

“Los patrones de sensibilización por componentes en la alergia al veneno de himenópteros”.

Dras. Berta Ruiz León y Carmen Moreno Aguilar.

Servicio de Alergología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

INTRODUCCIÓN

La alergia al veneno de himenópteros supone un importante problema de salud, no tanto por su prevalencia como por el riesgo de desencadenar una reacción anafiláctica, potencialmente mortal, cuando un paciente es picado por uno de estos insectos. En nuestro país se estima que entre 2,3% y 2,8% de la población rural sufre reacciones alérgicas sistémicas por veneno de himenópteros (1).

El abordaje diagnóstico de estos pacientes exige, además de una buena historia clínica y la demostración de sensibilización a través de pruebas cutáneas e IgE a extractos completos, el uso de moléculas alergénicas aisladas mediante el denominado “diagnóstico por componentes”.

El estudio diagnóstico basado en componentes alergénicos del veneno de himenópteros nos permite identificar con precisión el alérgeno o alérgenos que producen la enfermedad en cada paciente y establecer perfiles de reactividad individual, al mismo tiempo que contribuye a una comprensión más detallada sobre el papel de cada componente del veneno en particular. Se alcanza un diagnóstico mucho más sensible y específico, solucionando en gran parte el problema de la polisensibilización, al discriminar entre alérgenos genuinos y marcadores de reactividad cruzada.

En la actualidad existe la posibilidad del estudio molecular de forma individual o mediante sistemas múltiple con la capacidad de detectar simultáneamente la IgE frente a múltiples extractos o alérgenos individuales (2).

Las proteínas alergénicas usadas pueden ser nativas purificadas o recombinantes, éstas últimas están libres de carbohidratos, expresadas en vectores bacterianos limitando así la glicosilación (3). El uso de proteínas recombinantes ayuda a diferenciar la reactividad cruzada de la verdadera sensibilización en el caso de alérgenos glicoproteicos (4). En el caso de reactividad cruzada debida a homología de la fracción proteica, el diagnóstico basado en componentes también permite identificar sensibilización específica a estas proteínas, que son origen de falsos positivos cuando se emplea el veneno completo.

En otras fuentes alergénicas (pólenes, alimentos...), el diagnóstico basado en componentes ha permitido encontrar marcadores biológicos de bajo o alto riesgo asociado a la severidad de la sintomatología o ha permitido reconocer biomarcadores asociados a un mayor riesgo de presentar reacciones adversas con la Inmunoterapia (5–8).

A continuación, se abordará la rentabilidad del diagnóstico molecular en la alergia a venenos de los himenópteros más relevantes en nuestra zona, que nos ha permitido conocer perfiles de sensibilización con patrones específicos de áreas geográficas y la identificación de biomarcadores que influyen en la seguridad y eficacia de la inmunoterapia en el caso de la alergia a veneno de abeja.

Moléculas alergénicas en la alergia a venenos de himenópteros

En los últimos años, se ha avanzado significativamente en la identificación de nuevos alérgenos al veneno de himenópteros y el desarrollo de técnicas para la producción recombinante de éstos. En la Tabla I se recoge el venoma conocido y disponible de los principales himenópteros alergénicos en nuestra zona.

Véspidos



Foto 1. Imagen de *Polistes dominula* y *Vespula germanica*. (www.alergiaabejasyavispas.com)

En España existen dos especies predominantes de véspidos alergénicos: *Polistes dominula* y *Vespula germanica* (Foto1). Para garantizar un buen diagnóstico diferencial, resulta obligado el estudio en conjunto de la sensibilización a *Vespula* y *Polistes* por coexistir ambas avispas en el mismo hábitat, aunque en algunas zonas haya un véspido más predominante que en otras.

Es importante usar para el diagnóstico alérgenos provenientes de estas especies, sobre todo para *Polistes dominula*, ya que su sensibilidad y especificidad son mayores que los alérgenos provenientes de *Polistes* americanos (9).

Los alérgenos de véspidos más utilizados para diagnóstico son las fosfolipasas (Pol d 1 y Ves v 1) y los antígenos 5 (Pol d 5 y Ves v 5) (3).

