjima koje uključuju mastocite, kao što su hronična urtikarija, uremijski pruritus, mijeloidni maligniteti, hipereozinofilni sindrom povezan sa mutacijom FIP1L1-PDGFRA, mijelodisplazni sindromi i sindrom aktivacije mastocita (23,24). Sistemska mastocitoza je bolest gde je anafilaksa relativno čest nalaz, naročito indolentna sistemska mastocitoza (ISM), a ubod Hymenoptera insekta je najčešći okidač anafilakse kod ovih pacijenata (25). Prema objavljenim podacima, mastocitoza čini 1% do 7% svih slučajeva sa HVA (26). Prihvaćena gornja granica za

normalnu koncentraciju triptaze 11, 4 µg/L može biti neadekvatna (27). Šansa za SAR se značajno povećava iznad koncentracije od približno 5 µg/L. Nivoi BST su skoro uvek povišeni kod pacijenata sa sistemskom mastocitozom, ali kod pacijenata sa kutanom mastocitozom u većini slučajeva se detektuju normalni nivoi (28). Iako potvrda dijagnoze mastocitoze zahteva analizu bioptata koštane srži, Evropska mreža za mastocitozu preporučuje korišćenje takozvanog REMA skora (*Red Española de Mastocitosis*; engl. *Spanish Mastocytosis Network*) kao koristan skrining za dokazivanje poremećaja mastocita (25). Sistemska mastocitoza mora biti sumnjiva kod osoba muškog pola koji imaju kardiovaskularne simptome, vrtoglavicu ili gubitak svesti u odsustvu pruritusa, urtikarije i angioedema posle uboda insekta, nezavisno od nivoa BST (29). Anafilaksa izazvana venomom Hymenoptera u nedostatku specifičnih IgE (sIgE) antitela i anafilaksa tokom ili posle prekida VIT je usko povezana sa postojanjem sistemske mastocitoze (29). Imunoterapiju odgovarajućim venomom treba dati doživotno svim pacijentima sa mastocitozom i dokazanim sIgE na uzročni venom. Međutim, kod pacijenata sa negativnim sIgE-testom dodatni alergološki testovi mogu doprineti potvrđivanju mehanizma anafilakse čime se obezbeđuje indikacija za VIT (29). Merenje BST kod pacijenata sa HVA može pomoći da se identifikuju oni pacijenti koji istovremeno imaju mastocitozu ili sindrom monoklonske aktivacije mastocita (30). Prevalenca teške SAR je oko 50% kod pacijenata sa koncentracijom triptaze od 20,4 do 29,9 µg/L (31).

Ostali najznačajniji faktori rizika su teža predhodna alergijska reakcija III ili IV stepena prema Milerovoj klasifikaciji (13), starija životna dob, muški pol, lekovi za hipertenziju beta-blokatori i inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACEI), godišnji broj uboda i atopijske bolesti (32,33). Postoje dokazi da se anafilaksa ne javlja češće kod pacijenata koji uzimaju beta-blokatore. Ovi pacijenti, međutim, ipak mogu biti pod povećanim rizikom od SAR, a hitno lečenje adrenalinom može biti manje efikasno (34). Efekat ACEI, koji je nezavisan od starosti, sugerise specifičnu ulogu kinin-angiotenzin sistema unutar mehanizama koji izazivaju anafilaktički šok (35). Stariji pacijenti sa kardiovaskularnim bolestima koji se leče beta-blokatorima mogu biti posebno izloženi velikom riziku od teške SAR u slučaju uboda insekta (34). Vaskularni komorbiditeti, kao što je hipertenzija, su takođe značajni faktori rizika za tešku SAR (36). Pretežno

kardiovaskularni simptomi u nedostatku urtikarije ili angioedema koji slede ubod insekta su sumljivi za poremećaj mastocita i trebalo bi da se razlikuje od napada panike ili vazovagalne sinkope. Slično tome, neobjašnjiva sinkopa ili idiopatska anafilaksija može otkriti mastocitozu ili naslednu alfa-triptazemiju (37). Kako pacijenti sa HVA i klonskim poremećajem mastocita uglavnom nemaju tipične kožne lezije mastocitoze, dijagnoza se lako može propustiti, te je stoga jako bitna dijagnostička strategija kako bi se ovi pacijenti pravilno identifikovali (37).

Starost je moćan prediktor teške SAR nakon akutnog koronarnog sindroma. Muški pol je nezavisan faktor rizika za tešku SAR na ubod Hymenoptera (38). Efekat muškog pola kod anafilakse izazvane ubodom insekta verovatno je rezultat efekta selekcije. Zbog različitog stepena izloženosti, odrasli muškarci su češće izloženi ubodu nego žene i stoga bi mogli biti izloženi većem riziku za razvijanje senzibilizacije ili teške SAR. Pacijenti sa HVA, koji imaju čak i diskretno povišenu BST, imaju veći rizik za tešku SAR nakon ponovnog uboda insekta, bez obzira na druge prognostičke faktore. Stariji pacijenti i oni koji su doživeli HVA su poželjni kandidati za imunoterapiju (31).

Iako nedostaju pouzdani biomarkeri (39) ili dijagnostički testovi za procenu opasnosti od fatalne anafilakse, potrebno je dovoljno iskustva i znanja za savetovanje pacijenata (40). VIT smanjuje rizik od naknadne SAR do oko 5% u poređenju sa rizikom od SAR kod nelečenih pacijenata za koje rizik može biti čak do 60% (18). Rizik za SAR nakon prekida VIT je 10% do 15%, dok je rizik veći kod pacijenata koji su primali VIT manje od 5 godina (41).

1.4. Dijagnoza i selekcija pacijenata za specifičnu VIT

Dijagnostički sIgE-testovi treba da se vrše kod svih pacijenata sa istorijom SAR nakon uboda Hymenoptera insekta (42). Isto tako, sIgE-testove treba obavljati i kod pacijenata sa istorijom VLR ako imaju visok rizik da budu ponovo ubodeni, kao što su pčelari i poljoprivrednici ili ukoliko imaju značajno smanjen kvalitet života zbog toga (43–45). Dijagnoza HVA u svim navedenim slučajevima daje kvalifikaciju za VIT. Imunoterapija

venomom je najefikasnija metoda lečenja alergija, tokom koje imunološki sistem razvija imunološku toleranciju na alergen. Međutim, VIT traje više godina i povezana je sa rizikom od neželjenih reakcija. Zato je tačna dijagnoza i započinjanje VIT kod pacijenta jako važno (46). Tačna identifikacija insekta koji je doveo do SAR je od velikog značaja za izbor venoma za dugotrajnu VIT, jer je usled pogrešnog izbora venoma za VIT moguća *de novo* senzibilizacija na pogrešan venom (47). Postoje smernice sa dijagnostičkim algoritmom za alergične pacijente koje pomažu u procesu odlučivanja za dugotrajnu VIT. Proces odlučivanja za VIT podrazumeva sagledavanje kliničkih simptoma, dijagnostičkih testova, faktora rizika i prednosti imunoterapije za svaki pojedinačni slučaj. Standardna dijagnoza počinje detaljnom anamnezom pacijenta (klinički simptomi, težina SAR, vrsta insekta, broj uboda, tretman SAR) i procenom faktora rizika (lekovi, kardiovaskularni rizici i druge bolesti). Naročito je značajna identifikacija insekta koji je doveo do alergijske reakcije. Nije retko da pacijent ima poteškoću da pravilno identifikuje insekt koji je doveo do alergijske reakcije ili da je događaj doživeo davno pa je zato slabo zapamćen (19). Ako je pacijent doživeo SAR ili VLR na ubod insekta, preporučuju se dalji dijagnostički testovi. Početni laboratorijski pristup u dijagnostici je otkrivanje vrste hipersenzitivne reakcije, odnosno da li je reakcija pacijenta posredovana IgE antitelima ili nije. Dijagnoza se pored istorije alergije na ubod insekta mora potvrditi i otkrivanjem sIgE na relevantni alergen. Većina autora smatra da je detekcija sIgE najvažniji dijagnostički korak pre početka dugotrajne VIT (48).

Rutinski dijagnostički testovi uključuju kožne testove i određivanje nivoa sIgE na venom (49) (**Slika 3**). Iako su kožni prik i intradermalni testovi sa ekstraktima venoma najosetljiviji za dijagnozu alergije na venom, može proći 2-3 nedelje da postanu pozitivni, a s druge strane, mogu pokazati neuverljive višestruko pozitivne rezultate. Takođe, kvalitet i standardizacija alergena za kožni test veoma variraju u zavisnosti od proizvođača (50). Nedostatak kožnih testova je u tome što se izvode sa ekstraktima venoma koji mogu sadržati premalo alergena ili biti deficitarni za određene alergene, kao što je pokazano za ikarapin (Api m 10) (51). Da bi se izbegli lažno-negativni rezultati navedene testove treba uraditi najmanje 2-4 nedelje nakon uboda (49).

Prema evropskim smernicama, prvo treba uraditi kožni prik test (42). Ukoliko su rezultati negativni, sledeći korak uključuje intradermalni test. Intradermalni testovi imaju

mnogo veću osetljivost od prik testova, što je dokazano u kliničkim studijama (42,52). Za dijagnozu HVA, senzitivnost kožnog prik testa je 49%, dok je senzitivnost kombinacije kožnog prik testa i intradermalnog testa 94% (49) (**Slika 3**). U Evropi su na raspolaganju standardizovani venomi *Apis mellifera*, *Vespula spp.* i *Vespa crabro* i mogu se koristiti za kožno testiranje. Ovi standardizovani testovi su bezbedni i za pacijente sa mastocitozom (53,54).

Dijagnostički testovi zasnovani na detekciji antitela na ekstrakte venoma, iako veoma senzitivni, nemaju adekvatnu specifičnost (55). Više od 50% pacijenata sa alergijom na venom Hymenoptera ima sIgE na dve ili više vrsta ekstrakta venoma (višestruka-pozitivnost) iako je većina njih imala SAR samo na jedan insekt (56). Višestruko pozitivni rezultati nastaju zbog: 1. prave dvostruke IgE senzibilizacije na specifične alergene venoma pčele (*Apis mellifera*) i žute ose (*Vespula vulgaris*, engl. wasp) ili stršljena (*Vespa crabro*) ili 2. prisustva klinički irelevantnih IgE na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (engl. *Cross-reactive carbohydrate determinants-CCD*) koje mogu biti prisutne u sva tri venoma. Unakrsna IgE-reaktivnost na CCD često može dovesti do nepotrebne dugotrajne VIT, što povećava rizik od ponovne SAR (48). Detekcija serumskog IgE na specifične i unakrsno-reaktivne alergene venoma pčele, venoma ose i venoma stršljena olakšava diskriminaciju između prave senzibilizacije i unakrsne reaktivnosti, što je od suštinskog značaja za odabir alergena koji će se primenjivati za VIT (57).

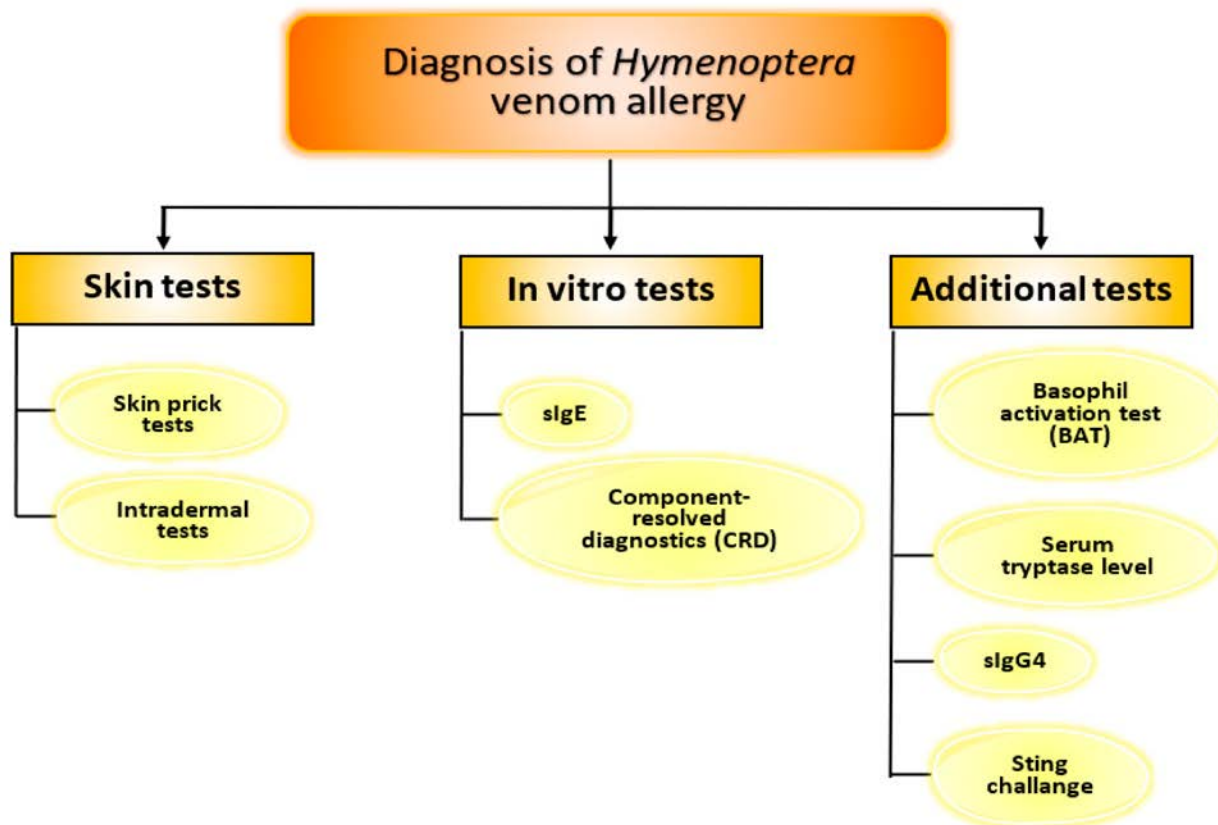
Mnogo veća senzitivnost *in vitro* sIgE-testova dobija se sprovođenjem dijagnostike koja koristi pojedinačne komponente (engl. *Component-resolved diagnostics-CRD*) (58,59). CRD koristi prečišćene prirodne ili rekombinantne alergene za otkrivanje IgE na pojedinačne alergene, tako da molekularna dijagnostika sa neglikozilovanim rekombinantnim alergenima koji su oslobođeni CCD može poboljšati dijagnostičku tačnost kod pacijenata sa istorijom HVA, posebno kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću (59). Danas je CRD sve značajnija u kliničkom istraživanju hipersenzitivnih reakcija posredovanih IgE antitelima (59). Dok se konvencionalni dijagnostički sIgE-testovi baziraju na preparate ekstrakta venoma, takozvana CRD omogućava prepoznavanja profila alergena pacijenta koji će se utvrditi. Osim toga, CRD omogućava da se odredi primarna senzibilizacija i unakrsna reaktivnost kod pacijenata sa višestruko pozitivnim rezultatima na cele, prirodne ekstrakte

(58). Ova inovativna dijagnostika je posebno važna za pacijente koji ne uspevaju da identifikuju ili imenuje vrstu Hymenoptera insekta. Ova dijagnostika ima prednost u odnosu na konvencionalne dijagnostičke testove sa ekstraktima venoma koji mogu dati lažnu višestruku-pozitivnost na više vrsta Hymenoptera zbog njihovih sličnih unakrsno-reaktivnih proteinskih alergena i/ili CCD (**Slika 3**).

Među ostalim dodatnim dijagnostičkim metodama koje se koriste u dijagnozi HVA, treba pomenuti sledeće testove: test aktivacije bazofila (BAT), merenje nivoa BST i serumskih specifičnih IgG4 antitela (sIgG4), kao i test izazivanja uboda sa živim insektom. Pacijenti koji nisu pokazali IgE-reaktivnost ni na jedan testirani alergen *in vivo* i *in vitro* testovima čine manje od 2% pacijenata koji imaju istoriju alergije. U slučajevima kada svi drugi dijagnostički testovi ne daju odgovarajuću dijagnozu preporučuje se *in vitro* BAT. Bazofili se prepoznaju po posebnim markerima (CCR3 +/CD3-, CD123+/HLA-DR- i IgE+/CD203c+), a njihova aktivnost se meri pomoću monoklonskih antitela. BAT se obavlja samo u specijalizovanim medicinskim centrima (60). Procedura podrazumeva uzimanje pune krvi koja se stimuliše alergenima venoma, a aktivacija bazofila se meri protočnom citometrijom. Ukupno 67–81% pacijenata sa negativnim *in vivo* kožnim testovima i *in vitro* sIgE-testovima mogu biti dijagnostikovani korišćenjem BAT. BAT se preporučuje i u slučaju višestruko pozitivnih rezultata na venome Hymenoptera ili u slučaju neuverljivih rezultata sa rekombinantnim alergenima. Obzirom da pacijenti sa povišenim nivoima BST pokazuju znatno veći rizik od ozbiljnih reakcija na ubode Hymenoptera, posebno pacijenti sa mastocitozom (36,37), jako je važno kod ovih pacijenta detektovati nivo BST.

Serumska IgG4 antitela na specifični venom nastaju u kontaktu sa alergenom i mogu igrati zaštitnu ulogu (61). Isto tako, potrebno je istraživanje da bi se dokazalo da li se sIgG4 mogu koristiti kao marker uspešnosti VIT. Rano izlaganje venomu pčele pokreće IgG1 i IgG2 podtipove imunskog odgovora manjeg stepena, dok dugotrajna izloženost, koja se često nalazi kod pčelara, pokreće sIgG4 podtip humoralnog imunskog odgovora. Značajno viši nivoi sIgG4 na venom pčele otkriveni su kod pčelara koje su redovno ubodale pčele i koji nisu imali alergijske reakcije, uprkos povišenim vrednostima sIgE na venom pčele. Povišeni nivoi sIgG4 se primećuju tokom VIT, ali dalje istraživanje je potrebno da bi se otkrilo da li se nivoi sIgG4 mogu koristiti kao marker uspešnosti VIT (**Slika 3**). Na kraju, test izazivanja uboda sa

živim insektom trenutno se ne preporučuje kao rutinska dijagnostička metoda zbog visokog rizika od teške SAR nakon uboda (62). Međutim, test izazivanja uboda sa živim insektom može se koristiti za procenu efikasnosti VIT, posebno kod pacijenata sa visokim rizikom od ponovnog uboda (5,62).



Slika 3. Dijagnostika alergije na Hymenoptera venome. Preuzeto od Matysiak J i sar. *Biomedicines*, 2022

Može se zaključiti da je savremena dijagnostika alergije na venome Hymenoptera veoma senzitivna, posebno uz upotrebu CRD. Izvođenjem *in vivo* kožnih i *in vitro* sIgE-testova zajedno i, u posebnim slučajevima dodatnih testova, moguće je dijagnostikovati većinu pacijenata. Međutim, još uvek nije moguće dijagnostikovati sve pacijente koji su doživeli HVA. Postoje poteškoće u slučaju višestruke pozitivnosti i donošenje odluke o odgovarajućoj VIT. Treba naglasiti da rezultati sIgE-testova nisu u korelaciji sa težinom SAR

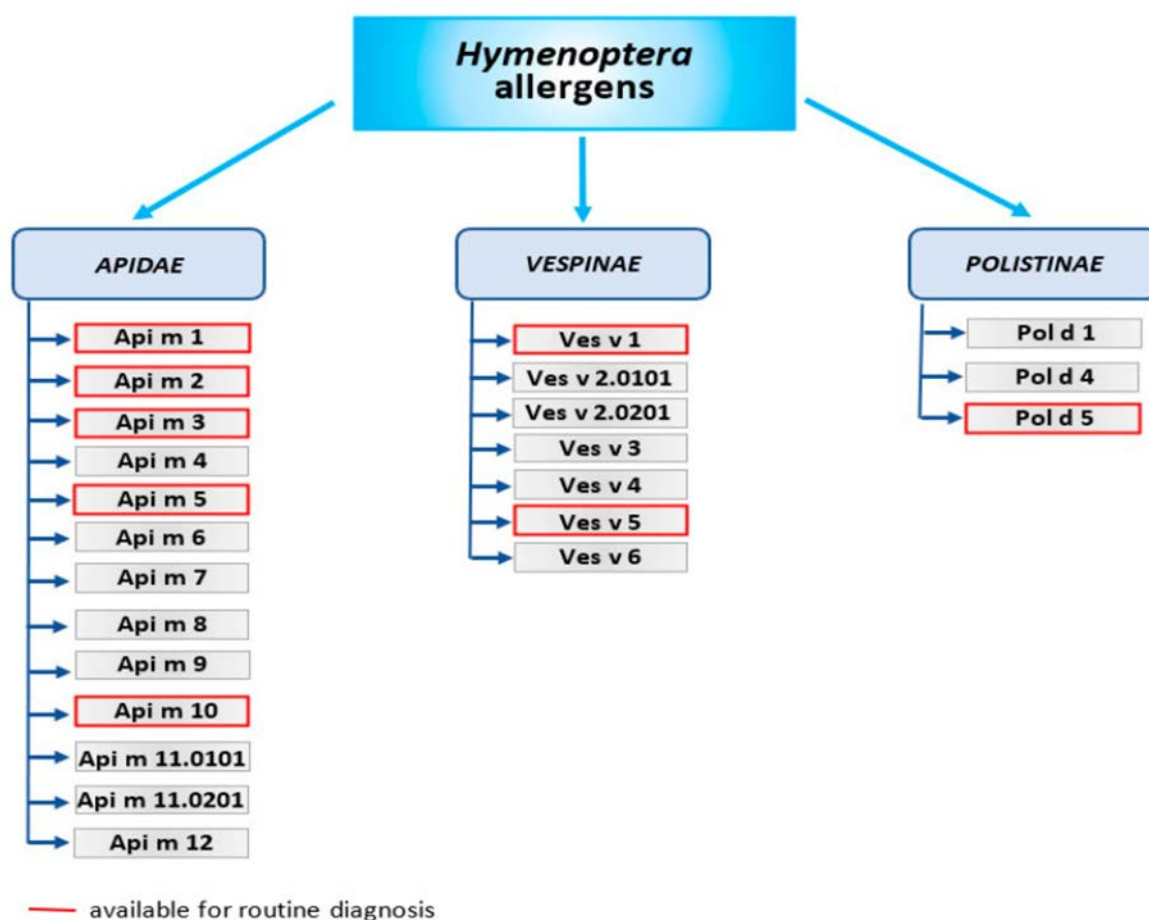
kod pacijenata sa HVA. Obzirom da je HVA potencijalno opasna po život alergija, dijagnoza HVA i VIT imaju značajan uticaj na kvalitet života pacijenta. Zato je budući cilj istraživanja pronaći bolje biomarkere HVA koji mogu poboljšati dijagnozu i proceniti efikasnost VIT (39).

1.5. Alergeni venoma Hymenoptera

Hymenoptera venomi su složene mešavine različitih bioaktivnih molekula koje se sastoje od biogenih amina, peptida, glikozilovanih i neglikozilovanih proteina. Većina proteina veće molekulske mase u sastavu venoma ima enzimsku aktivnost (63). Osim toga, venomi sadrže fosfolipide, feromone, nestabilna jedinjenja i oko 80% vode (2). Najbolje ispitani Hymenoptera venom je venom pčele (64,65). Iako je nekoliko stotina proteina i peptida sadržanih u pčelinom otrovu već identifikovano, njegov pun sastav još uvek nije ispitan (66,67). Znanje o tačnom sastavu venoma Hymenoptera je neophodno za tačnu dijagnozu HVA. Razumevanje za sve komponente alergena ne samo u venomu, nego i u terapijskim ekstraktima koji se koriste za specifičnu VIT, može da utiču na ishod VIT. Prema Potkomitetu za nomenklaturu alergena odobren od strane svetske zdravstvene organizacija i međunarodne unije imunoloških društava (engl. *the World Health Organization and International Union of Immunological Societies - WHO/IUIS*)(68), proteinska komponenta jednog venoma smatra se alergenom ako se IgE antitela specifično vezuju za protein kod najmanje 2 od 10 ispitanika sa alergijom na venom i ako nema IgE vezivanja kod ispitanika bez alergije na venom (69). Ovo vezivanje IgE bi bilo poželjno utvrditi i za proteine koji su oslobođeni CCD. Do sada je identifikovano 113 proteina i peptida u venomu pčele, a takođe su otkrivene i sezonske varijacije u sastava venoma pčele (70).

Prema WHO/IUIS, registrovano je dvanaest proteinskih komponenti koje predstavljaju alergene pčele i pet proteinskih komponenti koje predstavljaju alergene ose (68). Jedanaest od dvanaest alergena potiče od venoma pčele (Api m 1–Api m 12), dok dve proteinske izoforme potiču od pčelinjeg sekreta iz matičnih mlečnih žlezda (Api m 11a (0101) i Api m 11b (0201))(46). Neki alergeni prisutni u venomu pčele su specifični za pčele i nisu prisutni u venomima osa. Oni se nazivaju marker alergeni jer služe kao znak prave

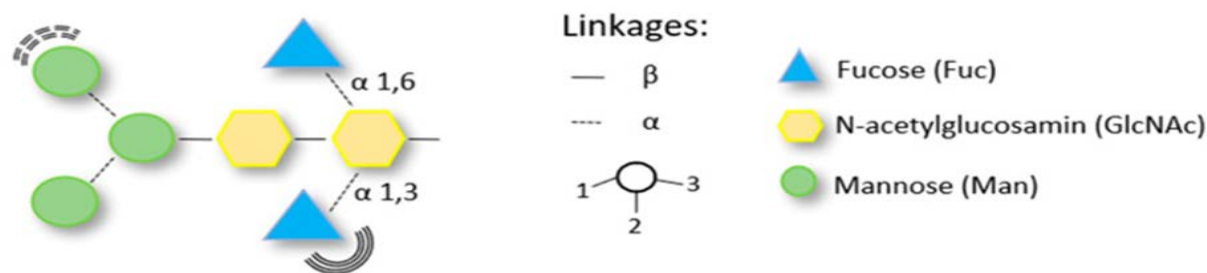
senzibilizacije na venom Hymenoptera. Primeri marker alergena specifičnih za pčelu su fosfolipaza A2 (engl. *Phospholipase A2*-Api m 1), kiselna fosfataza (engl. *Acid phosphatase* -Api m 3), melitin (engl. *Melittin*-Api m 4) i ikarapin (engl. *Icarapin*-Api m 10). Marker alergeni specifični za osu su fosfolipaza A1 (engl. *Phospholipase A1*-Ves v 1) i antigen 5 (engl. *Antigen 5*-Ves v 5) (46,71). Pored ovoga, neki alergeni pčele su slični alergenima ose zbog visokog sadržaja identičnih proteinskih sekvenci. Takvi alergeni se nazivaju homologni ili unakrsno-reaktivni alergeni zato što osoba koje je senzibilisana na jedan od ovih alergena može pokazati unakrsnu reaktivnost sa drugim homolognim alergenom. Alergeni prisutni u venomima pčele i ose koji pokazuju unakrsnu-reaktivnost zbog velikog procenta identičnih sekvenci su dipeptidil-peptidaze IV (engl. *Dipeptidyl peptidase*-Api m 5 i Ves v 3) (72) hijaluronidaze (engl. *Hyaluronidase*-Api m 2 i Ves v 2) i vitelogenini (engl. *Vitellogenin*-Api m 12 i Ves v 6) (5). Hijaluronidaza ose postoji u 2 izoforme, Ves v 2.0101 i Ves v 2.0201, od kojih je Ves v 2.0201 neaktivna, ali preovlađujuća izoforma (73)(Slika 4).



Slika 4 . Alergeni venoma Hymenoptera. *Preuzeto od Matysiak J i sar. Biomedicines, 2022*

Većina alergena venoma su glikoproteini koji sadrže jedan ili više oligosaharida vezanih za protein (74). Glavni alergeni pčele Api m 1 i Api m 2 i ose Ves v 2 su glikozilovani. Ugljenohidratine strukture glavnih alergena pčele i ose sadrže alfa 1,3-vezani ostatak fukoze na N-glikanskom jezgru koje proizvode insekti i biljke. Obe strukture u sastavu venoma, proteinske i CCD strukture su unakrsno-reaktivne i mogu predstavljati visoko imunogene epitope za IgE antitela (73,75). Glikozilacija predstavlja posttranslacionu modifikaciju proteina koja se obavlja u endoplazmatskom retikulumu (76). Biljni glikoproteini nose alfa 1,3-fukozu i beta 1,2-ksilozu koje su vezane za glikansko jezgro i čine dve N-glikanske strukture: MUXF (bromelain) i MMXF (engl. *horseradish peroxidase*). Glikoproteini insekata sadrže alfa 1,3-fukozu i alfa 1,6-fukozu vezane za glikansko jezgro koje su karakterične za njihovu strukturu (**Slika 5**) (77). Glavne razlike između ugljenohidratnih struktura insekata i biljaka su prisustvo ksiloze ili 1,6-fukoze. Antitela IgE klase usmerena protiv ovih glikanskih epitopa pružaju osnovu za *in vitro* unakrsnu-reaktivnost alergena. U rutinskoj praksi, najčešće se koriste MUXF i MMXF glikoproteini za identifikaciju IgE-reaktivnosti na CCD (74).

Klinički značaj CCD je još uvek nejasan, ali u slučaju HVA konsenzus je da CCD predstavljaju klinički irelevantne determinante (74,78).



Slika 5. Struktura N-glikana Hymenoptera insekta. *Preuzeto od Matysiak J i sar. Biomedicines, 2022*

Glavne alergene venoma *Apidae* predstavljaju (71)(**Tabela 1**):

Api m 1 - Fosfolipaza A2 je najbolje okarakterisan alergen venoma pčele i predstavlja jedan od glavnih alergena u venomu. Api m 1 sa molekulskom težinom oko 16 kDa čini 10% do 12% suve težine pčelinjeg venoma i predstavlja najaktivniju poznatu fosfolipazu (79).

Enzim se sastoji od jednog lanca sa 128 aminokiselinskih ostataka, vezanim ostacima ugljenih hidrata i oko 6 do 8 disulfidnih mostova koji stabilizuju terciarnu strukturu proteina (**Slika 6**). Sekretija Api m 1 prati sezonski obrazac (79), a varijacije sekrecije su sinhronizovane sa varijacijama sekrecije melitina-Api m 4. Sekretija oba proteina raste istom brzinom. Pod uticajem enzimske aktivnosti fosfolipaze A2 dolazi do hidrolize membranskih fosfolipida, ćelijska membrana gubi svoj potencijal i postaje propustljiva za jone kalcijuma. Ovo povećanje koncentraciji jona kalcijuma u citoplazmi izaziva poremećaj funkcije mitohondrija (66,67).

Api m 2 - Hijaluronidaza je enzim molekulske težine 44 kDa koji sadrži 382 aminokiseline. To je drugi glavni alergen pčele koji čini oko 2% suve mase venoma. Hijaluronidaza je odgovorna za degradaciju hijaluronske kiseline čime se povećava propustljivost vezivnog tkiva i smanjuje viskoznost telesnih tečnosti što olakšava širenje toksina. Oko 50% osoba alergičnih na pčelinji venom ima IgE antitela specifična za hijaluronidazu (80).

Api m 3 - Kisela fosfataza je enzim koji pokazuje optimalnu aktivnost u kiseloj pH sredini. Sastoji se od 373 aminokiseline i sadrži 3 potencijalna mesta N-glikozilacije i dve disulfidne veze koje stabilizuju enzim. Enzim je prisutan u pčelinjem venomu u maloj količini i čini 1% do 2% suve težine venoma (81).

Api m 4 - Melitin je jedan od glavnih enzima pronađen u pčelinjem venomu sa jakim hemolitičkim i antimikrobnim aktivnostima. Dokazano je da ima mnogo niža alergogena svojstva od fosfolipaze A2 ili hijaluronidaze pčele. Ovaj enzim deluje sinergistički sa fosfolipazom A2. Melitin remeti strukturu lipidnog dvosloja ćelijske membrane što dovodi do osetljivosti membrane na enzimsko dejstvo fosfolipaze A2. Kao posledica toga dolazi do lize ćelije, kao i hemolize eritrocita. Enzim je kardiotoksičan i dovodi do disfunkcije srčanih kontrakcija, morfoloških promena srčanog mišića, bradikardije, aritmija i atrioventrikularnih blokova. Isto tako, odgovoran je za lokalno zapaljenje i osećaj bola oko mesta uboda pčele, obzorom da aktivira primarne nociceptore ćelija. Ovaj enzim ima sezonski karakter lučenja koji je takođe sinhronizovan zajedno sa lučenjem fosfolipaze A2 (79,81).

Api m 5 - Dipeptidil-peptidaza IV je enzim molekulske težine 100 kDa. Zbog strukturne sličnosti sa enzimom koji se nalazi u venomu ose Ves v 3, smatra se drugim najčešćim uzrokom unakrsne-reaktivnosti između dve vrste insekata (82). Dipeptidil-peptidaza IV je odgovorna za pretvaranje promelitina u melitin u krvnim sudovima i moduliranje hemotaktičke aktivnosti imunskih ćelija nakon uboda insekta.

Api m 10 - Ikarapin je enzim molekulske težine 50-55 kDa koji se sastoji od 223 aminokiseline koji ima nestabilnu strukturu podložnu degradaciji. Smatra se glavnim alergenom pčelinjeg venoma iako je sadržaj u venomu manji od 1%. Api m 10 je bogat ugljenim hidratima, nestabilan, nepoznate funkcije i vrlo važan dijagnostički marker. Do sada je otkriveno devet izoformi Api m 10, a karakteristično za njega je što je nedovoljno zastupljen u terapijskim ekstraktima koji se koriste za VIT (51,82).

Pokazalo se da postoji antigenu 5 sličan protein u venomu pčele, koji je izražen samo u zimskom periodu i moguće je da ne pokazuje IgE-reaktivnost sa serumima osoba sa alergijom zbog izostanka senzibilizirajućih uboda tokom zime (70).

Među alergenima *Vespinae* najznačajniji su (**Tabela 1**):

Ves v 5 - Antigen 5 je važan i veoma rasprostranjen alergen u venomu *Vespidae*. Pošto je Antigen 5 u velikoj količini prisutan u venomu ose predstavlja glavni alergen ose, međutim njegova funkcija je još uvek nepoznata (83). Pošto antigeni 5 imaju visok stepen identičnih sekvenci, pa samim tim i proteinskih epitopa, oni su veoma unakrsno-reaktivni nezavisno od vrste *Vespidae* koja je dovela do senzibilizacije (83). Sekundarna struktura proteina je raspoređena u α - β - α -sendviču i sastoji se od centralnog β -lista okruženog sa obe strane α -heliksom. Većina strukturnih elemenata u Ves v 5 može se očekivati u svim antigenima 5 *Vespidae* (84) (**Slika 6**).

Trodimenzionalne strukture najvažnijih Hymenoptera alergena prikazane su na **Slici 6**.

Tabela 1. Pregled najvažnijih alergena venoma Hymenoptera. Preuzeto i modificovano od Jakob T i sar. Allergo J Int, 2017

Allergen	Ime/Funkcija	Molekulska težina (kDa)	N glikozilacija (potencijalna)
Pčela (<i>Apis mellifera</i>)			
Api m 1	<i>Phospholipase A2</i>	17	1
Api m 2 ^a	<i>Hyaluronidase</i>	45	3
Api m 3	<i>Acid phosphatase</i>	49	2
Api m 4	<i>Melittin</i>	3	-
Api m 5 ^b	<i>Allergen C/DPP IV</i>	100	6
Api m 6	<i>Protease inhibitor</i>	8	-
Api m 7	<i>Protease</i>	39	3
Api m 8	<i>Carboxylesterase</i>	70	4
Api m 9	<i>Carboxypeptidase</i>	60	4
Api m 10	<i>CRP/Icarapin</i>	55	2
Api m 11	<i>Major royal jelly protein 8 (MRJP 8)</i>	65	6
Api m 11	<i>Major royal jelly protein 9 (MRJP 9)</i>	60	3
Api m 12 ^c	<i>Vitellogenin</i>	200	1
Osa (<i>Vespula spp.</i>)			
Ves v 1	<i>Phospholipase A1</i>	35	-
Ves v 2.0101 ^a	<i>Hyaluronidase</i>	45	4
Ves v 2.0201 ^a	<i>Hyaluronidase</i>	45	2
Ves v 3 ^b	<i>Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV)</i>	100	6
Ves v 5	<i>Antigen 5</i>	25	-
Ves v 6 ^c	<i>Vitellogenin</i>	200	4
Stršlje (<i>Vespa crabo</i>)			
Vesp c 1	<i>Phospholipase A</i>	34	0
Vesp ma 2	<i>Hyaluronidase</i>	33	4
Vesp c 5	<i>Antigen 5</i>	23	0

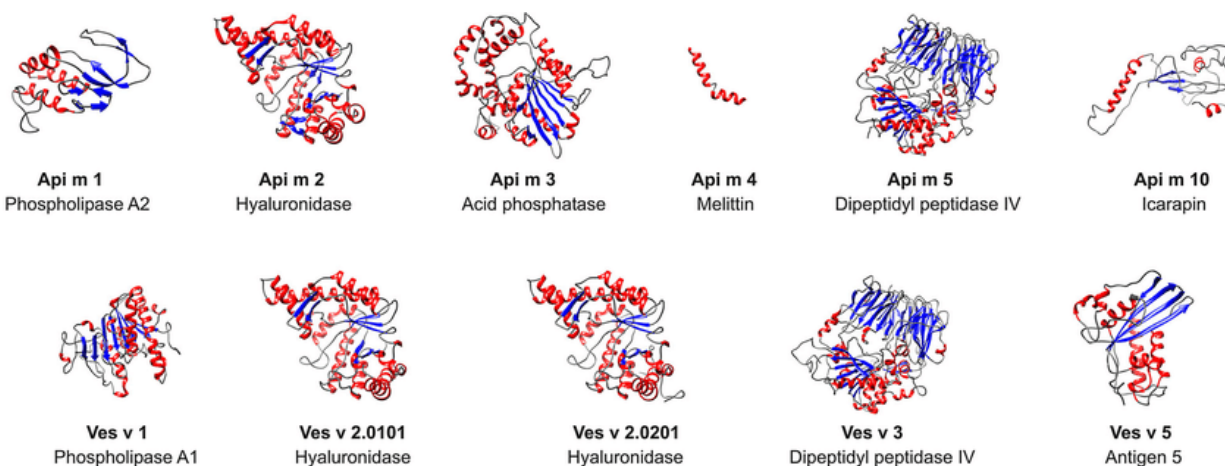
^{a,b,c} Homologi alergeni, CRP: Protein bogat ugljenohidratima (engl. *Carbohydrate-rich protein*), DPP IV: *Dipeptidylpeptidase IV*

Ves v 1 - Fosfolipaza A1 je peptid sa hemolitičkom aktivnošću.

Ves v 2 - Hijaluronidaza (Ves v 2.0101 i Ves v 2.0201 izoforme) je enzim ose koji hidrolizuje hijaluronsku kiselinu. Hijaluronidaza ose Ves v 2 i hijaluronidaza pčele Api m 2 imaju visok procent identičnih sekvenci.

Ves v 3 - Dipeptidil peptidaza-IV ose je enzim sa visokom unakrsnom-reaktivnošću, zbog 76,1% identičnih sekvenci kao i Api m 5.

Ves v 6 – Vitelogenin ose je enzim sa visokom unakrsnom-reaktivnošću zbog visokog procenta identičnih sekvenci kao i Api m 12 (Tabela 1).



Slika 6. Trodimenzionalna struktura važnih alergena Hymenoptera venoma. Alfa-heliks i β - ploče su prikazane crvenom i plavom bojom, redom. *Preuzeto i modificovano od Simon Blank, i sar. Allergo J Int, 2020*

1.6. Molekularna dijagnostika koja koristi pojedinačne rekombinantne komponente (engl. *Component-resolved diagnostics-CRD*)

Paralelno sa razvojem novih metode za detekciju sIgE došlo je do revolucije u oblasti ekstrakata alergena. U početku su korišćeni sirovi prirodni i nestandardizovani ekstrakti, a

potom upotreba standardizovanih ekstrakata sa unapređenim preciznijim sadržajem komponenti (2). Napredak molekularne biologije tokom poslednjih decenija omogućio je detaljnu karakterizaciju relevantnih Hymenoptera alergena. Za razliku od dijagnostike na bazi ekstrakta venoma koja meri nivo sIgE na ceo prirodni venom, CRD je bazirana na detekciji sIgE na pojedinačne alergene venoma. Testiranje specifične IgE-reaktivnosti na pojedinačne alergene komponente predstavlja superiornu dijagnostiku u odnosu na konvencionalno alergološko testiranje (85). Rekombinantna ekspresija alergena je omogućila proizvodnju alergena bez CCD koji se mogu koristiti u dijagnostičke svrhe (86,87). Kao rezultat toga, molekularna alergološka dijagnostika postala je sastavni deo dijagnostike HVA. Dijagnostika koja koristi pojedinačne rekombinantne alergene ne samo da pruža informacije o tome da li je pacijent senzibilisan na ceo venom, već i koji alergeni venoma su relevantni za pacijenta. Međunarodna granica za detekciju sIgE je decenijama unazad bila 0,35 kUA/l. Međutim, razvojem CRD i savremenih autoanalizatora predložena i prihvaćena donja granica za detekciju sIgE od strane regulatornih organa je 0,1 kUA/l (88).

Veliko ograničenje sIgE-testiranja na ekstrakte venoma različitih Hymenoptera ne dozvoljava diskriminaciju između unakrsne reaktivnosti i primarne senzibilizacije na više venoma. Analiza pojedinačnih alergeničkih komponenti venoma omogućava identifikaciju alergena koji su prisutni samo u jednom ili drugom venomu i zato predstavljaju marker alergene jer identifikuju primarnu senzibilizaciju na specifičan venom. Marker alergeni za detekciju primarne senzibilizacije na venom ose su Ves v 1 i Ves v 5, dok su za detekciju primarne senzibilizacije na venom pčele Api m 1, Api m 3, Api m 4 i Api m 10 (58). Do sada nisu identifikovani marker alergeni koji bi podržali definitivnu diskriminaciju preosetljivosti na venome različitih potfamilija *Vespidae* (58).

