ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Virginia
Rodríguez Vázquez

Tesis doctoral

Anafilaxia por Vespa velutina nigrithorax: estudio molecular y su aplicación clínica

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Investigación Clínica en Medicina

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
(EDIUS)

Tesis Doctoral

Anafilaxia por *Vespa velutina nigrithorax*: estudio molecular y su aplicación clínica

Virginia Rodríguez Vázquez

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO
EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

Doña Virginia Rodríguez Vázquez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

a) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
b) *En su caso, en la tesis se hace referencia, a las colaboraciones que tuvo en este trabajo.*
c) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
d) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mi para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, a 16 de diciembre de 2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA Y TUTORA DE LA TESIS

Anafilaxia por *Vespa velutina nigrithorax*: estudio molecular y su aplicación clínica

Dª Carmen Vidal Pan

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dª Virginia Rodríguez Vázquez, bajo mi dirección y tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne os requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 16 de diciembre de 2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Doña Virginia Rodríguez Vázquez,

Declara no tener ningún conflicto de interés en relación con esta tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 16 de diciembre de 2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

A mi directora, Prof. Dra. Carmen Vidal Pan, por haberme dado la oportunidad de hacer esta tesis bajo su supervisión. Gracias por tu paciencia, colaboración y apoyo.

A todos los compañeros que han trabajado o trabajan actualmente en el Servicio de Alergología del CHUS, por su participación en el desarrollo de esta tesis y, sobre todo, por su amistad todos estos años.

A mis padres, por su sacrificio y dedicación a la familia.

Por último, quiero dar mi agradecimiento a los pacientes, los verdaderos protagonistas de nuestro trabajo y de este proyecto de investigación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Estructura general de la tesis y rol de la doctoranda

La presente memoria incluye 4 sub-estudios con el nexo común de profundizar en el conocimiento de la anafilaxia por el veneno de *Vespa velutina*. Los trabajos realizados investigan aspectos diagnósticos y terapéuticos de los pacientes que presentan esta expresión clínica de sensibilización alérgica. Los pacientes incluidos en cada estudio son diferentes a excepción del grupo de pacientes tratados con veneno de *Vespula spp*, algunos de los cuales presentan datos basales que fueron incluidos en el primer estudio.

Todos los estudios se realizaron en el Servicio de Alergología del Complejo Hospitalario de Santiago con participación del Laboratorio de Inmunología y apoyo puntual del Dr Rafael Monsalve (Investigación y Desarrollo, ALK, Madrid) y contaron con financiación del Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Santidad, PI16/1401 y PI19/01023, “Una manera de hacer Europa”) y de la Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica, siendo la investigadora principal la directora de esta Tesis y participando la doctoranda como investigadora colaboradora.

La doctoranda ha participado activamente en la recogida de la información y análisis de los datos de todos los estudios y ha sido la responsable directa de los estudios realizados en el seguimiento de la inmunoterapia y todo lo relacionado con la activación de basófilos, siendo la autora preferente en las publicaciones relacionadas con estos aspectos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Aclaración sobre la terminología y abreviaturas específicas empleadas

CCD. Carbohidratos con reactividad cruzada (del inglés *Cross-reactive Carbohydrate Determinants*).

sIgE. IgE específica.

CAP. Método de laboratorio (no es un acrónimo) que hace referencia, en inglés, a la forma del dispositivo que fue adoptado como nombre por la casa comercial.

CRD. Cuaderno de Recogida de Datos.

TAB. Prueba (test) de activación de basófilos.

IECA. Inhibidores del Enzima Convertidora de la Angiotensina.

Nomenclatura de los componentes moleculares de los venenos de himenópteros:

Se presentan con las 3 primeras letras del género seguidas de la primera letra de la especie y el número de identificación de función o de orden de descubrimiento. Por ejemplo: Api m 1 (alérgeno mayor de *Apis mellifera* descubierto en primer lugar).

Cuando se trata de moléculas para diagnóstico obtenidas por tecnología recombinante, se presentan con "r" delante. Por ejemplo: rApi m 1.

Cuando se trata de moléculas para diagnóstico obtenidas de la fuente natural, se presentan con "n" delante. Por ejemplo: nVes v 2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resumen

Introducción. La *Vespa velutina* es una especie de himenóptero invasora procedente de Asia que, desde 2015, está provocando problemas de salud en nuestra población en forma de reacciones alérgicas graves. La falta de métodos diagnósticos y terapéuticos específicos condujo a la realización de los presentes estudios.

Objetivo general. Estudiar el perfil de sensibilización alérgico de los pacientes que habían padecido una reacción alérgica grave, anafilaxia, tras la picadura de *Vespa velutina*, tratando de identificar los componentes moleculares implicados y comprobar una posible respuesta terapéutica con el veneno de una especie próxima filogenéticamente.