El antígeno 5 es una proteína de función desconocida. En el caso del veneno de *Vespula*, se ha demostrado en 308 pacientes que el uso de Ves v5 (InmunoCAP) mejora la sensibilización hasta un 96,8% en comparación con el extracto completo de *Vespula* con un 83,4% de sensibilización (10). En relación con el antígeno 5 de *Polistes* se considera específico de la especie y una de las causas de las diferentes respuestas inmunológicas entre los venenos estadounidenses y europeos (11,12)

Las hialuronidasas (Pol d 2 y Ves v 2) son alérgenos menores y por la similitud con la hialuronidasa de abeja (Api m 2) (13), y sobre todo a través de determinantes carbohidratados (14), pueden contribuir a la doble positividad entre abeja y vespídos. Recientemente se ha caracterizado Pol d 3 como una dipeptidilpeptidasa IV, cuya molécula recombinante reconoce el 66% de los paciente sensibilizados (15).

Otros alérgenos que pueden ser relevantes son la proteasa en *Polistes* (Pol d 4), sensibilizador débil en el veneno *Polistes* de América del Norte, mientras que es un alérgeno significativo en Europa, por lo tanto, también puede explicar la baja reactividad cruzada entre los venenos estadounidenses y europeos (12,16,17).

La dipeptidilpetidasa IV (Ves v 3) y la vitelogenina (Ves v 6) en *Vespula*, presentan identidad parcial con las de abeja, la dipeptidilpeptidasa IV (Api m 5) y vitelogenina (Api m 12) respectivamente (18,19).

Perfil de sensibilización para el diagnóstico e inmunoterapia

La IgE frente a Ves v1, Ves v5 y Pol d 5 son las determinaciones disponibles para diagnóstico a día de hoy, nos pueden ayudar a confirmar la sensibilización genuina, fenotipar a los pacientes y a la elección de inmunoterapia.

El perfil de sensibilización a vespídos en nuestro país ha sido fenotipado en un estudio en el que participaron 59 pacientes de diferentes regiones. Utilizando la técnica Advia Centaur, el uso de antígeno 5 recombinante de vespídos (rVes v5, rPol a 5) sólo permitió medir IgEe en el 52% de los pacientes. El cambio de recombinante por nativo y de mezcla de *Polistes* por *Polistes dominula* (nVes v5, nPol d5) aumentó la detección al 80% y la adicción de otros antígenos nativos (Pol d1, Ves v1) permitió detectar IgEe en el 100% de los pacientes. Estos componentes pueden ser suficiente para discriminar la fuente de sensibilización en individuos alérgicos a vespídos.

La fosfolipasa A1 (Ves v 1 ó Pol d 1) se manifestó como alérgeno principal del veneno de avispa en nuestro área. En relación a *Polistes*, se observó en 25 pacientes de una misma región del centro de España, que el 44% (11 pacientes) presentaron niveles mínimos para el antígeno 5 de *Polistes* (nPol d 5) con niveles elevados para la fosfolipasa A1 (nPol d 1), poniendo de manifiesto posibles fenotipos regionales (9). Este hecho también fue observado por Galindo-Bonilla y cols. en una población menor de alérgicos a vespídos (13 pacientes), en los cuales, la fosfolipasa A1 (Pol d1) se comportaba como alérgeno principal en el 53% de ellos, mientras que el antígeno 5 se comportó con un sensibilizante menor (20).

Actualmente, resultaría crucial poder determinar Pol d 1 en nuestra práctica clínica habitual, pero aún no es posible.

En pacientes alérgicos al veneno de *Vespula*, el uso de la combinación rVes v 1+ rVes v 5 mediante InmunoCAP, aumentó la sensibilidad diagnóstica hasta el 92% (21).

No obstante, en algunos casos con la determinación de estos componentes no se resuelve la incertidumbre de la elección de inmunoterapia *Polistes/Vespula*, y debemos usar los valores cuantitativos, observando si existe una gran diferencia entre los niveles de IgE, similar a lo que nos ocurre con el uso de extracto completo.

Una situación excepcional pero no imposible, es que exista IgE frente a extracto completo y no frente a los grupos 1 y 5. En este caso, habría que valorar a los componentes de reactividad cruzada y si la respuesta no está en ellos, asumir el efecto incierto de la inmunoterapia sobre una sensibilización de perfil atípico.

No se han descrito en los alérgenos a véspidos marcadores de severidad con las picaduras, ni biomarcadores relacionados con la eficacia y tolerancia a la Inmunoterapia.

Apis mellifera



Foto 2. Imagen de *Apis mellifera*.
(www.alergiaabejasyavispas.com)

El veneno de abeja es una mezcla compleja de proteínas alergénicas, con función enzimática, junto con otras moléculas farmacológicamente activas como las aminas biógenas y péptidos básicos (22). La secuenciación completa del genoma de *Apis mellifera* (Foto 2) ha permitido el estudio de la composición de su veneno, convirtiéndolo en el veneno de himenópteros mejor caracterizado.