Alergene komponente koje ukazuju na ukrasnu-reaktivnost između vrsta *Apidae* i *Vespidae* su Api m 2 i Ves v 2, Api m 5 i Ves v 3, kao i Api m 12 i Ves v 6 (72,86,89,90). Značajno je istaći da je sIgE-reaktivnost na hijaluronidazu ose (Ves v 2a, Ves v 2b) uglavnom zasnovana na prisustvu IgE antitela usmerenih na epitope CCD što dovodi u pitanje njihovu relevantnost u kontekstu alergije (86,91). Nasuprot tome, IgE-reaktivnost na hijaluronidazu pčele (Api m 2) je usmerena na proteinski deo alergena u značajnom procentu, čak do 52% (92,93).

Na svakoj komponenti alergena, postoje obično nekoliko različitih epitopa za vezivanje odgovarajućih antitela. S druge strane, proteini sa sličnom strukturom su često prisutni kod biološki povezanih vrsta, a antitela koja se formiraju protiv takvih proteinskih struktura mogu se vezati za istu ili sličnu strukturu na proteinu druge vrste i uzrokovati unakrsnu-reaktivnost. Komponente alergena specifične za vrstu su jedinstveni markeri za njegov izvor alergena, a identifikacija antitela na alergene komponente omogućava detekciju primarne senzibilizacije koja je dovela do SAR. Antitela na komponente alergena koje predstavljaju markere za unakrsnu-reaktivnost zbog njihove slične proteinske strukture mogu dati dragocene informacije o mogućim senzibilizacijama na nekoliko različitih vrsta (94). Podaci analize strukture glikoproteina pokazuju da, uprkos visokom procentu identičnih sekvenci, hijaluronidaza pčele i ose Api m 2 i Ves v 2 pokazuju vrlo malo homologije koja potiče od površinskih epitopa alergena. Drugim rečima, hijaluronidaza ose Ves v 2 nema epitope koji bi mogli da nose IgE-posredovanu unakrsnu-reaktivnost sa epitopima hijaluronidaze pčele Api m 2 (95). Dakle, sIgE-reaktivnost na Api m 2 koja je oslobođena CCD može biti indikator za primarnu senzibilizaciju na veonom pčele (92). Ovi nalazi ukazuju da upotreba alergena bez CCD predstavlja novu strategiju sa velikim implikacijama za dijagnostičke i terapijske pristupe.

Ekstrakti prirodnih venoma koji se koriste za dijagnozu mogu dovesti do lažno-pozitivnih rezultata zbog unakrsne IgE-reaktivnosti usmerene protiv epitopa CCD. Molekularna alergološka dijagnostika, korišćenjem rekombinantnih alergena koji su oslobođeni CCD omogućava otkrivanje prave senzibilizacije, a samim tim kod mnogih pacijenata poboljšava izbor odgovarajućeg venoma za VIT. Do 75% višestruko pozitivnih *in vitro* testova sa venomima pčele i ose uzrokovano je IgE antitelima na epitope CCD (CCD-sIgE) i na proteinske epitope homologih alergena (96). Merenje CCD-sIgE može objasniti nalaz višestruke pozitivnosti kod alergičnih pacijenata (97,98). Unakrsna-reaktivnost koja se može pripisati proteinskim epitopima homologih alergena prisutnih u venomima Hymenoptera iznosi oko 50%. Kao rezultat toga, dijagnostički testovi zasnovani na detekciji antitela na ekstrakte venoma, iako su veoma senzitivni nemaju adekvatnu specifičnost (55). Pokazano je da su IgE antitela usmerena protiv CCD epitopa insekata i biljaka antitela visokog afiniteta, ali kao što je pomenuto, nemaju klinički značaj iz nepoznatog razloga (99).

Merenjem IgE na CCD marker MUKSF3-bromelain moguće je utvrditi prisustvo CCD-sIgE antitela kao razlog višestruko pozitivnih rezultata sIgE-testova. Međutim, pošto sIgE antitela mogu biti prisutna protiv oba, i epitopa CCD i proteinskih epitopa, izolovana detekcija CCD-sIgE ne omogućava isključivanje senzibilizacije na proteinske epitope venoma.

Postoje različiti sistemi za proizvodnju rekombinantnih alergena, kao što su E.coli i ćelije insekata *Spodoptera frugiperda* (Sf9), koji omogućavaju da protein bude pravilno trodimenzionalno savijen i ne bude glikozilovan (72,86,100). Alergene komponente iz venoma ose koje su dobijene rekombinantnom tehnologijom su rekombinantna (r) Ves v 1 (rVes v 1), rVes v 2, rVes v 3 i rVes v 5 (72,86,101,102), dok su alergene komponente iz venoma pčele koje su dobijene rekombinantnom tehnologijom rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5 i rApi m 10 (72,102–104).

Komercijalno dostupni pojedinačni rekombinantni alergeni za CRD su (105):

- rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 4, rApi m 5 i rApi m 10, rVes v 1 i rVes v 5 za ImmunoCAP metodu (*Phadia/Thermo Fisher Scientific*),
- rApi m 1, rApi m 2, r 10, rVes v 1 i rVes v 5 za Imunoblot metodu (*Euroimmun, Germany, Euroline*)
- rApi m 1, rApi m 2 i rVes v 5 za Immulite (*Siemens Healthcare Diagnostics*).

Dijagnostički problemi koji ponekad mogu da se pojave u vezi su izolacije i proizvodnje alergena venoma. Postoji rizik za proizvodnju kontaminiranih komponenti u preparatu koji može da iskrivi sliku na molekularnom nivou iako upotreba rekombinantnih alergena i mogućnost izvođenja analiza na molekularnom nivou dovode do poboljšanja dijagnostičke preciznosti (106). Efikasnost proizvodnje rekombinantnih alergena u prokariotskim sistemima često zavisi od samog proteina i uspešan je za strukturno relativno jednostavne i male molekule. U eukariotiskim sistemima, kao što su kvasac i posebne ćelije insekata i sisara, dodaju se oligosaharidi proteinima koji su slični ali nisu identični oligosaharidima nativnih proteina. Ovi oligosaharidi utiču na savijanje i imunoreaktivnost proteina (107). U poslednjih nekoliko godina ekspresija u ćelijama insekata predstavlja zadovoljavajući sistem za proizvodnju rekombinantnih alergena. Funkcionalnost proteina, autentičnost epitopa i pravilno savijanje proteina moglo bi biti demonstrirano za veliki broj

alergena (72). Uzročnici fenomena unakrsne-reaktivnosti su IgE antitela koja su usmerena na alfa 1,3- fukozne ostatake vezane za N-glikansko jezgro glikoproteina insekata i biljaka (99) (**Slika 7a**). U biljkama se dodatno nalazi beta 1,2-ksilozni ostatak na glikanskom jezgru na koji IgE antitela takođe mogu biti usmerena. Takve ksenobiotske modifikacije predstavljaju visoko imunogene epitope koji mogu indukovati antitela svih klasa, a posebno IgG i IgE antitela (99). Zamku u *in vitro* dijagnostici alergija predstavljaju CCD-sIgE, jer izazivaju višestruku-reaktivnosti sa bilo kojom glikozilovanom biljkom (hrana, polen) ili venomom insekta. Uticaj CCD-sIgE u dijagnostici alergije na pčelu može biti veliki jer nativna Api m 1 u svom prirodnom obliku nosi alfa 1,3-vezanu fukozu na N-glikanu. S druge strane, rApi m 1, koja se proizvodi bez celog jezgra glikana ili samo bez 1,3 fukoznog ostatka, pokazala je visoku pouzdanost za otkrivanje senzibilizacije na proteinske epitope u poređenju sa nativnom Api m 1. Dijagnostika koja koristi pojedinačne rekombinantne alergene, primenom neglikozilovanih alergena kao što su rApi m 1 i rVes v 5 (102,108) dovela je do značajnog napretka u razlikovanju prave dvostruke senzibilizacije naspram irelevantne unakrsne-reaktivnosti. Upotreba Sf9 ćelija insekata *Spodoptera frugiperda* je sistem ekspresije koji dovodi do alergena sa funkcionalnom glikozilacijom, pravilnim savijanjem i kompletnim spektrom epitopa (86,100).

Još jedan problem *in vitro* dijagnostike HVA predstavljaju pacijenti sa dokumentovanim anamnezom HVA, ali negativnim sIgE-testom. Mogući razlog negativnih sIgE-testova može biti taj što ekstrakti venoma predstavljaju heterogene smeše u kojima su komponente prisutne u različitim koncentracijama, kao i razlog da određeni alergeni mogu biti izgubljeni ili degradirani tokom obrade (51) (**Slike 7b i 7c**).

Nekoliko studija je potvrdilo da se upotrebom komercijalno dostupnih rekombinantnih alergena bez CCD dijagnoza alergije na pčelu može potvrditi kod 94,4% pacijenata (59), dok upotreba rVes v 5 i rVes v 1 može potvrditi alergiju na osu kod 100% pacijenata (5,102). Mnogi pacijenti sa istinskom senzibilizacijom mogu se identifikovati pomoću rApi m 1 i rVes v 5 koji su dostupni za rutinsku *in vitro* dijagnostiku, a koji strukturno nisu povezani. Prema smernicama Evropske akademije za alergiju i kliničku imunologiju (engl. *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology-EAACI*), VIT se ne preporučuje pacijentima bez kliničkih simptoma sa slučajno otkrivenom senzibilizacijom na

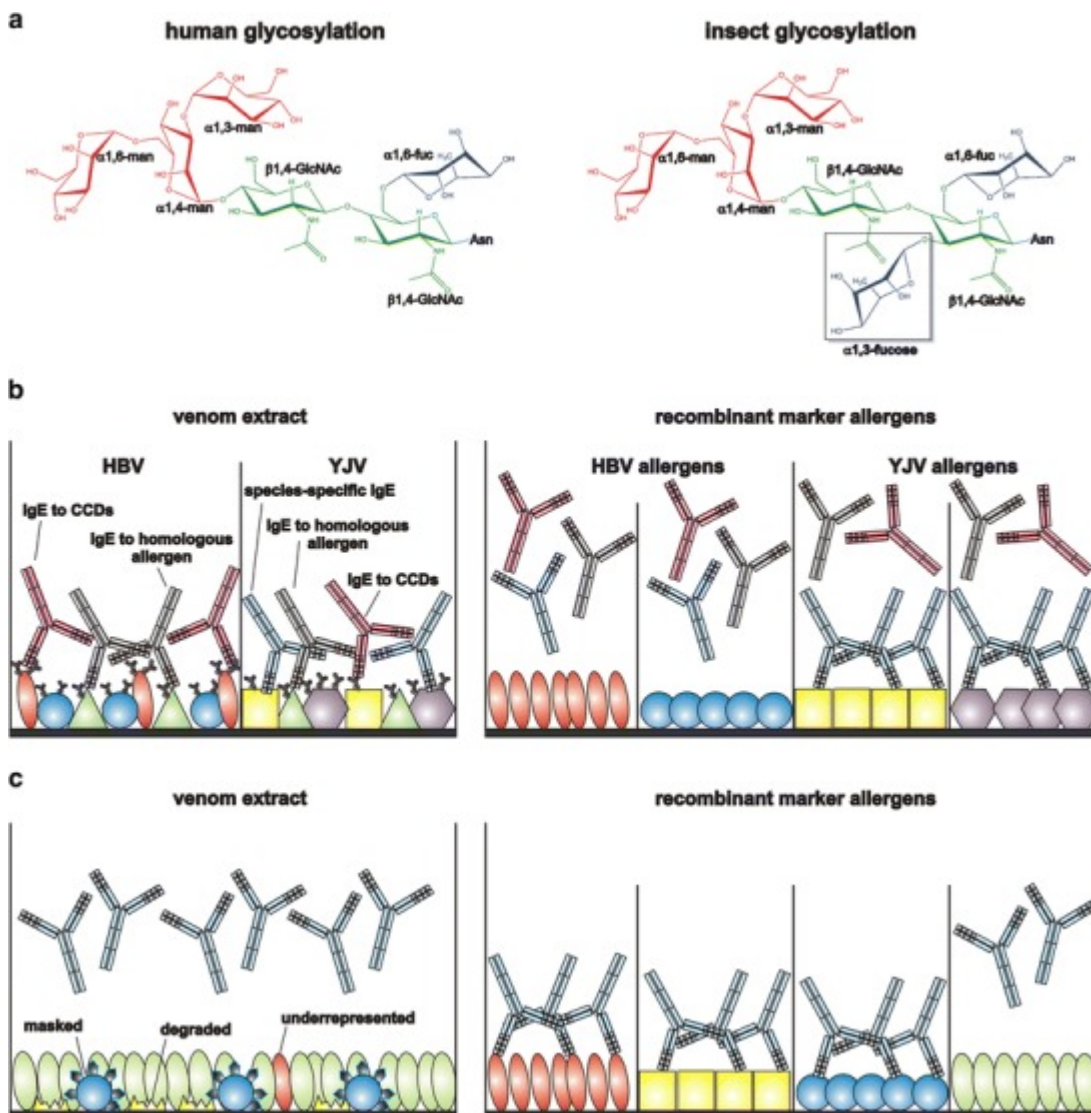
venom insekta (42). Antigen 5 je prepoznat kao glavni i najsnažniji alergen u otrovu ose i stršljena i može pomoći u serološkoj potvrdi senzibilizacije kako kod alergičnih pacijenata na osu tako i kod alergičnih pacijenata na stršljen (109,110).

Serum-specifična IgE na rVes v 5, detektovana ImmunoCAP metodom su pokazala zadovoljavajuću senzitivnost (84-93%) i specifičnost (94-100%) za dijagnozu prave senzibilizacije na osu ili stršljen i mogu pomoći u adekvatnom izboru odgovarajućih alergena za VIT (56,111,112). Međutim, niska senzitivnost za dijagnostiku sIgE na rApi m 1 u rasponu od 57% do 79%, prijavljena je kod pacijenata sa alergijom na pčelu (50,102). Veću senzitivnost za rApi m 1 (88% do 97%) kod pacijenata sa alergijom na pčelu su prijavile druge grupe autora (56,112,113). Senzitivnost Api m 1 može zavistiti od regionalnih razlika ili od sIgE-testa koji se koristi u dijagnostici. Postoji pretpostavka da kapacitet vezivanja sIgE za rekombinantni Api m 1 koji se koristi u ImmunoCAP dijagnostici može biti smanjen zbog nepravilnog savijanja proteina rekombinantnom tehnologijom (113). S druge strane, pokazano je da sIgE-reaktivnosti na prirodni Api m 1 i rekombinantni Api m 1 daje identične rezultate ImmunoCAP metodom (114). Senzibilizacija na druge glavne alergene pčele Api m 3 i Api m 10 je prisutna kod 50% i 62% pacijenata alergičnih na venom pčele. Korišćenje proširenog repertoara alergena Api m 1, Api m 3, Api m 4 i Api m 10 značajno povećava dijagnostičku senzitivnost za detekciju senzibilizacije na venom pčele do 90% u poređenju sa korišćenjem samo Api m 1 (115). S druge strane, najveća senzitivnost, do 100% je pronađena za ekstrakte venoma pčele i ose (56,102,111,113).

U većini slučajeva, kada dijagnostika zasnovana na ekstraktima venoma ne utvrdi tačan uzročnik alergije zbog višestruke senzibilizacije ili negativnih sIgE-testova, CRD omogućava detaljno otkrivanje profila senzibilizacije i identifikaciju venoma koji je doveo do kliničkih simptoma. Zajedno sa boljim poznavanjem molekularnog sastava različitih ekstrakata venoma, CRD može doprineti optimalnoj terapiji prilagođenoj pacijentima (116). Štaviše, za pacijente koje je teško dijagnostikovati zbog niskih koncentracija sIgE, CRD ima veću senzitivnost u poređenju sa testiranjem na bazi ekstrakta venoma.

Važno je znati da određeni alergeni nisu dovoljno zastupljeni u nekim terapijskim ekstraktima što može biti razlog terapijskih neuspeha (93). Dijagnostika koja koristi

pojedinačne rekombinantne alergene može biti od veće pomoći u dijagnostikovanju alergije na venom ose nego alergije na venom pčele zbog specifičnosti sastava venoma. Alergeni prisutni u velikim količinama u terapijskim mešvinama za VIT su Api m 1, Api m 2 i Api m 4 (10%, 3% i >40% suve težine venoma, redom). Nasuprot ovome, Api m 3, Api m 5 i Api m 10 su nedovoljno zastupljeni (manje od 1% suve težine venoma) ili odsutni u brojnim terapijskim preparatima (93,104).



Slika 7. Molekularna IgE dijagnostika. Preuzeto od Ollert M, Blank S. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015

Obzirom na složene obrasce senzibilizacije kod pacijenata sa alergijom na pčelu, zbog velikog broja različitih alergena prisutnih u pčelinjem venomu, potrebno je dalje ispitivanje za analizu i identifikaciju visokorizičnih profila. Treba naglasiti da CRD može razlikovati klinički značajnu senzibilizaciju od klinički irelevantne senzibilizacije (116). Mogućnost utvrđivanja specifičnih IgE antitela na više rekombinantnih alergenijskih komponenti omogućavaju razvoj CRD. Pored pravilnog tumačenja rezultata testova, kliničari moraju da znaju o osnovama CRD, njihovim kliničkim implikacijama i moraju imati na umu da senzibilizacija ne mora nužno podrazumevati kliničku alergiju. Dijagnostika koja koristi pojedinačne rekombinantne alergene je važna za donošenje odgovarajućih i pravovremenih kliničkih odluka za svakog pacijenta (117–119).

1.7. Test aktivacije bazofila (BAT)

U skladu sa CRD je i test aktivacije bazofila (BAT). BAT ima značajnu ulogu u dijagnozi HVA iako nije prva dijagnostička opcija. BAT zahteva stručnost u praktičnoj primeni i tumačenju rezultata i obično se sprovodi u sekundarnim i tercijarnim zdravstvenim centrima. Molekuli CD203c i CD63 se eksprimiraju na membranama granula bazofila. Aktivacija bazofila alergenom dovodi do eksprimiranja molekula CD203c i CD63 na površini bazofila koji se mogu kvantifikovati protočnom citometrijom. Pokazano je da je senzitivnost BAT za merenje ekspresije CD63 89%, a za CD203c 97% (120). Upotreba CD63 je više rasprostranjena. Nivo od 15% aktivacije bazofila je izabran kao granični nivo za identifikaciju senzibilizacija na venom Hymenoptera (121).

Test aktivacije bazofila se preporučuje samo ako sve ostale dijagnostičke metode ne otkriju alergiju uprkos ubedljivoj istoriji HVA (122). Pomoću BAT može se detektovati 80% senzibilisanih pacijenata koji su imali ubedljivu HVA i negativne sIgE-testove (60). Efikasnost BAT može biti smanjena kod pacijenata sa mastocitozom ili kod pacijenata sa niskim koncentracijama ukupnog serumskog IgE. Grupa autora je pokazala da BAT poboljšava dijagnostičku tačnost alergije na venom ose koristeći rekombinantne alergene ose rVes v 1 i rVes v 5 (121). Međutim, još uvek je nejasno da li je moguće razlikovati

primarnu senzibilizaciju od unakrsne-reaktivnosti u slučaju detektovane senzibilizacije na unakrsno-reaktivne alergene kao što su Ves v 2 i Api m 2 ili Ves v 3 i Api m 5.

Obzirom da BAT nije u potpunosti standardizovana metoda, teško je uporediti rezultate različitih studija. Lažno-pozitivni rezultati testa mogu biti uzrokovani visokim koncentracijama venoma, dok lažno-negativni rezultati mogu biti posledica nižeg apsolutniog broja bazofila (<150) ili dugog vremenskog perioda između uboda insekta i sIgE-testa. U svakom slučaju, BAT može biti od koristi za dobijanje detaljnijih informacija o Hymenoptera insektu, kao i u praćenju efektivnosti VIT (123).

1.8. CCD-sIgE antitela i CCD-inhibicija

Već je pomenuto da ugljeni hidrati u sastavu glikoproteina biljaka i insekata predstavljaju najobilnije imunološke determinante. Oni su strukturalna osnova onoga što je poznato kao unakrsno-reaktivne determinante ugljenih hidrata ili skraćeno CCD. Uprkos nekim strukturnim varijacijama, dva glavna ugljena hidrata su ksiloza i fukoza povezana sa jezgrom glikana koji čine suštinski deo dva nezavisna epitopa. Biljke sadrže oba epitopa dok glikoproteini insekata sadrže samo fukoze. Alfa 1,3-fukoza se redovno nalazi u glikoproteinima insekata, kao što su fosfolipaza A2 (124,125) i hijaluronidaza pčele i hijaluronidaza ose (73,126). Navedeni alergeni osim 1,3-fukoze u svom sastavu sadrže i 1,6-fukoze. Klinički efekat CCD-sIgE antitela kod pacijenata koji su razvili ova antitela, je najverovatnije mali u većini slučajeva, ali za nepristrasnog biološkog hemičara ugljeni hidrati nisu molekuli manjeg značaja (77). Međutim, veliki broj pacijenata ima CCD-sIgE antitela koja remete interpretaciju rezultata (94), a samim tim otežavaju dijagnozu HVA. Oko 50-60% pacijenata sa alergijom na HVA ima IgE-reaktivnost na *Apodae* i *Vespoidea*. Unakrsna-reaktivnost zasnovana na proteinima i determinantama ugljenih hidrata su najčešći uzroci višestruke pozitivnosti (86). Već pomenuti proteini u sastavu Hymenoptera venoma uključeni u unakrsnu-reaktivnost su hijaluronidaze Api m 2 i Ves v 2 i dipeptidil-peptidaze Api m 5 i Ves v 3 pčele i ose (127). Unakrsna-reaktivnost uzrokovana CCD-om može se eliminisati korišćenjem CRD i CCD-inhibicijom koji se nedovoljno koriste u kliničkoj praksi

(128–130). Testom CCD-inhibicije postiže se eliminacija CCD-sIgE antitela kod pacijenata koji su ih razvili i na taj način olakšava dijagnostika HVA.

Lažno-pozitivni rezultati su čest problem u *in vitro* dijagnostici HVA (6). Većina alergena venoma su glikoproteini i unakrsno povezivanje samo CCD epitopa sa IgE vezanim za mastocite ne dovodi do degranulacije mastocita. Prisustvo sIgE na ekstrakte prirodnog venoma ne dozvoljava razlikovanje između sIgE-reaktivnosti na proteinske epitope od sIgE-reaktivnosti na CCD epitope (71,131). Dijagnostika zasnovana na ekstraktima otežava odabir relevantnog venoma za VIT. U nekim slučajevima, uprkos nalazu sIgE, pacijenti nisu ranije imali simptome alergije jer je senzibilizacija uzrokovana dobro tolerisanim alergenom venoma. Imunoterapija tokom 3 do 5 godina sa relevantnim venomom je i dalje jedini efikasan i uzročni tretman HVA. Klinički značaj sIgE usmerenih na CCD epitope je kontroverzan (57,132,133). Zbog klinički irelevantnih CCD-sIgE, povećan nivo sIgE antitela na konvencionalni ekstrakt venoma treba pažljivo tumačiti u kontekstu kliničke istorije. Nažalost, identifikacija relevantnog venoma odgovornog za alergiju je ponekad teška, jer pacijenti nisu mogli da identifikuje insekt (129). Štaviše, neki pacijenti sa visokim nivoima sIgE antitela ne pokazuju kliničke manifestacije, dok drugi pacijenti sa niskim nivoima sIgE mogu doživeti tešku anafilaksu (71,129). U našoj prethodnoj studiji je pokazano da CCD-sIgE antitela češće imaju pacijenti sa alergijom na pčelu (129). Ovaj nalaz se može objasniti činjenicom da je većina alergena pčela glikozilovana, dok dva glavna alergena ose Ves v 5 i Ves v 1 nisu glikozilovana (134). Takođe, otkrili smo da upotreba rekombinantnog glavnog alergena pčele rApi m 1 u dijagnostici nije bila dovoljna, bez obzira na metod detekcije. S druge strane, upotreba rekombinantnog glavnog alergena ose rVes v 5 bila je dovoljna za detekciju oko 90% pacijenata sa alergijom na osu (129). Varijabilnost testova u dijagnostici alergija je česta zbog nedostatka međunarodnih standarda za alergene i antitela. To često dovodi do različitih rezultata ispitivanja i komplikuje njihovu uporedivost. Sve u svemu, buduća istraživanja treba da utvrde da li CCD-sIgE antitela mogu dovesti do ozbiljnih alergijskih simptoma ili ne.

1.9. Venom-specifična imunoterapija (VIT)

Za pacijente sa HVA jedina terapija koja modifikuje bolest sprečavajući učestale anafilaktičke reakcije i mortalitet (135,136) i koja poboljšava kvalitet života je specifična VIT (137). Imunoterapija odgovarajućim venomom se primenjuje više od četiri decenije, a prvi put je odobrena za primenu u Sjedinjenim Američkim Državama (42,138). Specifična imunoterapija treba da bude široko dostupna za sve pacijente sa HVA koji su u riziku za buduću SAR (33). Ona ima za cilj da indukuje imunološku toleranciju pružajući dugoročnu zaštitu od buduće SAR kod 95% pacijenata koji su alergični na venom ose i oko 80% pacijenata koji su alergični na venom pčele (19,139). Isto tako, VIT omogućava pacijentima da u nekom momentu prekinu nošenje injekcije epinefrina za samosalnu upotrebu (EpiPen), ali uprkos svim zaslugama EpiPen-a i VIT, oba tretmana mogu imati negativne posledice koje su isto tako važne za pacijente (140).

Važno je prepoznati visokorizične faktore koji identifikuju pacijente koji zahtevaju VIT. Rizik od beta-blokatora i ACEI tokom VIT je mali i ne bi trebalo da utiče na odluku o započinjanju VIT. Izbor venoma, režim i doza VIT treba da budu personalizovani. Odluka da se prekine VIT posle 5 godina donosi se na osnovu kliničkih podataka, poznatih faktora rizika i rezultata dijagnostičkih testova. Tokom VIT rizik od anafilakse je ispod 3% kod osoba sa istorijom VLR ili kožnim sistemskim reakcijama. Tokom VIT pacijenti treba da nose EpiPen zbog potencijalne mogućnosti za nastanak SAR ukoliko budu ubodeni (140). U nedostatku medicinskih indikacija za VIT, EpiPen je alternativna suboptimalna monoterapija kod alergičnih osoba iako je za mnoge pacijente opterećujuća.

Postepeno povećanje doze venoma indukuje toleranciju kroz složene imunološke mehanizme. Pacijenti se leče povećanjem doza alergena do određene koncentracije održavanja, a lečenje se sprovodi nekoliko godina. Prva randomizovana kontrolisana studija o korišćenju ekstrakta prirodnog venoma pokazala je visoku efikasnost (141). Imunoterapija se preporučuje kod dece i odraslih sa dokumentovanom senzibilizacijom na venom Hymenoptera i SAR koja premašuje generalizovane simptome kože (svrab, urtikarija i angioedem), ali i kod odraslih pacijenta sa generalizovanim simptomima kože ako je kvalitet

života oštećen (42). Uprkos studijama koje pokazuju značajno smanjenje simptoma nakon specifične VIT, verovatnoća neželjenih reakcija nije mala, a dugo trajanje terapije dovodi do visokih troškova lečenja i niske adherencije pacijenata.

1.9.1. Apsolutne i relativne kontraindikacije za VIT

Oko 47% evropskih alergologa ima iskustvo sa primenom VIT kod pacijenata sa kardiovaskularnim, malignim, autoimunskim oboljenjima i onih koji su na terapiji ACEI i/ili beta-blokatorima (142). Ustanovljeno je da kardiovaskularne bolesti same po sebi nisu kontraindikacija za VIT, kao i da se VIT može sprovoditi kod starijih pacijenata sa kardiovaskularnim oboljenjima (143). Iako lečenje adrenalinom pacijenta sa kardiovaskularnim oboljenjima na terapiji beta-blokatorima može biti manje efikasno, ovi pacijenti nemaju veći rizik za SAR na ubod Hymenoptera insekta i VIT nije kontraindikovana (34,143). Na maloj grupi pacijenata, istraživanjem je ustanovljeno da ACEI mogu predstavljati veći rizik za SAR. Prema najnovijim EAACI smernicama, terapija ACE inhibitorom se može nastaviti tokom VIT, ali pacijenti treba da budu upoznati sa mogućim rizicima od SAR tokom VIT (42,144). Aktuelno maligno oboljenje se smatra relativnom kontraindikacijom, obzirom da nema dokaza o bilo kakvim nepovoljnim efektima VIT na rast tumora ili efikasnost hemioterapije. Imunoterapija se može preporučiti pacijentima sa visokim rizikom za SAR na Hymenoptera venom ukoliko je maligna bolest stabilna ili u remisiji (145). Organ-specifična autoimunska oboljenja dijabetes melitus, Hašimotov tiroiditis, Kronova bolest, ulcerozni kolitis i reumatoidni artritis se ne smatraju kontraindikacijama kada je oboljenje stabilno ili u remisiji, ali treba imati na umu da bi imunosupresivna terapija mogla uticati na efikasnost VIT (49). Kod dece se sprovode iste preporuke za VIT, ali se VIT retko primenjuje kod dece uzrasta ispod pet godina zato što je teška SAR retka u ovoj uzrasnoj dobi (146). Kod trudnica imunoterapija se može nastaviti sa tolerantnijom dozom održavanja samo ukoliko je terapija započeta pre trudnoće, ali se ne preporučuje pokretanje VIT u trudnoći (42). Kod pacijenta sa teškom početnom SAR i

mastocitozom i/ili povišenom BST, VIT može biti manje efikasna i zato je treba sprovoditi dugo, nekada i doživotno (147).

1.9.2. Protokoli VIT

Savremeni terapijski proizvodi za specifičnu VIT su ekstrakti venoma koji se prečišćavaju standardizovanom procedurom. Proces proizvodnje ovih proizvoda regulisano je smernicama. Zbog poverljivih podataka specifičnih za proizvođača, ekstrakti venoma za VIT mogu se razlikovati po sastavu i aktivnosti alergena. Proizvodi za VIT su dostupni kao vodeni i liofilizovani ekstrakti venoma ili kao depo-preparati (136). Aktuelne smernice za VIT Američke Akademije za Alergologiju i Kliničku Imunologiju (engl. *The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology -AAAAI*) preporučuju VIT osobama koje su imale kliničke podatke o SAR na ubod Hymenoptera (122). Najnovije EAACI smernice navode indikacije za VIT i uključuju decu i odrasle koji su imali SAR (42). Obe smernice podrazumevaju definitivnu dijagnozu HVA potvrđenu *in vivo* ili *in vitro* sIgE-testom. Injekcija za VIT predstavlja medicinski zadatak i treba da je obavlja lekar špricom od 1 ml sa iglom za injekciju veličine 14–18. VIT se sprovodi potkožnim injekcijama na ekstenzornim stranama nadlaktica (49). Procedura za primenu VIT podrazumeva davanje preparata venoma insekta kroz seriju potkožnih injekcija. To je postupak u dva koraka koji se sastoji od inicijalne faze i faze održavanja (42). Početna doza VIT je 0,1 mg, a potom se doza postepeno povećava do doze održavanja od 100 µg. Smatra se da je doza od 100 µg ekvivalentna količini venoma tokom dva uboda pčele. Kod pacijenata sa SAR nakon uboda insekta preporučuje se povećanje doze na 200 µg (42). Generalno, VIT se smatra bezbednom, iako u nekim slučajevima potencijalno može nastati SAR opasna po život.

Brzi i ultra-brzi protokoli lečenja mogu rezultirati većom učestalošću SAR u poređenju sa klaster ili konvencionalnim protokolima (148). U najnovijoj studiji, istraživanjem je pokazano da su brzi i ultra-brzi protokoli za VIT bezbedniji od klaster protokola zbog manje učestalosti SAR (149). Vreme do dostizanja doze održavanja zavisi od protokola koji se koristi. Konvencionalni protokol podrazumeva postepeno povećavanje

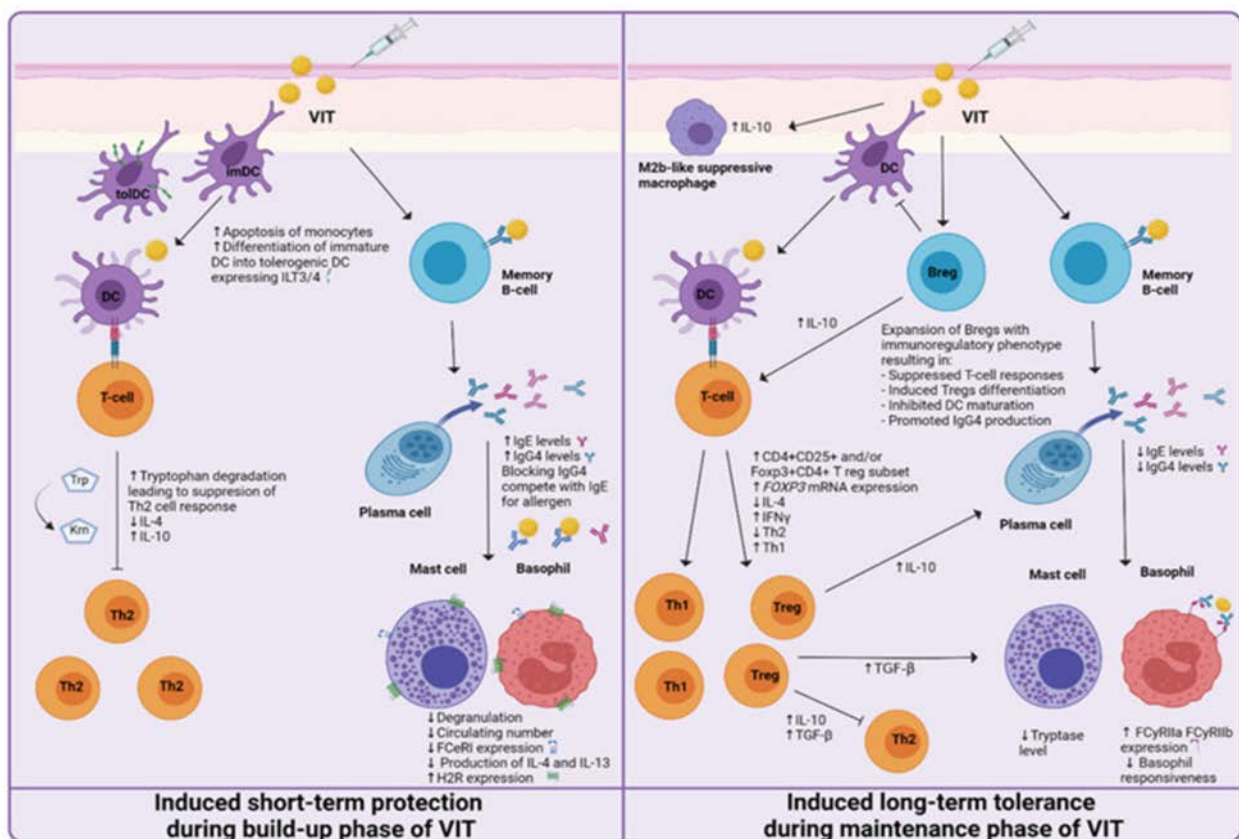
doze venoma tokom 8 do 16 nedelja lečenja (150). Brži protokoli lečenja podrazumevaju dostizanje doze održavanja u roku od jedne nedelje, dva do tri dana ili u roku od četiri do osam sati (150,151). Klaster protokol predstavlja alternativni režim za konvencionalni protokol. Preporučena početna doza je između 0,001 i 0,1 µg. Subkutane injekcije u fazi održavanja se obično daju u intervalima od četiri nedelje u prvoj godini lečenja, svakih šest nedelja u drugoj godini lečenja i svakih osam nedelja od treće do pete godine VIT (152). Protokol koji se koristi može se prilagoditi individualno, u zavisnosti od toga kako pacijent reaguje tokom VIT (153).

Važno je naglasiti da se, za razliku od imunoterapije hranom ili polenom, imunološka tolerancija uspostavljena tokom VIT smatra doživotnom, čak i nakon prekida lečenja (154). Iako su se mnoge studije fokusirale na otkrivanje biomarkera za praćenje terapije i procenu efikasnosti imunoterapije, do sada nije ustanovljen relevantni biomarker. Izazov kontrolisanog uboda ostao je do danas zlatni standard za procenu tolerancije venoma (155).

Trajanje VIT potrebno za postizanje dugotrajne tolerancije varira među pacijentima. Smatra se da je najmanje pet godina optimalno za postizanje dugotrajne tolerancija jer pruža zaštitu od neželjenih reakcija na ponovni ubod Hymenoptera (122,156). Postoje nekoliko specifičnih faktora rizika kao što je starija životna dob, teška SAR na prethodni ubod ili na ubod/injekciju tokom VIT, lečenje kraće od 5 godina, povišena BST i/ili poremećaji mastocita, alergija na venom pčele i kardiovaskularne bolesti (157). Međutim, svi pacijenti tokom VIT i dalje imaju 10% mogućnosti da dobiju alergijsku reakciju na budući ubod. Zato su periodi lečenja duži od 5 godina povezani sa nižim rizikom od recidiva (158) i to je jedini način da se rizik smanji na 2% (82). Da bi rizik od recidiva nakon prekida VIT bio što manji, mora se razmotriti produžena VIT ili čak doživotna VIT. Opšti konsenzus je da pacijenti sa inicijalnom teškom SAR i pacijenti sa dijagnozom klonskog poremećaja mastocita (često udruženog sa povišenom BST i mutacijom KIT D816V) treba da primaju doživotno VIT (159,160).

1.9.3. Imunski mehanizmi tokom specifične VIT

Specifična VIT ima za cilj da izazove prelazak sa proalergijskog i proinflamatornog Th2 stanja koji su prisutni kod osobe sa alergijom u stanje imunološke tolerancije. Indukcija tolerancije na specifičan alergen tokom VIT karakterišu promene ćelijskog i humoralnog odgovora. Promene T-ćelijskog i B-ćelijskog odgovora zajedno sa promenama u profilima citokina i klase antitela su karakteristične tokom VIT (161,162). Kod alergične osobe, Th2 ćelije specifične za venom izazivaju i iniciraju alergijsku reakciju, dok se tokom VIT formiraju regulatorne T-ćelije (T-reg) specifične za venom (163). Ponovljeno izlaganje alergenu u malim dozama dovodi do ograničenog zapaljenja ili bez zapaljenja. Kao rezultat toga, diferencijacija i aktivacija naivnih T-ćelija se pomera ka odgovoru Th1 i T-reg, što naknadno modifikuje odgovor B-ćelija, i na kraju dovodi do povećanja specifičnih IgG4 antitela. U daljem toku, T-reg ćelije su u stanju da potisnu proalergijske Th2 ćelije, a dalje potiskivanje Th2 dovodi do smanjenja sekrecije citokina IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13. Isto tako, T-reg smanjuju aktivaciju i degranulaciju mastocita, eozinofila i bazofila i dovode do smanjenja zapaljenja. Odgovor B-ćelija podrazumeva prelazak proalergijskih B-ćelija koje proizvode IgE na B-ćelije koje proizvode IgG4 sa regulatornim fenotipom i posledičnim povećanjem sekrecije IL-10 i TGF-beta (164). Prisustvo sIgG4 antitela je od velikog značaja u ranim fazama VIT, ali kasnije broj sIgG4 antitela opada. Iako se nivoi sIgG4 progresivno smanjuju, njihov uticaj na inhibiciju aktivacije bazofila ostaje. Blokirajuća sIgG4 antitela treba da imaju zaštitnu anti-inflamatornu ulogu. B-ćelije sa regulatornim fenotipom su takođe u stanju da potisne proliferaciju T-ćelija specifičnih za venom i da izazovu formiranje dodatnih T-reg. Ove promene dovode do promena u fenotipu imunskog sistema koji toleriše venom (165) (**Slika 8**). Kada dođe do ponovnog izlaganja alergenu, osim sIgG4 i drugi faktori se takmiče sa sIgE i inhibiraju IgE-posredovanu degranulaciju efektorskih ćelija. Karakteristično je da tokom VIT dolazi do početnog rasta koncentracije sIgE iza koje sledi postepeno smanjenje koncentracije sIgE tokom nekoliko meseci. Promene koncentracije sIgE tokom VIT nisu u korelaciji sa kliničkim poboljšanjem alergije (166).



Slika 8. Mehanizmi indukcije tolerancije tokom imunoterapije venomom. Preuzeto od Demšar Luzar A i sar. *Cells*, 2021

Postoje stalni istraživački napori da se pronađu prediktivni biomarkeri za praćenje efikasnosti VIT. Imunska tolerancija uspostavljena tokom i nakon završetka VIT smatra se doživotnom, mada ima autora koji su istraživanjem ustanovili da taj vremenski period može biti do 20 godina nakon terapije (167). Stečena tolerancija na alergen karakteriše nekoliko mehanizama. Tokom inicijalne faze uočava se nespecifičan kratkotrajni zaštitni efekat, dok se u fazi održavanja VIT odvija indukcija specifičnih dugotrajnih mehanizama tolerancije (153) (Slika 8).

1.9.4. Buduće smernice za VIT

Dijagnostika koja koristi pojedinačne rekombinantne alergene korišćenjem alergena bez CCD omogućava razlikovanje unakrsne-reaktivnosti i prave alergije, a samim tim i izbor odgovarajućeg venoma za VIT (58). Ipak, i dalje postoji nedostatak informacija o relevantnim alergenima prisutnim u venomima različitih vrsta Hymenoptera. Ove informacije bi bile korisne za povećanje senzitivnosti i specifičnosti dijagnostičkih sIgE-testova, kao i za poboljšanje terapijskih ekstrakata koji se koriste za VIT. Osnovni cilj istraživača je povećanje efikasnosti terapije i smanjenje vremena lečenja. Shodno tome, postoji potreba da se identifikuju biomarkeri koji mogu efikasno predvideti efikasnost VIT.

Kao posledica razvoja CRD i pronalaženja novih dijagnostičkih komponenti, omogućila bi se identifikacija različitih profila senzibilizacije i VIT prilagođena svakom pacijentu. Takva terapija bi omogućila lečenje pacijenata sa adekvatnim količinama alergena i samo sa alergenima na koje su pacijenti senzibilisani. S obzirom na složene profile senzibilizacije alergičnih pacijenata i nejednake distribucije relevantnih alergena u terapijskim ekstraktima, takva terapija bi mogla imati visok potencijal za superiornu efikasnost i izbegavanje se *de novo* senzibilizacija na druge alergene (58,87).

Prvi deo našeg istraživanja je imao za cilj da analizira dijagnostički značaj sIgE-testiranja na rekombinantne alergene kod pacijenata sa istorijom SAR na ubod Hymenoptera. Odredili smo razlike u grupama pacijenata za koje je utvrđeno da su sIgE-pozitivni na pojedinačni (PV ili OV ili SV) ekstrakt ili višestruko pozitivni (PV/OV i PV/OV/SV) na ekstrakte uzimajući u obzir težinu SAR i sIgE-reaktivnost za rApi m 1, rVes v 5 i CCD. Takođe smo ispitali da li postoji korelacije između koncentracije sIgE na alergene koje su detektovane ImmunoCAP i Imunoblot metodama. Prema podacima o alergijskoj reakciji na ubod insekta, uporedili smo senzitivnost i specifičnost sIgE-testiranja na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene pomoću obe metode.

Drugi deo našeg istraživanja je imao za cilj da analizira dijagnostički značaj CRD za istovremeno određivanje sIgE antitela na pet najvažnijih rekombinantnih alergena rApi m 1, rApi m 2, rApi m 10, rVes v 1, rVes v 5 i CCD-inhibicije kod pacijenata sa HVA. Jedan od ciljeva je bio da na osnovu pouzdanih podataka o alergijskoj reakciji na ubod insekta i sIgE-testa definišemo grupe višestruko-pozitivnih pacijenata kojima je potrebna CCD-inhibicija pre početka dugotrajne VIT.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Određivanje učestalosti dvostruke senzibilizacije na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene pčele i ose, kao i učestalost specifičnih IgE (sIgE) na unakrsno-reaktivne determinante ugljenig hidrata (engl. *cross-reactive carbohydrate determinants* - CCD)
2. Određivanje prisustva sIgE na različite rekombinantne alergene pčele kod pacijenata preosetljivih na ubod pčele
3. Određivanje specifičnosti i senzitivnosti nalaza sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene pčele i ose ImmunoCAP i Immunoblot metodama
4. Utvrđivanje korelacije dijagnostičkih testova od značaja za detekciju sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene pčele i ose
5. Utvrđivanje efekta imunoterapije merenjem specifičnih IgG4 (sIgG4) na alergene pčele i ose

3. MATERIJAL I METODE

3.1. DIZAJN STUDIJE

Istraživanje je sprovedeno u vidu retrospektivne studije na Klinici za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS). Protokol istraživanja odobren je od strane Etičkog komiteta UKCS i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, broj 1550/V-8.

3.2. ISPITANICI

Ispitanici su bili pacijenti Klinike za alergologiju i imunologiju UKCS sa postavljenom dijagnozom HVA koji su kontrolisani i lečeni u ambulantnim uslovima Klinike za alergologiju i imunologiju u periodu od marta 2015. godine do januara 2022. godine. U istraživanje su uključeni pacijenti kod kojih je dijagnoza alergijske reakcije postavljena na osnovu podatka o alergijskoj reakciji na ubod Hymenoptera insekta i *in vitro* laboratorijskih testova za detekciju specifičnih IgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene pčele, ose i stršljena. U skladu sa prethodno postavljenim ciljevima, učešće u istraživanju su mogli da uzmu svi pacijenti sa HVA ukoliko svoju saglasnost za učestvovanje potvrde potpisivanjem informisanog pristanka. Isključujući kriterijum bio je povišena bazalna serumska triptaza (BST) (nivo > 11,4 µg/L). U prvom delu istraživanja uključeno je 82 pacijenta, a isključujući kriterijum bio je alergijska reakcija na više od jednog uboda Hymenoptera insekta. U drugom delu istraživanja, uključen je 71 pacijent, i osim povišene BST, nije bilo drugih isključujućih kriterijuma. Od svih ispitanika upitnikom su prikupljeni demografski podaci (godine starosti, pol, vrsta insekta i broj uboda koji je doveo do SAR, bavljenje pčelarstvom), podaci o ličnoj anamnezi i podaci o komorbiditetima (poremećaji mastocita). Ozbiljnost SAR je procenjena na osnovu Milerove klasifikacije HVA, koja podrazumeva četiri stepena težine alergijskih reakcija kao posledica uboda Hymenoptera koje se kreću od blagih do opasnog po život: I stepen: generalizovana urtikarija, svrab i malaksalost; II stepen: angioedem,

teskoba u grudima, gastrointenstinalne tegobe; III stepen: respiratorni poremećaji (gušenje, promuklost), slabost i konfuzija; IV stepen: pad krvnog pritiska i gubitak svesti (anafilaktički šok) (13).

U prvom delu istraživanja ispitanici su klasifikovani u dve grupe u zavisnosti od toga da li su imali sIgE-reaktivnost na više ekstrakta venoma, odnosno višestruku pozitivnost ili su imali sIgE-reaktivnost samo na jednu vrstu ekstrakta venoma, odnosno jednostruku pozitivnost. U drugom delu istraživanja ispitanici su takođe klasifikovani u dve grupe u zavisnosti od toga da li su imali sIgE reaktivnost na CCD (CCD-sIgE pozitivni) ili nisu (CCD-sIgE negativni).

3.3. LABORATORIJSKE ANALIZE

Za istraživački rad korišćeni su rezultati imunoloških analiza dobijenih iz uzoraka seruma ispitanika koje su učinjene na Odeljenju za visoko specijalizovanu *in vitro* dijagnostiku imunoloških i alergijskih oboljenja Klinike za alergologiju i imunologiju UKCS.

3.3.1. ImmunoCAP - IgE test

ImmunoCAP fluoroenzimski test (*Thermo Fisher Scientific/Phadia*, Upsala, Švedska) predstavlja zlatni standard u *in vitro* dijagnostici alergija. Test omogućava kvantitativno merenje alergen-specifičnih IgE u ljudskom serumu ili plazmi (**Slika 9**). Antitela klase IgE se pojavljuju u ljudskom serumu i plazmi kao rezultat senzibilizacije na određeni alergen. Metodologija se zasniva na visokom kapacitetu vezivanja antitela. Pouzdanost rezultata testa leži u samom dizajnu čvrste faze koja se sastoji od trodimenzionalnog celuloznog polimera koji ima veliku površinu i visok kapacitet za vezivanje alergena. Zbog ovakve strukture testa, ImmunoCAP metoda ima visoku specifičnost i senzitivnost za detekciju antitela. Ovim testom se detektuju IgE antitela u opsegu od 0,1 do 100 kUA/L, gde A predstavlja antitela specifična

za alergen. U kliničkoj praksi 0,35 kUA/L se koristi kao granična vrednost. Serumi sa veoma visokim nivoima sIgE antitela >100 kUA/l mogu se precizno detektovati korišćenjem razblaženja i naknadnim množenjem rezultata.

Za testiranje su se uzimali uzorci venske krvi, a potom nakon centrifugiranja izdvojilo se 40 µL seruma pacijenta za detekciju sIgE na specifičnu vrstu alergena. Čvrsta faza testa se sastojala od derivata celuloze zatvorenog u kapsuli. Hidrofilni, veoma razgranati polimeri celuloze pružali su idealnu mikro okolinu za alergene vezujući ih nepromenjene. Test dizajniran kao sendvič imunoesej i karakteristično postavljeni alergeni reagovali su sa antitelima u uzorku seruma. Relevantni alergen se kovalentno vezao za sIgE iz seruma pacijenta. Nakon ispiranja kojim su se uklonila nevezana, nespecifična IgE antitela, dodata su mišja monoklonska anti-IgE antitela obeležena enzimom (engl. *Enzyme Conjugat*). Kao enzim koristila se beta-galaktozidaza, koja je uzrokovala transformaciju dodatog supstrata 4-metilumbeliferil-β-D-galaktozida (engl. *Substrate Solution*) u fluorescirajući produkt. Monoklonska antitela obeležena enzimom formirala su kompleks sa predhodno vezanim sIgE za alergene u čvrstoj fazi. Po isteku inkubacije, nevezana enzim-obeležena IgE antitela su se ispirala, a zatim se vezani kompleks ponovo inkubirao sa 0,01% 4-metilumbeliferil-β-D-galaktozidazom (engl. *Development Solution*) prema uputstvu za upotrebu. Na kraju postupka reakcija se zaustavila reagensom za stopiranje reakcije (engl. *Stop Solution*) i potom se merila fluorescencija eluata. Intenzitet izmerene fluorescencije bio je proporcionalan koncentraciji IgE antitijela u ispitivanom uzorku. Za dobijanje konačnog rezultata, intenzitet fluorescencije se prevodio u koncentracije IgE koristeći kalibracijsku krivu. Koncentracije antitela su se izražavale kvantitativno u mernim jedinicama kUA/L. Granična vrednost za pozitivne rezultate sIgE-testa bila je 0,35 kUA/L.

3.3.2. ImmunoCAP - IgG4 test

Kvantitativna detekcija alergen-specifičnih IgG4 antitela u serumu pomoću ImmunoCAP testova dala je odgovarajuću procenu imunološkog odgovora tokom VIT. Tokom VIT povišeni nivoi sIgG4 ukazuju da imunski sistem reaguje na terapiju jer IgG4 ima

sposobnost da moduliše imunski odgovor na alergen i samim tim potencijal da utiče na klinički odgovor. Uzorci seruma pacijenata pre VIT i tokom VIT su testirani ImmunoCAP testom za detekciju sIgG4 prema uputstvu proizvođača. U kliničkoj praksi granična vrednost sIgG4 na venom pčele je 0,05 kUA/L, dok je granična vrednost sIgG4 na venom ose 0,03 kUA/L.



Slika 9. ImmunoCAP odeljenja za visoko specijalizovanu in vitro dijagnostiku imunoloških i alergijskih oboljenja Klinike za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog Kliničkog Centra Srbije

3.3.3. Imunoblot - IgE test

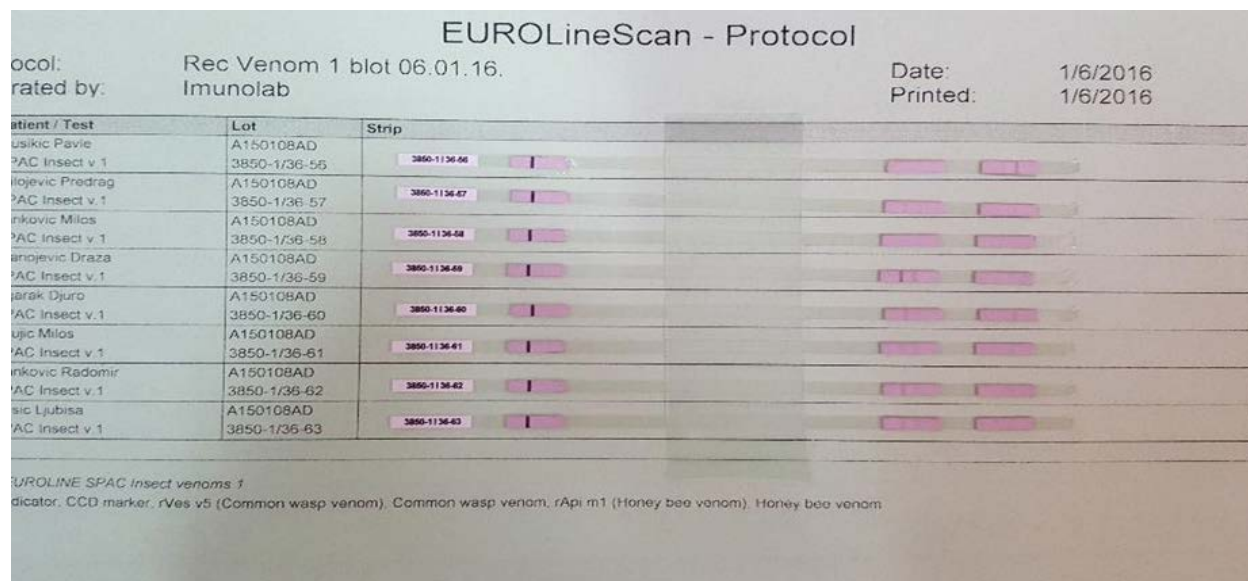
Istovremena detekcija specifičnih IgE antetela na više alergena i CCD je ispitivana imunoblot metodom korišćenjem EUROLINE testova (*Euroimmun, Germany, Euroline*) (**Slika 10**). U Imunoblot testu, antigeni obloženi membranama se koriste kao čvrsta faza da bi se otkrila specifična antitela u uzorcima seruma pacijenata. Ako uzorak sadrži specifična antitela ona se vezuju za antigene vezane za membranu. U sledećem koraku, dodaju se mišja IgE-antitela obeležena alkalnom fosfatazom (engl. *Enzyme Conjugat*), koja se vezuje za

specifična antitela. Alkalna fosfataza katalizuje reakciju sa naknadno dodatim nitro plavim tetrazolijum hloridom/5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfatom (engl. *Substrate Solution*). Ako su specifična antitela prisutna u uzorku pacijenta, tamna linija se pojavljuje na odgovarajućem položaju antigena. Intenzitet rezultujućeg bojenja je proporcionalan koncentraciji antitela u uzorku. EUROLINE testovi su višeparametarske linije koje omogućavaju stvaranje sveobuhvatnih kombinovanih profila antitela na jednoj test traci. Kao čvrsta faza koja sadrži antigen, koriste se membranske trake sa višestrukim prečišćenim, biohemijski okarakterisanim antigenima ili ekstraktima antigena kao tanke paralelne linije. Membrane su fiksirane kao čipovi na tačno određenim pozicijama na plastične folije. Membranske trake ne sadrže suvišne proteine koji mogu dovesti do nespecifičnih pozitivnih rezultata. Na svakoj EUROLINE test traci postoji kontrolna traka koja pokazuje da li su pojedinačni koraci inkubacije izvedeni ispravno. Evaluacija se vrši potpuno automatski pomoću softvera EUROLIneScan (*Euroimmun, Germany, Euroline*).

Za detekciju sIgE antitela korišćeni su: 1. Imunoblot (*Euroimmun, Germany, Euroline, the allergy profile DPA-Dx insect venoms 2*) za istovremenu detekciju IgE antitetela na ekstrakt venoma pčele, ekstrakt venoma ose, ekstrakt venoma stršljena, rekombinantni alergen pčele rAp m 1, rekombinantni alergen ose rVes v 5 i CCD; 2. Imunoblot (*Euroimmun, Germany, Euroline, the allergy profile DPA-Dx insect venoms 3*) za istovremenu detekciju IgE antitela na ekstrakt venoma pčele, ekstrakt venoma ose, ekstrakt venoma stršljena, rekombinantne alergene pčele Api m 1, rApi m 2, rApi m 10, reombinantne alergene ose Ves v 1, rVes v 5 i CCD.

Test trake nakon što su se navlažile sa po 1 ml univerzalnog pufera, inkubirane su 60 minuta sa po 400µl nerazblaženog seruma. Nakon 3 pranja sa po 1 ml univerzalnog pufera u trajanju od po 5 minuta i dodavanja 1 ml enzimskog konjugata, druga inkubacija trajala je 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon pranja istim postupkom kao i pri prvom pranju i dodavanja 1 ml supstrata, treća inkubacija trajala je 10 minuta. Nakon treće inkubacije test trake su prane destilovanom vodom tri puta po 1 minut, a potom sušene na sobnoj temperaturi. Pozitivni uzorci su doveli do promene boje reakcije koja se videla kao tamna prebojenost linuja na test trakama. Interpretacija rezultata izvršena je pomoću EUROLIneScan-a.

Granična vrednost za pozitivne rezultate sIgE-testa bila je 0,35 kUA/L. Specifična IgE-reaktivnost je kvantitativno kategorisana u šest klasa: klasa 1 ($\geq 0,35$ do $< 0,70$ kUA/L), klasa 2 ($\geq 0,70$ do $< 3,50$ kUA/L), klasa 3 ($\geq 3,50$ do $< 17,50$ kUA/L), Klasa 4 ($\geq 17,50$ do $< 50,00$ kUA/L), klasa 5 ($\geq 50,00$ do $< 100,00$ kUA/L) i klasa 6 ($\geq 100,00$ kUA/L).

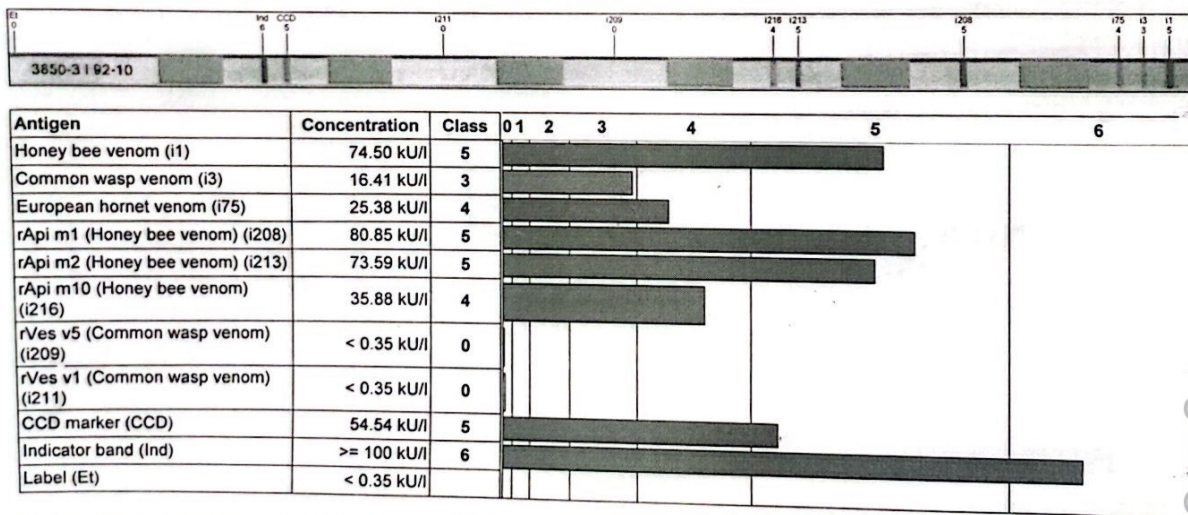


Slika 10. Imunoblot test trake za detekciju IgE na pojedinačne prirodne i rekombinantne alergene i na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (CCD)

3.3.4. Test inhibicije unakrsno-reaktivnih ugljenohidratnih determinanti (CCD)

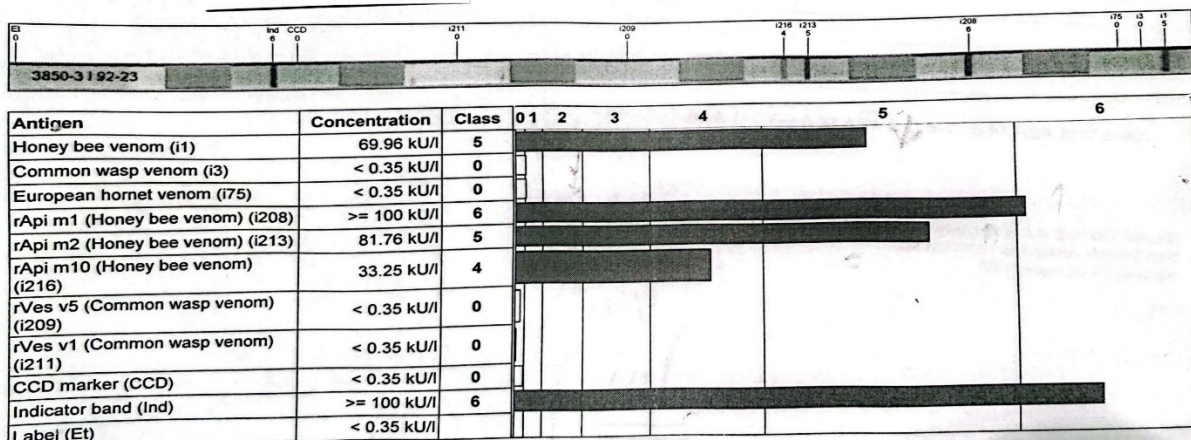
Uzorci seruma pacijenata sa višestrukom pozitivnošću testirani su pomoću EUROLINE testa korišćenjem anti-CCD apsorbenta (*Euroimmun, Germany*). Apsorbent (CCD-inhibitor) za eliminaciju CCD-sIgE se sastojao od glikoproteina bromelaina ekstrahovanog iz stabljike ananasa. Uzorci seruma su inkubirani sa anti-CCD apsorbentom 60 minuta na sobnoj temperaturi prema uputstvima proizvođača. Serumi su ponovo testirani korišćenjem Imunoblot testa (*Euroimmun, Germany, Euroline, the allergy profile DPA-Dx insect venoms 3*) već opisanim postupkom. Imunoblot zapisi pre i nakon CCD-inhibicije prikazani su na **Slikama 11 i 12.**

Patient ID:
Test: Allergy EUROLINE DPA-Dx Insect venoms 3
Well: 5
 Date of incubation: 17.12.2021
Date of birth: 31.5.1999
 Lab number: 47/47t
Strip number: 3850-3I 92-10
 Receipt of sample: 9.7.2021
Sent from:
Lot: def_3850-3
Protocol name:



Slika 11. Imunoblot zapis pre inhibicije unakrsno-reaktivnih ugljenohidratnih determinanti (CCD)

Patient ID:
Test: Allergy EUROLINE DPA-Ux insect venoms 3
Well: 2
 Date of incubation: 4.1.2022
Date of birth: 31.5.1999
 Lab number: 47-47t
Strip number: 3850-3I 92-23
 Receipt of sample: 9.7.2021
Sent from:
Lot: def_3850-3
Protocol name:



Slika 12. Imunoblot zapis nakon inhibicije unakrsno-reaktivnih ugljenohidratnih determinanti (CCD)

3.3.5. Bazalna serumska triptaza

Jedan od najvažnijih *in vitro* testova u oblasti alergologije je merenje nivoa triptaze mastocita koji ima brojne dijagnostičke upotrebe, posebno za dijagnozu anafilaktičke reakcije i mastocitoze. Triptaza se luči iz prethodno formiranih granula neposredno nakon aktiviranja mastocita. Dominantne izoforme su α - i β -triptaza, a α - i β -protriptaze se kontinuirano luče iz mastocita. Kod zdravih osoba ove protriptaze odražavaju konstitutivnu ukupnu serumsku triptazu (30). Nasuprot tome, zrela β -triptaza se prethodno formira i nalazi u granulama mastocita, a oslobađa se nakon degranulacije mastocita. Smatra se da je osnovna uloga triptaze hemotaksija i proliferaciju fibroblasta u zapaljenju. Glavna upotreba testa je u dijagnostici anafilaktičkih reakcija, ali ne pravi razliku između IgE posredovanih reakcija i reakcija koje nisu posredovane IgE antitelima. Nivo triptaze je u pozitivnoj korelaciji sa stepenom težine anafilakse i ima tendenciju da bude viši kod anafilakse izazvane lekom ili venomom insekta u odnosu na anafilaksu izazvanu hranom (30,168)). Maksimalni nivoi triptaze se dostižu 1-2 sata nakon anafilaktičkog okidača. Povišena triptaza ima slabu senzitivnost i pacijenti mogu imati normalne nivoe tokom anafilakse. ImmunoCAP Triptaza-test meri ukupan nivo triptaze koju mastociti oslobađaju u cirkulaciju. Povišeni nivoi triptaze pomažu kliničarima da potvrde aktivaciju mastocita tokom teške anafilakse i da podrži dijagnozu mastocitoze. Prolazno povećanje triptaze tokom teške alergijske reakcije pomaže da se identifikuje i proceni obim reakcije. Stalno povišen nivo triptaze ukazuje na mogući poremećaj mastocita.

Svim ispitanicima je određivan nivo BST pomoću ImmunoCAP metode već opisanim postupkom. Granična vrednost BST je bila 11,4 $\mu\text{g/L}$. Vrednosti iznad 11,4 $\mu\text{g/L}$ odražavale su povišen nivo triptaze.

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Podaci su analizirani primenom metoda deskriptivne i analitičke statistike.

Od deskriptivnih metoda korišćeni su: apsolutni i relativni brojevi (n, %), mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana) i mere disperzije (standardna devijacija). Izbor testa za testiranje razlike/povezanosti zavisio je od tipa podataka i raspodele.

Od analitičkih statističkih metoda, za poređenje statistički značajne razlike za numeričke podatke su korišćeni testovi razlike: t test ili Wilcoxon test, dok su za nominalne podatke korišćeni neparametarski testovi Hi-kvadrat test ili Fišerov test tačne verovatnoće.

Procena značajnosti povezanosti je ispitivana pomoću Spearman-ovog koeficijenta korelacije za varijable bez normalne raspodele.

Statistička značajnost je definisana na nivou verovatnoće nulte hipoteze od $P < 0,05$ do visoko statistički značajnog nivoa $P < 0,01$. Rezultati istraživanja su prikazani tabelarno i grafički.

Prema istoriji alergije uboda Hymenoptera, uporedili smo senzitivnost i specifičnost između dve metode. Osetljivost i specifičnost ovih metoda izračunate su korišćenjem formula:

$$\text{Senzitivnost} = \frac{\text{tačno pozitivno}}{\text{tačno pozitivno} + \text{lažno negativno}} \times 100\%$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{tačno negativno}}{\text{tačno negativno} + \text{lažno pozitivno}} \times 100\%$$

Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem IBM SPSS statističkog programa (Statistics software for Windows, version 17.0; IBM, Armonk, NY).

4. REZULTATI

4.1. Demografske karakteristike pacijenata sa višestrukom i jednostrukom IgE-pozitivnošću na ekstrakte venoma

U prvom delu istraživanja obuhvaćeno je 82 ispitanika sa SAR na venome Hymenoptera, od kojih 20 osoba ženskog pola i 62 osobe muškog pola. Prosečna starost u ovoj ispitivanoj grupi pacijenata je iznosila je 46,4 godina. Poređenje demografskih karakteristika pacijenata sa višestrukom pozitivnošću (42/82) i jednostrukom pozitivnošću (40/82) na ekstrakte venoma prikazano je u **Tabeli 1**.

Tabela 1. Poređenje demografskih karakteristika kod 82 pacijenata sa alergijom na venome Hymenoptera

	Višestruka pozitivnost PV/OV ili PV/OV/SV (n=42)	Jednostruka pozitivnost PV ili OV ili SV (n=40)
Godine (SV ±SD)	48,9 ± 14,2	43,8 ± 6,46
Žene (%)	6 (14,3)	14 (35)
Muškarci (%)	36 (85,7)	26 (65)
Pčelari (%)	7 (16,7)	5 (12,5)
Stepen težine sistemske alergijske reakcije (%)		
I	3 (7,1)	10 (25)
II	3 (7,1)	11 (27,5)
III	19 (45,2)	4 (10)
IV	17 (40,5)	15 (37,5)

PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena

U grupi od 82 pacijenta sa alergijom na venome Hymenoptera, osobe muškog pola su imale češće SAR (75,6%) u odnosu na osobe ženskog pola (24,4%) ($P = 0,029$). Većina pacijenata (55/82) je imala tešku SAR (III i IV stepen SAR) (67,1%) ($P < 0,001$).

Učestalost teške SAR bila je veća u grupi pacijenata sa višestrukom pozitivnošću 36/42 (85,7%) u poređenju sa grupom pacijenata sa jednostrukom pozitivnošću na ekstrakte venoma 19/40 (47,5%) ($P < 0,001$) (**Tabela 1**).

4.2. Detekcija sIgE antitela ImmunoCAP metodom

4.2.1. Detekcija sIgE na rekombinantnu fosfolipazu A2 i rekombinantni antigen 5

Detekcija sIgE antitela ImmunoCAP metodom bila je sprovedena kod 82 pacijenta. Specifičnu IgE-reaktivnost na rekombinantni antigen 5-rVes v 5 je bila prisutna kod 94,4% pacijenata jednostruko pozitivnih na ekstrakt OV i 100% jednostruko pozitivnih na SV, dok je sIgE-reaktivnost na rekombinantnu fosfolipazu A2-rApi m 1 bila prisutna kod 83,3% pacijenata jednostruko pozitivnih na ekstrakt PV (Tabela 2).

Tabela 2. Serum-specifična IgE (sIgE) na rekombinantnu fosfolipazu A2, rekombinantni antigen 5 i bromolein kod 82 pacijenta sa istorijom sistemske alergijske reakcije (SAR) na venome Hymenoptera

sIgE (ImmunoCAP)	Višestruka pozitivnost na ekstrakte PV/OV/SV Ili PV/OV (n=42)	Jednostruka pozitivnost na ekstrakt PV (n=12)	Jednostruka pozitivnost na ekstrakt OV (n=18)	Jednostruka pozitivnost na ekstrakt SV (n=10)
rApi m 1+ i rVes v 5+	11 (26,2%)	0	0	0
rApi m 1+ rVes v 5+	10 (23,8%)	10 (83,3%)	0	0
rApi m 1- rVes v 5-	18 (42,8%)	1 (8,3%)	17 (94,4%)	10 (100%)
rApi m 1- rVes v 5-	3 (7,1%)	1 (8,3%)	1 (5,6%)	0
Bromolein (CCD)+	17 (40,5%)	4 (33,3%)	0	1 (10%)

PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena; rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2; rVes v 5: rekombinantni antigen 5; CCD: unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante

Prava dvostruka pozitivnost određena prisustvom pozitivnih sIgE na rekombinantne glavne alergene rApi m 1 i rVes v 5 bila je prisutna kod 26,2% višestruko pozitivnih pacijenata i nijednog od 40 jednostruko pozitivnih pacijenata ($P < 0,001$) (Tabela 2). Kod pet od 82 (6,1%) pacijenata nije bila prisutna sIgE-reaktivnost na oba rekombinantna glavna

alergena rApi m 1 i rApi m 5. Anti-CCD-sIgE antitela bila su češće prisutna kod višestruko pozitivnih 17/42 (40,5%) nego kod jednostruko pozitivnih pacijenata 5/40 (12,5%) ($P < 0,001$).

Većina višestruko pozitivnih pacijenata (35/42) dala je tačne podatke o alergijskoj reakciji na ubod insekta. Na osnovu istorije (pčelarstvo, blizina mesta za gnežđenje uboda insekata, vizuelna identifikacija insekta, prisustvo uboda), 17/42 višestruko pozitivnih pacijenata imalo je SAR na ubod pčele, 12/42 na ubod ose i 6/42 na ubod stršljena. Sedam od 42 pacijenata nije moglo da identifikuje insekt koji je doveo do SAR (**Tabela 3**).

Specifična IgE-reaktivnost na rApi m 1 je bila prisutna kod 13/17 (76,5%) višestruko pozitivnih pacijenata sa istorijom SAR na ubod pčele. Svi višestruko pozitivni pacijenati sa istorijom SAR na ubod ose i stršljena imali su sIgE-reaktivnost na rVes v 5 (**Tabela 3**).

Tabela 3. Serum-specifična IgE (sIgE) na rekombinantnu fosfolipazu A2 i rekombinantni antigen 5 kod 42 pacijenta sa višestrukom pozitivnošću na ekstrakte venoma i istorijom sistemske alergijske reakcije (SAR) na odgovarajuću vrstu Hymenoptera

Istorija SAR na Hymenoptera insekt	Pozitivna sIgE-rApi m 1 i sIgE-rVes v 5 (n=11)	Pozitivna sIgE-rApi m 1 (n=10)	Pozitivna sIgE-rVes v 5 (n=18)	Negativna sIgE-rApi m 1 i sIgE-rVes v 5 (n=3)
Pčela (PV/OV+) (n=17)	3 (17,6%)	10 (58,8%)	1 (5,9%)	3 (17,6%)
Osa (PV/OV+) (n=12)	3 (25%)	0	9 (75%)	0
Stršljen (PV/OV/SV+) (n=6)	2 (33,3%)	0	4 (66,7%)	0
Neidentifikovan (PV/OV/SV+) (n=7)	3 (42,9%)	0	4 (57,1%)	0

PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena; rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2; rVes v 5: rekombinantni antigen 5

4.2.2. Detekcija sIgE na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (CCD)

Prema tačnim podacima o vrsti insekta koji je doveo do SAR, pozitivna CCD-sIgE antitela bila su češća kod pacijenata sa istorijom alergije na ubod pčele 14/29 (48,3%) nego kod pacijenata sa istorijom alergije na ubod ose 2/30 (6,7%) ($P < 0,001$) i ubod stršljena 4/16 (25%) ($P = 0,049$) (Tabela 4).

Tabela 4. Specifična IgE (sIgE) na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (CCD) kod 82 pacijenta sa alergijom na venome Hymenoptera

Istorija SAR na Hymenoptera insekt	Višestruka pozitivnost na ekstrakte PV/OV/SV ili PV/OV (n=42)		Jednostruka pozitivnost na ekstrakte PV ili OV ili SV (n=40)	
	CCD+ (n=17)	CCD- (n=25)	CCD+ (n=5)	CCD- (n=35)
Pčela (n=29)	10	7	4	8
Osa (n=30)	2	10	0	18
Stršljen (n=16)	3	3	1	9
Neidentifikovan (n=7)	2	5	-	-

PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena

4.2.3. Određivanje koncentracije sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5

Nisu nađene statistički značajne razlike u srednjim koncentracijama sIgE na ekstrakte venoma i rekombinante alergene fosfolipazu A2 i antigen 5 ImmunoCAP metodom između pacijenata sa istorijom lakše i pacijenata sa istorijom teške SAR (Tabela 5).

Tabela 5. Specifična IgE (sIgE) na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigena 5 kod 82 pacijenta sa istorijom lakše i teške SAR na venome Hymenoptera

sIgE (ImmunoCAP) kUA/L	I i II stepen SAR (n=27)	III i IV stepen SAR (n=55)	P
PV ekstrakt (SV±SD)	16,27±2,16	13,31±1,51	0,718
OV ekstrakt (SV±SD)	10,56±1,37	7,71±1,09	0,558
SV ekstrakt (SV±SD)	3,07±2,92	3,49±7,67	0,915
rApi m 1 (SV±SD)	4,98±6,30	2,11±2,91	0,374
rVes v 5 ((SV±SD)	5,56±6,76	6,32±1,20	0,840

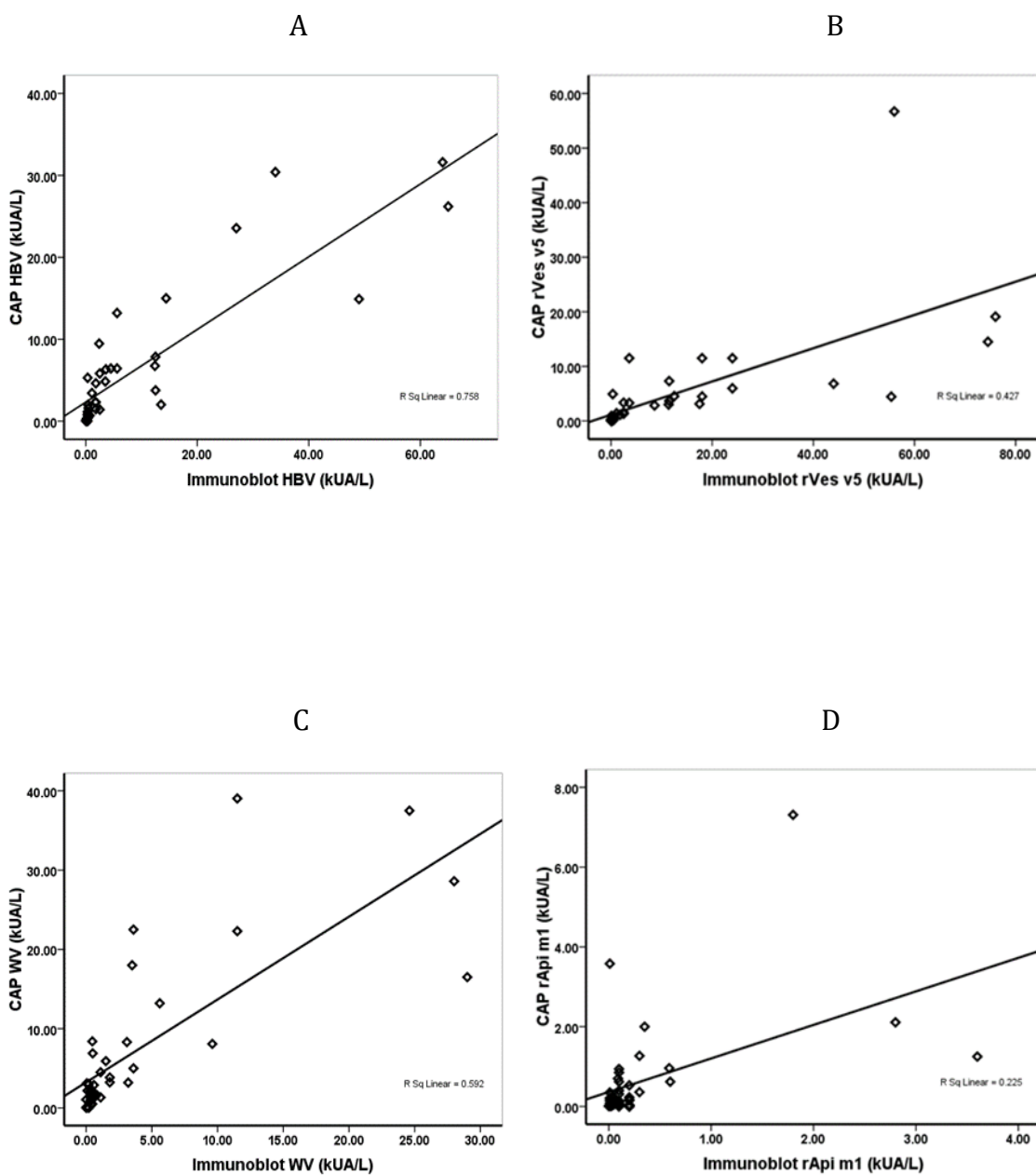
PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena; rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2; rVes v 5: rekombinantni antigen 5; SAR: sistemska alergijska reakcija

4.3. Poređenje ImmunoCAP i Imunoblot za detekciju sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5

4.3.1. Korelacija ImmunoCAP i Imunoblot za detekciju koncentracije sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5

Ispitivanje korelacije dijagnostičkih testova za detekcija koncentracije sIgE antitela na ekstrakte venoma pčele i ose i rekombinantne glavne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5 bila je sprovedena kod 39 pacijenata.

Utvrđena je visoko značajna pozitivna korelacija između koncentracija sIgE antitela detektovanih ImmunoCAP i Imunoblot metodama za ekstrakt pčele ($r, 0,886; P < 0,0001$) (**Grafikon 1A**) i rVes v 5 ($r, 0,886; P < 0,0001$) (**Grafikon 1B**), zatim za ekstrakt ose ($r, 0,808; P < 0,0001$) (**Grafikon 1C**) i rApi m 1 ($r, 0,349; P = 0,029$) (**Grafikon 1D**).



Grafikon 1. Korelacija ImmunoCAP i Imunoblot za detekciju nivoa sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene kod 39 pacijenata sa alergijom na venome Hymenoptera, (A) ekstrakt pčele (engl. *honeybee venom*, *HBV*), (B) rekombinantni antigen 5 (rVes v 5) (C) ekstrakt ose (engl. *wasp venom*, *WV*) (D) rekombinantna fosfolipaza A2 (rApi m 1)

4.3.2. Specifičnost i senzitivnost sIgE-testiranja za ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5

Prema podacima o vrsti insekta koji je doveo do SAR, specifičnost ImmunoCAP i Imunoblot metoda za rekombinantne glavne alergene rApi m 1 i rVes v 5 bila je odlična i značajno veća od specifičnosti za ekstrakte venoma (**Tabela 6**).

Tabela 6. Senzitivnost i specifičnost sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene detektovane ImmunoCAP i Imunoblot metodama, prema tačnoj istoriji uboda pčele i ose

sIgE (kUA/L)	Senzitivnost n (%)		Specifičnost n (%)	
	ImmunoCAP (n=59)	Imunoblot (n=30)	ImmunoCAP (n=59)	Imunoblot (n=30)
PV ekstrakt	29/29 (100)	12/13 (92,3)	16/30 (53,3)	8/17 (47,1)
OV ekstrakt	30/30 (100)	12/17 (70,6)	14/29 (48,3)	5/13 (38,5)
rApi m 1	23/29 (79,3)	5/13 (38,5)	27/30 (90)	16/17 (94)
rVes v 5	29/30 (96,7)	15/17 (88,2)	24/29 (82,8)	9/13 (69,2)

PV: venom pčele; OV: venom ose; rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2; rVes v 5: rekombinantni antigen 5

U grupi pacijenata sa istorijom alergije na ubod pčele, ImmunoCAP metoda je imala veću senzitivnost za detekciju sIgE na ekstrakt venoma pčele i rApi m 1 (100% i 79,3%) nego Imunoblot metoda (92,3% i 38,5%). Takođe, kod pacijenata sa istorijom alergije na ubod ose, ImmunoCAP metoda je imala veću senzitivnost za detekciju sIgE na ekstrakt venoma ose i rVes v 5 (100% i 96,7%) nego Imunoblot metoda (70,6% i 88,2%). Prema tačnoj istoriji uboda Hymenoptera insekta koji je doveo do SAR, ImmunoCAP metoda za detekciju sIgE-rApi m 1 (90%) imala je veću specifičnost od ImmunoCAP za detekciju sIgE na ekstrakt venoma pčele (53,3%), a ImmunoCAP za detekciju sIgE-rVes v 5 (82,8%) imala je veću specifičnost od ImmunoCAP za detekciju sIgE na ekstrakt venoma ose (48,3%) (**Tabela 6**).