Actualmente se han identificado 12 alérgenos del veneno de *Apis mellifera* (23)(Tabla 1). Los alérgenos del veneno de abeja mejor conocidos hasta el momento son fosfolipasa A2 (Api m 1), hialuronidasa (Api m 2) y el péptido melitina (Api m 4), los cuales constituyen la mayoría del peso seco del veneno.

Tabla 1. Alérgenos del veneno de *Apis mellifera*, *Polistes dominula* y *Vespula vulgaris* (1).

Alérgeno	Bioquímica	Peso molecular (kDa)	Fracción seca del veneno (%)	IgEe Positiva (%)	Glicosilación	Expresión Eucariota
Api m 1	Fosfolipasa A2	16	7-15	95	si	si
Api m 2	Hialuronidasa	43	1-3	50	si	si
Api m 3	Fosfatasa acida	45	1	37	si	si
Api m 4	Melitina	2,8	35-50	29/56	no	no
Api m 5	Dipeptidilpeptidasa IV	102	1	60	si	si
Api m 6	Inhibidor Proteasa	8	1-2	42	no	si
Api m 7	Proteasa	39	<1	80	si	si
Api m 8	Carboxilesterasa	70	<1	?	si	si
Api m 9	Carboxipeptidasa	60	?	?	si	si
Api m 10	Icarapina	50-55	?	50	si	si
Api m 11	Proteína Jalea Real	50-60	?	15/34	si	si
Api m 12	Vitelogenina	200	?	40	si	si
Pol d 1	Fosfolipasa A2	34	?	87	no	No
Pol d 2	Hialuronidasa	44	?	?	si	No
Pol d 4	Proteasa	33	?	?	si	No
Pol d 5	Antígeno 5	23	?	66	no	si
Ves v 1	Fosfolipasa A1	35	6-14%	79	no	si
Ves v 2	Hialuronidasa	45	1-3%	32	si	si
Ves v 3	Dipeptidilpeptidasa IV	100	1%	?	si	si
Ves v 4	Proteasa	42	?	?	si	no
Ves v 5	Antígeno 5	25	5-10%	87	no	si
Ves v 6	Vitelogenina	200	?	?	si	si

La fosfolipasa A2 (Api m 1) es el alérgeno más importante y potente del veneno de abeja (4,24), la positividad a la molécula recombinante significa sensibilización inequívoca a veneno apoideos, sin embargo la negatividad del test no excluye una sensibilización de perfil atípico.

La hialuronidasa (Api m 2) es una enzima glicosilada y está considerada un alérgeno mayor del veneno de abeja (24,25). Comparte un 55% de identidad de secuencia con la hialuronidasa de los vespídos (13), pudiendo explicar la reactividad cruzada entre los mismos, junto con los determinantes carbohidratados (14).

La melitina (Api m 4) es un péptido muy pequeño pero extraordinariamente abundante en el veneno. Su tamaño y sencillez hacen que se pueda utilizar para el diagnóstico in vitro como un producto de síntesis química, sin necesidad de extraerlo del veneno natural ni tampoco obtenerlo por recombinación. La sensibilización a melitina es inequívoca de sensibilización a veneno de abeja y está considerado un alérgeno poco prevalente (24,26). Sin embargo, recientemente ha demostrado ser mayoritario en una población de estudio en el sur de España (Córdoba) y como se verá después, Api m 4 es un biomarcador de gran utilidad clínica (27).

Aunque está disponible comercialmente, solo se encuentra en plataforma multiplex.

Otras proteínas poco abundantes que han sido descritas como potencialmente alérgicas son la fosfatasa ácida (Api m 3) (24,28), la dipeptidilpeptidasa IV (Api m 5) (18) y la icarapina (Api m 10).

La icarapina es una proteína compleja con diferentes isoformas (29) considerada un alérgeno genuino del veneno de abeja. Es una proteína glicosilada y en la práctica está disponible en la forma recombinante. A pesar de ser una proteína con una presencia muy escasa en el veneno, podría ser de gran interés diagnóstico y terapéutico, ya que sensibiliza a una población considerable y está poniendo de manifiesto un perfil de sensibilización exclusivo o predominante, detectándose además una infrarrepresentación de este alérgeno en algunos extractos terapéuticos (24, 30).