4.4. Demografske karakteristike CCD-sIgE pozitivnih i CCD-sIgE negativnih pacijenata

U drugom delu istraživanja testirani su serumski 71 pacijenta sa SAR na venome Hymenoptera od kojih 46 osoba ženskog pola i 25 osoba muškog pola. Prosečna starost u

ovoj ispitivanoj grupi pacijenata je iznosila 47 godina (46,9±15,1). Poređenje demografskih karakteristika CCD-sIgE negativnih (42/71) i CCD-sIgE pozitivnih pacijenata (29/71) prikazano je u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Poređenje demografskih karakteristika 71 pacijenta sa sistemskom alergijskom reakcijom na venome Hymenoptera

	Negativna CCD-sIgE (n=42)	Pozitivna CCD-sIgE (n=29)
Godine (SV ±SD)	43,6 ± 15,3	50,1 ± 14,8
Žene (%)	31 (73,8)	15 (51,7)
Muškarci (%)	11 (26,2)	14 (48,3)
Pčela (%)	20 (47,6)	12 (41,3)
Osa (%)	20 (47,9)	8 (27,6)
Stršljen (%)	2 (4,7)	3 (10,3)
Pčela i osa (%)	0	5 (17,2)
Pčela i stršljen (%)	0	1 (3,4)
Stepen težine sistemske alergijske reakcije (%)		
I	12 (28,6)	0
II	2 (4,8)	2 (6,8)
III	16 (38,1)	14 (48,3)
IV	12 (28,6)	13 (44,8)

CCD: unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante

Većina pacijenata (77,5%) imala je tešku SAR (III i IV stepen SAR) u poređenju sa pacijentima koji su imali lakšu SAR ($P < 0,001$). Nisu nađene značajne razlike učestalosti teške SAR između pacijenata ženskog i muškog pola. U grupi pacijenata sa pozitivnim CCD-sIgE antitelima, većina pacijenata je imala tešku SAR na Hymenoptera 27/29 (93%) nego lakšu SAR 2/29 (6,9%) ($P < 0,001$).

4.5. Detekcija sIgE antitela Imunoblot metodom

4.5.1. Detekcija sIgE antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2, hijaluronidazu, ikarapin, fosfolipazu A1 i antigen 5

Analizom seruma 71 pacijenta, 39 (55%) pacijenata je imalo višestruku pozitivnost na ekstrakte venoma, dok je 30 (42,3%) imalo jednostruku pozitivnost: 13 na ekstrakt venoma pčele, 15 na ekstrakt venoma ose i 2 na ekstrakt venoma stršljena. Samo dva (2,8%) pacijenta sa istorijom SAR na ubod ose nisu imala sIgE-reaktivnost na ekstrakte venoma (**Tabela 8**). Značajan broj (29/39) pacijenata sa višestrukom pozitivnošću imao je pozitivna CCD-sIgE antitela (PV/OV/SV/CCD-pozitivnost). Ostali pacijenti (10/39) su imali višestruku pozitivnost (PV/OV-pozitivnost ili PV/OV/SV-pozitivnost), ali bez CCD-sIgE pozitivnosti (**Tabele 8 i 9**).

Većina pacijenata (65/71) doživela je SAR nakon jednog uboda insekta. Kod svih jednostruko pozitivnih pacijenata, istorija prethodne alergije na ubod insekta slagala se sa nalazom pozitivnih sIgE antitela na odgovarajući ekstrakt venoma. Među pacijentima sa višestrukom pozitivnošću, 19/39 je imalo SAR na uboda pčele, 11/39 na ubod ose, 3/39 na ubod stršljena, dok je 6/39 imalo dve odvojene SAR na ubod pčele i ose ili pčele i stršljena (**Tabela 9**).

Tabela 8. Specifična IgE (sIgE) na rekombinantne alergene fosfolipazu A2, hijaluronidazu, ikarapin, fosfolipazu A1 i antigen 5 kod 42 pacijenta sa istorijom alergije na ubod Hymenoptera, bez sIgE-reaktivnosti na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (CCD)

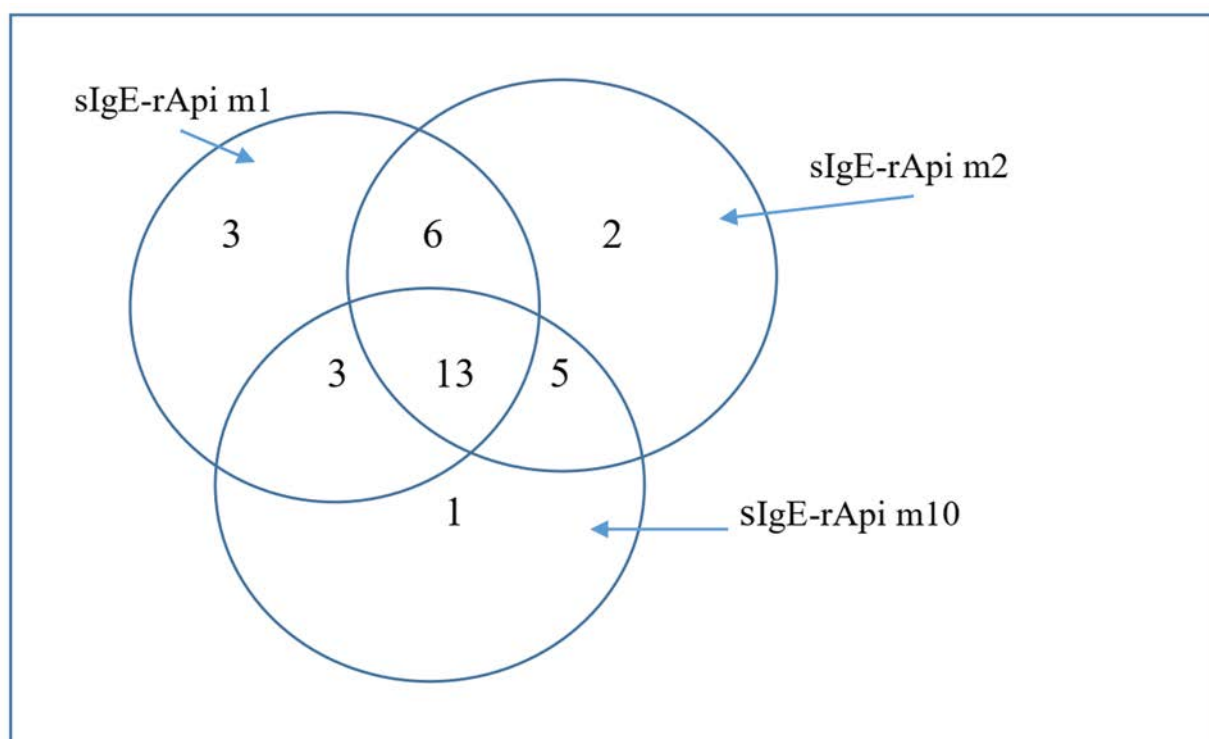
sIgE (Imunoblot)	Višestruka- pozitivnost na ekstrakte PV/OV/SV Ili PV/OV (n=10)	Jednostruka pozitivnost na ekstrakt PV (n=13)	Jednostruka pozitivnost na ekstrakt OV (n=15)	Jednostruka pozitivnost na ekstrakt SV (n=2)	Negativni za ekstrakt PV i OV i SV (n=2)
rApi m1 + rApi m2 + rApi m10 + i	5 (50%)	0	0	0	0
rVes v5 + rVes v1 +/-					
rApi m2 + i	0	0	0	0	1 (50%)
rVes v5 + rVes v1 +/-					
rApi m1 + rApi m2 + rApi m10 +	4 (40%)	9 (69,2%)	0	0	0
rApi m 2 + (samo)	0	2 (15,4%)	0	0	0
rVes v 5 + rVes v 1 +/-	1 (10%)	0	13 (86,6%)	2 (100%)	1 (50%)
rApi m 1 - rApi m 2 - rApi m 10 - rVes v 5 - r rVes v 1 -	0	2 (15,4%)	2 (13,3%)	0	0

PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena; rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2; rApi m 2: rekombinantna hijaluronidaza; rApi m 10: rekombinantni ikarapin; rVes v 5: rekombinantni antigen 5; rVes v 1: rekombinantna fosfolipaza A1

Među pacijentima sa alergijom na osu, 31/33 (94%) pacijent imalo je sIgE-reaktivnost na rVes v 5, dok je 6/31 (19,4%) imalo sIgE-reaktivnost na rVes v 5 i rVes v 1 ($P < 0,001$). Svih šest pacijenata sa alergijom na ubod stršljena imalo je sIgE-reaktivnost na rVes v 5, dok je 2/6 (33,3%) imalo sIgE-reaktivnost na rVes v 5 i rVes v 1. Nije bilo pacijenata

sa alergijom na ubod ose ili stršljena koji su imali izolovanu sIgE-reaktivnost na rVes v 1 (Tabele 8 i 9).

Imunoblot metodom, kod 33/38 (86,8%) pacijenta sa istorijom SAR na ubod pčele detektovana je PV-pozitivnost i sIgE-reaktivnost na više od jednog rekombinantnog alergena pčele. Analizom PV-pozitivnih seruma, 13/38 (31,6%) pacijenata je imalo sIgE-reaktivnost na sve testirane rekombinantne alergene pčele, 25 (65,7%) na rApi m 1, 26 (68,4%) na rApi m 2 i 22 (57,9%) na rApi m 10 (Grafikon 2). Manji broj, 5/38 (13,2%) pacijenata nije imao IgE-reaktivnost ni na jedan testirani rekombinantni alergen pčele.



Grafikon 2. Specifični IgE (sIgE) profil rekombinantnih alergena pčele: rekombinantna fosfolipaza A2-rApi m 1, rekombinantna hijaluronidaza-rApi m 2 i rekombinantni ikarapin-rApi m 10 kod 33/38 pacijenta sa istorijom alergije na ubod pčele, pre inhibicije unakrsno-reaktivnih ugljenohidratnih determinanti (CCD)

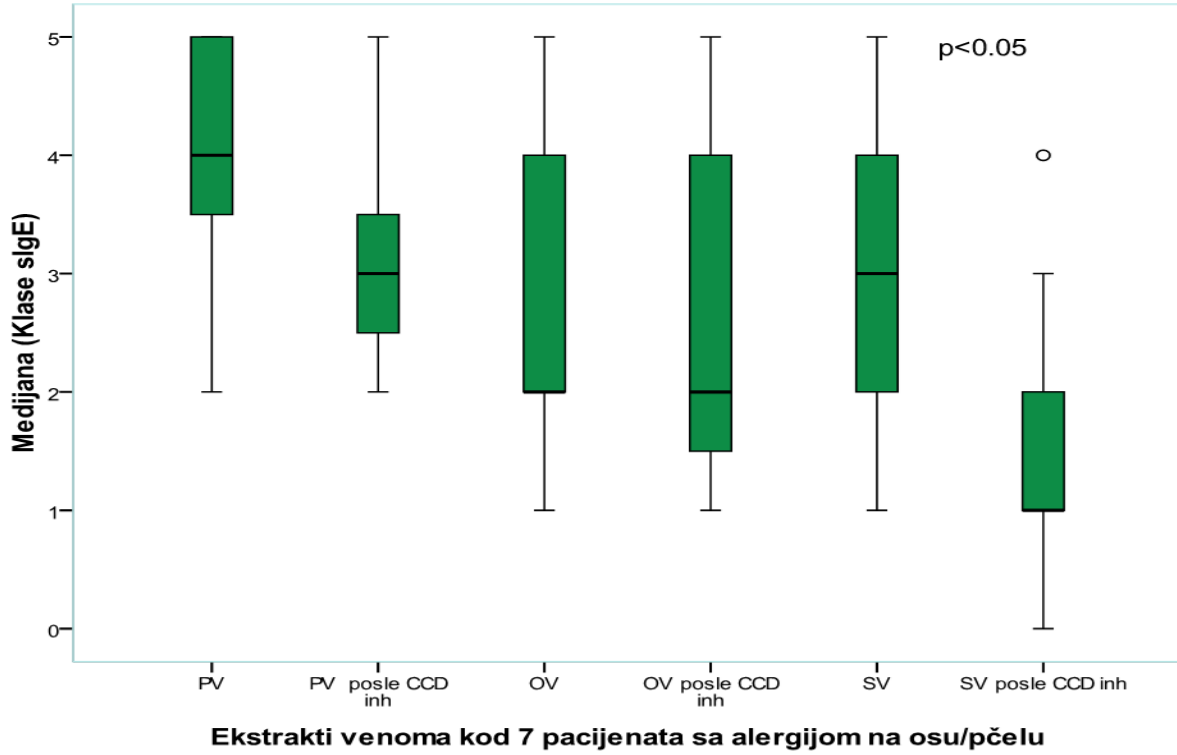
4.5.2. Specifična IgE antitela na rekombinantne alergene fosfolipazu A2, hijaluronidazu, ikarapin, fosfolipazu A1 i antigen 5 pre i nakon CCD-inhibicije

Tabela 9. Koncentracije sIgE (Klase I-VI) na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene kod 29 višestruko PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata pre i posle CCD-inhibicije

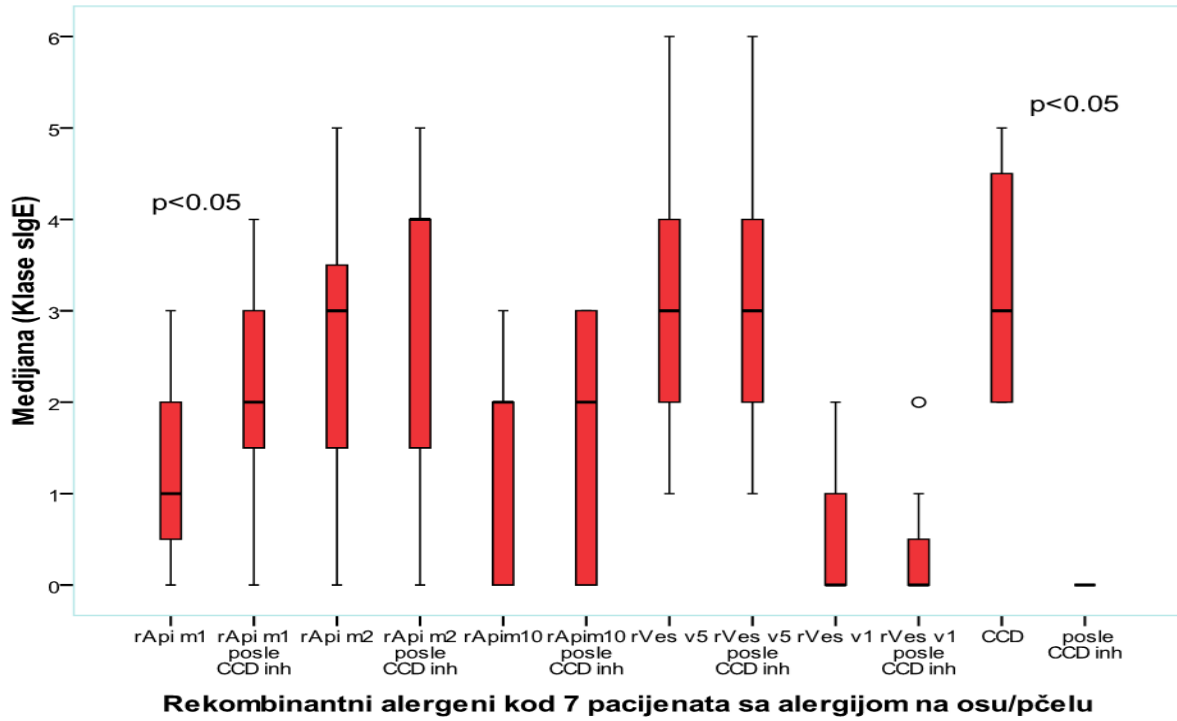
Insekt	CCD-sIgE pozitivni pacijenti pre CCD-inhibicije								CCD-sIgE pozitivni pacijenti posle CCD-inhibicije							
	PV	OV	SV	rApi m 1	rApi m 2	rApi m 10	rVes v 5	rVes v 1	PV	VV	SV	rApi m 1	rApi m 2	rApi m10	rVes v 5	rVes v 1
I																
1.P /O	4	5	4	2	3	2	6	1	3	5	3	4	4	3	6	1
2. P /O	5	2	2	2	3	0	2	0	5	1	1	2	4	0	2	0
3. P /O	5	4	4	0	1	2	1	2	3	4	0	1	1	3	1	2
4. P /O	4	2	3	3	2	0	2	0	2	2	1	4	2	0	2	0
5.O	2	2	2	1	0	0	3	0	2	2	1	2	0	0	3	0
6. P /S	5	4	5	0	5	2	5	1	4	4	4	0	5	2	5	0
7. P /O	3	1	1	1	4	3	3	0	3	1	1	2	4	3	3	0
II																
1. S	4	3	4	0	5	0	4	0	4	3	3	0	5	0	3	0
2. S	3	3	3	0	5	0	3	1	3	3	3	1	5	0	3	0
3. O	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0
4. O	3	3	4	0	3	0	4	0	1	3	4	0	3	0	4	0
III																
1. P	5	3	5	4	6	4	0	0	5	3	3	5	6	5	0	0
2. P	4	2	2	2	5	3	0	0	4	0	0	3	5	4	0	0
3. P	4	1	2	3	5	4	0	0	5	0	0	4	5	5	0	0
4. P	2	1	1	4	2	1	0	0	3	0	0	5	2	1	0	0
5. P	4	1	1	5	0	6	0	0	5	0	1	5	0	6	0	0
6. P	4	1	2	4	0	4	0	0	3	0	0	4	0	4	0	0
7. P	5	3	4	5	5	4	0	0	5	0	0	6	5	4	0	0
8. P	3	1	1	0	2	3	0	0	2	0	0	0	2	3	0	0
9. P	5	3	3	5	2	5	0	0	5	0	0	5	3	5	0	0
IV																
1. P	4	3	4	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0
2. P	3	1	2	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0
3. P	3	2	3	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0
V																
1. O	1	2	1	0	0	0	3	0	1	2	1	0	1	0	3	0
2. O	3	3	3	0	0	0	4	1	1	2	2	0	0	0	3	1
3. S	2	3	3	0	0	0	2	0	3	3	3	0	0	0	2	0
4. O	3	2	2	0	0	0	5	0	2	2	1	1	0	1	4	0
5. O	3	3	3	0	0	0	4	0	3	3	2	0	0	0	3	0
6. O	2	2	2	0	0	0	3	0	1	2	1	0	0	0	3	0

P: pčela; O: osa; S: stršljen; PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena; rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2; rApi m 2: rekombinantna hijaluronidaza; rApi m 10: rekombinantni ikarapin; rVes v 5: rekombinantni antigen 5; rVes v 1: rekombinantna fosfolipaza A1; CCD: unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante

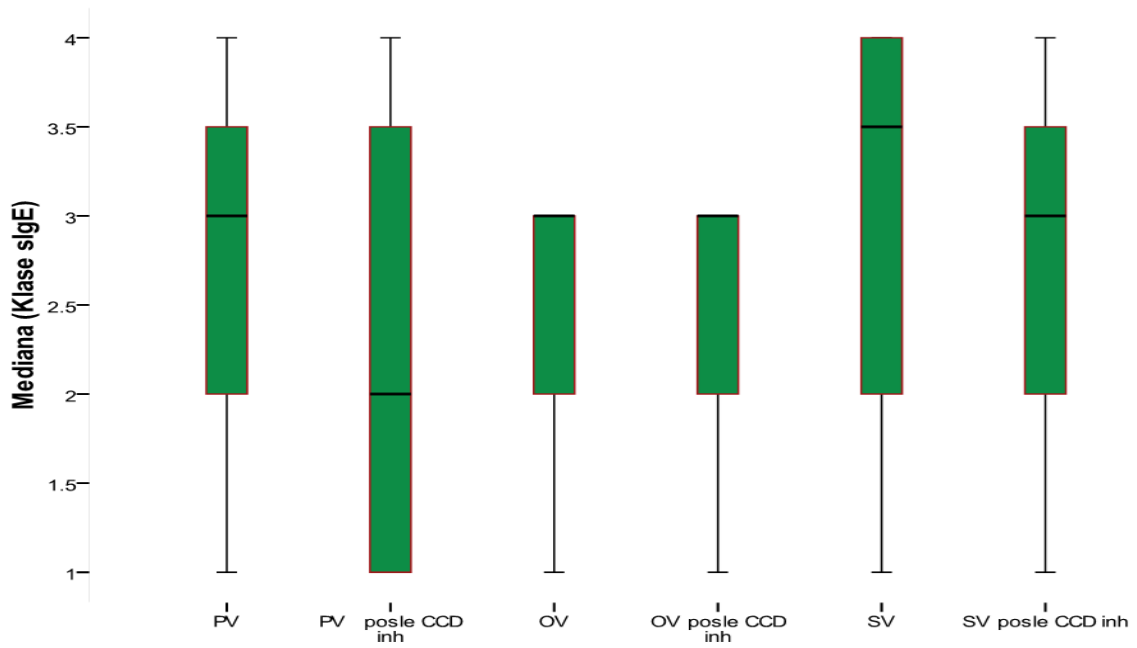
A



B

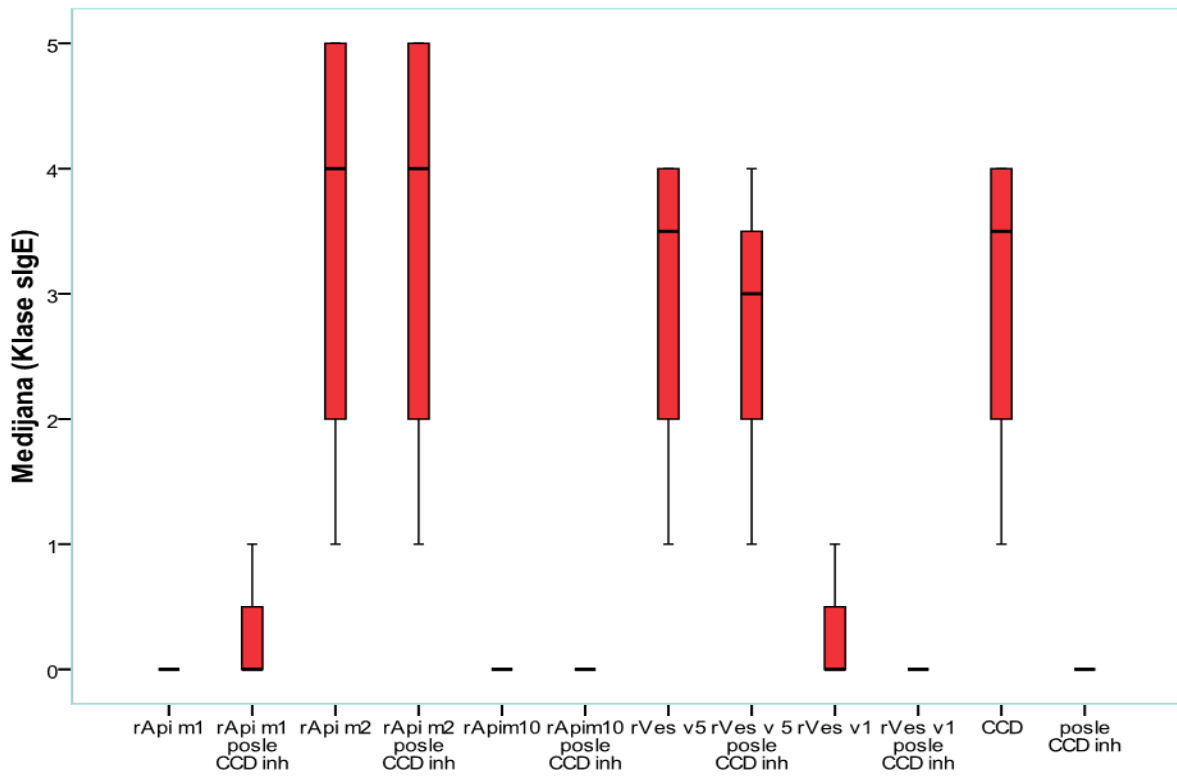


C



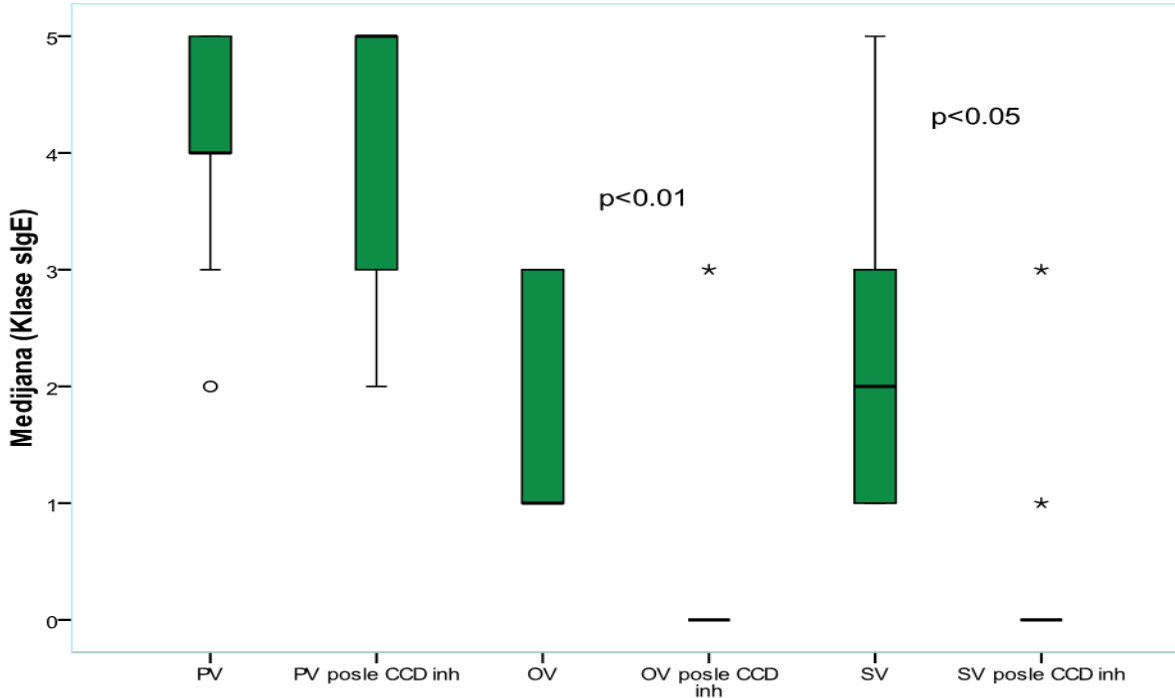
Ekstrakti venoma kod 4 pacijenata sa alergijom na osu/stršljen

D



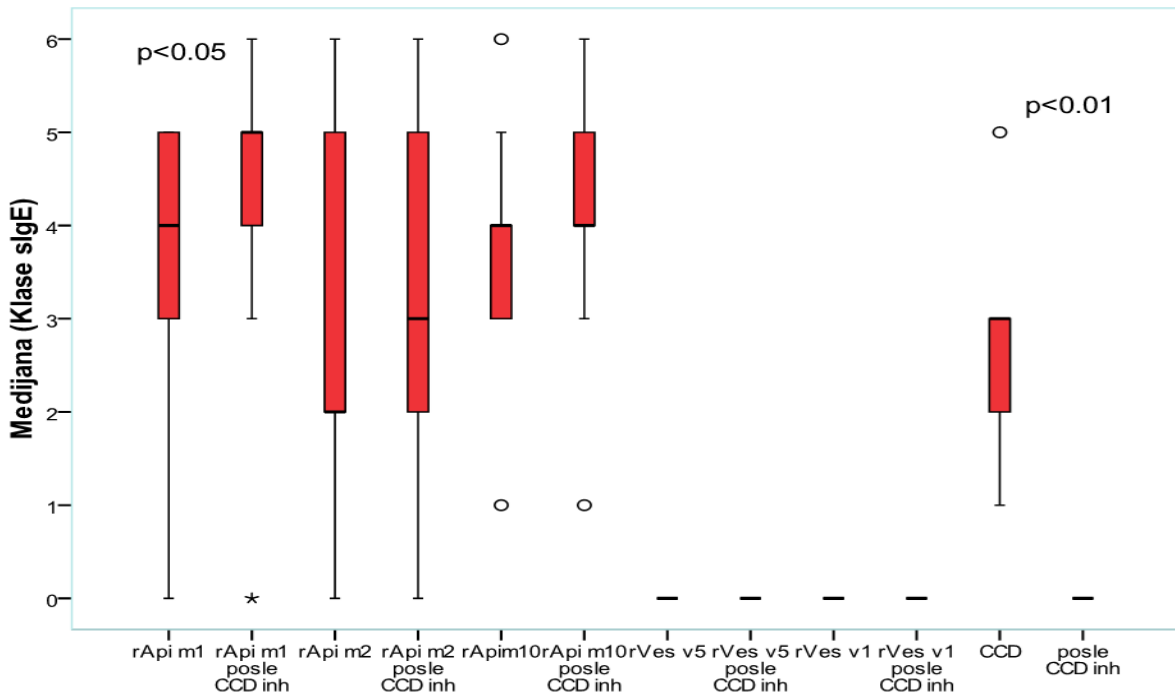
Rekombinantni alergeni kod 4 pacijenta sa alergijom na osu/stršljen

E



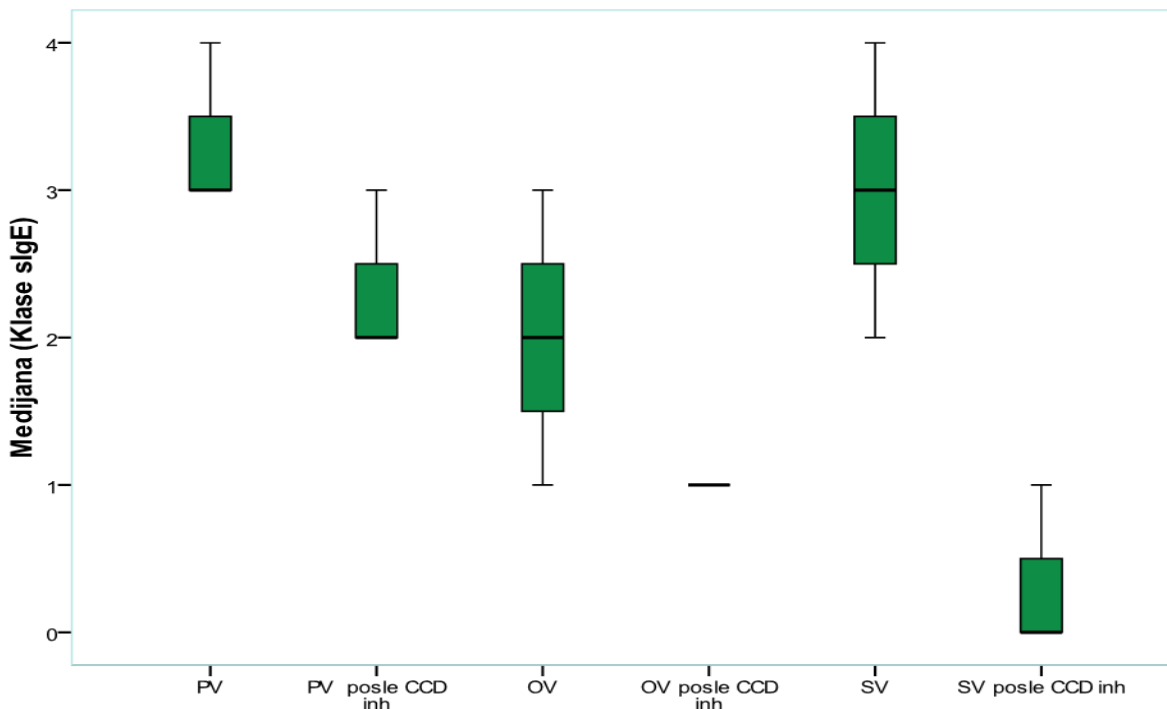
Ekstrakti venoma kod 9 pacijenata sa alergijom na pčelu

F



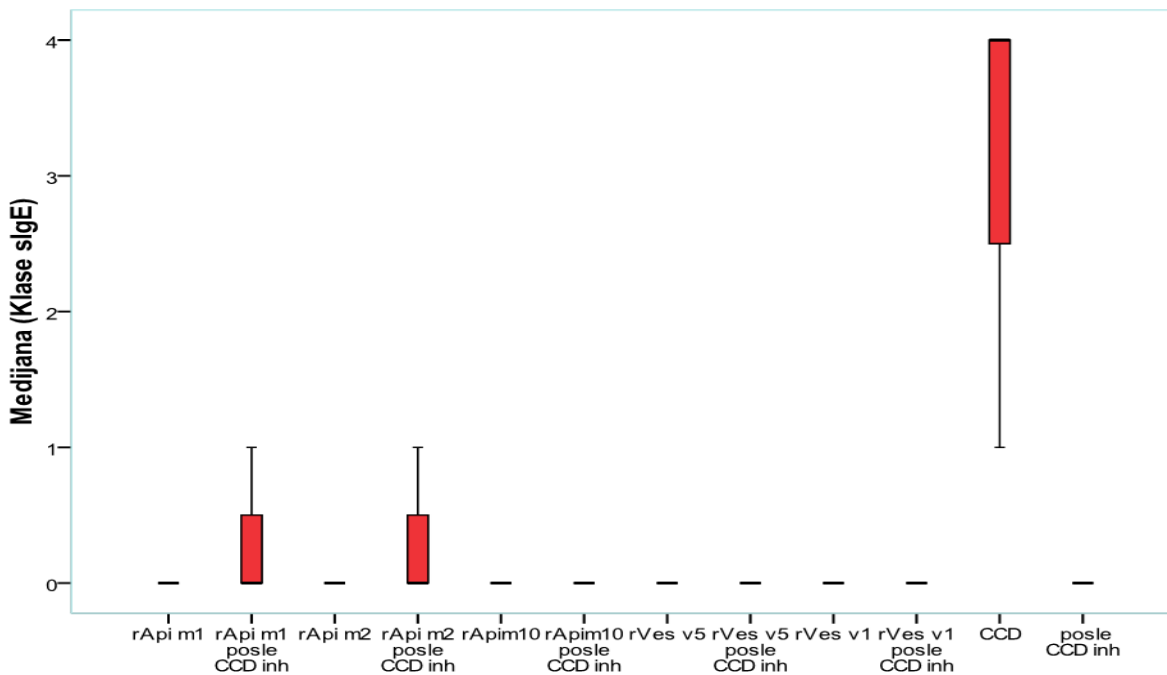
Rekombinantni alergeni kod 9 pacijenata sa alergijom na pčelu

G



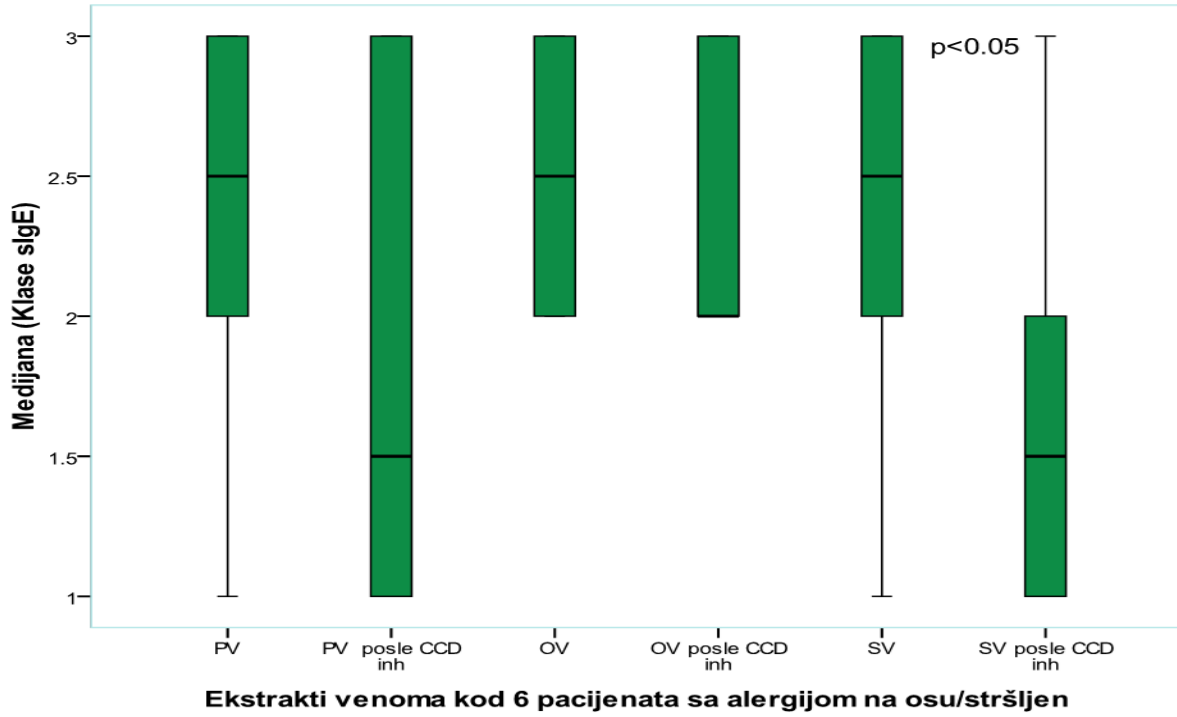
Ekstrakti venoma kod 3 pacijenta sa alergijom na pčelu

H

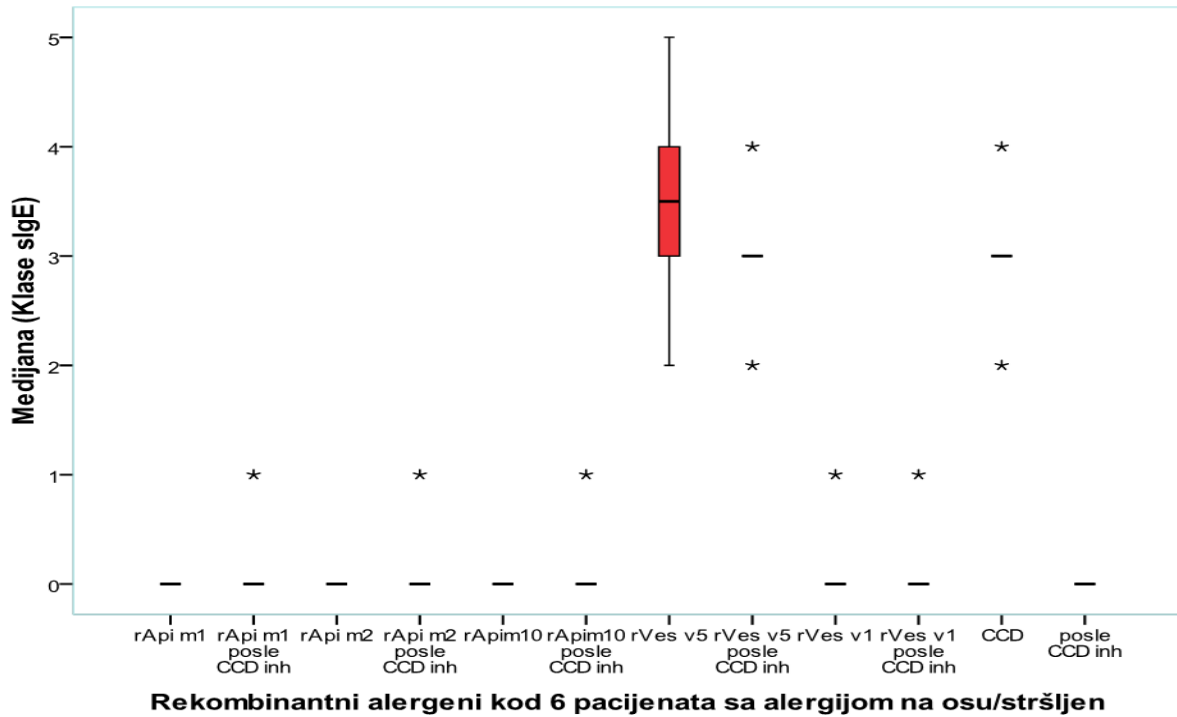


Rekombinantni alergeni kod 3 pacijenta sa alergijom na pčelu

I



J



Grafikon 3. Grafički prikazi rezultata predstavljenih u Tabeli 9

Klase specifičnih IgE (sIgE) (medijana) za ekstrakte venoma (PV: venom pčele, OV: venom ose, SV: venom stršljena) i rekombinantne alergene (rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2, rApi m 2: rekombinantna hijaluronidaza, rApi m 10: rekombinantni ikarapin, rVes v 5: rekombinantni antigen 5, rVes v1: rekombinantna fosfolipaza A1) kod 29 pacijenata sa višestrukom pozitivnošću i sIgE na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (CCD) pre i posle CCD-inhibicije: **(A)** sIgE na ekstrakte venoma kod 7 pacijenata sa alergijom na pčelu/osu ili pčelu/stršljen, **(B)** sIgE na rekombinantne alergene kod 7 pacijenata sa alergijom na pčelu/osu ili pčelu/stršljen, **(C)** sIgE na ekstrakte venoma kod 4 pacijenta sa alergijom na osu ili stršljen, **(D)** sIgE na rekombinantne alergene kod 4 pacijenta sa alergijom na osu ili stršljen, **(E)** sIgE na ekstrakte venoma kod 9 pacijenata sa alergijom na pčelu, **(F)** sIgE na rekombinantne alergene kod 9 pacijenata sa alergijom na pčelu, **(G)** sIgE na ekstrakte venoma kod 3 pacijenta sa alergijom na pčelu, **(H)** sIgE na rekombinantne alergene kod 3 pacijenta sa alergijom na pčelu, **(I)** sIgE na ekstrakte venoma kod 6 pacijenata sa alergijom na osu ili stršljen, **(J)** sIgE na rekombinantne alergene kod 6 pacijenata sa alergijom na osu ili stršljen

Prava višestruka senzibilizacija na obe vrste insekta određena sIgE-reaktivnošću na najmanje jedan rekombinantni alergen pčele i rVes v 5 detektovana je kod 16/39 (41%) višestruko pozitivnih pacijenata i nijednog od 30 jednostruko pozitivnih pacijenata ($P < 0,001$). Sedam od 71 (9,9%) pacijenata je bilo negativno na sve testirane rekombinantne alergene (**Tabela 8 i 9**).