Perfil de sensibilización para el diagnóstico.

Para optimizar la sensibilidad diagnóstica es necesario incluir determinaciones a varios alérgenos del veneno de abeja.

Actualmente, están disponibles para diagnóstico habitual rApi m 1, rApi m 2, rApi m 5 y rApi m 10 con técnica InmunoCAP y en plataforma multiplex el alérgeno Api m 4.

Se ha observado que el uso del alérgeno de Api m 1, presenta diferente sensibilidad según la técnica y fuente utilizadas (31–34). Diferentes estudios confirman que el alérgeno recombinante mayor de abeja, rApi m1, posee una baja sensibilidad diagnóstica (58-80%) lo que limita su utilidad clínica (31, 35, 36). A favor del uso de la proteína nativa, Korošec y cols. describen mayor sensibilidad que con el alérgeno recombinante en pacientes con reacciones más graves (35).

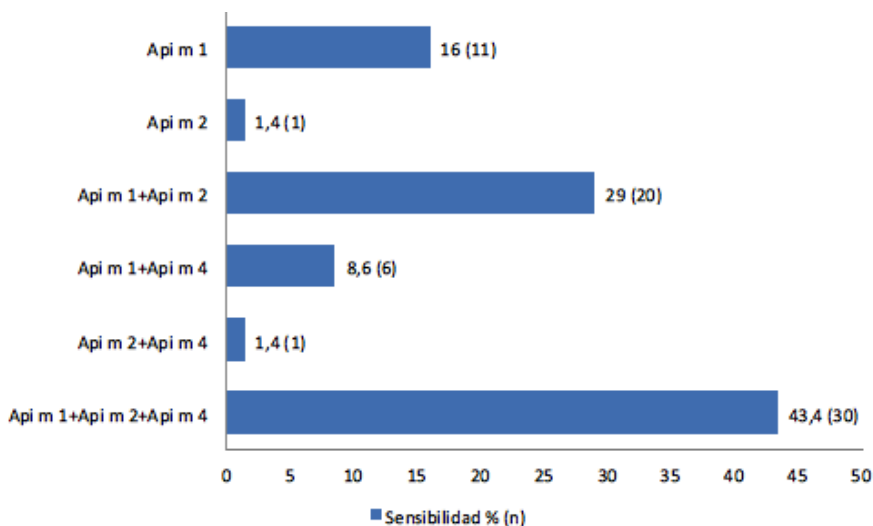
Las discrepancias diagnósticas descritas podrían ser parcialmente resueltas incorporando al panel diagnóstico nuevos alérgenos específicos.

En un estudio centroeuropeo, la incorporación de rApi m 2 y nApi m 4 pudo aumentar la sensibilización hasta un 17,5% (31). En nuestro país, un estudio fenotipa a 69 pacientes del sur de España, alérgicos a veneno de abeja usando nApi m 1, rApi m 2 y Api m 4 con plataforma Advia Centaur (Gráfico 1), las tres moléculas se comportaron como alérgenos mayoritarios (punto de corte convencional de 0,35 kU/L), y diagnosticaron al 100% de los pacientes. La prevalencia de sensibilización frente a nApi m 1, rApi m 2 y Api m 4 fue del 95,6%, 75,4% y 53,6% respectivamente (Punto de corte 0,35KU/L) (27).

Köhler y cols. usan un panel más amplio con alérgenos recombinantes del veneno de abeja (rApi m 2, rApi m3, Api m 4, rApi m5, rApi m10), y obtuvieron una sensibilidad del 94,4%. Este estudio revela que los alérgenos Api m3, Api m5 y Api m 10 son también alérgenos mayores, y muestra distintos perfiles de sensibilización, que podrían explicar el fracaso terapéutico en algunos pacientes alérgicos a veneno de abeja (24).

También pueden añadirse determinantes carbohidratados aislados bromelina, MUXF3, peroxidasa y oxidasa del ac. Ascórbico que identifica sensibilización a carbohidratos y por lo tanto reactividad cruzada de amplio espectro con poca significación clínica (37, 38).

Gráfico 1. Sensibilidad de IgE específica a diferentes perfiles de alérgenos del veneno de abeja (punto de corte 0,35 kU/L).



Perfil de sensibilización para inmunoterapia

La posibilidad de investigar la sensibilización al veneno de abeja a través del diagnóstico molecular podría explicar la diferencia que existe entre los venenos de abeja y avispas, en relación al problema de menor tolerancia-peor eficacia de la inmunoterapia.