Prema CRD i CCD-inhibiciji, selektovano je pet podgrupa PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata (**Tabela 9, Grafikon 3**). U prvoj grupi PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata (7/29) sa istorijom SAR na ubode pčele i ose/stršljena (1/7 pacijent je doživeo SAR zbog uboda ose), kod svih 7 pacijenata detektovana je prava višestruka pozitivnost i značajno smanjenje SV-pozitivnosti ($P < 0,05$) nakon CCD-inhibicije (**Grafikoni 3A i 3B**). I pre i posle CCD-inhibicije, kod druge grupe selektovanih PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata (4/29) sa istorijom SAR na ubod ose/stršljena detektovana je sIgE-reaktivnost na rApi m 2 i rVes v 5 (**Grafikoni 3C i 3D**). U trećoj grupi PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata (9/29) sa istorijom SAR na ubod pčele, sIgE-testiranjem potvrđena je alergija na pčelu zbog nalaza sIgE-reaktivnosti na većinu testiranih rekombinantnih alergena pčele i gubitka pozitivnosti na OV ($P < 0,01$) i SV ($P < 0,05$) nakon CCD-inhibicije. Rezultati Imunoblot testiranja su identifikovali značajno povećanu senzitivnost za PV-pozitivnost nakon CCD-inhibicije sa 0% na 77% (**Grafikoni 3E i 3F**). U četvrtoj grupi PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata (3/29)

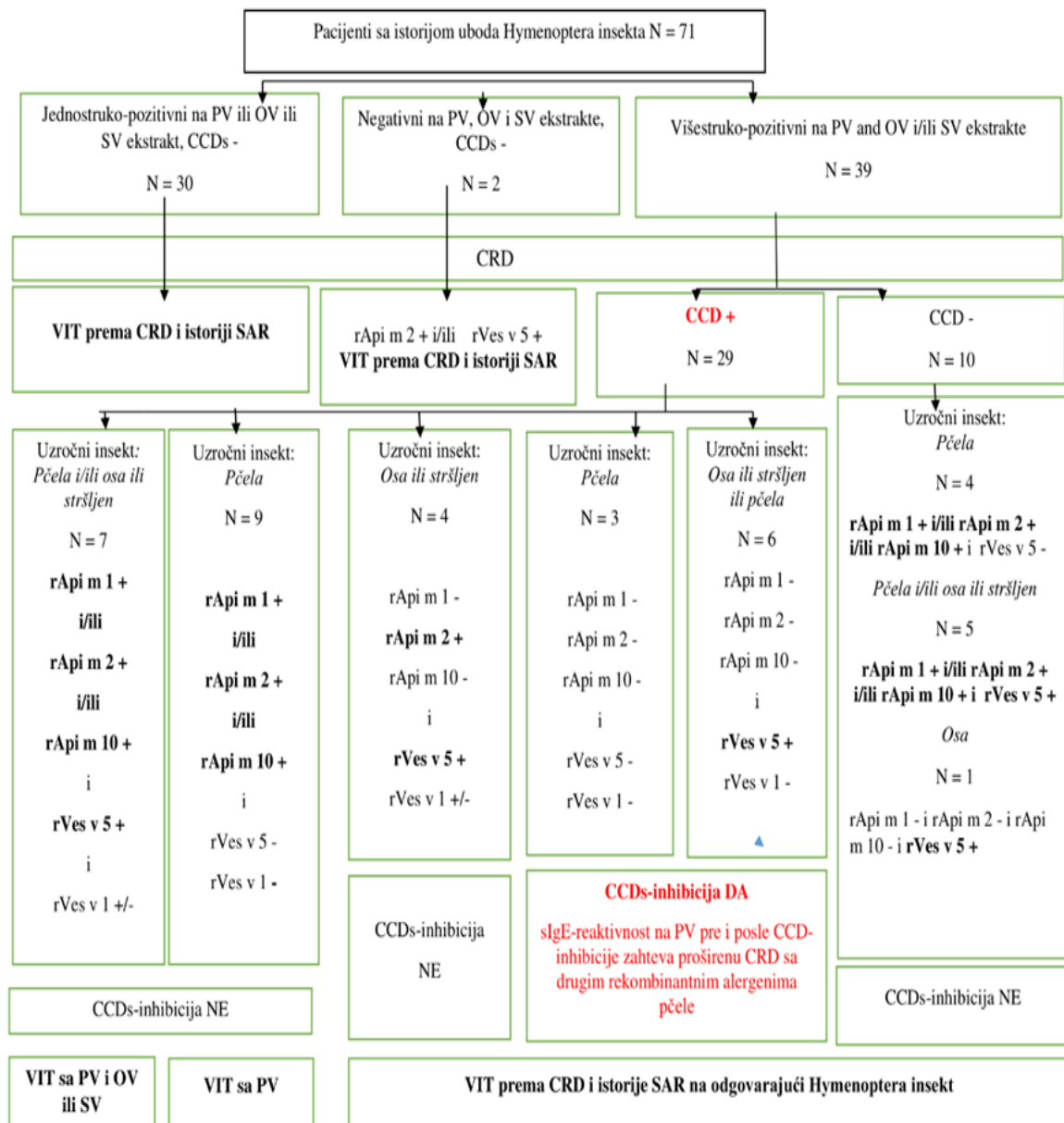
sa istorijom SAR na ubod pčele, pre CCD-inhibicije nije bila detektovana sIgE-reaktivnosti na testirane rekombinantne alergene pčele. Nakon CCD-inhibicije, kod 2/3 pacijenta detektovana je sIgE-reaktivnost na rApi m 1 ili rApi m 2 (**Gradikoni 3G i 3H**). U petoj grupi PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata (6/29) sa istorijom SAR na ubode ose/stršljena, bila je detektovana sIgE-reaktivnost samo na rVes v 5 pre CCD-inhibicije. Nakon CCD-inhibicije, kod 2/6 pacijenta, pored sIgE-reaktivnosti na rVes v 5, bila je detektovana i sIgE-reaktivnost na rApi m 1 i rApi m 10 ili rApi m 2 (**Grafikoni 3I i 3J**). U grupi PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata, svih 29 pacijenata je potpuno izgubilo CCD-sIgE pozitivnost nakon CCD-inhibicije ($P < 0,01$) (**Tabela 9**). Takođe, nakon CCD-inhibicije 22/29 pacijenata je zadržalo višestruku pozitivnost na PV/OV ili PV/OV/SV (**Tabela 9**), ali je utvrđeno značajno smanjenje srednje koncentracije sIgE antitela na ekstrakte venoma ose ($P < 0,047$) i stršljena ($P < 0,001$) (**Tabela 10**). Prema dobijenim rezultatima, kreiran je algoritam za neophodne dijagnostičke korake kako bi se obezbedio adekvatan terapijski pristup za dugotrajnu VIT (**Grafikon 4**).

Nakon CCD-inhibicije utvrđeno je značajno smanjenje srednje koncentracije sIgE antitela na rVes v 5 ($P < 0,004$). Suprotno, utvrđeno je značajno povećanje srednjih koncentracija sIgE antitela na rApi m 1 ($P < 0,012$) i rApi m 2 ($P < 0,031$) nakon CCD-inhibicije (**Tabela 10**).

Tabela 10. Specifična IgE (sIgE) antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene pčele i ose kod 29 višestruko pozitivnih pacijenta sa sIgE na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (CCD) i istorijom alergije na ubod Hymenoptera, pre i posle CCD-inhibicije

sIgE (Imunoblot) kUA/L	Pre CCD-inhibicije	Posle CCD-inhibicije	P
PV ekstrakt (SV±SD)	41,01±22,02	32,93±25,46	0,066
OV ekstrakt (SV±SD)	13,58±18,47	11,31±17,82	0,047
SV ekstrakt (SV±SD)	31,72±28,37	18,63±13,35	0,001
rApi m 1 (SV±SD)	14,62±25,29	27,39±37,73	0,012
rApi m 2 (SV±SD)	41,67±43,83	46,09±45,58	0,031
rApi m 10 (SV±SD)	17,11±34,34	25,79±41,07	0,076
rVes v 5 (SV±SD)	28,05±35,33	20,81±31,57	0,004
rVes v 1 (SV±SD)	0,22±3,12	0,19±3,31	0,502

PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena; rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2; rApi m 2: rekombinantna hijaluronidaza; rApi m 10: rekombinantni ikarapin; rVes v 5: rekombinantni antigen 5; rVes v 1: rekombinantna fosfolipaza A1



CRD: dijagnostika bazirana na pojedinačnim komponentama; PV: venom pčele; OV: venom ose; SV: venom stršljena; rApi m 1: rekombinantna fosfolipaza A2; rApi m 2: rekombinantna hijaluronidaza; rApi m 10: rekombinantni ikarapin; rVes v 5: rekombinantni antigen 5; rVes v 1: rekombinantna fosfolipaza A1; CCD: unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (CCD); VIT: venom-imunoterapija

Grafikon 4. Algoritam za neophodne dijagnostičke korake koji obezbeđuju adekvatan terapijski pristup kod 71 pacijenta sa sistemskom alergijskom reakcijom (SAR) na ubod Hymenoptera

4.6. Detekcija koncentracije sIgG4 ImmunoCAP metodom

Specifična IgG4 antitela bila su testirana ImmunoCAP metodom kod ukupno 52 pacijenta na imunoterapiji odgovarajućim venomom.

Tabela 11. Specifična IgG4 antitela na ekstrakt venoma pčele (PV) kod 28 pacijenata na imunoterapiji venomom pčele (pVIT) u fazi održavanja pVIT

Pacijenti	Pol	sIgE-PV (kUA/L) pre pVIT	Faza održavanja pVIT sIgG4 (kUA/L)	Trajanje pVIT (meseci)
1. N.B.	ž	5,56	27,60	36
2. G.S.	m	4,17	13,80	46
3. S.Z.	m	6,95	5,12	32
4. R.Z.	m	30,40	6,57	36
5. L.M.	m	2,52	13,80	21
6. K.S.	m	0,47	1,66	12
7. D.D.	ž	23,70	0,27	12
8. N.S.	ž	2,40	0,76	54
9. P.B.	m	-	9,21	69
10. M.B.	m	0,63	3,32	76
11. Z.D.	m	1,48	4,01	12
12. G.P.	m	100	0,71	12
13. R.I.	ž	-	3,74	33
14. C.V.	m	-	7,74	71
15. DMV.	ž	1,34	11,7	32
16. S.D.	ž	0,40	0,59	84
17. S.M.	m	7,50	2,49	16
18. R.M.	m	1,86	8,43	66
19. Z.T.	m	2,08	2,33	24
20. R.N.	m	30,00	1,51	21
21. M.S.	m	3,63	21,5	41
22. V.Z.	m	-	2,43	66
23. D.S.	m	19,6	10,2	32
24. S.I.	m	1,20	1,85	84
25. P.V.	ž	7,01	0,67	34
26. U.Dj.	m	2,87	0,64	45
27. S.V.	ž	6,00	0,001	60
28. I.M.	m	3,06	1,86	12

ž: osoba ženskog pola; m: osoba muškog pola

Tokom konvencionalnog protokola VIT svi pacijenti sa inicijalnom alergijom na ubod pčele (28,6% osoba ženskog pola i 71,4% osoba muškog pola) nisu imali SAR u fazi indukcije

i fazi održavanja VIT venomom pčele (pVIT) (IV rastvor 0,4 ml - 100 µg). Detektovano je povećanje nivoa sIgG4 na PV (> 0,05 kUA/L) kod 27/28 pacijenata (96,4%) u fazi održavanja pVIT (**Tabela 11**).

Tabela 12. Specifična IgG4 antitela na ekstrakt venoma ose (OV) kod 24 pacijenata na imunoterapiji venomom ose (oVIT) u fazi održavanja oVIT

Pacijenti	Pol	sIgE-OV (kUA/L) pre oVIT	Faza održavanja oVIT sIgG4 (kUA/L)	Trajanje oVIT (meseći)
1. N.S.	m	5,60	18,7	65
2. B.J.	ž	31,90	0,23	40
3. D.S.	m	2,63	0,001	20
4. D.D.	m	3,36	0,20	21
5. G.S.	m	0,83	0,81	31
6. P.N.	m	3,00	3,10	33
7. P.D.	m	-	3,20	65
8. R.D.	ž	16,50	1,40	45
9. J.M.	m	0,43	0,01	60
10. V.Z.	m	1,96	2,40	66
11. A.R.	ž	7,97	3,93	54
12. V.V.	ž	4,90	0,56	57
13. R.Z.	ž	9,30	0,18	48
14. S.D.	m	1,00	0,53	84
15. P.Lj.	m	3,24	0,33	50
16. A.Lj.	m	6,89	0,42	48
17. Z.R.	m	2,64	0,17	12
18. P.Z.	m	0,66	1,51	30
19. S.D.	m	3,70	1,02	82
20. U.Dj.	m	2,53	1,40	72
21. R.S.	ž	0,35	0,41	66
22. R.D.	ž	36,4	2,10	42
23. D.D.	m	8,24	1,30	30
24. M.V.	m	3,30	0,66	63

ž: osoba ženskog pola; m: osoba muškog pola

Kod 16/28 (57,1%) pacijenata, nivoi sIgG4 antitela su bili iznad vrednosti praga koji obezbeđuje zaštitni efekat pVIT (2,4 kUA/L) u fazi održavanja pVIT. Srednja vrednost koncentracije sIgG4 antitela kod pacijenata koji su imali nivo sIgG4 iznad vrednosti praga koji obezbeđuje zaštitni efekat pVIT u fazi održavanja pVIT iznosio je 9,47 kUA/l. Vreme

trajanja pVIT je bilo preko 2 godine kod 20/28 (71,4%) pacijenata, a prosečno vreme trajanja pVIT kod 28 pacijenata je bilo 3 godine i 4 meseca (**Tabela 11**).

Tokom VIT, svi pacijenti sa inicijalnom alergijom na ubod ose (29,2% osoba ženskog pola i 70,8% osoba muškog pola) nisu imali SAR u fazi indukcije i fazi održavanja (IV rastvor 0,4 ml - 100 µg) VIT venomom ose (oVIT). Detektovano je povećanje nivoa sIgG4 na OV (> 0,03 kUA/L) kod 22/24 pacijenta (91,7%) u fazi održavanja oVIT. Samo kod 1/24 (0,04%) pacijenta u fazi održavanja oVIT (5 godina i 4 meseca) koncentracija sIgG4 je bila iznad vrednosti praga koji obezbeđuje zaštitni efekat oVIT (6,6 kUA/L) (**Tabela 12**). Prosečno vreme trajanja oVIT je bilo 4 godine i 1 mesec.

5. DISKUSIJA

Ovo istraživanje pokazuje značaj nove molekularne metodologije u svakodnevnoj kliničkoj praksi alergologa koji smatra da je SAR uzrokovana venomom Hymenoptera. Specifično IgE-testiranje na rekombinantne alergene bez CCD je neophodno za adekvatan odabir venoma za VIT, posebno kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću na ekstrakte venoma.

U prvom delu istraživanja studija je imala za cilj da analizira dijagnostički značaj sIgE-testiranja ImmunoCAP metodom na rekombinantne alergene kod pacijenata sa istorijom SAR na ubod Hymenoptera. Identifikovali smo razlike u grupama pacijenata za koje je utvrđeno da su sIgE-pozitivni na pojedinačni (PV ili OV ili SV) ekstrakt ili višestruko pozitivni (PV/OV i PV/OV/SV) na ekstrakte uzimajući u obzir ozbiljnost SAR i sIgE-reaktivnost na rekombinantne glavne alergene fosfolipazu A2-rApi m1 i antigen 5-rVes v 5, kao i CCD. Ispitali smo takođe, korelaciju ImmunoCAP i imunoblot metoda za detekciju koncentracija sIgE antitela na venome. Prema tačnim podacima o alergiji i vrsti Hymenoptera insekata, uporedili smo senzitivnost i specifičnost sIgE-testiranja na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene između dve metode.

Ukupno 51% pacijenata u našoj ispiivanoj grupi je imala višestruku pozitivnost na PV/OV ili PV/OV/SV ekstrakte. Pokazano je da upotreba ekstrakta venoma daje lažno-pozitivne rezultate i značajno smanjuje specifičnost sIgE-testiranja. Prema podacima o vrsti insekta, specifičnost sIgE-testiranja na rekombinantnu fosfolipazu A2-rApi m 1 i rekombinantni antigen 5-rVes v 5 bila je značajno veća od sIgE-testiranja na pojedinačne ekstrakte venoma pčele i ose. Korelacija dva testa bila je veoma značajna za ekstrakt pčele, ekstrakt ose i rekombinantni antigen 5-rVes v 5. Ovo je prva studija o dijagnostičkom značaju rekombinantnih alergena kod pacijenata sa višestrukom senzibilizacijom na ekstrakte venoma u jugoistočnom delu Evrope.

Precizna identifikacija senzibilizacije na relevantne venome je od velikog značaja za započinjanje adekvatne imunoterapije kod pacijenata sa HVA. Iako kožni testovi predstavljaju prvi nivo pristupa za dijagnostiku alergije posredovane IgE antitelima, *in vitro*

testovi su najvažniji dijagnostički korak pre uvođenja dugotrajne VIT (48,58). Zlatni standard za dijagnozu alergije na venome Hymenoptera je kožno testiranje sa ekstraktima venoma (147). Međutim, kožni test može pokazati neobjašnjivu varijabilnost i neuverljive višestruko pozitivne rezultate (169). Takođe, kvalitet i standardizacija alergena za kožne testove mogu uticati na tumačenje rezultata.

Prema nalazima naše studije koja je uključila 82 ispitanika, SAR se češće javlja kod muškaraca nego kod žena ($P = 0,029$) što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (170). Većina naših pacijenata je imala tešku SAR ($P < 0,001$) i težina SAR je bila nezavisna od koncentracija sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne glavne alergene merenih ImmunoCAP metodom ($P > 0,05$). Ovi podaci su prethodno objavljeni i od strane drugih autora (170). Prema literaturi, 3%-7,5% ljudi razvije SAR nakon uboda Hymenoptera insekata (171). Šansa za sistemsku reakciju na ubod varira između 30% i 65% kod odraslih osoba koje su prethodno doživele sistemsku reakciju i zavisi od težine prethodne alergijske reakcije. Prema nedavnim EAACI smernicama, VIT se preporučuje kandidatima sa podacima teške SAR, pčelarima, pacijentima sa alergijom na pčelu i pacijentima sa poremećajima mastocita ili povišenom BST (42).

Proces odlučivanja za uvođenje VIT je veoma važan za efikasnost terapije i treba biti prilagođen svakom pacijentu. Molekularna alergološka dijagnostika, koja koristi pojedinačne rekombinantne alergene bez CCD, omogućava otkrivanje prave senzibilizacije i na taj način kod mnogih pacijenata poboljšava izbor odgovarajućeg venoma za VIT (50,97). Pouzdana identifikacija insekta koji je doveo do SAR je obično teška. Slično, u našoj grupi pacijenata, 7/82 (8,5%) nije moglo da identifikuje insekt. Upotreba ekstrakta venoma za detekciju sIgE može dovesti do lažno-pozitivnih rezultata zbog njihove unakrsne reaktivnosti. Do 75% utvrđene višestruke pozitivnosti *in vitro* testovima sa ekstraktima venoma uzrokovano je sIgE antitelima na CCD koji su sastavni deo glikoproteina homologih alergena (56). Višestruka pozitivnost se može izbeći merenjem CCD-sIgE antitela (97,98). Rezultati istraživanja su pokazali da je određivanje sIgE na rekombinantne glavne alergene posebno korisno za pacijente sa višestrukou pozitivnošću na ekstrakte venoma i one koji nisu mogli da identifikuju insekt.

Unakrsna reaktivnost se može pripisati CCD koji su često prisutni u alergenima insekata i biljaka i uobičajenim glikoproteinskim epitopima homologih alergena koji ulaze u sastav venoma Hymenoptera, kao što je opisano za hijaluronidaze (Api m 2 i Ves v 2) i dipeptidil-peptidaze (Api m 5 i Ves v 3). Poznato je da hijaluronidaze (Api m 2 i Ves v 2) i dipeptidil-peptidaze (Api m 5 i Ves v 3) imaju oko 50% identičnih sekvenci (72,90). Kao rezultat toga, dijagnostički IgE-testovi zasnovani na detekciji antitela na ekstrakte venoma, iako veoma senzitivni, nemaju adekvatnu specifičnost (55). Naše istraživanje je potvrdilo podatke iz prethodnih studija koje su ustanovile da 50-60% pacijenata sa alergijom na venome Hymenoptera ima višestruku pozitivnost. Utvrđeno je da veliki broj pacijenata sa SAR nakon uboda pčele, ose ili stršljena ima pozitivana sIgE na sva tri ekstrakta venoma. Ovo se može objasniti ili prisustvom CCD-sIgE ili istinskom senzibilizacijom (56). Kod naših pacijenata, pozitivna CCD-sIgE antitela su bila češća kod višestruko pozitivnih nego kod jednostruko pozitivnih pacijenata ($P < 0,001$). Stoga, CCD-sIgE antitela značajno doprinose unakrsnoj reaktivnosti utvrđenoj kod ovih pacijenata (50,97). Međutim, istovremeno prisustvo CCD-sIgE i IgE antitela na unakrsno-reaktivne proteinske epitope može još više otežati odluku o izboru odgovarajućeg venoma za imunoterapiju (59). Takođe, analiza CCD-sIgE antitela pokazala je da su naši pacijenti sa istorijom alergije na ubod pčele češće imali pozitivana CCD-sIgE antitela od pacijenata sa istorijom alergije na ubod ose ($P < 0,001$). Sve u svemu, ovo se može objasniti činjenicom da je većina alergena pčele glikozilovana, dok dva glavna alergena ose antigen 5 i fosfolipaza A1 nisu glikozilovana (59). Koncept da višestruka pozitivnost na ekstrakte venoma potiče od CCD-sIgE antitela je prethodno potvrđen (56,97). S druge strane, prava sIgE-pozitivnost može biti uzrokovana senzibilizacijom na ubod koji se prethodno dobro tolerisao (50). U tom smislu, 26,2% naših pacijenata pokazalo je senzibilizaciju na rApi m 1 i rVes v 5. Uzeto zajedno, bolje rešenje za otkrivanje istinske sIgE-reaktivnosti može biti test CCD-inhibicije pomoću ImmunoCAP ili Imunoblot metode (172).

Novo molekularno-alergološko testiranje zasnovano na detekciji sIgE usmerenih na nekoliko neglikozilovanih alergena može pomoći u određivanju prave senzibilizacije i rezultirati adekvatnim terapijskim pristupom (50,111-113). Mnogi pacijenti sa istinskom senzibilizacijom mogu se identifikovati koristeći rApi m 1 i rVes v 5 koji su dostupni za rutinsku *in vitro* dijagnostiku, i što je još važnije, nisu strukturalno povezani (173). Prema

najnovijim EAACI smernicama, VIT se ne preporučuje kod pacijenata sa slučajno otkrivenom senzibilizacijom na Hymenoptera insekte bez kliničkih simptoma alergije (42). Korišćenjem različitih kombinacija najvažnijih rekombinantnih alergena pčele, senzitivnost sIgE-testiranja dostiže 94,4% (115). Kombinacijom rekombinantnih alergena ose rVes v 5 i rVes v 1, senzitivnost sIgE-testiranja dostiže čak i do 100% (50,79,119).

Naši rezultati dobijeni pomoću ImmunoCAP metode identifikovali su veoma visoku senzitivnost za ekstrakt ose i rekombinantni antigen 5-rVes v 5 kod pacijenata sa istorijom alergije na ubod ose (100% i 96,7%) i još veću senzitivnost za rekombinantni antigen 5-rVes v 5 kod pacijenata sa istorijom alergije na ubod stršljena (100%). Prethodne studije su prijavile nižu senzitivnost testa za rVes v 5 u rasponu od 86,5% do 93% (56,93,111,113) kod pacijenata sa alergijom na ubod ose. Takođe, otkrivena je odlična korelacije nivoa sIgE za ekstrakt venoma stršljena i rVes v 5 pomoću ImunoCAP metode (174). Kao što već znamo, unakrsna reaktivnost koja se javlja između venoma različitih *Vespidae*, *Vespula vulgaris* i *Vespa crabo* je jaka, uglavnom zbog sličnosti sastava venoma i strukture alergena. Antigen 5 je prepoznat kao glavni i najmoćniji alergen ose i stršljena (174). Imajući u vidu ovo razmatranje, identifikacija sIgE na rVes v 5 može pomoći u serološkoj potvrđi senzibilizacije na venom stršljena. Prema literaturi, 92,6% pacijenata senzibiliziranih na venom stršljena ima pozitivna sIgE na rVes v 5 (42).

Senzitivnost sIgE-testiranja za ekstrakt venoma pčele (100%) i rApi m 1 (79,3%) kod pacijenata sa alergijom na pčelu je slična ili veća u poređenju sa prethodno objavljenim rezultatima (50,102,175). Senzitivnost sIgE-testiranja za rApi m 1 od 83,3% kod jednostruko pozitivnih i 76,5% kod višestruko pozitivnih pacijenata potvrdilo je da je Api m 1 jedan od glavnih alergena pčele. Četiri od 5 pacijenata koji su bili negativni na oba rekombinantna alergena imalo je istoriju prethodne alergijske reakcije na ubod pčele. Klinička dijagnoza alergije na pčelu bi bila preciznija sa istovremenom upotrebom nekoliko komercijalno dostupnijih rekombinantnih alergena pčele kao što su rApi m 1, rApi m 2, rApi m 4, rApi m 5 i rApi m 10 (115). Ipak, uprkos dobroj korelaciji obe metode za sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene, naši rezultati su pokazali da ImmunoCAP metoda ima veću senzitivnost i specifičnost od Imunoblot metode. Pored toga, prema tačnoj istoriji alergije na ubod insekta, senzitivnost i specifičnost za rApi m 1 i rVes v 5 su više od 75%.

Glavno ograničenje ovog istraživanja bila je nepotpuna dostupnost nekoliko rekombinantnih alergena pčele. Glavni alergen pčele, rekombinantna fosfolipaza A2-rApi m 1 bila je dovoljna za potvrdu alergije kod 80% pacijenata, ali za 20% pacijenata sa istorijom alergije na ubod pčele bilo je potrebno dodatno IgE-testiranje na druge rekombinantne alergene pčele. Takođe, Imunoblot metodom je testiran relativno mali broj pacijenata, ali naši podaci predstavljaju prvu analizu korelacije ImmunoCAP i Imunoblot za detekciju nivoa IgE antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene rApi m 1 i rVes v 5.

U zaključku ovog istraživanja pokazano je da je SAR bila češća kod osoba muškog pola. Većina pacijenata je imala tešku SAR. Ozbiljnost SAR nije zavisila od nivoa sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene. Više od 50% pacijenata imalo je višestruku pozitivnost na ekstrakte venoma. Teška SAR i CCD-sIgE bili su češći kod višestruko pozitivnih nego kod jednostruko pozitivnih pacijenata. Specifična IgE antitela na CCD bila su češća kod pacijenata sa alergijom na pčelu nego kod pacijenata sa alergijom na osu i stršljen. Utvrđena je značajna korelacija između nivoa sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene pomoću ImmunoCAP i Imunoblot metoda. ImmunoCAP metoda je imala veću senzitivnost i specifičnost od Imunoblot metode za dijagnozu HVA. Takođe je pokazano da upotreba ekstrakta prirodnog venoma daje lažno-pozitivne rezultate i značajno smanjuje specifičnost IgE-testa.

Klinička istorija i molekularno alergološko testiranje su od suštinskog značaja za adekvatan izbor venoma za dugotrajne imunoterapiju, posebno kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću na ekstrakte venoma i kod pacijenata koji ne mogu da identifikuju insekt koji je izazvao SAR. S obzirom da prisustvo CCD-sIgE komplikuje tumačenje rezultata sIgE-testa, drugi deo istraživanja je imao za cilj da analizira klinički značaj CRD i CCD-inhibicije za selekciju alergena za VIT. Dijagnostika koja koristi pojedinačne alergene sa profilom pet najvažnijih rekombinantnih alergena pčele i ose i CCD-inhibicija CCD-sIgE pozitivnih seruma su bile od pomoći u određivanju prave senzibilizacije kod ispitivanih višestruko pozitivnih pacijenata koji su imali HVA. Ovaj dijagnostički pristup treba da bude izuzetno važan za izbor adekvatnog venoma za dugotrajnu VIT (50,130). U ovom delu istraživanja prvi put su identifikovane različite grupe pacijenata koji su klasifikovani u pet podgrupa PV/OV/SV/CCD-pozitivnih, koji dele karakteristične obrasce kliničke istorije i

seroloških sIgE-testova. Naši prethodno dobijeni rezultati su ustanovili da je potrebno povećati broj rekombinantnih alergena za sIgE-testiranje (129). Posebno je analizirana grupa pacijenata sa višestrukom pozitivnošću sa ciljem da se utvrdili kako CCD-inhibicija utiče na sIgE-rezultate i da li je neophodno primeniti CCD-inhibiciju kod svih CCD-sIgE pozitivnih pacijenata.

Imunoblot metodom testirani su serumski 71 pacijenta, od kojih je 39 pacijenata imalo višestruku pozitivnost, dok je 29/39 pacijenata imalo CCD-sIgE antitela. Novije studije su otkrile da veliki deo unakrsne reaktivnosti između alergena ose i pčele nije posledica unakrsne reaktivnosti na homologe proteine, već je uzrokovana CCD (130,176,177). Alfa 1, 3-vezani fukozni ostatak na N-acetil-glukozaminu N-glikana je prisutan u fosfolipazi A2 pčele i hijaluronidazama pčele i ose (73,153,178), a ovi epitopi mogu indukovati proizvodnju CCD-sIgE antitela različitih izotipova (179,180).

Većina PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata (27/29) je imala tešku SAR ($p < 0,001$). Iako je manji broj višestruko pozitivnih pacijenata imalo lakšu SAR, ranije je pokazano da glikozilacija može uticati na dostupnost epitopa, imunoreaktivnost i enzimsku funkciju prirodnih alergena (71,180,181). Za sada ne postoji apsolutno tačno objašnjenje biološke uloge epitopa ugljenih hidrata u izazivanju alergijskih reakcija, ali prethodni rezultati su pokazali da je sIgE-reaktivnost na glikozilovane alergene veća u poređenju sa rekombinantnim alergenima. Dobro je poznato da CCD strukture modifikuju proteine tokom post-translacione glikozilacije u Goldžijevom aparatu i da ovaj proces zavisi od sistema ekspresije i vrste proteina.

Razlika u IgE-reaktivnosti na glikozilovane alergene u poređenju sa rekombinantnim alergenima može biti posledica strukture proteina, pošto proces glikozilacije može biti neophodan za stabilizaciju nekih proteinskih nabora (180). Ima nekoliko primera u kojima struktura ugljenih hidrata doprinosi epitopu proteinskog alergena koji antitelo obično prepoznaje na način specifičan za vrstu. Uloga glikana kao dela epitopa je pokazana u oba procesa, vezivanje monoklonskih antitela i oslobađanje histamina iz bazofila (182). Takođe, sve je više podataka koji ukazuju da CCD predstavljaju haptene. Uporedne studije o prirodnoj glikozilovanoj i rekombinantnoj fosfolipazi A2 pčele su pokazale da glikozilacija prirodnog

alergena poboljšava njegov kapacitet vezivanja za IgE, odnosno alergeno. Pored toga, enzimski funkcija native varijante bila je jača (181).

Više puta je istaknuto da su CCD-sIgE antitela odgovorna za oko 50% dvostruke senzibilizacije na venom pčele i ose (56,97). Prethodno objavljeni podaci su pokazali da oko polovina pacijenata sa HVA produkuje CCD-sIgE antitela (56,129). Anti-CCD-sIgE predstavljaju zamku *in vitro* dijagnostike jer dovode do unakrsne sIgE-reaktivnosti sa bilo kojim glikozilovanim alergenima (polen, hrana ili venom) i značajno ometaju detekciju klinički relevantne sIgE-senzibilizacije na proteinske epitope (130,183). Dvostruka ili trostruka sIgE-pozitivnost na ekstrakte venoma komplikuje izbor odgovarajućeg venoma za VIT, što dovodi do povećanog rizika od neželjenih efekata, *de novo* senzibilizacije i većih troškova lečenja (19). Kod ovih pacijenata, CRD i CCD-inhibicija daju tačnije dijagnostičke rezultate (131,184).

U većini zemalja, prihvaćeni klinički standardi preporučuju kožno testiranje kao početni metod (185). Međutim, kožno testiranje može pokazati neuverljive višestruko pozitivne rezultate koji dodatno komplikuju dijagnozu HVA. Značaj CCD-inhibicije u *in vitro* dijagnostici je veliki jer CCD-inhibicija eliminiše lažno-pozitivne rezultate (184). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da test CCD-inhibicije ne treba izvoditi kod svih CCD-sIgE pozitivnih pacijenata. Na osnovu CRD i CCD-inhibicije, uočili smo da postoji slaganje između rezultata IgE-testiranja i podataka o vrsti insekta koji je doveo do alergijske reakcije.

Proces odlučivanja za VIT je veoma važan za efikasnost terapije, a u većini slučajeva dovoljan je tretman sa samo jednim venomom. Među našim višestruko pozitivnim pacijentima sa istovremenim prisustvom CCD-sIgE antitela (n=29) koji su doživeli SAR nakon uboda ose ili stršljena, 5/29 pacijenata je nakon CCD-inhibicije imalo sIgE-reaktivnost na rApi m 2 i rVes v 5. Ukupno 11/29 pacijenata je imalo sIgE-reaktivnost na rApi m 2 i rVes v 5 nakon CCD-inhibicije, ali 6/11 pacijenata je imalo kliničku prezentaciju alergije na obe vrste insekta kao i sIgE-reaktivnost na druge rekombinantne alergene pčele rApi m 1 i/ili rApi m 10. Među višestruko pozitivnim pacijentima koji nisu imali CCD-sIgE antitela, jedan pacijent sa alergijom na osu imao je sIgE-reaktivnost na rApi m 2 i rVes v 5, dok su ostali pacijenti (četiri od pet) imali alergiju na obe vrste insekta potvrđenu sIgE antitelima na više

rekombinantnih alergena pčele i rVes v 5. Ovi podaci sugerišu da je sIgE-reaktivnost na rApi m 2 bila zasnovana na prepoznavanju proteinskih epitopa sličnih onima na homologom rVes v 2. Ovi podaci sa velikom verovatnoćom ukazuju da je 5/29 ispitivanih pacijenata nakon testa CCD-inhibicije imalo sIgE antitela na homologe proteinske epitope hijaluronidaze.

Uloga hijaluronidaza kao glavnih unakrsno-reaktivnih alergena pčele i ose bila je ranije prepoznata zbog visoke homologije između hijaluronidaza svih vrsta (174). Slično, jedna grupa autora je pokazala da su sIgE antitela na rApi m 2 imali pojedini pacijenti koji su bili senzibilisani samo na venom osa (180). Prema najnovijim EAACI smernicama za imunoterapiju Hymenoptera venomom, u većini slučajeva dovoljan je tretman samo sa jednim venomom. Glavni dijagnostički problem je da trenutno dostupni testovi ne mogu razlikovati asimptomatsku senzibilizaciju od klinički relevantne alergije. Uzimajući u obzir navedene činjenice, naši rezultati sugerišu da kombinacija više od jednog rekombinantnog alergena pčele i rVes v 5 u dijagnostici omogućava pouzdaniju dijagnozu alergije na obe vrste Hymenoptera. Iako hijaluronidaza pčele pokazuje visok procenat homologije sa hijaluronidazom ose (90,98,183), ponekad može biti teško odrediti da li ovi rezultati odražavaju senzibilizaciju zbog unakrsne reaktivnosti između zajedničkih proteinskih determinanti ili istinsku dvostruku senzibilizaciju na obe vrste insekta. Pošto pacijenti sa alergijom na venom pčele mogu imati monosenzibilizaciju na Api m 2, odluka u vezi VIT kod pacijenata sa sIgE-reaktivnošću na rApi m 2 i rVes v 5 treba da se zasniva na CRD, ozbiljnosti SAR i istoriji alergije na ubod insekta (98,183,186). Zanimljivo je da se senzitivnost PV-pozitivnosti značajno povećala nakon testa CCD-inhibicije sa 0% na 77% u ispitivanoj selektovanoj podgrupi PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata sa SAR na uboda pčele. Kod ove grupe pacijenata test CCD-inhibicije može zameniti skupu CRD.

Pokazali smo da je CCD-inhibicija posebno korisna u podgrupi PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata koji su bili negativni na sve testirane rekombinantne alergene i u podgrupi PV/OV/SV/CCD/rVes v 5-pozitivnih pacijenata. U ovim podgrupama pacijenata, PV-pozitivnost je bila detektovana i pre i nakon CCD-inhibicije. Stoga, ovim pacijentima je potrebno proširenje panela rekombinantnih alergena pčele. Takođe, nakon testa CCD-inhibicije povećao se broj pacijenata sa sIgE-reaktivnošću na rekombinantne alergene pčele sa 20 na 24 od ukupno 29 pacijenata.

Imajući u vidu da se sIgE-senzibilizacija može slučajno detektovati kod pacijenata bez kliničke alergije na ubod Hymenoptera insekta, ne može se potpuno isključiti mogućnost alergijske reakcije na budući ubod. Zbog mogućnosti štetnog efekta na budući ubod, a prema najnovijim EAACI smernicama za VIT, nije pogrešno sprovesti VIT sa dva venoma kod pacijenata sa istinskom dvostrukom pozitivnošću prema rezultatima CRD i CCD-inhibicije (42). U tom kontekstu, novootkrivena sIgE-reaktivnost na rekombinantne alergene pčele kod naša četiri pacijenta sa alergijom nakon testa CCD-inhibicije bila je veoma važna. Već odavno je poznato da nivoi sIgE nisu u korelaciji sa težinom alergijske reakcije (129,187). Isto tako, dugotrajnu VIT treba razmotriti kod pacijenata sa senzibilizacijom na venom pčele jer su oni u većem riziku za SAR (42).

Iznenadujuće, analiza PV/OV/SV/CCD-pozitivnih pacijenata nakon CCD-inhibicije dovela je do statistički značajnog povećanje nivoa sIgE na rekombinantnu fosfolipazu-rApi m 1 i rekombinantnu hijaluronidazu-rApi m 2 ($P < 0,05$) i statistički značajnog smanjenja nivoa sIgE na rekombinantni antigen 5-rVes v 5 ($P < 0,01$), što do sada niko od drugih istraživača nije pokazao. Tačni razlozi za promene nivoa sIgE na pomenute rekombinantne alergene nakon testa CCD-inhibicije nisu sasvim jasni. Ovi nalazi mogu biti uzrokovani različitom strukturom nativnih alergena venoma pčele i ose i poteškoćama u dobijanju prečišćenih rekombinantnih alergena. Nažalost, rekombinantni proteini mogu biti modifikovani post-translacionim modifikacijama u Goldžijevom aparatu eukariotskih ćelija i mogu da vezuju različite ugljene hidrate (188). Ključni delovi CCD su ostaci fukoze koji se javljaju u glikoproteinima insekata, ili ostaci fukoze i ksiloze u biljnim glikoproteinima koji mogu predstavljati epitope za različite vrste imunoglobulina. Jedna grupa autora pretpostavlja da bi klinički značaj CCD u HVA mogao biti rezultat koncentracije i afiniteta IgE i IgG antitela (99).

Kod alergičnih pacijenata, nativni glikozilovani proteini pčele pokreću proizvodnju CCD-sIgE, ali i CCD-sIgG antitela svih podklasa različitih afiniteta (189). Tokom istraživanja, postavili smo hipotezu da rezultati CCD-inhibicije indirektno ukazuju da rekombinantni alergeni fosfolipaza A2-rApi m 1 i hijaluronidaza-rApi m 2 sadrže male količine CCD antigena, što može omogućiti antitelima različitih klasa (CCD-sIgE i CCD-IgG) da ometaju vezivanje sIgE za proteinske epitope pre CCD-inhibicije. Ovo proizvodi lažno niže nivo sIgE

antitela pre CCD-inhibicije. Konačno, nakon CCD-inhibicije zbog pristupačnosti proteinskih epitopa za IgE, rezultira višim, pravim nivoima sIgE na rekombinantnu alergene rApi m 1 i rApi m 2. Ova hipoteza takođe može biti objašnjenje za povećan broj pacijenata sa sIgE-reaktivnošću na rekombinantne alergene pčele nakon CCD-inhibicije. Nasuprot ovome, uzimajući u obzir da Ves v 5 nije prirodno glikozilovan (*Gibbs i sar. 2008*), postavljena je hipoteza da rekombinantni antigen 5-rVes v 5 može indukovati produkciju samo IgE antitela na proteinske epitope i da rVes v 5 u Imunoblotu sadrži male količine CCD antigena, što omogućava vezivanje sveprisutnih sIgE antitela na CCD.

Još su *Jin* i saradnici istakli značaj stalnog kontakta sa glikoalergenima hrane u gastrointestinalnom traktu i polenom (glikozilovanim proteinima) na mukoznim površinama respiratornog sistema, koji mogu izazvati proizvodnju određenih nivoa sIgE antitela protiv CCD epitopa (99). S tim u vezi, predpostavili smo da ovaj fenomen dovodi do lažnih, viših nivoa sIgE na rVes v 5 pre CCD-inhibicije i dolazi se do zaključka da CCD-inhibicija smanjuje nespecifično vezivanje CCD-sIgE antitela što dovodi do pravih, nižih nivoa sIgE antitela na rVes v 5. Dodatno, naši rezultati su pokazali da CCD-inhibicija može prevazići trenutna ograničenja nekih procedura u rekombinantnoj tehnologiji koja skriva ili daje izmenjenu prezentaciju pojedinih IgE epitopa kako je objašnjeno od strane austrijskih istraživača *Campana* i saradnika, posebno u Imunoblotu koji ne prikazuje trodimenzionalnu konformacionu strukturu antigena (190). Ipak, rekombinantna proizvodnja određenih alergena još uvek treba da prevaziđe tehnološke prepreke, a razvoj prečišćenih i pravilno savijenih rekombinantnih proteina bez CCD je obavezan u dijagnostici alergija i imunoterapiji.

U ovom delu istraživanje koje je obavljeno sa većim brojem pacijenata sa alergijom na pčelu, senzitivnost Imunoblota za rApi m 1 bila je 65,7%. Slično tome, otkrili smo solidnu senzitivnost Imunoblot metode za rApi m 2 i rApi m 10 (68,4% i 58%) kod pacijenata sa alergijom na pčelu. Osetljivost CRD primenom istovremene detekcije sIgE na najmanje jedan testirani rekombinantni alergen pčele bila je 86,8%. Do sada je opisano 12 alergena pčele, a Api m 1 i Api m 4 se nalaze u značajnim količinama u venomu pčelu (189). Jedno istraživanje je pokazalo da su Api m 2 i Api m 10 važni glavni alergeni sa sIgE-reaktivnošću u rasponu od 47,9-52,2% i 61,8-72,2% (115). Od velikog značaja je što su naši rezultati CRD pokazali

veoma visoku senzitivnost za rVes v 5 kod pacijenata sa alergijom na osu (94%) i pacijenata sa alergijom na stršljen (100%). Takođe smo pokazali da nije bilo pacijenata sa alergijom na osu ili stršljen koji su imali izolovanu sIgE-reaktivnost na rVes v 1. Manji broj ispitivanih pacijenata sa alergijom na osu i stršljen (8/39) je imao sIgE-reaktivnost na rVes v 5 i rVes v 1. Rezultati nekoliko istraživanja ranije potvrdilo je da je rVes v 5 dovoljan kod većine pacijenata za serološku potvrdu alergije na osu ili stršljen (50,191). Kada je potrebno napraviti diferencijaciju alergije na osu i stršljen, pored sIgE-reaktivnosti na rVes v 5, veoma je važan podatak o vrsti insekta koji je doveo do alergijske reakcije. Pored ovoga, procenat pacijenata sa alergijom na pčelu senzibilisanih na rApi m 1 kreće se u rasponu od 57% do 83,3%, a procenat pacijenata sa alergijom na osu senzibilisanih na rVes v 5 kreće se od 86,55 do 96,7% mereno ImmunoCAP metodom (102,112,113). U skladu sa ovim zapažanjima, naši rezultati su potvrdili da je Imunoblot metoda imala zadovoljavajuću osetljivost za iste alergene.

Pošto CRD u našem istraživanju nije uspela da dijagnostikuje (5/38) 13,2% pacijenata koji su doživeli SAR na ubod pčele i (2/33) 6,1% pacijenata koji su doživeli SAR na ubod ose, kod ovih pacijenata potrebna je dijagnostika sa proširenim panelom rekombinantnih alergena kako bi se potvrdila HVA. S druge strane, CRD može pomoći u identifikaciji pacijenata sa istorijom HVA koji su imali negativne sIgE-testove na ekstrakte venoma (58), kao što je bio slučaj kod dva naša pacijenta sa SAR na ubod ose.

Iako koncentracije sIgE tokom uspešne VIT nisu u korelaciji sa kliničkim poboljšanjem, poznato je da promene u koncentracijama IgE i IgG4 antitela ukazuju na poboljšanje imunološke tolerancije tokom VIT (153,192). Pošto je odnos IgG/IgE dobar marker efikasnosti (193) važno je znati njihove prave početne koncentracije pre početka dugotrajne VIT. Buduće studije će razjasniti da li koncentracije sIgE antitela pre ili posle CCD-inhibicije treba uzeti kao klinički relevantne. Jedan od ciljeva našeg istraživanja bio je i ispitivanje efekta imunoterapije merenjem sIgG4 antitela na alergene pčele i ose u fazi održavanja VIT. Istraživanja *Lee* i saradnika sa Harvarda u Bostonu su pokazala da odgovor B-ćelija podrazumeva prelazak proalergijskih B ćelija koje proizvode IgE ka B ćelijama koje potom proizvode IgG4 sa regulatornim fenotipom i posledičnim povećanjem sekrecije IL-10 i TGF-beta i da je prisustvo sIgG4 antitela od velikog značaja u ranim fazama VIT (164). Iako

se nivoi sIgG4 vremenom progresivno smanjuju, njihov uticaj na inhibiciju aktivacije bazofila ostaje, tako da blokirajuća sIgG4 antitela treba da imaju zaštitnu anti-inflamatornu ulogu. Naime, ovim istraživanjem je pokazano da su pacijenti na imunoterapiji venomom pčele imali značajan porast nivoa sIgG4 u fazi održavanja VIT u odnosu na pacijente na imunoterapiji venomom ose ($P < 0,001$). Ovi podaci su u skladu sa ranije potvrđenim rezultatima od strane američkih (164) i engleskih (166) istraživača koji su ustanovili da povišen nivo IgG4 može biti biomarker za efikasnost VIT jer je u korelaciji sa zaštitom od ponovnog uboda.

Naši rezultati pokazuju da je test CCD-inhibicije koristan kod pacijenata koji su negativni na sve testirane rekombinantne alergene pčele. Pacijenti sa sIgE-reaktivnost na ekstrakt venom pčele, pre i nakon CCD-inhibicije, zahtevaju proširen panel rekombinantnih alergena pčele (194). Molekularna dijagnostika je veliki korak ka personalizovanoj medicini (104) posebno kod pacijenata koji su isključivo senzibilisani na alergene koji su nedovoljno zastupljeni u terapijskim smešama za VIT, kao što je opisano za rApi m 10 (93). Ovim istraživanjem pokazano je da Imunoblot metoda, sa profilom pet najvažnijih rekombinantnih alergena, ima visoku senzitivnost za dijagnozu HVA (194) i da pacijenti sa višestrukom PV/OV/SV/CCD-pozitivnošću imaju češće tešku SAR (III i IV stepeni težine). Kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću, CCD-inhibicija povećava senzitivnost CRD i pomaže da se definišu pacijenti sa alergijom na pčelu kojima je potrebna proširena CRD. Test CCD-inhibicije i CRD pomažu sinergijski da se otkrije klinički relevantna, istinska senzibilizacija i poboljša izbor venom za dugotrajnu VIT. Ovaj pristup, u kojem su CRD i CCD-inhibicija omogućile kreiranje dijagnostičkog algoritma koji je veoma značajan u kliničkom radu pre uvođenja imunoterapije je po prvi put ikada učinjen kod pacijenata sa alergijom na Hymenoptera venome.

6. ZAKLJUČCI

Prema postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Više od 50% pacijenata sa alergijom na venome Hymenoptera ima višestruku IgE-pozitivnost na ekstrakte venoma, dok pravu dvostruku senzibilizaciju na rekombinantnu fosfolipazu A2-rApi m 1 i rekombinantni antigen 5-rVes v5 ima 26% pacijenata
2. Serumska CCD-sIgE antitela su češća kod pacijenata sa višestrukom IgE-pozitivnošću nego kod pacijenata sa jednostrukom IgE-pozitivnošću na ekstrakte venoma ($P < 0,001$)
3. Serumska CCD-sIgE antitela su češća kod pacijenata alergičnih na venom pčele u odnosu na pacijente alergične na venom ose ($P < 0,0001$) i venom stršljena ($P = 0.049$)
4. Teška sistemska alergijska reakcija (III i IV stepena) je češća kod pacijenata sa višestrukom IgE-pozitivnošću nego kod pacijenata sa jednostrukom IgE-pozitivnošću na ekstrakte venoma ($P < 0,001$)
5. Težina sistemske alergijske reakcije ne zavisi od nivoa sIgE na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene
6. Postoji značajna pozitivna korelacija ImmunoCAP i Imunoblot metoda za ekstrakte venoma ($P < 0,0001$) i rekombinantne alergene fosfolipazu A2-rAp m 1 i antigen 5-rVes v 5 ($P < 0,05$)
7. Prema istoriji prethodne alergijske reakcije, specifičnost ImmunoCAP i Imunoblot za rekombinantne alergene fosfolipazu A2-rApi m 1 (90% i 94%) i antigen 5-rVes v 5

(83% i 69%) je odlična i značajno veća od specifičnosti za ekstrakte venoma pčele (53% i 47%) i ose (48% i 39%)

8. Kod pacijenata alergičnih na pčelu, ImmunoCAP metoda ima veću senzitivnost za ekstrakt venoma pčele i rekombinantnu fosfolipazu A2-rApi m 1 (100% i 79%) nego Immunoblot (92% i 39%), a kod pacijenata alergičnih na osu, ImmunoCAP ima veću senzitivnost za ekstrakt venoma ose i rekombinantni antigen 5-rVes v 5 (100% i 97%) nego Immunoblot metoda (71% i 88%)
9. Specifična IgE na fosfolipazu A2-rApi m 1, hijaluronidazu-rApi m 2 i ikarapin-rApi m 10 detektovana su kod 66%, 68% i 58% alergičnih pacijenata
10. Immunoblot sa profilom pet najvažnijih rekombinantnih alergena fosfolipaze A2-rApi m 1, hijaluronidaze-rApi m 2, ikarapina-rApi m 10, fosfolipaze A1-rVes v 1 i antigena 5-rVes v 5 ima visoku senzitivnost za dijagnozu alergije na pčelu (87%) i osu (94%), posebno kod pacijenata sa višestrukom IgE-pozitivnošću
11. Prava višestruka senzibilizacija je detektovana kod 45% višestruko- i CCD-pozitivnih pacijenata nakon CCD-inhibicije
12. Test CCD-inhibicije je koristan kod pacijenata istovremeno višestruko- i CCD-pozitivnih, koji su negativni na sve testirane rekombinantne alergene pčele
13. Test CCD-inhibicije povećava senzitivnost dijagnostike koja koristi pojedinačne rekombinantne alergene. Perzistiranje pozitivnosti na ekstrakt venoma pčele nakon CCD-inhibicije zahteva dijagnostiku sa proširenim panelom rekombinantnih alergena
14. Porast nivoa specifičnih IgG4 antitela u fazi održavanja imunoterapije je značajno viši kod pacijenata na imunoterapiji venomom pčele nego kod pacijenata na imunoterapiji venomom ose ($P < 0,0001$)

7. LITERATURA

1. Worm M, Eckermann O, Dölle S, Aberer W, Beyer K, Hawranek T, et al. Triggers and treatment of anaphylaxis: An analysis of 4000 cases from Germany, Austria and Switzerland. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(21):367–75.
2. Pucca MB, Cerni FA, Oliveira IS, Jenkins TP, Argemí L, Sørensen C V., et al. Bee Updated: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Envenoming Therapy. *Front Immunol.* 2019;10:2090.
3. Rajan TV. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: A re-interpretation. *Trends Immunol.* 2003;24(7):376–9.
4. Dispenza MC. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc.* 2019; 40(6):470-473.
5. Biló BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN, Birnbaum J, et al. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy.* 2005;60(11):1339-49.
6. 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(3):33–48.
7. Nittner-Marszalska M, Kopeć A, Biegus M, Kosińska M, Obojski A, Pawłowicz R, et al. Non-ST segment elevation myocardial infarction after multiple bee stings. A case of “delayed” Kounis II syndrome? *Int J Cardiol.* 2013;166(3):62–5.
8. Tőro K, Borka K, Kardos M, Kristóf I, Sótonyi P. Expression and function of c5a receptor in a fatal anaphylaxis after honey bee sting. *J Forensic Sci.* 2011;56(2):526–8.
9. Głobińska A, Boonpiyathad T, Satitsuksanoa P, Kleuskens M, van de Veen W, Sokolowska M, et al. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Diverse mechanisms of immune tolerance to allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018 ;121(3):306-312.
10. Vitte J, Vibhushan S, Bratti M, Montero-Hernández JE, Blank U. Allergy, Anaphylaxis

- and Non-Allergic Hypersensitivity: IgE, Mast Cells and Beyond. *Med Princ Pract*. 2022;31(6):501-515.
11. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(2):135-42.
 12. Cox LS, Sanchez-Borges M, Lockey RF. World Allergy Organization Systemic Allergic Reaction Grading System: Is a Modification Needed? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(1):58-62
 13. Mueller HL. Diagnosis and Treatment of Insect Sensitivity. *J Asthma Res*. 1966 ;3(4):331-3
 14. Müller UR. Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(4):343-7.
 15. Jacobson, R.S. (2017). Entomological Aspects of Insect Sting Allergy. In: Freeman, T., Tracy, J. (eds) *Stinging Insect Allergy*. Springer, Cham.
 16. Ensina LF, Min TK, Félix MMR, de Alcântara CT, Costa C. Acute Urticaria and Anaphylaxis: Differences and Similarities in Clinical Management. *Front Allergy*. 2022; 3:840999.
 17. Cardona V, Ansotegui IJ, Ebisawa M, El-Gamal Y, Fernandez Rivas M, Fineman S, et al. World allergy organization anaphylaxis guidance 2020. *World Allergy Organ J*. 2020 ;13(10):100472.
 18. Toletone A, Voltolini S, Passalacqua G, Dini G, Bignardi D, Minale P, et al. Hymenoptera venom allergy in outdoor workers: Occupational exposure, clinical features and effects of allergen immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother*. 2017;13(2):477-83.
 19. Golden DBK. Insect Sting Anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(2):261-72.
 20. Severino M, Bonadonna P, Passalacqua G. Large local reactions from stinging insects: From epidemiology to management. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9(4):334-7.

21. Antonicelli L, Bilò MB, Bonifazi F. Epidemiology of hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002;2(4):341–6.
22. Worm M, Moneret-Vautrin A, Scherer K, Lang R, Fernandez-Rivas M, Cardona V, et al. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). *Allergy*. 2014;69(10):1397-404.
23. Schwartz LB. Diagnostic Value of Tryptase in Anaphylaxis and Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):451–63.
24. Ferrer M. Immunological events in chronic spontaneous urticaria. *Clin Transl Allergy*. 2015;5(1):1–8.
25. Vázquez-Revuelta P, González-de-Olano D. Prevalence of clonal mast cell disorders in patients presenting with hymenoptera venom anaphylaxis might be higher than expected. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(3):193–4.
26. Bonadonna P, Lombardo C, Zanotti R. Mastocytosis and allergic diseases. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(5):288–97.
27. Sperr WR, El-Samahi A, Kundi M, Girschikofsky M, Winkler S, Lutz D, et al. Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: A novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(10):914–23.
28. Valent P, Akin C, Arock M, Brockow K, Butterfield JH, Carter MC, et al. 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(3):215–25.
29. Alvarez-Twose I, Matito A. Mastocytosis presenting as insect anaphylaxis: Gender differences and natural history. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019;19(5):468–74.
30. Haeberli 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(9):1216–20.
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(2):365–81.
32. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: Importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(5):1047–54.
 33. Mesquita AM, Carneiro-Leão L, Amaral L, Coimbra A. Hymenoptera venom allergy: Resting reactions. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2021;53(2):94–6.
 34. Müller UR, Haeberli G. Use of β -blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(3):606–10.
 35. Brown SGA. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(2):371–6.
 36. Farioli L, Losappio LM, Schroeder JW, Preziosi D, Scibilia J, Caron L, et al. Basal tryptase levels can predict clinical severity in hymenoptera venom anaphylaxis and ischemic cardiovascular disorders. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2019;29(2):162–4.
 37. Chatain C, Sedillot N, Thomas M, Pernollet M, Bocquet A, Boccon-Gibod I, et al. Fatal hymenoptera venom anaphylaxis by undetected clonal mast cell disorder: A better identification of high risk patients is needed. *Rev Med Interne.* 2021;42(12):869–74.
 38. Bilò MB, Tontini C, Martini M, Corsi A, Agolini S, Antonicelli L. Clinical aspects of hymenoptera venom allergy and venom immunotherapy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2019;51(6):244–57.
 39. Fernández-Bravo S, Palacio-García L, Requena-Robledo N, Yuste-Montalvo A, Nuñez-Borque E, Esteban V. Anaphylaxis: mediators, biomarkers and microenvironments. *J Investig Allergy Clin Immunol.* 2022;32(6):419–37.
 40. Mikhail I, Stukus DR, Prince BT. Fatal Anaphylaxis: Epidemiology and Risk Factors. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2021;21(4):28.

41. Arzt L, Bokanovic D, Schrautzer C, Laipold K, Möbs C, Pfützner W, et al. Immunological differences between insect venom-allergic patients with and without immunotherapy and asymptotically sensitized subjects. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2018;73(6):1223–31.
42. Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2018;73(4):744–64.
43. Sturm GJ, Kranzelbinder B, Schuster C, Sturm EM, Bokanovic D, Vollmann J, et al. Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(6):1635-43.
44. Vachová M, Panzner P, Malkusová I, Hanzlíková J, Vlas T. Utility of laboratory testing for the diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy Asthma Proc.* 2016;37(3):248–55.
45. Mosbech H, Tang L, Linneberg A. Insect sting reactions and specific IgE to venom and major allergens in a general population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170(3):194–200.
46. Matysiak J, Matuszewska E, Packi K, Klupczyńska-Gabryszak A. Diagnosis of Hymenoptera Venom Allergy: State of the Art, Challenges, and Perspectives. *Biomedicines.* 2022;10(9):1–15.
47. Kosnik M, Korosec P. Venom immunotherapy: Clinical efficacy, safety and contraindications. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(8):877–84.
48. Bilò MB. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: From epidemiology to treatment. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2011;66(Suppl 95):35–7.
49. Pfaar O, Bachert C, Bufe A, Buhl R, Ebner C, Eng P, et al. Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases. *Allergologie.* 2015;38(9):431–70.
50. 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 Eur J Allergy Clin Immunol.* 2012;67(8):1069–73.
51. Blank S, Seismann H, Michel Y, McIntyre M, Cifuentes L, Braren I, et al. Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2011;66(10):1322–9.
 52. Bilò MB, Martini M, Berra D, Scarpa A, Losappio L, Quercia O, et al. Hymenoptera venom immunotherapy: How to safely switch to the same venom from a different manufacturer. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2018;28(3):205–8.
 53. Möbs C, Ipsen H, Mayer L, Slotosch C, Petersen A, Würtzen PA, et al. Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 ;130(5):1108-1116.
 54. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(3):654–65.
 55. Watanabe M, Hirata H, Arima M, Hayashi Y, Chibana K, Yoshida N, et al. Measurement of Hymenoptera venom specific IgE by the IMMULITE 3gAllergy in subjects with negative or positive results by ImmunoCAP. *Asia Pac Allergy.* 2012;2(3):195.
 56. 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 Eur J Allergy Clin Immunol.* 2009;64(4):543–8.
 57. Ludman SW, Boyle RJ. Stinging insect allergy: Current perspectives on venom immunotherapy. *J Asthma Allergy.* 2015;8:75-86.
 58. Jakob T, Müller U, Helbling A, Spillner E. Component resolved diagnostics for hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2017;17(5):363–72.
 59. Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to insect venom allergens: Role of molecular

- diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015; 15(5):26.
60. Korošec P, Šilar M, Eržen R, Čelesnik N, Bajrović N, Zidarn M, et al. Clinical routine utility of Basophil activation testing for diagnosis of hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161(4):363–8.
 61. van De Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):1204–12.
 62. Bilò MB, Pravettoni V, Bignardi D, Bonadonna P, Mauro M, Novembre E, et al. Hymenoptera venom allergy: Management of children and adults in clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2019;29(3):180–205.
 63. Khalil A, Elesawy BH, Ali TM, Ahmed OM. Bee venom: From venom to drug. *Molecules.* 2021;26(16):1–17.
 64. Tracy JM, Golden DBK. Hymenoptera Venom Extracts in Clinical Practice. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(6):1856-1862.
 65. Hossen MS, Shapla UM, Gan SH, Khalil MI. Impact of bee venom enzymes on diseases and immune responses. *Molecules.* 2017;22(1):1–16.
 66. Van Vaerenbergh M, Debyser G, Devreese B, de Graaf DC. Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *J Proteomics.* 2014;99:169-78.
 67. Danneels EL, Van Vaerenbergh M, Debyser G, Devreese B, de Graaf DC. Honeybee venom proteome profile of queens and winter bees as determined by a mass spectrometric approach. *Toxins (Basel).* 2015;7(11):4468–83.
 68. Goodman RE, Breiteneder H. The WHO/IUIS Allergen Nomenclature. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2019;74(3):429–31.
 69. Radauer C, Nandy A, Ferreira F, Goodman RE, Larsen JN, Lidholm J, et al. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences.

- Allergy Eur J Allergy Clin Immunol. 2014;69(4):413–9.
70. Van Vaerenbergh M, Cardoen D, Formesyn EM, Brunain M, Van Driessche G, Blank S, et al. Extending the honey bee venom with the antimicrobial peptide apidaecin and a protein resembling wasp antigen 5. *Insect Mol Biol*. 2013;22(2):199–210.
 71. Burzyńska M, Piasecka-kwiatkowska D. A review of honeybee venom allergens and allergenicity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8371..
 72. Blank S, Seismann H, Bockisch B, Braren I, Cifuentes L, McIntyre M, et al. 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(9):5403–13.
 73. Kolarich D, Léonard R, Hemmer W, Altmann F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *FEBS J*. 2005;272(20):5182–90.
 74. Brehler R, Grundmann S, Stöcker B. Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013;13(4):360–4.
 75. Fötisch K, Vieths S. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconj J*. 2001;18(5):373–90.
 76. Dennis EA, Cao J, Hsu Y, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev*. 2011;111(10):6130-85.
 77. Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142(2):99–115.
 78. Bergmann-Hug K, Fricker M, Hausmann O, Helbling A, Jörg L. Sensitization to Hymenoptera venom in pollen allergic patients: Frequency and involvement of cross-reacting carbohydrate determinants (CCD). *PLoS One*. 2020;15(9):e0238740.
 79. Sturm GJ, Biló MB, Bonadonna P, Hemmer W, Caruso B, Bokanovic D, et al. Ves v 5 can establish the diagnosis in patients without detectable specific IgE to wasp venom and

- a possible north-south difference in Api m 1 sensitization in Europe. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(3):817.
80. 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(4):350-2.
 81. 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(4):848-54.
 82. Glaeser A, Müller C, Bode S. Anaphylactic reactions in the build-up phase of rush immunotherapy for bee venom allergy in pediatric patients: a single-center experience. *Clin Mol Allergy.* 2022;20(1):4.
 83. Blank S, Bazon ML, Grosch J, Schmidt-Weber CB, Brochetto-Braga MR, Bilò MB, et al. Antigen 5 Allergens of Hymenoptera Venoms and Their Role in Diagnosis and Therapy of Venom Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2020;20(10):58
 84. Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins - Roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev.* 2008;29(7):865-97.
 85. Antolín-Amérigo D, Ruiz-León B, Boni E, Alfaya-Arias T, Álvarez-Mon M, Barbarroja-Escudero J, et al. Component-resolved diagnosis in hymenoptera allergy. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2018;46(3):253-262.
 86. Seismann H, Blank S, Braren I, Greunke K, Cifuentes L, Grunwald T, et al. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of α -1,3-core fucosylation. *Mol Immunol.* 2010;47(4):799-808.
 87. Tomsitz D, Brockow K. Component Resolved Diagnosis in Hymenoptera Anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17(6):1-9.
 88. Dalenberg DA, Schryver PG, Klee GG. Analytical Performance Specifications. Relating Laboratory Performance to Quality Required for Intended Clinical Use. *Clin Lab Med.*

2013;33(1):55–73.

89. Blank S, Seismann H, McIntyre M, Ollert M, Wolf S, Bantleon FI, et al. Vitellogenins Are New High Molecular Weight Components and Allergens (Api m 12 and Ves v 6) of *Apis mellifera* and *Vespula vulgaris* Venom. *PLoS One*. 2013;8(4):e62009.
90. 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(1–3):184–91.
91. Seppälä U, Selby D, Monsalve R, King TP, Ebner C, Roepstorff P, et al. 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(10):2014–21.
92. Arzt L, Bokanovic D, Schrautzer C, Schwarz I, Laipold K, Aberer W, et al. Questionable diagnostic benefit of the commercially available panel of bee venom components. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2017;72(9):1419–22.
93. Frick M, Fischer J, Helbling A, Ruëff F, Wiczorek D, Ollert M, et al. Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(6):1663–1671.
94. Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(10):1442–60.
95. Skov LK, Seppälä U, Coen JFF, Crickmore N, King TP, Monsalve R, et al. 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(6):595–604.
96. Ruiz-Leon B, Serrano P, Vidal C, Moreno-Aguilar C. Management of Double Sensitization to Vespids in Europe. *Toxins (Basel)*. 2022;14(2):1–13.
97. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: Improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate

- determinants. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(1):155-61.
98. Jovanović D, Perić-Popadić A, Andrejević S, Jovanović I, Bonači-Nikolić B. Triple IgE-positivity to hornet, wasp and bee venom in the patient with anaphylaxis: Diagnostic and therapeutic approach. *Vojnosanit Pregl*. 2019;76(8):839–42.
 99. Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(1):185-190.
 100. Michel Y, McIntyre M, Ginglinger H, Ollert M, Cifuentes L, Blank S, et al. The putative serine protease inhibitor Api m 6 from *Apis Mellifera* venom: Recombinant and structural evaluation. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(7):476–84.
 101. Seismann H, Blank S, Cifuentes L, Braren I, Bredehorst R, Grunwald T, et al. Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity. *Clin Mol Allergy*. 2010;8:1–8.
 102. 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(1):265–7.
 103. Soldatova LN, Tsai C, Dobrovolskaia E, Marković-Housley Z, Slater JE. Characterization of the N-glycans of recombinant bee venom hyaluronidase (Api m 2) expressed in insect cells. *Allergy Asthma Proc*. 2007;28(2):210–5.
 104. Blank S, Etzold S, Darsow U, Schiener M, Eberlein B, Russkamp D, et al. Component-resolved evaluation of the content of major allergens in therapeutic extracts for specific immunotherapy of honeybee venom allergy. *Hum Vaccines Immunother*. 2017;13(10):2482–9.
 105. Blank S, Bilò MB, Grosch J, Schmidt-Weber CB, Ollert M, Jakob T. Marker allergens in Hymenoptera venom allergy — Characteristics and potential use in precision medicine. *Allergo J Int*. 2021;30(1):26–38.
 106. Müller UR. Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect

- venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3(4):299–303.
107. Soldatova LN, Crameri R, Gmachl M, Kemeny DM, Schmidt M, Weber M, et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101(5):691–8.
 108. Perez-Riverol A, Justo-Jacomini DL, de Lima Zollner R, Brochetto-Braga MR. Facing hymenoptera venom allergy: From natural to recombinant allergens. *Toxins (Basel)*. 2015;7(7):2551–70.
 109. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2015;70(11):1393–405.
 110. Yoshida N, Hirata H, Watanabe M, Sugiyama K, Arima M, Fukushima Y, et al. Improved sensitivity to venom specific-immunoglobulin E by spiking with the allergen component in Japanese patients suspected of Hymenoptera venom allergy. *Allergol Int*. 2015;64(3):248–52
 111. Schrautzer C, Bokanovic D, Hemmer W, Lang R, Hawranek T, Schwarz I, et al. Sensitivity and specificity of Hymenoptera allergen components depend on the diagnostic assay employed. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1603–5.
 112. Monsalve RI, Vega A, Marqués L, Miranda A, Fernández J, Soriano V, et al. Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: Phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2012;67(4):528–36.
 113. 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(4):621–30.
 114. Jakob T, Köhler J, Blank S, Magnusson U, Huss-Marp J, Spillner E, et al. 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(1):276–8.
115. Köhler J, Blank S, Müller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1383-9.
 116. Bilò MB, Ollert M, Blank S. The role of component-resolved diagnosis in Hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019;19(6):614–22.
 117. Quercia O, Cova V, Martini M, Cortellini G, Murzilli F, Bignardi D, et al. CAP-Inhibition, molecular diagnostics, and Total IgE in the evaluation of polistes and vespula double sensitization. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018;177(4):365–9.
 118. Savi E, Peveri S, Makri E, Pravettoni V, Incorvaia C. Comparing the ability of molecular diagnosis and CAP-inhibition in identifying the really causative venom in patients with positive tests to *Vespula* and *Polistes* species. *Clin Mol Allergy*. 2016;14(1):4–9.
 119. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Čelesnik N, Šilar M, Zidarn M, et al. High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(5):1406–8.
 120. Eberlein-König B, Varga R, Mempel M, Darsow U, Behrendt H, Ring J. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2006;61(9):1084–5.
 121. Balzer L, Pennino D, Blank S, Seismann H, Darsow U, Schnedler M, et al. Basophil activation test using recombinant allergens: Highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. *PLoS One*. 2014;9(10):e108619.
 122. Golden DBK, Demain J, Freeman T, Graft D, Tankersley M, Tracy J, et al. Stinging insect hypersensitivity: A practice parameter update 2016. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2017;118(1):28-54.
 123. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, Antépara I, Urrutia I, Jáuregui I, et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2003;58(4):312–7.

124. Haslam SM, Reason AJ, Morris HR, Dell A. Glyco-Forum section. 1994;4(2):105–6.
125. Kubelka V, Altmann F, Staudacher E, Tretter V, März L, Hård K, et al. Primary structures of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A2. *Eur J Biochem.* 1993;213(3):1193–204.
126. Kolarich D, Altmann F. N-glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: Application to peanut allergen Ara h 1 and olive pollen allergen Ole e 1. *Anal Biochem.* 2000;285(1):64–75.
127. Hemmer W. Kreuzreaktivität auf bienen- und wespengift. *Hautarzt.* 2008;59(3):194–9.
128. Perez-Riverol A, Fernandes LGR, Musacchio Lasa A, dos Santos-Pinto JRA, Moitinho Abram D, Izuka Moraes GH, et al. Phospholipase A1-based cross-reactivity among venoms of clinically relevant Hymenoptera from Neotropical and temperate regions. *Mol Immunol.* 2018;93:87-93.
129. Jovanovic D, Peric-Popadic A, Andrejevic S, Stojanovic M, Bonaci-Nikolic B. The diagnostic importance of recombinant allergen IgE testing in patients with hymenoptera venom allergy: Comparison of two methods. *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2021;20(4):413–22.
130. Luo W, Huang H, Zheng P, Zheng J, Sun B. CCD Inhibition Test Can Improve the Accuracy of the Detection of Pollen and Seed Food Allergen-Specific IgE in Southern China. *J Asthma Allergy.* 2021;14:439–47.
131. Holzweber F, Svehla E, Fellner W, Dalik T, Stubler S, Hemmer W, et al. Inhibition of IgE binding to cross-reactive carbohydrate determinants enhances diagnostic selectivity. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2013;68(10):1269–77.
132. Simons FER. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl. 2): :S161-81.
133. Cichocka-Jarosz E. Hymenoptera venom allergy in humans. *Folia Med Cracov.* 2012;52(3–4):43–60.

134. 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 Eur J Allergy Clin Immunol.* 2006;61(10):1220-9.
135. Golden DBK. Insect sting allergy and venom immunotherapy : a model and a mystery. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(3):439-47.
136. Bilò MB, Antonicelli L, Bonifazi F. Purified vs. nonpurified venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10(4):330-6.
137. Elberink JNGO, De Monchy JGR, Golden DBK, Brouwer JLP, Guyatt GH, Dubois AEJ. Development and validation of a health-related quality-of-life questionnaire in patients with yellow jacket allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(1):162-70.
138. Dhami S, Zaman H, Varga EM, Sturm GJ, Muraro A, Akdis CA, et al. Allergen immunotherapy for insect venom allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2017;72(3):342-65.
139. Ruëff F, Vos B, Oude Elberink J, Bender A, Chatelain R, Dugas-Breit S, et al. Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(5):736-46.
140. Oude Elberink JNG, van der Heide S, Guyatt GH, Dubois AEJ. Analysis of the burden of treatment in patients receiving an EpiPen for yellow jacket anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(3):699-704.
141. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Benton AW, Amodio FJ, Lichtenstein ML. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med.* 1978;299(4):157-61.
142. Rodríguez del Rio P, Pitsios C, Tsoumani M, Pfaar O, Paraskevopoulos G, Gawlik R, et al. Physicians' experience and opinion on contraindications to allergen immunotherapy: The CONSIT survey. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2017 ;118(5):621-628.e1.

143. Pitsios C, Demoly P, Bilò MB, Gerth Van Wijk R, Pfaar O, Sturm GJ, et al. Clinical contraindications to allergen immunotherapy: An EAACI position paper. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2015;70(8):897–909.
144. Slade CA, Douglass JA. Changing practice: No need to stop ACE inhibition for venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(5):617–9.
145. Wöhrl S, Kinaciyan T, Jalili A, Stingl G, Moritz KB. Malignancy and specific allergen immunotherapy: The results of a case series. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;156(3):313–9.
146. Stritzke AI, Eng PA. Age-dependent sting recurrence and outcome in immunotherapy-treated children with anaphylaxis to Hymenoptera venom. *Clin Exp Allergy.* 2013;43(8):950–5.
147. Krishna MT, Ewan PW, Diwakar L, Durham SR, Frew AJ, Leech SC, et al. Diagnosis and management of hymenoptera venom allergy: British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI) guidelines. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(9):1201–20.
148. Patella V, Florio G, Giuliano A, Oricchio C, Spadaro G, Marone G, et al. Hymenoptera Venom Immunotherapy: Tolerance and Efficacy of an Ultrarush Protocol versus a Rush and a Slow Conventional Protocol. *J Allergy.* 2012;2012:192192.
149. Pospischil IM, Kagerer M, Cozzio A, Angelova-Fischer I, Guenova E, Ballmer-Weber B, et al. Comparison of the Safety Profiles of 3 Different Hymenoptera Venom Immunotherapy Protocols: A Retrospective 2-Center Study of 143 Patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(10):783–9.
150. Golden DBK, Valentine MD, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Regimens of hymenoptera venom immunotherapy. *Ann Intern Med.* 1980;92(5):620–4.
151. 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(6):928–33.
152. Bonifazi F, Jutel M, Biló BM, Birnbaum J, Muller U. Prevention and treatment of

- hymenoptera venom allergy: Guidelines for clinical practice. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2005;60(12):1459–70.
153. Demšar Luzar A, Korošec P, Košnik M, Zidarn M, Rijavec M. Hymenoptera venom immunotherapy: Immune mechanisms of induced protection and tolerance. *Cells.* 2021;10(7):1575.
 154. Sindher SB, Long A, Acharya S, Sampath V, Nadeau KC. The Use of Biomarkers to Predict Aero-Allergen and Food Immunotherapy Responses. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;55(2):190–204.
 155. Aßmus K, Meissner M, Kaufmann R, Valesky EM. Benefits and limitations of sting challenge in hymenoptera venom allergy. *Allergol Sel.* 2021;5(01):45–50.
 156. Silva D, Pereira AM, Santos N, Amaral L, Delgado L, Oude Elberink JNGH, et al. The vespid allergy quality of life questionnaire - cultural adaptation and translation to Portuguese. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2017;49(3):114–21.
 157. Golden DBK, Kwiterovich KA, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM. Discontinuing venom immunotherapy: Outcome after five years. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97(2):579–87.
 158. Stoevesandt J, Hosp C, Kerstan A, Trautmann A. Risk stratification of systemic allergic reactions during Hymenoptera venom immunotherapy buildup phase. *JDDG - J Ger Soc Dermatology.* 2014;12(3):244–55.
 159. Šelb J, Rijavec M, Eržen R, Zidarn M, Kopač P, Škerget M, et al. Routine KIT p.D816V screening identifies clonal mast cell disease in patients with Hymenoptera allergy regularly missed using baseline tryptase levels alone. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(2):621-626.e7.
 160. Bonadonna P, Zanotti R, Pagani M, Bonifacio M, Scaffidi L, Olivieri E, et al. Anaphylactic Reactions After Discontinuation of Hymenoptera Venom Immunotherapy: A Clonal Mast Cell Disorder Should Be Suspected. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(4):1368–72.

161. van Zelm MC, McKenzie CI, Varese N, Rolland JM, O’Hehir RE. Recent developments and highlights in immune monitoring of allergen immunotherapy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2019;74(12):2342–54.
162. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2012;2(1):2.
163. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*. 2015;8(1):17.
164. Lee KM, Stott RT, Zhao G, Soohoo J, Xiong W, Lian MM, et al. TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1728–36.
165. MacGlashan D, Hamilton RG. Parameters determining the efficacy of CD32 to inhibit activation of Fc ϵ RI in human basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(4):1256-1258.e11.
166. Sahiner UM, Durham SR. Hymenoptera venom allergy: How does venom immunotherapy prevent anaphylaxis from bee and wasp stings? *Front Immunol*. 2019;10:1959.
167. Adelmeyer J, Pickert J, Pfützner W, Möbs C. Long-term impact of hymenoptera venom immunotherapy on clinical course, immune parameters, and psychosocial aspects. *Allergol Sel*. 2021;5(01):57–66.
168. Kucharewicz I, Bodzenta-Lukaszyk A, Szymanski W, Mroczko B, Szmitkowski M. Basal serum tryptase level correlates with severity of hymenoptera sting and age. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(2):65–9.
169. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92(5):707–16.
170. Fehr D, Micaletto S, Moehr T, Schmid-Grendelmeier P. Risk factors for severe systemic sting reactions in wasp (*Vespula* spp.) and honeybee (*Apis mellifera*) venom allergic

- patients. *Clin Transl Allergy*. 2019;9(1):1–8.
171. Blank S, Bilò MB, Ollert M. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: Important steps towards precision medicine. *Clin Exp Allergy*. 2018 ;48(4):354-364.
 172. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson IBH, Altmann F, Wöhrl S, et al. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(6):1045–52.
 173. Te Piao King, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(2):99–106.
 174. King TP, Lu G, Gonzalez M, Qian N, Soldatova L. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(3):588–600.
 175. Sturm GJ, Hemmer W, Hawranek T, Lang R, Ollert M, Spillner E, et al. 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(1):247–8.
 176. Mahler V, Gutgesell C, Valenta R, Fuchs T. Natural rubber latex and hymenoptera venoms share ImmunoglobulinE-epitopes accounting for cross-reactive carbohydrate determinants. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(11):1446–56.
 177. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Dalik I, Götz M, Jarisch R. Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(3):460–9.
 178. Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol*. 1987;104(5):1157–64.

179. Tretter V, Altmann F, Kubelka V, März L, Becker WM. Fucose α 1,3-linked to the core region of glycoprotein n-glycans creates an important epitope for ige from honeybee venom allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;102(3):259–66.
180. Mittermann I, Zidarn M, Silar M, Markovic-Housley Z, Aberer W, Korosec P, et al. Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(6):1300-1307. e3.
181. Gattinger P, Bidovec-Stojkovic U, Zidarn M, Korosec P, Valenta R, Mittermann I. Glycosylation enhances allergenic activity of major bee venom allergen Api m 1 by adding IgE epitopes. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(4):1502-1504.e5.
182. Do DC, Yang S, Yao X, Hamilton RG, Schroeder JT, Gao P. N-glycan in cockroach allergen regulates human basophil function. *Immun Inflamm Dis.* 2017;5(4):386–99.
183. Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Müller U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure.* 2000;8(10):1025–35.
184. Aberer W, Holzweber F, Hemmer W, Koch L, Bokanovic D, Fellner W, et al. Inhibition of cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) enhances the selectivity of in vitro allergy diagnosis. *Allergol Sel.* 2017;1(2):141–9.
185. Tracy JM. Testing for Venom Allergy: Should We Change Testing Order? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022;10(3):844–5.
186. Reisman RE, Demasi JM. Relationship of serum venom-specific IgE titers to clinical aspects of stinging insect allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 1989;89(1):67–70.
187. Hollstein MM, Matzke SS, Lorbeer L, Forkel S, Fuchs T, Lex C, et al. Intracutaneous Skin Tests and Serum IgE Levels Cannot Predict the Grade of Anaphylaxis in Patients with Insect Venom Allergies. *J Asthma Allergy.* 2022;15:907–18.
188. Dicker M, Strasser R. Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(10):1501–16.
189. Spillner E, Blank S, Jakob T. Hymenoptera allergens: From venom to “venome.” *Front*

- Immunol. 2014;5:77.
190. Campana R, Vrtala S, Maderegger B, Dall'Antonia Y, Zafred D, Blatt K, et al. Altered IgE epitope presentation: A model for hypoallergenic activity revealed for Bet v 1 trimer. *Mol Immunol*. 2011;48(4):431–41.
 191. Hirata H, Yoshida N, Watanabe M, Sugiyama K, Arima M, Ishii Y. Sensitization of specific IgE-positive Japanese who have experienced Hymenoptera stings to recombinant versions of the Ves v 1 and Ves v 5 allergens in hornet venom. *Allergol Int*. 2015;64(1):115–7.
 192. Pereira Santos MC, Pedro E, Spínola Santos A, Branco Ferreira M, Palma Carlos ML, Palma Carlos AG. Immunoblot studies in allergic patients to hymenoptera venom before and during immunotherapy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2005;37(7):273–8.
 193. Saulite I, Hoetzenecker W, Guenova E, Schmid-Grendelmeier P, Glatz M. Skin Test Reactivity to Hymenoptera Venom after Venom Immunotherapy Correlates Inversely with the IgG/IgE Ratio. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;174(3–4):190–9.
 194. Jovanovic D, Peric-Popadic A, Djuric V, Stojanovic M, Lekic B, Milicevic O, Bonaci-Nikolic B. Molecular Diagnostics and Inhibition of Cross-Reactive Carbohydrate Determinants in Hymenoptera Venom Allergy. 2023;e12230. <https://doi.org/10.1002/clt2.12230>.

Lista skraćenica:

AAAAI – engl. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*

ACEI - Inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima

Api m 1 – engl. *Phospholipase A2*

Api m 2 – engl. *Hyaluronidase*

Api m 3 – engl. *Acid phosphatase*

Api m 4 – engl. *Mellitin*

Api m 5 – engl. *Dipeptidyl peptidase IV*

Api m 6 – engl. *Protease inhibitor*

Api m 7 – engl. *Protease*

Api m 8 – engl. *Carboxylesterase*

Api m 9 – engl. *Carboxypeptidase*

Api m 10 – engl. *Icarapin*

Api m 11.0101 – engl. *Major royal jelly protein 8 (MRJP 8)*

Api m 11.0201 – engl. *Major royal jelly protein 9 (MRJP 9)*

Api m 12 – engl. *Vitellogenin*

BAT – Test aktivacije bazofila

BST – Bazalna serumska triptaza

CCD – engl. *Cross-reactive carbohydrate determinants*

CRD – engl. *Component-resolved diagnostics*

EAACI – engl. *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Evropska akademija za alergiju i kliničku imunologiju*

FcεRI - specifične Fc receptore visokog afiniteta

GF-CSF - Faktor stimulacije kolonije monocita i granulocita

HVA – Hymenoptera venom alergija

IgE – Imunoglobulin E

IgG – Imunoglobulin G

IgG4 – Imunoglobulin G podklase 4

ISM – Indolentna sistemska mastocitoza

ITAM - Imunoreceptorski tirozinski aktivacioni motivi

NORA – engl. *First European data from the network of severe allergic reactions*

OV – Venom ose

PV – Venom pčele

r - rekombinantna

REMA – engl. *Spanish Mastocytosis Network (Red Española de Mastocitosis)*

SV - Venom stršljena

Sf9 - Spodoptera frugiperda ćelije

SAR – Sistemska alergijska reakcija

TNF – engl. *Tumor necrosis factor*

Thf – Folikularnih pomoćničkih T- ćelije

Th2 - Pomoćničkih T- ćelije tip 2

T-reg – Regulatorne T ćelije

Ves v 1 – engl. *Phospholipase A1*

Ves v 2.0101 – engl. *Hyaluronidase*

Ves v 2.02.01 – engl. *Hyaluronidase*

Ves v 3 – engl. *Dipeptidyl peptidase IV*

Ves v 5 – engl. *Antigen 5*

Ves v 6 – eng. *Vitellogenin*

VLR – Velika lokalna reakcija

WHO/IUIS – engl. *World Health Organization and International Union of Immunological Societies*

Biografija

Dr Dragana (Radovan) Jovanović je rođena 13.03.1970. godine u Zrenjaninu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1998. godine sa prosečnom ocenom 8,86. Specijalistički ispit iz Interne medicine položila je 15.07.2004. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od januara 2009. godine zaposlena je na Klinici za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije.