El Servicio de Alergología del Hospital Universitario Reina Sofía, diseñó un estudio con el objetivo de establecer la relevancia clínica de los alérgenos Api m 1, Api m 2 y Api m 4, y de identificar posibles fenotipos de sensibilización, así como la búsqueda de biomarcadores predictores de la aparición de reacciones sistémicas durante la inmunoterapia con veneno de abeja.

En nuestro estudio se puso de manifiesto que la IgE frente a Api m 4 se comportaba como un biomarcador candidato de riesgo para las reacciones por inmunoterapia, y que los pacientes que estaban sensibilizados, incluso débilmente (0,1KU/L), presentaban reacciones con mayor frecuencia que los que no lo estaban (Tabla 2). La sensibilización intensa frente a Api m 1 o Api m 2 se comportó como un factor de riesgo para que estas reacciones sistémicas frente a la inmunoterapia fueran de mayor gravedad (incluyen inestabilidad hemodinámica o ventilatoria) (27).

Por otra parte, una vez que se demostró que existían diferentes perfiles de pacientes alérgicos al veneno de abeja quisimos saber cómo se comportaban dos poblaciones cuya

diferencia radicaba en los niveles de IgE a Api m 4 en términos de seguridad y eficacia de la inmunoterapia, mediante la utilización de extractos alérgicos adaptados al perfil de sensibilización. Establecimos el punto de corte en el valor de 0,98 kU/L que fue el resultante de la mediana de una población piloto representativa de nuestra área. Los pacientes con IgE a Api m4 \geq 0,98 kU/L se catalogaron como Fenotipo B, recibiendo extracto acuoso completo Pharnalgen®, y a los pacientes del fenotipo A con IgE a Api m4 $<$ 0,98 kU/L se les asignó el extracto acuoso purificado Aquagen®, un extracto deplecionado de la fracción de más bajo peso molecular como la melitina. Resultó que los pacientes del fenotipo B (altos respondedores a Api m 4) se caracterizaron, entre otras, por una mala tolerancia a la inmunoterapia (tasa de reacciones sistémicas 41%) y una peor tasa de éxito de la misma (eficacia 82%), pero no tuvieron una respuesta inmunológica (intradermorreacción, IgE e IgG4) a la inmunoterapia diferente de lo esperable. Por lo que la IgE frente a Api m 4, se comportó como un indicador fenotípico individual, capaz de discriminar gravedad de la enfermedad y respuesta a la inmunoterapia (39).

Tabla 2. Valores de IgE específica (kU/l) según presencia de reacciones sistémicas.

IgE (kU/l)	R.SISTEMICAS	N	MEDIAN	Q3	P VALUE
Api m1	SI	19	21.96	83.6	0.2140
	NO	50	5.20	21.0	
Api m2	SI	19	4.47	10.7	
	NO	50	1.81	16.4	
Api m4	SI	19	1.78	5.4	
	NO	50	0.29	0.8	

Toda esta información puede ser manejada en la clínica, identificando a priori pacientes que muy probablemente van a tener reacciones sistémicas con la inmunoterapia y adecuando las condiciones de administración para proporcionar una mayor seguridad.

Conclusiones

El diagnóstico por componentes es una pieza clave para el fenotipado de pacientes con alergia al veneno de himenópteros, así como para la elección de la inmunoterapia.

Dejando claro que no todos los pacientes alérgicos a veneno de himenópteros son iguales y que no a todos se les debe ofrecer la misma solución. Una vez conocida la relevancia clínica de algunos alérgenos del veneno de abeja, se hace incuestionable la necesidad para el diagnóstico habitual de los pacientes, y también parece obvio que su contenido en los extractos inyectados con fines terapéuticos debería ser conocido, cuantificado y controlado en todos los lotes.