Akademski specijalistički rad iz oblasti imunologije, pod nazivom "Dijagnostički značaj određivanja antineutrofilnih citoplazmatskih antitela specifičnih za baktericidni protein" odbranila je 2012. godine, mentor Prof. dr Branka Bonači-Nikolić. Iste godine, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisuje Doktorske studije smera Molekularna medicina.

Rad uže specijalizacije iz oblasti alergologije i kliničke imunologije pod nazivom "Dvostruka i trostruka pozitivnost specifičnih IgE antitela na venom ose, pčele i stršljena: Uloga molekularne dijagnostike" odbranila je 11.07.2018. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, mentor Prof dr Mirjana Bogić. Izabrana za kliničkog asistenta na katedri interne medicine Medicinskog fakulteta u Beogradu dana 15.12.2021. godine.

Dr Dragana Jovanović je autor i koautor 9 publikacija objavljenih u časopisima indeksiranim u Institute of Science Index (SCI) bazi podataka. U vezi sa doktorskom disertacijom, objavila je dva naučna rada u kojima je prvi i korespondirajući autor, jedan iz kategorije M22 (IF 5.657) i jedan iz kategorije M23 (IF 1,570). Takođe, objavila je rad u časopisu Medicinski podmladak: Rad pod nazivom „Imunoterapija kod pacijenata sa prvim tipom preosetljivosti na Hymenoptera venome“.



Dr Dragana Jovanović je dobitnik međunarodne nagrade: International Medis Awards for Medical Research 2015 za najbolje medicinsko dostignuće iz oblasti ALERGOLOGIJE u regiji srednje i jugoistočne Evrope: Rad pod nazivom "Trostruka pozitivnost na venom stršljena, ose i pčele: Unapređenje dijagnostičke procedure IgE-testiranjem sa rekombinantnim alergenima".

Objavljeni radovi:

1. **Jovanovic D**, Peric-Popadic A, Djuric V, Stojanovic M, Lekic B, Milicevic O, Bonaci-Nikolic B. Molecular Diagnostics and Inhibition of Cross-Reactive Carbohydrate Determinants in Hymenoptera Venom Allergy. 2023;e12230. <https://doi.org/10.1002/ctt2.12230>. IF 5.657
2. **Jovanovic D**, Peric-Popadic A, Andrejevic S, Stojanovic M, Bonaci-Nikolic B. The diagnostic importance of recombinant allergen IgE testing in patients with hymenoptera venom allergy: Comparison of two methods. Iran J Allergy, Asthma Immunol. 2021;20(4):413–22. IF 1.570
3. **Jovanović D**, Perić-Popadić A. Imunoterapija kod pacijenata sa prvim tipom preosetljivosti na Hymenoptera venome. MedPodml.2023; (DOI 10.5937/mp74-40715) M52

ORIGINAL ARTICLE

Molecular diagnostics and inhibition of cross-reactive carbohydrate determinants in Hymenoptera venom allergy

Dragana Jovanovic^{1,2}  | Aleksandra Peric-Popadic^{1,2} | Vojislav Djuric^{1,2} |
Maja Stojanovic^{1,2}  | Branislav Lekic^{2,3} | Ognjen Milicevic^{2,4} |
Branka Bonaci-Nikolic^{1,2}

¹Clinic of Allergy and Immunology, University Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

²University of Belgrade Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia

³Clinic of Dermatovenerology, University Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

⁴Department for Medical Statistics and Informatics, Institute for Medicine Statistics and Informatics, University Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

Correspondence

Dragana Jovanovic, Clinic of Allergy and Immunology, University Clinical Center of Serbia, University of Belgrade Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia.

Email: dr.drag.jovanovic@gmail.com

Funding information

Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Grant/Award Number: 200110

Abstract

Background: The composition of venom extracts, cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) and the component-resolved diagnostics (CRD) are important fields of investigation. IgE-reactivity to CCD complicates the interpretation of IgE to Hymenoptera venoms, especially in patients with multiple-positivity. We analyzed the clinical importance of CRD and CCD-inhibition for selection of allergens for venom immunotherapy (VIT).

Methods: In 71 patients, we measured specific IgE (sIgE) to honeybee venom (HBV), wasp venom (WV), hornet venom (HV), CCD, and recombinant allergens: phospholipase A2 (rApi m 1), hyaluronidase (rApi m 2), icarapin (rApi m 10), antigen 5 (rVes v 5), and phospholipase A1 (Immunoblot). In 29/71 HBV/WV/HV/CCD-positive patients CCD-inhibition was performed. According to CRD and CCD-inhibition, we identified true sensitization and defined groups of multiple-positive patients who needed CCD-inhibition before starting VIT.

Results: sIgE-rApi m 1, sIgE-rApi m 2, and sIgE-rApi m 10 were detected in 65.7%, 68.4%, and 58%, respectively. In HBV allergic patients, CRD sensitivity was 86.8%. In WV allergic patients, sensitivity of sIgE-rVes v 5 was 94%. True multiple-sensitization was found in 44.8% of HBV/WV/HV/CCD-positive patients after CCD-inhibition. Patients with multiple venom- and CCD-positivity had more frequent severe allergic reactions ($p < 0.001$). CCD-inhibition was helpful in HBV/WV/HV/CCD-positive patients who were negative to all tested recombinant honeybee allergens. Persistence of HBV-positivity after CCD-inhibition requires CRD to other honeybee recombinant allergens.

Conclusion: CRD, using a profile of five most important recombinant allergens and CCD, has a high sensitivity for the diagnosis of venom allergy, especially in patients positive to several venom extracts. CRD and CCD-inhibition are helpful to reveal the clinically relevant, true sensitization and improve the selection of venoms for long-lasting VIT.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. Clinical and Translational Allergy published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of European Academy of Allergy and Clinical Immunology.

KEYWORDS

carbohydrate determinants, honeybee venom, Hymenoptera, insect venom allergy, molecular diagnostics, wasps

1 | BACKGROUND

Hymenoptera venoms are known to cause life-threatening and fatal immunoglobulin E (IgE)-mediated anaphylactic reactions. About 50%–60% of patients with Hymenoptera venom allergy (HVA) have specific IgE (sIgE) reactivity to both insect–species, honeybee (*Apis mellifera*) and yellow jacket (*Vespula vulgaris*, also called wasp) or hornet (*Vespa crabro*). Protein-based and carbohydrate determinants-based cross-reactivity are the most frequent causes of multiplicity.¹

Venom extracts are complex, heterogeneous mixtures rich in glycoproteins. Cross-reactive carbohydrate determinants (CCD), composed of α -1,3-fucosylated *N*-glycans, interfere with the detection of clinically relevant IgE specific to protein epitopes.² In contrast to diagnostics based on whole venom extracts, the component-resolved diagnostics (CRD) reveal sIgE to single recombinant allergens without CCD. In patients positive to several venom extracts, CRD can distinguish true, clinically relevant IgE sensitization to protein epitopes from sIgE-reactivity to CCD. Compared to diagnostics based on whole venom extracts, CRD improves the selection of allergens that will be used for long-lasting venom immunotherapy (VIT).^{3–5}

Hymenoptera proteins involved in cross-reactivity are hyaluronidases (Api m 2 and Ves v 2) and dipeptidyl-peptidases (Api m 5 and Ves v 3) from honeybee and wasp, respectively.² Cross-reactivity caused by CCD can be eliminated using CRD and CCD-inhibition that are underused in clinical practice.⁵ False-positive results are a common problem in the *in vitro* diagnostics of HVA.⁶ The majority of venom allergens are glycoproteins and cross-linking of only CCD epitopes with mast cell-bound IgE does not lead to mast cell degranulation. sIgE-reactivity to whole venom extract does not allow a distinction between sIgE-reactivity to protein epitopes from sIgE-reactivity to CCD epitopes.^{7,8} Extract-based diagnostics limit the use of standard sIgE serology for selection of causative venom for VIT. In some cases, despite finding of sIgE, patients did not have allergy symptoms, because sensitization was caused by well-tolerated venom allergen. VIT over 3–5 years with insect venom is still the only effective and causal treatment of HVA. The clinical importance of sIgE against CCD epitopes (CCD-sIgE) is controversial, although most studies showed that CCD-sIgE have no clinical relevance.^{9–11} Due to the clinically irrelevant CCD-sIgE, increased levels of sIgE to conventional whole venom extract should be interpreted carefully, in the context of the clinical history. Unfortunately, identification of the allergy-relevant venom is sometimes difficult, because the patient could not identify the insect.⁴ Moreover, some patients with high sIgE-levels do not show clinical manifestations, while other patients with low sIgE-levels may experience life-threatening systemic allergic reactions (SAR).^{4,8}

In our previous study, we showed that CCD-sIgE were more frequently found in honeybee allergic patients.⁴ This finding can be explained by the fact that majority of honeybee allergens are glycosylated, while the two major wasp allergens are not glycosylated.^{12,13} Also, we found that the use of the major allergen rApi m 1 (phospholipase A2) was not sufficient, regardless of the detection method. On the other hand, using recombinant major wasp allergen rVes v 5 (antigen 5) was enough for about 90% of wasp allergic patients.⁴

The variability of test systems in allergy diagnostics is due to a lack of international standards for allergens and antibodies. This often leads to different test results and complicates their comparability.

This study aimed to analyze the diagnostic importance of CRD for simultaneous determination of five most important recombinant allergens and CCD-inhibition in patients with HVA. According to the reliable history of insect sting allergy, and the sIgE-test we intended to identify criteria for true sensitization and to define groups of multiple-positive patients who needed CCD-inhibition before starting long-term VIT.

2 | METHODS**2.1 | Patients**

This retrospective, single-center study included 71 Hymenoptera allergic patients: 46 male (64.8%) and 25 female (35.2%) (mean age 46.3 ± 15.3 years, range 18–75 years) with sIgE ≥ 0.35 kUA/L who have been followed-up as outpatients or in-patients from November 2019 to January 2022, at the Clinic of Allergy and Immunology, University Clinical Center of Serbia in Belgrade. A blood sample for analysis was taken from all patients who agreed to participate in the study signing the informed consent. The study has been approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty, University of Belgrade, and number 1550/V-8.

Patients who had a documented history of a reliable culprit insect that caused SAR were included in the study. We classified our patients in two groups: CCD-sIgE positive (29/71) and CCD-sIgE negative (42/71). Severity of SAR to Hymenoptera stings were classified according to Mueller ranging from I to IV degree (Table 1).¹⁴

2.2 | Methods

Serum sIgE-levels to honeybee venom (HBV), wasp venom (WV), hornet venom (HV), and recombinant allergens: rApi m 1, rApi m 2, icarapin (rApi m 10) from HBV, rVes v 5, phospholipase A1 (rVes v 1)

TABLE 1 Comparison of demographic characteristics and degree of severity systemic allergic reaction in 71 patients with Hymenoptera venom allergy, with and without CCD-sIgE.

	CCD-sIgE negative (n = 42)	CCD-sIgE positive (n = 29)
Age (years)	43.6 ± 15.3	50.1 ± 14.8
Female (%)	31 (73.8)	15 (51.7)
Male (%)	11 (26.2)	14 (48.3)
Honeybee (%)	20 (47.6)	12 (41.3)
Wasp (%)	20 (47.9)	8 (27.6)
Hornet (%)	2 (4.7)	3 (10.3)
Honeybee and wasp (%)	0	5 (17.2)
Honeybee and hornet (%)	0	1 (3.4)
Degree of severity sting reactions (%)		
I	12 (28.6)	0
II	2 (4.8)	2 (6.8)
III	16 (38.1)	14 (48.3)
IV	12 (28.6)	13 (44.8)

Abbreviations: CCD, cross-reactive carbohydrate determinants; sIgE, specific IgE.

from WV, and CCD were measured by Immunoblot (Euroimmun, Germany, Euroline DPA-Dx insect venoms 3). Serum samples of 29/71 multiple-positive patients were tested in the EUROLINE assay using the anti-CCD Absorbent (Euroimmun). The absorbent (CCD-inhibitor) for eliminating CCD-sIgE was composed of glycoprotein bromelain extracted from pineapple. Serum samples were incubated with anti-CCD absorbent for 60 min at room temperature according to the manufacturer's instructions. The sera were retested using the same insect venoms profile, as previously mentioned.

The cut-off value for positive sIgE-test results was 0.35 kUA/L. The sIgE-reactivity was categorized quantitatively into six classes: Class 1 (≥ 0.35 to < 0.70 kUA/L), Class 2 (≥ 0.70 to < 3.50 kUA/L), Class 3 (≥ 3.50 to < 17.50 kUA/L), Class 4 (≥ 17.50 to < 50.00 kUA/L), Class 5 (≥ 50.00 to < 100.00 kUA/L), and Class 6 (≥ 100.00 kUA/L).

2.3 | Statistical analyses

Obtained data were analyzed using IBM SPSS Statistics software for Windows (version 17; IBM, Armonk, NY). Mean quantitative variables were used and frequency of qualitative variables were also calculated. Nonparametric Chi-square and Fisher exact tests were used to evaluate the relationship between variables. The Wilcoxon signed-rank test and *t*-test were used to compare two matched samples. According to a history of insect sting allergy, we calculated sensitivity using the formula: Sensitivity = true-positive/true-positive + false-negative \times 100%.

3 | RESULTS

A comparison of demographic characteristics of CCD-sIgE negative (42/71) and CCD-sIgE positive patients (29/71) is shown in Table 1.

The majority of patients (55/71) had severe SAR (III and IV grades of SAR) (77.5%) ($p < 0.001$). No significant differences were found in the frequency of severe SAR between female and male patients.

In the CCD-sIgE positive group, more patients had severe SAR to Hymenoptera sting 27/29 (93%) than mild SAR 2/29 (6.9%) ($p < 0.001$).

Among the 71 patients, 39 (55%) patients showed multiple-positivity, while 30 (42.3%) showed single-positivity: 13 to HBV extract, 15 to WV extract, and 2 to HV extract. Only two (2.8%) patients with a history of SAR after a wasp stings did not show sIgE-reactivity to venom extracts (Table 2). A significant number (29/39) of patients had multiple- and CCD-positivity (HBV/WV/HV/CCD-positive). The rest of the patients (10/39) had multiple-positivity (HBV/WV or HBV/WV/HV positive) but without CCD-sIgE-positivity (Tables 2 and 3).

The majority of patients (65/71) experienced SAR after one insect sting. In all single-positive patients, a history of insect sting allergy agreed with the finding of sIgE to the corresponding venom extract. Among patients with multiple-positivity, 19/39 had SAR to the honeybee, 11/39 to wasp, 3/39 to hornet, while 6/39 had two separate SAR to the honeybee and wasp or honeybee and hornet stings.

Among the wasp allergic patients, 31/33 (94%) patients had sIgE-reactivity to rVes v 5, while 6/31 (19.4%) had sIgE-reactivity to rVes v 5 and rVes v 1 ($p < 0.001$).

All six hornet allergic patients had sIgE-reactivity to rVes v 5, while 2/6 (33.3%) of them had sIgE-reactivity to rVes v 5 and rVes v 1. There were no wasp or hornet allergic patients who had an isolated sIgE-reactivity to rVes v 1 (Tables 2 and 3).

Using Immunoblot analysis, 33/38 (86.8%) honeybee allergic patients presented HBV-positivity and all 33 patients had sIgE-reactivity to at least one tested recombinant honeybee allergen. By analyzing HBV-positive sera, 13/38 (31.6%) were sIgE-reactive to all tested recombinant honeybee allergens, 25 (65.7%) to rApi m 1, 26 (68.4%) to rApi m 2, and 22 (57.9%) to rApi m 10 (Figure 1). A small number 5/38 (13.2%) of patients had no IgE-reactivity to any of the tested recombinant honeybee allergens.

True multiple-sensitization to both insect-species determined by sIgE-reactivity to at least one recombinant honeybee allergen and rVes v 5 were found in 16/39 (41%) multiple-positive patients and in none of the 30 single-positive patients ($p < 0.001$). Seven of 71 (9.9%) patients were negative for all tested recombinant allergens (Tables 2 and 3).

According to CRD and CCD-inhibition, five different subgroups of HBV/WV/HV/CCD-positive patients were distinguished (Table 3).

In the first group of selected patients (7/29) with a history of SAR to honeybee and wasp/hornet stings (except for one patient who

TABLE 2 Specific IgE to recombinant honeybee and wasp allergens in 42 Hymenoptera venom allergic patients without CCD-sIgE.

IgE (immunoblot)	Multiple-positivity to HBV/WV/HV or HBV/WV extracts (n = 10)	Single-positivity to HBV extract (n = 13)	Single-positivity to WV extract (n = 15)	Single-positivity to HV extract (n = 2)	Negative for HBV and WV and HV extract (n = 2)
rApi m 1 + and/or rApi m 2 + and/or rApi m 10 + and rVes v 5 + and rVes v 1 +/-	5 (50%)	0	0	0	0
rApi m 2 + and rVes v 5 + rVes v 1 +/-	0	0	0	0	1 (50%)
rApi m 1 + and/or rApi m 2 + and/or rApi m 10 +	4 (40%)	9 (69.2%)	0	0	0
rApi m 2 + only	0	2 (15.4%)	0	0	0
rVes v 5 + and rVes v 1 +/-	1 (10%)	0	13 (86.6%)	2 (100%)	1 (50%)
rApi m 1 - rApi m 2 - rApi m 10 - rVes v 5 - rVes v 1 -	0	2 (15.4%)	2 (13.3%)	0	0

Abbreviations: CCD, cross-reactive carbohydrate determinants; HBV, honeybee venom; HV, hornet venom; rApi m 1, recombinant phospholipase A2; rApi m 2, recombinant hyaluronidase; rApi m 10, recombinant icarapin; rVes v 1, recombinant phospholipase A1; rVes v 5, recombinant antigen 5; WV, wasp venom.

experienced SAR due to wasp sting), we found a true multiple-positivity and a significant decrease of HV-positivity ($p < 0.05$) after CCD-inhibition.

The second group (4/29) of patients with a history of SAR due to wasp/hornet sting had sIgE-reactivity to rApi m 2 and rVes v 5, before and after CCD-inhibition.

In the third group of selected patients (9/29) with a history of SAR to honeybee sting, IgE-testing confirmed a honeybee allergy due to sIgE-reactivity to the majority of tested recombinant honeybee allergens and loss of WV-positivity ($p < 0.01$) and HV-positivity ($p < 0.05$) after CCD-inhibition. We showed that CCD-inhibition significantly increased sensitivity for HBV-single-positivity from 0% to 77%.

In the fourth group of selected patients (3/29) with a history of SAR to honeybee sting, there was no sIgE-reactivity to all tested recombinant allergens. After CCD-inhibition, in 2/3 patients we found sIgE-reactivity to rApi m 1 or rApi m 2.

The fifth group of selected patients (6/29) with a history of SAR to wasp/hornet stings, showed initial sIgE-reactivity only to rVes v 5. After CCD-inhibition, 2/6 patients showed sIgE-reactivity to rApi m 1 and rApi m 10 or rApi m 2, in addition to sIgE-reactivity to rVes v 5.

In the group of 29 HBV/WV/HV/CCD-positive patients, all patients completely lost CCD-positivity after CCD-inhibition ($p < 0.01$). 22/29 patients retained HBV/WV- or HBV/WV/HV-positivity, but a significant decrease was found in the mean concentration of sIgE to WV and HV extracts (Table 4). A significant decrease was found in the mean concentration of sIgE to rVes v 5. On the contrary, a substantial increase was found in the mean concentration of sIgE to rApi m 1 and rApi m 2 after CCD-inhibition (Table 4).

According to our results, we proposed an algorithm for the necessary diagnostic steps to ensure an adequate therapeutic approach for long-lasting VIT (Figure 2).

4 | DISCUSSION

Our study demonstrates the clinical importance of molecular CRD, using profile of the five most important recombinant allergens and CCD-inhibition of CCD-sIgE-positive sera in the daily clinical practice. CRD and CCD-inhibition were helpful in determining true sensitization in our multiple-positive patients who had HVA. This diagnostic approach should be extremely important for the selection of adequate venom for long-lasting VIT.^{5,15} For the first time we identified different clusters of patients that were classified in the five subgroups of HBV/WV/HV/CCD-positive patients, sharing the characteristic patterns of a history of insect sting allergy and serological sIgE-tests.

Our previously published study showed that we must increase the number of recombinant honeybee allergens, tested by Immunoblot.⁴ We especially analyzed a group of patients with multiple-positivity in order to determine how CCD-inhibition affects sIgE-results and whether it is necessary to apply CCD-inhibition in all CCD-sIgE-positive patients.

We found that 39/71 patients had multiple-positivity, while 29/39 patients had CCD-sIgE. More recent studies revealed that much of the cross-reactivity between wasp and honeybee allergens is not due to protein cross-reactivity but is caused by CCD.¹⁶⁻¹⁸

α -1,3-Linked fucose residue on the N-acetyl-glucosamine N-glycan are present in phospholipase A2 (Api m 1) from HBV, and hyaluronidases (Api m 2, Ves v 2) from HBV and WV, respectively,¹⁹⁻²¹ and these epitopes can induce the production of anti-CCD antibodies of different isotypes.^{22,23}

Our HBV/WV/HV/CCD-positive patients (27/29) had more often severe SAR ($p < 0.001$). Although, we could not rule out the possibility that patients with mild SAR were less frequently present in our group, it has been previously shown that glycosylation can contribute

TABLE 3 Levels of specific IgE (Class I-VI) to venom extracts and recombinant honeybee and wasp allergens in 29 multiple HBV/WV/HV/CCD-positive Hymenoptera venom allergic patients, before and after CCD-inhibition.

Insect	CCD-sIgE positive patients before CCD-inhibition								CCD-sIgE positive patients after CCD-inhibition							
	HBV	WV	HV	rApi m 1	rApi m 2	rApi m 10	rVes v 5	rVes v 1	HBV	WV	HV	rApi m 1	rApi m 2	rApi m 10	rVes v 5	rVes v 1
I																
HB/W	4	5	4	2	3	2	6	1	3	5	3	4	4	3	6	1
HB/W	5	2	2	2	3	0	2	0	5	1	1	2	4	0	2	0
HB/W	5	4	4	0	1	2	1	2	3	4	0	1	1	3	1	2
HB/W	4	2	3	3	2	0	2	0	2	2	1	4	2	0	2	0
W	2	2	2	1	0	0	3	0	2	2	1	2	0	0	3	0
HB/H	5	4	5	0	5	2	5	1	4	4	4	0	5	2	5	0
HB/W	3	1	1	1	4	3	3	0	3	1	1	2	4	3	3	0
II																
H	4	3	4	0	5	0	4	0	4	3	3	0	5	0	3	0
H	3	3	3	0	5	0	3	1	3	3	3	1	5	0	3	0
W	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0
W	3	3	4	0	3	0	4	0	1	3	4	0	3	0	4	0
III																
HB	5	3	5	4	6	4	0	0	5	3	3	5	6	5	0	0
HB	4	2	2	2	5	3	0	0	4	0	0	3	5	4	0	0
HB	4	1	2	3	5	4	0	0	5	0	0	4	5	5	0	0
HB	2	1	1	4	2	1	0	0	3	0	0	5	2	1	0	0
HB	4	1	1	5	0	6	0	0	5	0	1	5	0	6	0	0
HB	4	1	2	4	0	4	0	0	3	0	0	4	0	4	0	0
HB	5	3	4	5	5	4	0	0	5	0	0	6	5	4	0	0
HB	3	1	1	0	2	3	0	0	2	0	0	0	2	3	0	0
HB	5	3	3	5	2	5	0	0	5	0	0	5	3	5	0	0
IV																
HB	4	3	4	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0
HB	3	1	2	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0
HB	3	2	3	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0
V																
W	1	2	1	0	0	0	3	0	1	2	1	0	1	0	3	0
W	3	3	3	0	0	0	4	1	1	2	2	0	0	0	3	1
H	2	3	3	0	0	0	2	0	3	3	3	0	0	0	2	0
W	3	2	2	0	0	0	5	0	2	2	1	1	0	1	4	0
W	3	3	3	0	0	0	4	0	3	3	2	0	0	0	3	0
W	2	2	2	0	0	0	3	0	1	2	1	0	0	0	3	0

Note: Shaded areas: Levels of IgE (Class I-VI) to recombinant honeybee and wasp allergens.

Abbreviations: CCD, cross-reactive carbohydrate determinants; H, hornet; HB, honeybee; HBV, honeybee venom; HV, hornet venom; rApi m 1, recombinant phospholipase A2; rApi m 2, recombinant hyaluronidase; rApi m 10, recombinant icarapin; rVes v 1, recombinant phospholipase A1; rVes v 5, recombinant antigen 5; sIgE, specific IgE; W, wasp; WV, wasp venom.

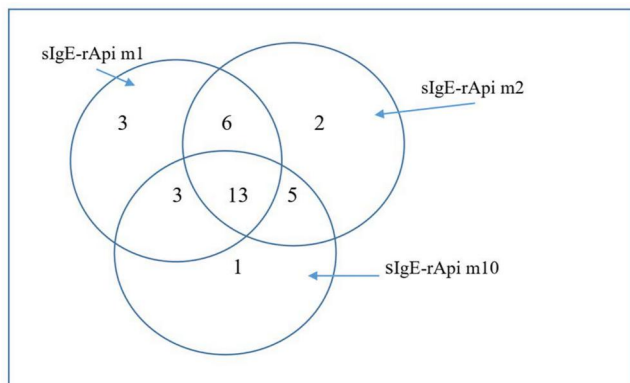


FIGURE 1 Specific IgE (sIgE) profile of recombinant major honeybee allergens in 33/38 patients with honeybee venom allergy. rApi m 1, recombinant phospholipase A2; rApi m 2, recombinant hyaluronidase; rApi m 10, recombinant icarapin; sIgE, specific IgE.

TABLE 4 Levels of specific IgE to venom extracts and recombinant allergens in 29 multiple HBV/WV/HV/CCD-positive Hymenoptera venom allergic patients, before and after CCD-inhibition.

sIgE (Immunoblot) kUA/l	Before CCD-inhibition	After CCD-inhibition	P
HBV extract (mean ± SD)	41.01 ± 22.02	32.93 ± 25.46	0.066
WV extract (mean ± SD)	13.58 ± 18.47	11.31 ± 17.82	0.047
HV extract (mean ± SD)	31.72 ± 28.37	18.63 ± 13.35	0.001
rApi m 1 (mean ± SD)	14.62 ± 25.29	27.39 ± 37.73	0.012
rApi m 2 (mean ± SD)	41.67 ± 43.83	46.09 ± 45.58	0.031
rApi m 10 (mean ± SD)	17.11 ± 34.34	25.79 ± 41.07	0.076
rVes v 5 (mean ± SD)	28.05 ± 35.33	20.81 ± 31.57	0.004
rVes v 1 (mean ± SD)	0.22 ± 3.12	0.19 ± 3.031	0.502

Abbreviations: CCD, cross-reactive carbohydrate determinant; HBV, honeybee venom; HV, hornet venom; rApi m 1, recombinant phospholipase A2; rApi m 2, recombinant hyaluronidase; rApi m 10, recombinant icarapin; rVes v 1, recombinant phospholipase A1; rVes v 5, recombinant antigen 5; sIgE, specific IgE; WV, wasp venom.

to epitope availability, immunoreactivity, and enzymatic function of native allergens.^{8,22,24}

CCD-sIgE have been reported to be responsible for more than 50% of double-sensitizations to HBV and WV.^{25,26} Both, previously studied data and our data showed that about half of the patients with HVA develop CCD-sIgE.^{4,26} CCD-sIgE represent a pitfall of *in vitro* diagnostics because they cause multiple-reactivity with any glycosylated allergens (pollen, food, or venom) and significantly interfere with the detection of clinically relevant IgE-sensitization to protein epitopes.^{5,27} The double- or triple-positivity of sIgE to whole venom complicates the choice of appropriate VIT, resulting in increased risk of side effects, de novo sensitizations and higher costs.¹⁹ In these patients, CRD and CCD-inhibition provide more accurate diagnostic results.^{7,17}

In most countries, the accepted clinical standards recommend skin-testing as the initial method.²⁸ However, skin-testing may show

inconclusive multiple-positive results that further complicate the diagnosis of HVA. The significance of *in vitro* diagnosis of allergy indicates the importance of CCD-inhibition because it eliminates false-positive results.¹⁷

We demonstrated that CCD-inhibition should not be performed in all CCD-sIgE-positive patients. Based on CRD and CCD-inhibition, we found the agreement between the results of the IgE-testing and the history of insect sting allergy.

The decision process for VIT is very important for the efficiency of the therapy, and in most cases treatment with only one venom appears to be sufficient. Among the HBV/WV/HV/CCD-positive patients with wasp/hornet allergy, 5/29 patients after CCD-inhibition showed sIgE-reactivity to rApi m 2 and rVes v 5. Although, Api m 2 shows a high percentage of homology with Ves v 2,^{27,29} it can sometimes be difficult to determine whether these results reflect sensitization due to cross-reactivity between the shared protein determinants or true double sensitization to both insect species. Since HBV-allergic patients can have Api m 2 mono-sensitization, a decision regarding VIT in patients with IgE-reactivity to rApi m 2 and rVes v 5 should be based on CRD, severity of SAR and history of insect sting allergy.^{27,30,31}

Interestingly, the sensitivity of HBV-single-positivity was significantly increased after CCD-inhibition from 0% to 77% in our third group of HBV/WV/HV/CCD-positive honeybee allergic patients. In this group of patients CCD-inhibition can replace expensive CRD.

We demonstrated that CCD-inhibition is especially helpful in the subgroup of HBV/WV/HV/CCD-positive patients who were negative for all tested recombinant allergens and in the subgroup of HBV/WV/HV/CCD/rVes v 5-positive patients. In these patients, HBV-positivity persisted after CCD-inhibition. Therefore, these patients require an extended CRD to other recombinant honeybee allergens. Also, the number of patients with sIgE-reactivity to recombinant honeybee allergens increased after CCD-inhibition.

Having in mind that sIgE-sensitization can be found incidentally in a patient without a clinical history of SAR, the possibility of an allergic reaction to a future insect sting cannot be completely excluded. Due to the possibility of an adverse effects on a future sting, and according to the latest VIT guidelines of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), it is not wrong to perform VIT with two venoms in patients with true double-positivity according to results of CRD and CCD-inhibition.³²

In this context, the newly detected sIgE-reactivity to recombinant honeybee allergens in our four venom-allergic patients after CCD-inhibition was very important. It is already known, that sIgE-levels do not correlate with the severity of the allergic reaction.^{4,33} Also, long-lasting VIT should be considered for patients with honeybee sensitization because they are at a higher risk for SAR.³²

Surprisingly, we are the first to observe a significant increase of sIgE-levels to rApi m 1 and rApi m 2 ($p < 0.05$), and a significant decrease of sIgE-levels to rVes v 5 ($p < 0.01$) after CCD-inhibition in HBV/WV/HV/CCD-positive patients. The exact reasons for changes of sIgE-levels to recombinant allergens after CCD-inhibition are not entirely clear. In fact, this finding may be caused by different

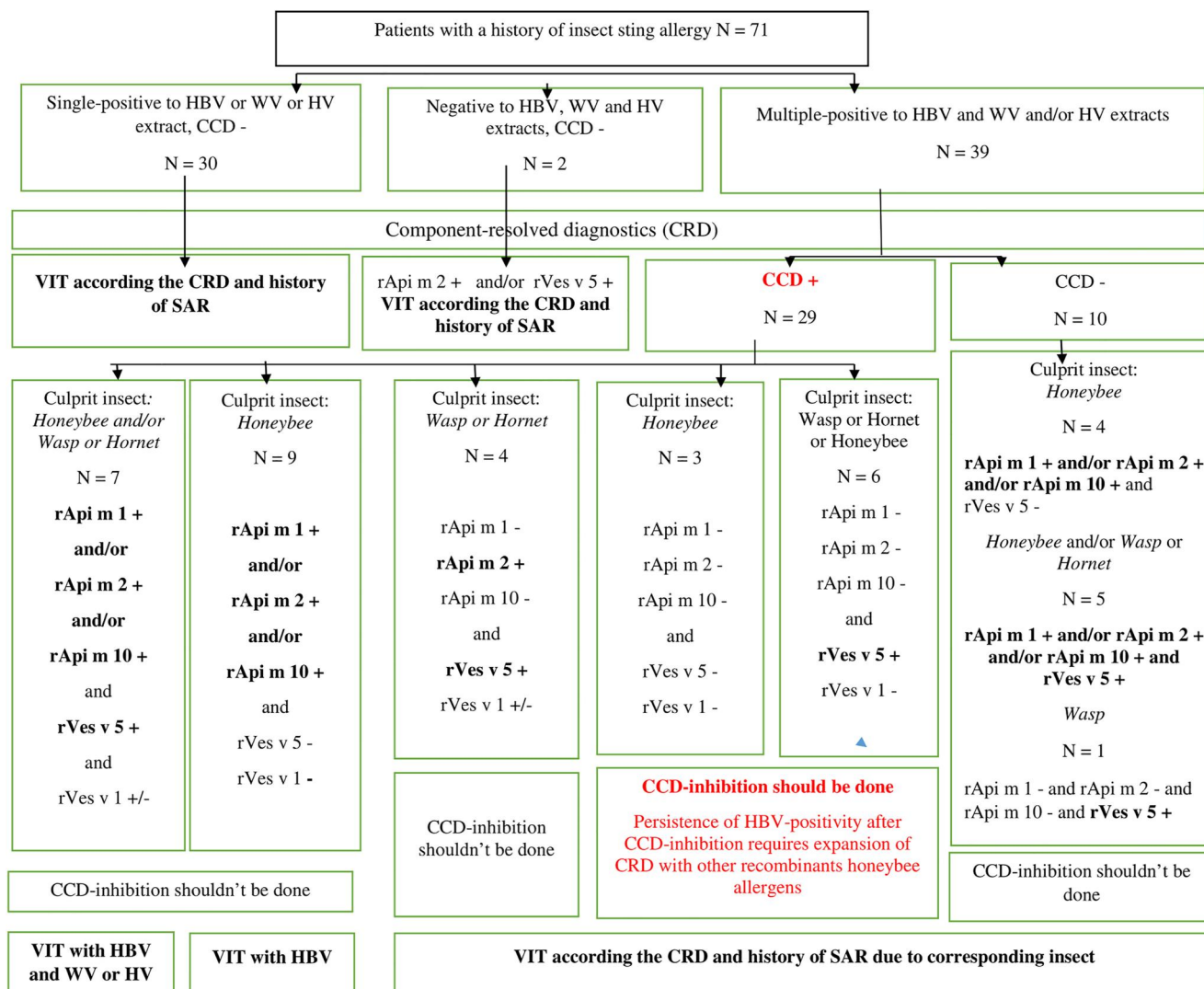


FIGURE 2 Algorithm for the necessary diagnostic steps that ensure an adequate therapeutic approach for long-lasting VIT in 71 patients with Hymenoptera venom allergy. CCD, cross-reactive carbohydrate determinants; CRD, component-resolved diagnostics; HBV, honeybee venom; HV, hornet venom; rApi m 1, recombinant phospholipase A2; rApi m 10, recombinant icarapin; rApi m 2, recombinant hyaluronidase; rVes v 1, recombinant phospholipase A1; rVes v 5, recombinant antigen 5; VIT, venom-immunotherapy; WV, wasp venom.

structure of native HBV and WV allergens and by difficulties in obtaining purified recombinant allergens. Unfortunately, the recombinant proteins can be modified by posttranslational modifications in Golgi apparatus of eukaryotic cells and may bind different sugars.³⁴ In allergic patients, native glycosylated honeybee proteins trigger production of CCD-sIgE, but also CCD-sIgG (all subclasses) of different affinities.^{35,36} Our results indirectly indicate that rApi m 1 and rApi m 2 contain small amounts of CCD antigens, which may allow CCD-sIgG and CCD-sIgE to interfere with the binding of sIgE to protein epitopes. This produces falsely lower sIgE-levels before CCD-inhibition. Finally, after CCD-inhibition, protein sIgE epitopes are more accessible, leading to true, higher sIgE-levels to rApi m 1 and rApi m 2. This hypothesis can also be an explanation for the increased number of patients with sIgE to recombinant honeybee allergens after CCD-inhibition.

Contrary, Ves v 5 is not naturally glycosylated and can only induce the production of protein-based antibodies. But, we suppose that rVes v 5 in Immunoblot contains small amounts of CCD antigens, which allows binding of ubiquitous CCD-sIgE. Constant contact with food-allergens in the gastrointestinal tract and pollen (glycosylated proteins) on the mucosal surfaces of the respiratory system, can induce production of certain sIgE-levels against the CCD epitopes.³⁵ This leads to false, higher sIgE-levels to rVes v 5 before CCD-inhibition. CCD-inhibition reduces non-specific binding of CCD-sIgE leading to true, lower sIgE-levels to rVes v 5.

Our results indicated that CCD-inhibition can overcome current limitations of some procedures in recombinant technology, especially in Immunoblot which do not display three-dimensional conformational structure of antigens that hide or change presentation of some IgE epitopes.³⁷ Nevertheless, the recombinant production of certain

allergens still needs to overcome technological hurdles and the development of purified CCD-free, correctly folded recombinant proteins is mandatory in allergy diagnostics and immunotherapy.

In this study with a larger number of honeybee allergic patients, the sensitivity of Immunoblot for rApi m 1 was 65.7%. Similarly, we detected solid sensitivity for rApi m 2 and rApi m 10 (68.4% and 58%, respectively) in honeybee allergic patients. Sensitivity of CRD using simultaneous detection of sIgE for at least one tested recombinant honeybee allergen was 86.8%. So far, 12 HBV allergens have been described until now, and Api m 1 and Api m 4 (melittin) are found in significant amounts in HBV.³⁶ One study showed that Api m 2 and Api m 10 are important major allergens with sIgE-reactivity in the range of 47.9%–52.2% and 61.8%–72.2%, respectively.³⁸

Importantly, our result identified a very high sensitivity for rVes v 5 in wasp allergic patients (94%) and hornet allergic patients (100%). We also demonstrated no patients with wasp or hornet allergy who had only sIgE-reactivity to rVes v 1. The minority of patients with wasp and hornet allergy (8/39) had sIgE-reactivity to rVes v 5 and rVes v 1. The results of several studies have confirmed that rVes v 5 is sufficient in most patients for serological confirmation of wasp or hornet allergy.^{15,26,39} When a differential diagnosis between wasp and hornet allergy is required a history of insect sting allergy is very important, in addition of sIgE-reactivity to rVes v 5. In addition, the sensitization rate of honeybee allergic patients to rApi m 1 is 57% to 83.3%, and sensitization rate of wasp allergic patients to rVes v 5 is 86.55%–96.7% measured by ImmunoCAP.^{38,40,41} In line with these observations, our results confirmed that Immunoblot had satisfactory sensitivity to the same allergens.

Since, CRD in our study failed to diagnose (5/38) 13.2% of honeybee allergic patients, and (2/33) 6.1% of wasp allergic patients, it may suggest that additional CRD are needed in these patients. On the other hand, CRD can help identify patients with a history of insect sting allergy without sIgE-reactivity to venom extracts,⁴² as it was in two of our wasp allergic patients.

Although, sIgE-levels during successful VIT do not correlate with clinical improvement, changes in IgE- and IgG4-levels are known to indicate VIT-induced improvements in immune tolerance.^{19,43} Since the IgG/IgE ratio is a good marker of efficacy,⁴⁴ it is important to know their true initial concentrations, before starting long-term VIT. Future studies will elucidate whether sIgE-levels before or after CCD-inhibition should be taken as clinically relevant.

Our results demonstrate that the CCD-inhibition test is useful in patients who tested negative for recombinant honeybee allergens. Our patients, who had persistent HBV-positivity even after CCD-inhibition, require CRD to other recombinant honeybee allergens.

Molecular diagnostics is a major step toward personalized medicine,⁴⁵ especially in patients who are exclusively sensitized to allergens that are underrepresented in therapeutic mixtures for VIT, as described for rApi m 10.⁴⁶ We demonstrated that Immunoblot, using profile of the five most important recombinant allergens had a high sensitivity for diagnosis HVA. Patients with multiple HBV/WV/HV/CCD-positivity had more frequently severe SAR.

In patients with multiple-positivity, CCD-inhibition increases sensitivity of CRD and help to define HBV allergic patients who require an extended CRD. CCD-inhibition and CRD help synergistically to reveal the clinical relevant, true sensitization and improve the selection of allergens for long-lasting VIT.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dragana Jovanovic: conceptualization (equal); data curation (equal); investigation (equal); methodology (equal); writing – original draft (equal). **Aleksandra Peric-Popadic:** investigation (equal); validation (equal). **Vojislav Djuric:** data curation (equal); writing – review and editing (equal). **Maja Stojanovic:** data curation (equal); validation (equal); writing – review and editing (equal). **Branislav Lekic:** methodology (equal); software (equal). **Ognjen Milicevic:** software (equal). **Branka Bonaci-Nikolic:** conceptualization (equal); investigation (equal); methodology (equal); supervision (equal); writing – review and editing (equal).

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Grant Number 200110.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Dragana Jovanovic  <https://orcid.org/0000-0002-7496-0587>

Maja Stojanovic  <https://orcid.org/0000-0003-4589-7344>

REFERENCES

- Seismann H, Blank S, Braren I, et al. Dissecting cross-reactivity in Hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. *Mol Immunol*. 2010;47(4):799-808.
- Hemmer W. Cross-reactivity to honeybee and wasp venom. *Hautarzt*. 2008;59(3):194-199.
- Perez-Riverola A, Romani Fernandes LGR, Musacchio Lasa A, et al. Phospholipase A1-based cross-reactivity among venoms of clinically relevant Hymenoptera from Neotropical and temperate regions. *Mol Immunol*. 2018;93:87-93.
- Jovanovic D, Peric-Popadic A, Andrejevic S, Stojanovic M, Bonaci-Nikolic B. The diagnostic importance of recombinant allergen IgE testing in patients with Hymenoptera venom allergy: comparison of two methods. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2021;20(4):413-422.
- Luo W, Huang H, Zheng P, Zheng J, Sun B. CCD inhibition test can improve the accuracy of the detection of pollen and seed food allergen-specific IgE in Southern China. *J Asthma Allergy*. 2021;14:439-447.
- Jakob T, Rafei-Shamsabadi D, Spillner E, Müller S. Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. *Allergo J Int*. 2017;26(3):93-105.

7. Holzweber F, Svehla E, Fellner W, et al. Inhibition of IgE binding to cross-reactive carbohydrate determinants enhances diagnostic selectivity. *Allergy*. 2013;68(10):1269-1277.
8. Burzyńska M, Piasecka-Kwiatkowska D. A review of honeybee venom allergens and allergenicity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8371.
9. Golden DB, Demain J, Freeman T, et al. Stinging insect hypersensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118(1):28-54.
10. Estelle F, Simons R. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S161-S181.
11. Cichočka-Jarosz E. Hymenoptera venom allergy in humans. *Folia Med Crac*. 2012;52(3-4):43-60.
12. Jappe U, Raulf-Heimsoth M. The significance of cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) for allergy diagnosis. *Allergologie*. 2008;31(3):82-90.
13. Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, et al. In vitro Hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy*. 2006;61(10):1220-1229.
14. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *Asthma Res*. 1966;3(4):331-333.
15. 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 in venom allergy. *Allergy*. 2012;67(8):1069-1073.
16. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Dalik I, Götz M, Jarisch R. Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(3):460-469.
17. Aberer W, Holzweber F, Hemmer W, et al. Inhibition of cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) enhances the accuracy of in vitro allergy diagnosis. *Allergol Select*. 2017;1(2):141-149.
18. Mahler V, Gutgesell C, Valenta R, Fuchs T. Natural rubber latex and Hymenoptera venoms share immunoglobulin E-epitopes accounting for cross-reactive carbohydrate determinants. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(11):1446-1456.
19. Demšar Luzar A, Korošec P, Košnik M, Zidarn M, Rijavec M. Hymenoptera venom immunotherapy: immune mechanisms of induced protection and tolerance. *Cells*. 2021;10(7):1575.
20. Hart GW. Three decades of research on O-GlcNAcylation – a major nutrient sensor that regulates signaling, transcription and cellular metabolism. *Front Endocrinol*. 2014;5:183.
21. Kolarich D, Léonard R, Hemmer W, Altmann F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespa vulgaris*. *FEBS J*. 2005;272(20):5182-5190.
22. Mittermann I, Zidarn M, Silar M, et al. Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(6):1300-1307.
23. Tretter V, Altmann F, Kubelka V, März L, Becke WM. Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;102(3):259-266.
24. Gattinger P, Bidovec-Stojkovic U, Zidarn M, Korosec P, Valenta R, Mittermann I. Glycosylation enhances allergenic activity of major bee venom allergen Api m 1 by adding IgE epitopes. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(4):1502-1504.
25. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(1):155-161.
26. Müller UR, Johansen N, Peterson AB, Fromberg-Neilsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity of honey bee and vespa venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy*. 2009;64(4):543-548.
27. Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Müller U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure*. 2000;8(10):1025-1035.
28. Tracy JM. Testing for venom allergy: should we change testing order? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022;10(3):844-845.
29. Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):184-190.
30. Reisman RE, DeMasi JM. Relationship of serum venom-specific IgE titers to clinical aspects of stinging insect allergy. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;89(1):67-70.
31. Jovanovic D, Peric-Popadic A, Andrejevic S, Jovanovic I, Bonaci-Nikolic B. Triple IgE-positivity to hornet, wasp and bee venom in the patient with SAR: diagnostic and therapeutic approach. *Vojnosanit Pregl*. 2019;76(8):839-842.
32. Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2018;73(4):744-764.
33. Hollstein MM, Matzke SS, Lorbeer L, et al. Intracutaneous skin tests and serum IgE levels cannot predict the grade of anaphylaxis in patients with insect venom allergies. *J Asthma Allergy*. 2022;15:907-918.
34. Dicker M, Strasser R. Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(10):1501-1516.
35. Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(1):185-190.
36. Spillner E, Blank S, Jakob T. Hymenoptera allergens: from venom to “venome”. *Front Immunol*. 2014;5:77.
37. Campana R, Vrtala S, Maderegger B, et al. Altered IgE epitope presentation: a model for hypoallergenic activity revealed for Bet v 1 trimer. *Mol Immunol*. 2011;48(4):431-441.
38. Köhler J, Blank S, Müller S, et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1383-1389.
39. Hirata H, Yoshida N, Watanabe M, Sugiyama K, Arima M, Ishii Y. Sensitization of specific IgE-positive Japanese who have experienced Hymenoptera stings to recombinant versions of the Ves v 1 and Ves v 5 allergens in hornet venom. *Allergol Int*. 2015;64(1):115-117.
40. Hofman 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(1):265-267.
41. 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 correlations with the severity of the sting reaction. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(4):621-630.
42. Blank S, Biló MB, Ollert M. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: important steps towards precision medicine. *Clin Exp Allergy*. 2018;48(4):354-364.
43. Pereira Santos MC, Pedro E, Spinola Santos A, Branco Ferreira M, Palma Carlos ML, Palma Carlos AG. Immunoblot studies in allergic patients to Hymenoptera venom before and during immunotherapy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2005;37(7):273-278.
44. Saulite I, Hoetzenecker W, Guenova E, Schmid-Grendelmeier P, Glatz M. Skin test reactivity to Hymenoptera venom after venom immunotherapy correlates inversely with the IgG/IgE ratio. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;174(3-4):190-199.

45. Blank S, Etzold S, Darsow U, et al. Component-resolved evaluation of the content of major allergens in therapeutic extracts for specific immunotherapy of honeybee venom allergy. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(10):2482-2489.
46. Frick M, Fischer J, Helbling A, et al. Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(6):1663-1671.

How to cite this article: Jovanovic D, Peric-Popadic A, Djuric V, et al. Molecular diagnostics and inhibition of cross-reactive carbohydrate determinants in Hymenoptera venom allergy. *Clin Transl Allergy.* 2023;e12230. <https://doi.org/10.1002/ct2.12230>

ORIGINAL ARTICLE

Iran J Allergy Asthma Immunol

August 2021; 20(4):413-422.

Doi: 10.18502/ijaai.v20i4.6951

The Diagnostic Importance of Recombinant Allergen IgE Testing in Patients with Hymenoptera Venom Allergy: Comparison of Two Methods

Dragana Jovanovic¹, Aleksandra Peric-Popadic^{1,2}, Sladjana Andrejevic^{1,2}, Maja Stojanovic^{1,2},
and Branka Bonaci-Nikolic^{1,2}

¹ Clinic of Allergy and Immunology, University Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

² Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Received: 11 August 2020; Received in revised form: 20 March 2021; Accepted: 6 April 2021

ABSTRACT

Adults with systemic anaphylactic reactions (SAR) to insect sting show often multiple-positivity of serum-specific IgE (sIgE) to *Hymenoptera* venoms. Unnecessary long-lasting venom-specific immunotherapies (VIT) in false-positive patients increase the risk of recurrent SAR. This report aims to analyze the diagnostic importance of recombinant allergen IgE testing in patients with SAR to *Hymenoptera* sting.

In 82 patients we measured sIgE to honeybee venom (HBV), wasp venom (WV) and hornet venom (HV) extracts, recombinant phospholipase A2 from HBV (sIgE-rApi m1), recombinant antigen 5 from WV (sIgE-rVes v5), and cross-reactive carbohydrate determinants-CCD-bromelain by ImmunoCAP. We analyzed the correlation of ImmunoCAP and Immunoblot for HBV and WV extracts, rApi m1, and rVes v5 in 39/82 patients. According to the history of the culprit insect, we compared sensitivity and specificity between the two methods.

The severity of the SAR does not depend on the sIgE level to venom extracts and recombinant allergens. Fifty-one percent of the patients had a multiple-positivity to HBV/WV or HBV/WV/HV extracts. Severe SAR and CCD-sIgE were more frequent in multiple-positive than single-positive patients. CCD-sIgE were more frequent in HBV allergic patients than WV and HV allergic patients. There was a significant correlation between levels of sIgE to venom extracts and recombinant allergens measured by ImmunoCAP and Immunoblot. ImmunoCAP has higher sensitivity and specificity than Immunoblot for diagnosis of SAR to *Hymenoptera* venoms.

IgE testing to recombinant CCD-free allergens is necessary for the adequate selection of long-lasting VIT, especially in patients with multiple sensitivities to venom extracts.

Keywords: Anaphylaxis; Hymenoptera; Honeybee venoms; Immunoblotting; Wasp venoms

INTRODUCTION

Hymenoptera venoms are considered to be one of

the most frequent triggers of systemic anaphylactic reactions (SAR) in adults.¹ They contain a complex mixture of glycosylated and non-glycosylated proteins,

Corresponding Author: Dragana Jovanovic, MD,
Clinic of Allergy and Immunology, University Clinical Centre of

Serbia, Belgrade, Serbia. Tel: (+381 64) 1168 821, (+381 11) 3663 197, E-mail: drlenajovanovic@yahoo.com

peptides, and biogenic amines. Specific IgE (sIgE) to more than one Hymenoptera venom could be found in up to 50% of adults with a history of SAR to an insect sting, although most of them report an allergic reaction to only one insect.² When positive antibodies to multiple venoms are detected they may be related to 1) genuine double IgE-sensitization to specific allergens of honeybee (*Apis mellifera*) and yellow jacket (*Vespa vulgaris*, in Europe also called wasp) or hornet venoms (*Vespa crabro*) or 2) presence of clinically irrelevant IgE to cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) present in all three venoms.³

Concurrent presence of sIgE to specific and cross-reactive allergens of honeybee venoms (HBV), wasp venoms (WV), and hornet venoms (HV) indicates further discrimination between genuine sensitization and cross-reactivity which is essential for the selection of appropriate allergens for venom-specific immunotherapies (VIT).⁴ Nowadays, molecular diagnosis with non-glycosylated recombinant allergens has significantly improved diagnostic accuracy, particularly in patients showing positive sIgE for multiple *Hymenoptera* venoms.⁵ The major allergen of WV and HV is antigen 5 (Ves v5), while phospholipase A2 (Api m1) is one of the most important allergens of HBV.⁶ Serum sIgE to recombinant major antigen 5 (rVes v5), measured by fluoro-enzyme immunoassay (ImmunoCAP-FEIA) had a satisfactory sensitivity (84-93%) and specificity (94-100%) for the diagnosis of genuine sensitization to WV or HV and may help adequate selection of suitable allergens for VIT.^{2,7-9} However, low sensitivity of recombinant Api m1 (rApi m1) ranging from 57% to 79%, has been reported in honeybee allergic patients.^{8,10,11} A higher sensitivity of rApi m1 (88% to 97%) in honeybee allergic patients was reported by other groups.^{2,12,13} On the other hand, the highest sensitivity, up to 100% was found for HBV and WV extracts.^{2,7,8,12} So far it is not clear why there are such large variations in sensitivity and specificity of sIgE to venom extracts and recombinant major venom allergens between different European countries.

This study aimed to analyze the diagnostic importance of recombinant allergen IgE-testing in patients with a history of SAR to *Hymenoptera* stings. We determined the differences in groups found to be sIgE-positive for single (HBV or WV or HV) extract or multiple-positive (HBV/WV and HBV/WV/HV) extracts using severity of SAR and positivity for rApi m1, rVes v5, and CCD. We also examined whether

there were correlations between concentrations of sIgE to venoms measured by ImmunoCAP and Immunoblot. According to the accurate history of insect sting, we compared the sensitivity and specificity of IgE-testing to venom extracts and recombinant allergens by ImmunoCAP and Immunoblot.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This retrospective study included 82 patients: 62 male (75.6%) and 20 female (24.4%) (mean age 46.4±13.2 years, range 18-70 years) with a newly-diagnosed SAR to venom sting. The study was performed between March 2015 and November 2019 at the Clinical Centre of Serbia, Belgrade. The protocol for the research has been approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty, University of Belgrade, and number 1550/V-8.

Patients with a documented history of SAR to more than one sting were excluded. 42 patients showed multiple-positivity, while 40 showed single-positivity: 12 to HBV extract, 18 to WV extract, and 10 to HV extract (Table 1). In all single-positive patients, a history of insect sting matched with positive sIgE to respective venom.

The severity of SAR was estimated based on Mueller's classification, including four degrees of severity of symptoms from a sting from mild to life-threatening: I-urticaria, II-angioedema, III-respiratory disorders, and IV-fall in blood pressure and loss of consciousness.¹⁴

None of our patients had mast cell disorder or elevated baseline serum tryptase (value≤11 mcg/L) measured by ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden).

Fluoro-enzyme Immunoassay (FEIA)

Serum levels of sIgE to HBV, WV, HV extracts, rApi m1, rVes v5, and cross-reactive carbohydrate determinants-CCD-bromelain were measured by FEIA (ImmunoCAP Phadia, Uppsala, Sweden). Levels of sIgE were expressed in quantitative units (kUA/L). A value of sIgE ≥0.35 kUA/L was considered positive.

Immunoblot

In 39/82 patients, serum sIgE levels to HBV, WV extracts, rApi m1, rVes v5, and CCD were measured by Immunoblot (Euroimmun, Germany, Euroline DPA-Dx insect venoms). Levels of sIgE were expressed in

IgE Testing in Venom Allergic Patients

quantitative units (kUA/L). A value of sIgE ≥ 0.35 kUA/L was considered positive.

Statistical Analyses

Obtained data were analyzed using IBM SPSS Statistics software for Windows (version 17; IBM, Armonk, NY). Mean quantitative variables were used and the frequency of qualitative variables was also calculated. Nonparametric Chi-square and Fisher exact tests were used to evaluate the relationship between the qualitative variables. In 39 patients we analyzed Spearman's correlation between levels of sIgE to HBV, WV extracts, rApi m1, and rVes v5 by ImmunoCAP and Immunoblot.

According to a history of insect sting, we compared sensitivity and specificity between the two methods. The sensitivity and specificity of these methods were calculated using the formulas:

Sensitivity = true-positive / true positive + false negative

Specificity = true negative / true negative + false positive.

RESULTS

In our group of 82 patients, male patients more frequent had SAR (75.6%) comparing to female patients (24.4%) ($p=0.029$).

A comparison of demographic characteristics of multiple-positive and single-positive patients is shown in Table 1.

The majority of patients (55/82) had more severe SAR (III and IV grades of SAR) (67.1%) ($p<0.001$).

The frequency of more severe SAR (85.7%) was higher in the group of patients with multiple-positivity compared to the group with single-positivity (47.5%) ($p<0.001$). The number of beekeepers did not differ significantly between groups of multiple-positive and single-positive patients.

94.4% of WV single-positive and 100% of HV single-positive patients had positivity of sIgE-rVes v5, while 83.3% of HBV single-positive patients had positivity of sIgE-rApi m1 (Table 2).

True double sensitizations to both venoms determined by positivity for venom-specific recombinant allergens were found in 26.2% of multiple-positive and none of the 40 single-positive patients ($p<0.001$) (Table 2). Five of 82 (6.1%) patients were negative to both recombinant allergens. CCD-sIgE were more often present in multiple-positive 17/42 (40.5%) than single-positive patients 5/40 (12.5%) ($p<0.001$).

The majority of multiple-positive patients (35/42) had an exact history of an insect sting. Based on the history (beekeeping, proximity to nesting places for stinging insects, visual identification of the insect, the presence of a stinger) 17/42 multiple-positive patients had SAR to the honeybee, 12/42 to wasp, and 6/42 to the hornet. Seven of 42 patients could not identify the insect (Table 3).

13/17 (76.5%) multiple-positive patients with a history of SAR due to honeybee sting displayed positivity of sIgE-rApi m1. All multiple-positive patients with a history of SAR due to wasp and hornet sting concomitant displayed positivity of sIgE-rVes v5 (Table 3).

Table 1. Comparison of demographic characteristics of patients with *Hymenoptera* venom allergy

	Multiple-positivity to HBV/WV or HBV/WV/HV extracts (n=42)	Single-positivity to HBV or WV or HV extract (n=40)
Age (years)	48.9 \pm 14.2	43.8 \pm 6.46
Female (%)	6 (14.3)	14 (35)
Male (%)	36 (85.7)	26 (65)
Beekeepers (%)	7 (16.7)	5 (12.5)
Degree of severity sting reactions (%)		
I	3 (7.1)	10 (25)
II	3 (7.1)	11 (27.5)
III	19 (45.2)	4 (10)
IV	17 (40.5)	15 (37.5)

HBV: honeybee venom; WV: wasp venom; HV: hornet venom

Table 2. Serum-specific IgE (sIgE) to recombinant major honeybee and wasp allergens and bromelain in 82 patients with a history of systemic anaphylactic reactions (SAR) to *Hymenoptera* sting

sIgE (ImmunoCAP)	Multiple-positivity to HBV/WV or HBV/WV/HV extracts (n=42)	Single-positivity to HBV extract (n=12)	Single-positivity to WV extract (n=18)	Single-positivity to HV extract (n=10)
rApi m1 and Ves v5 +	11 (26.2%)	0	0	0
rApi m1 +	10 (23.8%)	10 (83.3%)	0	0
rVes v5 +	18 (42.8%)	1 (8.3%)	17 (94.4%)	10 (100%)
rApi m1 and sIgE-Ves v5 -	3 (7.1%)	1 (8.3%)	1 (5.6%)	0
bromelain (CCD) +	17 (40.5%)	4 (33.3%)	0	1 (10%)

rApi m1: recombinant phospholipase A2, rVes v5: recombinant antigen 5, HBV: honeybee venom, WV: wasp venom, HV: hornet venom, CCD: cross-reactive carbohydrate determinants

Table 3. Serum-specific IgE (sIgE) to recombinant major honeybee and wasp allergens in 42 patients with multiple-positivity for venom extracts and history of systemic anaphylactic reactions (SAR) due to certain kinds of *Hymenoptera* sting

History of insect sting	positive sIgE to rApi m1 and rVesv5 (n=11)	positive sIgE to rApi m1 (n=10)	positive sIgE to rVes v5 (n=18)	negative sIgE to rApi m1 and rVesv5 (n=3)
Honeybee (HBV/WV+) (n=17)	3 (17.6%)	10 (58.8%)	1 (5.9%)	3 (17.6%)
Wasp (HBV/WV+) (n=12)	3 (25%)	0	9 (75%)	0
Hornet (HBV/WV/HV+) (n= 6)	2 (33.3%)	0	4 (66.7%)	0
Unidentified (HBV/WV/HV+) (n=7)	3 (42.9%)	0	4 (57.1%)	0

rApi m1: recombinant phospholipase A2, rVes v5: recombinant antigen 5, HBV: honeybee venom, WV: wasp venom, HV: hornet venom

According to the history of stinging insects, positive CCD-sIgE were more frequently found in patients with a history of honeybee sting 14/29 (48.3%) than in patients with a history of wasp sting 2/30 (6.7%) ($p<0.001$) and hornet sting 4/16 (25%) ($p=0.049$) (Table 4) No

significant differences were found in the mean concentration of sIgE to venom extracts and recombinant major allergens determined by ImmunoCAP between patients with a history of mild and patients with a history of severe SAR (Table 5).

Table 4. Specific IgE (sIgE) to cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) in 82 patients with *Hymenoptera* venom allergy

History of insect sting	Multiple-positivity to HBV/WV or HBV/WV/HV extracts (n=42)		Single-positivity to HBV or WV or HV extract (n=40)	
	CCD + (n=17)	CCD - (n=25)	CCD+ (n=5)	CCD- (n=35)
Honeybee (n=29)	10	7	4	8
Wasp (n=30)	2	10	0	18
Hornet (n=16)	3	3	1	9
Unidentified (n=7)	2	5	-	-

CCD: cross-reactive carbohydrate determinants, HBV: honeybee venom, WV: wasp venom, HV: hornet venom

IgE Testing in Venom Allergic Patients

Table 5. Specific IgE (sIgE) to venom extracts and recombinant allergens in 82 patients with a history of mild and more severe systemic anaphylactic reactions (SAR) to Hymenoptera sting

sIgE (ImmunoCAP)	I and II degrees of sting reactions (n=27)	III and IV degrees of sting reactions (n=55)	p
HBV extract (mean ±SD) (n=29)	16.27±2.16	13.31±1.51	0.718
WV extract (mean ±SD) (n=30)	10.56±1.37	7.71±1.09	0.558
HV extract (mean ±SD) (n=16)	3.07±2.92	3.49±7.67	0.915
rApi m1 (mean ±SD) (n=23)	4.98±6.30	2.11±2.91	0.374
rVes v5 (mean ±SD) (n=29)	5.56±6.76	6.32±1.20	0.840

HBV: honeybee venom, WV: wasp venom, HV: hornet venom, rApi m1: recombinant phospholipase A2, rVes v5: recombinant antigen 5

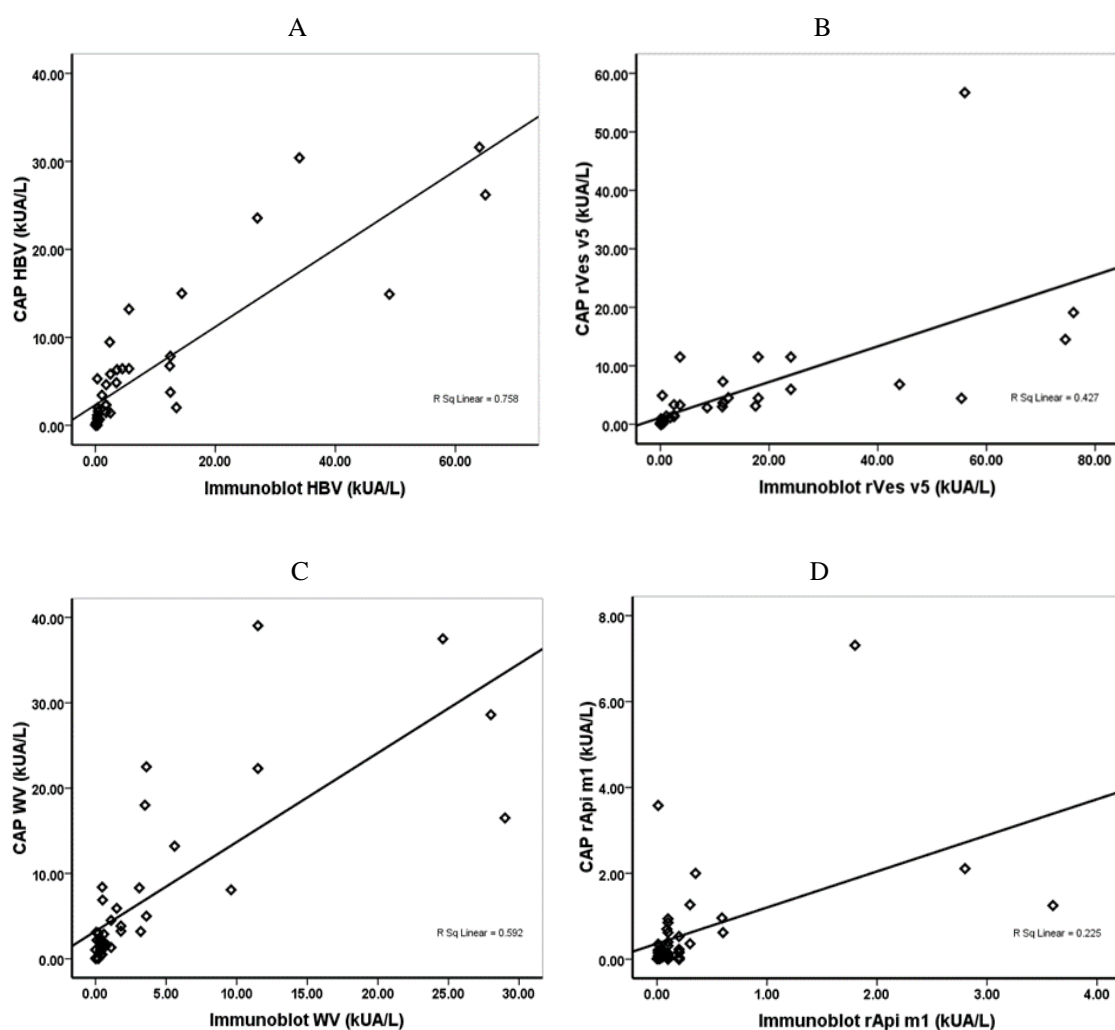


Figure 1. Correlation between concentrations of specific IgE (sIgE) to venom extracts and recombinant allergens determined by ImmunoCAP and Immunoblot in 39 patients with allergy to *Hymenoptera* sting. (A) honeybee venom (HBV) extract (B) recombinant antigen 5 (rVes v5) (C) wasp venom(WV) extract (D) recombinant phospholipase A2 (rApi m1)

The highly significant positive correlation between the levels of sIgE determined by two methods was found for the HBV extract ($r, 0.886; p < 0.0001$) (Figure 1A) and rVes v5 ($r, 0.886; p < 0.0001$) (Figure 1B), followed by the correlation for WV extract ($r, 0.808; p < 0.0001$) (Figure 1C) and finally for rApi m1 ($r, 0.349; p = 0.029$) (Figure 1D).

In addition, when tested by ImmunoCAP and Immunoblot, the specificity of sIgE to recombinant allergens (rApi m1 and rVes v5) was excellent and significantly higher than the specificity of sIgE to venom extracts (HBV and WV extracts) (Table 6).

Table 6. Sensitivity and specificity of specific IgE (sIgE) to venom extracts and major recombinant allergens determined by ImmunoCAP and Immunoblot, according to an accurate history of honeybee or wasp sting

sIgE	Sensitivity n (%)		Specificity n (%)	
	ImmunoCAP (n=59)	Immunoblot (n=30)	ImmunoCAP (n=59)	Immunoblot (n=30)
HBV extract	29/29 (100)	12/13 (92.3)	16/30 (53.3)	8/17 (47.1)
WV extract	30/30 (100)	12/17 (70.6)	14/29 (48.3)	5/13 (38.5)
rApi m1	23/29 (79.3)	5/13 (38.5)	27/30 (90)	16/17 (94)
rVes v5	29/30 (96.7)	15/17 (88.2)	24/29 (82.8)	9/13 (69.2)

HBV: honeybee venom, WV: wasp venom, rApi m1: recombinant phospholipase A2, rVes v5: recombinant antigen 5

In a group of patients with a history of honeybee sting, ImmunoCAP had higher sensitivity for HBV extract and rApi m1 (100% and 79.3%, respectively) than Immunoblot (92.3% and 38.5%, respectively). Also, in patients with a history of a wasp sting, ImmunoCAP had a higher sensitivity for WV extract and rVes v5 (100% and 96.7%, respectively) than Immunoblot (70.6% and 88.2%, respectively) (Table 6). According to an accurate history of insect sting, ImmunoCAP for rApi m1 (90%) had higher specificity than ImmunoCAP for HBV extract (53.3%), and ImmunoCAP for rVes v5 (82.8%) had higher specificity than ImmunoCAP for WV extract (48.3%).

DISCUSSION

Our study demonstrates the importance of a new molecular methodology in the daily clinical practice of an allergist who considers SAR caused by *Hymenoptera* venoms. IgE-testing to recombinant CCD-free allergens is necessary for the adequate selection of venoms for VIT, especially in patients with multiple-positivity to venom extracts. A total of 51% of patients in our study group had multiple-positivity to HBV/WV or HBV/WV/HV extracts. We have demonstrated that the use of venom extracts gives false-positive results and significantly reduces the specificity of IgE-testing. According to the accurate history of insect sting, the specificity of IgE-testing to

rApi m1 and rVesv5 was much higher than IgE-testing to HBV and WV. The correlation between both tests was highly significant for HBV, WV, and, rVes V5. We emphasize that this is the first study on the diagnostic importance of recombinant allergens in patients with multiple sensitivity to venom extracts in the southeastern part of Europe.

The precise identification of sensitization to the relevant insect is of great importance for initiating adequate immunotherapy in *Hymenoptera* venom allergic patients. Although skin testing represents the first level of approach for the diagnosis of IgE-mediated allergy, *in vitro* tests are the most important diagnostic step before the introduction of long-lasting VIT.^{3,4} The gold standard for diagnosis of insect venom allergy is skin testing with venom extracts.¹⁵ However, a skin test may show an unexplained variability and inconclusive multiple-positive results.¹⁶ Also, the quality and standardization of allergens for skin tests may influence the interpretation of the results.

According to the findings of our study, SAR appeared more frequently in males than in female patients ($p = 0.029$) which was in line with previously published results.¹⁷ The majority of our patients had more severe SAR ($p < 0.001$) and the severity of SAR was independent of the concentration of sIgE to venom extracts and recombinant major allergens measured by ImmunoCAP ($p > 0.05$). These data were previously found by other authors.¹⁷

IgE Testing in Venom Allergic Patients

According to the literature, 3% to 7.5% of people develop SAR after an insect sting.³ The chance of a systemic reaction to a sting varies between 30% and 65% in adults with previous systemic reactions, depending on the severity of previous reactions.⁴ According to the recent guidelines of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), VIT is recommended in candidates with a positive history of severe SAR, beekeepers, honeybee allergic patients, patients with mast cell disorders, or elevated baseline serum tryptase.¹⁸ Decision process for VIT introduction is very important for the efficacy of the therapy and should be adjusted for each patient. Molecular diagnostics, using recombinant CCD-free allergens, enables detection of genuine sensitization, and thus in many patients improves the selection of the appropriate VIT.^{11,19} Reliable identification of the stinging insect is usually difficult. Similarly, in our group of patients, 7/82 (8.5%) could not identify the insect. The use of venom extracts for the detection of sIgE could lead to “false-positive” results due to their cross-reactivity. Up to 75% of determined multiple-positivity by *in vitro* tests with honeybee and wasp venoms are caused by CCD-sIgE to common protein epitopes of homologous allergens.² Multiple-positivity could be avoided by measuring CCD-sIgE.^{19,20} Our results showed that determination of sIgE to recombinant major allergens is especially useful for the patients, with multiple-positivity to venom extracts and those who could not identify the insect.

Cross-reactivity can be attributed to CCD frequently present in allergens of insects and plants and common glycoprotein epitopes of homologous allergens present in *Hymenoptera* venoms as described for hyaluronidases (Api m2 and Ves v2) and dipeptidyl-peptidases (Api m5 and Ves v3) which are known to share around 50% sequence identity.^{21,22} As a result of that, diagnostics tests based on the detections of antibodies to venom extracts, although very sensitive, do not have adequate specificity.²³ Our study confirmed data from previous studies showing that 50-60% of patients with *Hymenoptera* venom allergy have multiple-positivity. A large number of patients with SAR after honeybee, wasp, or hornet sting were found to have positive sIgE to all three venom extracts. It may be explained by either a presence of CCD-sIgE or genuine sensitization.²

In our patients, positive CCD-sIgE was more frequent in multiple-positive than single-positive

patients ($p<0.001$). Therefore, CCD-sIgE significantly contributes to cross-reactivity determined in these patients.^{11,19} However, the simultaneous presence of CCD-sIgE and IgE to cross-reactive protein epitopes could make the decision on the selection of relevant venom for immunotherapy even more difficult.⁵ Also, the analysis of CCD-sIgE demonstrated that our patients with a history of honeybee sting more frequently had positive CCD-sIgE than patients with a history of wasp sting ($p<0.001$). Overall, this can be explained by the fact that all major honeybee allergens are glycosylated, while the two major wasp allergens are not glycosylated.⁵ The concept that multiple-positivity to venom extracts comes from CCD-sIgE was previously confirmed.^{2,19} On the other hand, genuine positivity may be caused by sensitization to a previously well-tolerated sting.¹¹ In this regard, 26.2% of our patients showed sensitization to rApi m1 and rVes v5. Taken together, a better solution for the detection of genuine positivity may be the inhibition test with CCD and venom extracts by ImmunoCAP or Immunoblot.²⁴

New molecular-allergy testing based on the detection of sIgE against several non-glycosylated allergens may help in determining the true sensitization and result in an adequate therapeutic approach.^{7,9,11,12} Many patients with genuine sensitization may be identified; using the rApi m1 and rVes v5 that are available for routine *in vitro* diagnostics, and more importantly not related structurally.²⁵ According to the latest guidelines, VIT is not recommended in patients with incidentally detected sensitization to insects without clinical symptoms.¹⁸

By using different combinations of the most important recombinant honeybee allergens, the sensitivity of IgE-testing reaches 94.4%.¹³ Combination of recombinant wasp allergens rVes v5 and rVes v1 (phospholipase A1), the sensitivity of IgE-testing reaches even up to 100%.^{11,26,27}

Our results of ImmunoCAP measurement identified a very high sensitivity for WV extract and rVes v5 in patients with a history of wasp sting (100% and 96.7%, respectively), and even higher sensitivity for rVes v5 in patients with a history of hornet sting (100%). Previous studies have reported lower sensitivity for rVes v5 ranging from 86.5% to 93%^{2,7,8,12} in wasp allergic patients. Also, good correlation levels of sIgE were revealed for HV extract and rVesv5 measured by immunoCAP.²⁸ As we already know, the cross-

reactivity that occurs between the venoms of different Vespidae (*Vespula vulgaris* and *Vespa crabo*) is strong, mainly due to the similarities of venom composition and structure of the allergens.²⁸ The antigen 5 has been recognized as the major and most potent allergen in wasp and hornets. Given this consideration, identification of sIgE-rVes v5 can help in serological confirmation of sensitization to the hornet. According to the literature, 92.6% of patients sensitized to hornet have positive sIgE-rVes v5.²⁹

The sensitivity of sIgE-testing for HBV extract (100%) and sIgE-rApi m1 (79.3%) in honeybee allergic patients are similar or higher in comparison with previously published results.^{8,11,30} The sensitivity of sIgE-rApi m1 of 83.3% in single-positive and 76.5% in multiple-positive patients confirmed Api m1 as one of the main honeybee allergens. Four of five patients who were negative to both recombinant allergens had a positive history of honeybee sting. Clinical diagnosis of honeybee allergy would be more precise with commercial availability of several honeybee allergens such as rApi m1, rApi m2, rApi m4 (melittin), rApi m5, and rApi m10 (icarpin).¹³

Nevertheless, despite a good correlation between levels of sIgE to venom extracts and recombinant allergens measured by both tests, our results showed that ImmunoCAP had a higher sensitivity and specificity than Immunoblot. In addition, according to the accurate history of insect sting, sensitivity and specificity for rApi m1 and rVes v5 are more than 75%.

This study's main limitation is the incomplete availability of several honeybee allergens. Major allergen rApi m1 that was used is enough for 80% of patients, but for 20% of patients with a history of honeybee sting, additional IgE-testing is necessary to other recombinant honeybee allergens. Also, a relatively small number of patients were tested by Immunoblot, but our data represent the first IgE correlation analysis between ImmunoCAP and Immunoblot for HBV, WV, rApi m1, and rVes v5.

In conclusion, this study has shown that SAR is more frequent in males. The majority of patients had severe SAR. The severity of SAR was not dependent on the level of sIgE to venom extracts and recombinant allergens. Multiple-positivity to venom extracts had more than 50% of patients. Severe SAR and CCD-sIgE were more frequent in multiple-positive than single-positive patients. Serum CCD-sIgE was more frequent in honeybee than wasp and hornet allergic patients.

There is a significant correlation between levels of sIgE to venom extracts and recombinant allergens by ImmunoCAP and Immunoblot. The ImmunoCAP had a higher sensitivity and specificity than Immunoblot for diagnosis of honeybee and wasp allergy. We have demonstrated that the use of whole venom extracts gives false-positive results and significantly reduces the specificity of the IgE test.

The clinical history and molecular allergy testing are essential for the adequate choice of long-lasting venom immunotherapy, especially in patients with multiple sensitivities to venom extracts and in patients who could not identify the insect which caused SAR.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Branka Bonaci Nikolic and Sladjana Andrejevic were supported by the Ministry of Science of the Republic of Serbia, Grant Number 175065

REFERENCES

1. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(5):1047-54.
2. Müller UR, Johansen N, Peterson AB, Fromberg-Neilsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: Analysis of double positivity of honey bee and vespula venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy*. 2009;64(4):543-8.
3. Blank S, Biló MB, Ollert M. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: Important steps towards precision medicine. *Clin Exp Allergy*. 2018;48(4):354–64.
4. Biló MB. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. *Allergy*. 2011;95(2):35-7.
5. Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(5):26.

IgE Testing in Venom Allergic Patients

6. King TP, Kochoomian L, Lam T. Immunochemical observations of antigen 5, a major venom allergen of hornets, yellowjackets and wasps. *Mol Immunol*. 1987;24(8):857-64.
7. Schrautzer C, Bokanovic D, Hemmer W, Lang R, Hawranek T, Schwarz I, et al. Sensitivity and specificity of Hymenoptera allergen components depend on the diagnostic assay employed. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1603-5.
8. Hofman SC, Pfender N, Weckesser S, Huss-Marp J, Jakob T. Added value of IgE detection to rApi m1 and rVes v5 in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(1):265-7.
9. Monsalve RI, Vega A, Marqués L, Miranda A, Fernández J, Soriano V, et al. Component-resolved diagnosis of vespid venom allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* and *Polistes* sensitization. *Allergy*. 2012;67(4):528-36.
10. Korosec P, Valenta R, Mittermann I, Čelšnik N, Erzen R, Židarn M, et al. Low sensitivity of commercially available rApi m1 for diagnosis of honey bee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):671-3.
11. 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 in venom allergy. *Allergy*. 2012;67(8):1069-73.
12. Šelb J, Kogovšek R, Šilar M, Košnik M, Korošec P. Improved recombinant Api m1- and Ves v5-based IgE testing to dissect bee and yellow jacket allergy and their correlations with the severity of the sting reaction. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(4):621-30.
13. Köhler J, Blank S, Müller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):383-9.
14. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *Asthma Res* 1966; 3 (4): 331-3.
15. Krishna MT, Ewan PW, Diwakar L, Durham SR, Frew AJ, Leech SC, et al. Diagnosis and management of hymenoptera venom allergy: British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI) guidelines. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(9):1201-20.
16. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92(5):707-16.
17. Fehr D, Micalletto S, Moehr T, Schmid-Grendelmeier P. Risk factors for severe systemic sting reactions in wasp (*Vespula* spp.) and honeybee (*Apis mellifera*) venom allergic patients. *Clin Transl Allergy*. 2019;11(2):9-54.
18. Sturm GJ, Varga E-M, Roberts G, Mosbech H, Bilo MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2018;73(4):744-64.
19. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(1):155-61.
20. Jovanovic D, Peric-Popadic A, Andrejevic S, Jovanovic I, Bonaci-Nikolic B. Triple IgE-positivity to hornet, wasp and bee venom in the patient with SAR: diagnostic and therapeutic approach. *Vojnosanit Pregl*. 2019;76(2):839-42.
21. Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):184-90.
22. Blank S, et al. Identification, recombinant expression and characterization of the 100 kDa high molecular weight Hymenoptera venom allergens Api m5 and Ves v3. *J Immunol*. 2010;184(9):5403-13.
23. Watanabe M, Hirata H, Arima M, Hayashi Y, Chibana K, Yoshida N, et al. Measurement of Hymenoptera venom specific IgE by the IMMULITE 3gAllergy in subjects with negative or positive result by ImmunoCAP. *Asia Pac Allergy*. 2012; 2(3):195-202.
24. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson B I, Almann F, Wöhrl S, et al. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honey bee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(6):1045-52.
25. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(8):99-106.
26. Sturm GJ, Biló MB, Bonadonna P, Hemmer W, Caruso B, Bokanovic D, Aberer W. Ves v 5 can establish the diagnosis in patients without detectable specific IgE to wasp venom and a possible north-south difference in Api m 1 sensitization in Europe. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(3):818-9.
27. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Čelšnik N, Šilar M, Židarn M, Košnik M. High sensitivity of CAP-FEIA rVes v5 and rVes v1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3):1406-8.

28. King TP, Lu G, Gonzales M, Qian N, Soldatova L. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(4):588-600.
29. Yoshida N, Hirata H, Watanabe M, Sugiyama K, Arima M, Fukushima Y, Ishii Y. Improved sensitivity to venom specific-immunoglobulin E by spiking with the allergen component in Japanese patients suspected of Hymenoptera venom allergy. *Allergol Int.* 2015;64(3):248–52.
30. Sturm GJ, Hemmer W, Hawranek T, Lang R, Ollert M, Spillner E, et al. Detection of IgE to recombinant Api m1 and rVes v5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128 (1):247-8.

Izjava o autorstvu

Potpisana: **Dragana Jovanović**

Broj upisa:

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom: **“Značaj određivanja specifičnih IgE antitela na rekombinantne alergene u planiranju venom imunoterapije”**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 09.03.2023.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Dragana Jovanović**

Broj upisa:

Studijski program: **Molekularna medicina**

Naslov rada: **“Značaj određivanja specifičnih IgE antitela na rekombinantne alergene u planiranju venom imunoterapije”**

Mentor: **Prof dr Aleksandra Perić-Popadić**

Potpisana: **Dragana Jovanović**

- Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.
- Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.
- Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 09.03.2023.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:
“Značaj određivanja specifičnih IgE antitela na rekombinantne alergene u planiranju venom imunoterapije”- koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila:

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda



U Beogradu, 09.03.2023.