Bibliografía

1. Alfaya Arias T, Soriano Gómis V, Soto Mera T, Vega Castro A, Vega Gutiérrez J, Alonso Llamazares A, et al. Key Issues in Hymenoptera Venom Allergy: An Update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017 Feb;27(1):19–31.
2. Ferrer M, Sanz ML, Sastre J, Bartra J, del Cuviillo A, Montoro J, et al. Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 Suppl 1:19–24.
3. Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015 May;15(5):26.
4. Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy*. 2009/01/06. 2009;64:543–8.
5. Serrano Delgado P. Sensibilización a alérgenos minoritarios de *Olea europea* como causa de reacciones sistémicas por inmunoterapia alérgeno-específica (doctoral Thesis). Córdoba (Spain): University of Córdoba. 2007;
6. Sastre J, Rodríguez F, Campo P, Laffond E, Marín A, Alonso MD. Adverse reactions to immunotherapy are associated with different patterns of sensitization to grass allergens. *Allergy*. 2015 May;70(5):598–600.
7. Quiralte J, Llanes E, Barral P, Arias de Saavedra JM, Saenz de San Pedro B, Villalba M, et al. Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. *Allergy*. 2005/02/01. 2005;60:360–5.
8. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, Palacin A, Vilella R, Picado C, et al. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy*. 2012/09/22. 2012;42(10):1529–39.
9. Monsalve RI, Vega A, Marques L, Miranda A, Fernandez 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*. 2012/01/11. 67(4):528–36.
10. Vos B, Kohler J, Muller S, Stretz E, Rueff F, Jakob T. Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to *Vespula* venom. *J Allergy Clin Immunol*. 2012/09/26. 2013;131:1225–7.
11. Sanchez F, Blanca M, Fernandez J, Miranda A, Terrados A, Torres MJ, et al. Comparative study between European and American species of *Polistes* using sera from European sensitized subjects. *Clin Exp Allergy*. 1995 Mar;25(3):281–7.
12. Severino MG, Campi P, Macchia D, Manfredi M, Turillazzi S, Spadolini I, et al. European *Polistes* venom allergy. *Allergy*. 2006 Jul;61(7):860–3.
13. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000/11/04. 2000;123:99–106.
14. 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*. 2009/11/17. 2010;125(1):184–90 e1.

15. Schiener M, Hilger C, Eberlein B, Pascal M, Kuehn A, Revets D, et al. The high molecular weight dipeptidyl peptidase IV Pold 3 is a major allergen of *Polistes dominula* venom. *Sci Rep*. 2018;In press.
16. Müller UR. *Insect venoms*. Chem Immunol Allergy. Basel: KARGER; 2010;95:141–56.
17. Pantera B, Hoffman DR, Carresi L, Cappugi G, Turillazzi S, Manao G, et al. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Oct 13;1623(2–3):72–81.
18. 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 Mar;184:5403–13.
19. 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*. 2013/04/30. 2013;8(4):e62009.
20. Galindo-Bonilla PA, Galán-Nieto A, Alfaya-Arias T, García-Rodríguez C, de la Roca-Pinzón F, Feo-Brito F. Component-resolved diagnosis in vespid venom-allergic individuals. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015 Jul;43(4):398–402.
21. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Silar 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 May;129(5):1406–8.
22. 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)*. 2017 Jul 21;
23. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. [Internet]. Available from: <http://www.allergen.org/search.php?allergennname=&allergensource=Apis+mellifera&TaxSource=&TaxOrder=&foodallerg=all&bioname=>
24. 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 May;133:1383–9, 1389–6.
25. Soldatova LN, Cramer R, Gmachi 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 May;101:691–8.
26. Paull BR, Yunginger JW, Gleich GJ. Melittin: an allergen of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1977/04/01. 1977;59(4):334–8.
27. 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 Feb;114(4):350–2.
28. Grunwald T, Bockisch B, Spillner E, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW. Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:848–54.
29. Van Vaerenbergh M, De Smet L, Rafei-Shamsabadi D, Blank S, Spillner E, Ebo DG, et al. IgE recognition of chimeric isoforms of the honeybee (*Apis mellifera*) venom allergen Api m 10 evaluated by protein array technology. *Mol Immunol*. 2015 Feb;63(2):449–55.

30. 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*. 2011/06/11. 2011;66:1322–9.
31. 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. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*; 2011 Jul;128:247–8.
32. Korošec P, Silar M, Zidarn M, Košnik M. Reply: To PMID 22277204. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Sep;130(3):818–9.
33. 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 Jul;130(1):276–9.
34. et al. Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S. Reply. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(1):128:248.
35. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Eržen R, Zidarn M, et al. Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128:671–3.
36. 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.
37. 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*. 2010/05/15. 2010;125(6):1300–1307 e3.
38. Mertens M, Brehler R. Suitability of different glycoproteins and test systems for detecting cross-reactive carbohydrate determinant-specific IgE in hymenoptera venom-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156(1):43–50.
39. Ruiz B, Serrano P, Moreno C. IgE-Api m 4 Is Useful for Identifying a Particular Phenotype of Bee Venom Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(6):355–61.