Pacientes y Métodos. La Tesis se compone de 4 subestudios:

1. Estudio transversal de prevalencia de reconocimiento de IgE específica frente a venenos de himenópteros disponibles comercialmente en pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina*. Se recogieron las variables epidemiológicas y clínicas y se realizó mediante ImmunoCAP® la determinación de IgE total y específica frente a venenos de *Vespula vulgaris, Polistes dominula, Apis mellifera, Vespa crabro* y *Dolichovespula*; así como frente a sus componentes moleculares (rApi m 1, rApi m 5, rApi m 10, rVes v 1, rVes v 5, rPol d 5 y CCD) y los niveles de triptasa basal.
2. Estudio transversal de reconocimiento de IgE específica a *Vespa velutina* y sus componentes moleculares nVesp v 1 y nVesp v 5 unidas a ImmunoCAP® activados con estreptavidina. Estudios de inhibición recíproca entre *Vespa velutina* y *Vespula spp* como método de identificación de sensibilizante primario.
3. Estudio transversal de la capacidad biológica del veneno de *Vespa velutina* y sus componentes nVesp v 1 y nVesp v 5 medida mediante prueba de activación de basófilos con expresión de CD63 en la superficie de los mismos. Simultáneamente se realizó una revisión bibliográfica sobre la evidencia publicada con este método diagnóstico en la alergia al veneno de los himenópteros.
4. Estudio longitudinal de seguimiento de los cambios inmunológicos (IgE e IgG4 específicas) inducidos por el veneno de *Vespula spp* administrado a pacientes con anafilaxia por Vespa velutina.

Resultados. Con un punto de corte de 0.35 kU_A/L, el 100% de los pacientes presentan IgE positiva frente a *Vespula spp,* reconociendo principalmente rVes v 5. El componente molecular en *Apis mellifera* que es reconocido con más frecuencia es Api m 5, equivalente a Ves v 3 en los véspidos. Existe una muy buena correlación entre *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5, con *Vespula spp*, Ves v 1 y Ves v 5, respectivamente. El veneno de *Vespula spp* inhibe la unión a la IgE del veneno de *Vespa velutina* por lo que *Vespula spp* se presenta como el sensibilizante primario. De los componentes moleculares de *Vespa velutina*, nVesp v 5 es el alérgeno mayor pues se detecta en más del 50% de la muestra. Por su parte, nVesp v 1, al contrario de lo que sucede con otras fosfolipasas A1 de venenos de himenópteros, es una molécula glicosilada. Respecto a la actividad biológica medida por medio de la expresión de CD63, tanto *Vespa velutina* como nVesp v 1 y nVesp v 5 son capaces de activar los basófilos, siendo mayor el

USC DE COMPOSTELA

porcentaje de activación conseguido por el veneno completo. Por último, la inmunoterapia con veneno de *Vespula spp* administrada a los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* inducen cambios en los niveles de IgE (disminución) e IgG4 específica (aumento) que son más evidentes a los 12 meses de tratamiento.

Conclusión general. Los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* presentan un elevado grado de reactividad cruzada con el veneno de *Vespula spp* que es, hasta la fecha, el sensibilizante primario, produciendo la inmunoterapia con *Vespula spp* cambios inmunológicos significativos en los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina*.

Palabras clave

Anafilaxia. IgE. *Vespa velutina. Vespula spp.* Componentes moleculares. Estudios de inhibición. Activación de basófilos. CD63. IgG4. Inmunoterapia específica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

Declaración de la autora de la tesis	III
Autorización de la directora y tutora de la tesis	V
Conflicto de interés de la autora	VII
Agradecimientos	IX
Estructura general de la tesis y rol de la doctoranda	XI
Aclaración sobre la terminología y abreviaturas empleadas	XIII
Resumen	XV
Índice	XVII
Índice de Figuras	XX
Índice de Tablas	XXI
Introducción	1
1. Los véspidos: una aproximación entomológica	3
2. *Vespa velutina nigrithorax*: una especie invasora	4
2.1. Ciclo biológico	5
2.2. Expansión de la *Vespa velutina* y sus consecuencias	7
3. Las picaduras de los himenópteros como causa de enfermedad	12
3.1. Tipos de manifestaciones clínicas tras la picadura de los himenópteros	12
3.2. Prevalencia de las reacciones adversas al veneno de los himenópteros	14
3.3. Historia natural y factores de riesgo en las reacciones por picaduras de himenópteros	15
3.4. Datos diferenciales en las picaduras que orientan al himenóptero implicado en la reacción	16
3.5. Componentes moleculares alergénicos del veneno de los himenópteros y detección de IgE específica frente a los mismos	18
3.6. No disponemos de IgE específica frente a *Vespa velutina* ni sus componentes moleculares	20
3.7. Se ha identificado el transcriptoma de *Vespa velutina* pero no se han identificado las moléculas alergénicas ni se dispone de vacuna para tratar a los pacientes	20
3.8. La prueba de activación de basófilos como método diagnóstico	20
4. Tratamiento específico de la alergia al veneno de los himenópteros: inmunoterapia	21
4.1. Elección del veneno	22

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2. Seguimiento de los pacientes 22
Justificación 25
Objetivos 29
Pacientes, Material y Métodos 33
1. Estudio del perfil de sensibilización de pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* y su comparación con el perfil de pacientes con anafilaxia debida al veneno de otros himenópteros 35
1.1. Determinaciones 35
1.1.1. Cuaderno de recogida de datos (CRD) 35
1.1.2. Estudios de laboratorio 36
2. Identificación de Vesp v 1 y Vesp v 5 como alérgenos en la sensibilización al veneno de *Vespa velutina* 37
2.1. Determinaciones 37
2.1.1. Cuaderno de recogida de datos (CRD) 37
2.1.2. Estudios de laboratorio 38
3. Identificación de la actividad biológica del veneno de *Vespa velutina* y sus componentes moleculares Vesp v 1 y Vesp v 5 mediante la prueba de activación de basófilos 39
3.1. Revisión de la utilidad de la prueba de activación de basófilos en el diagnóstico de la alergia al veneno de los himenópteros aplicado al seguimiento de la inmunoterapia específica con estos alérgenos 39
3.2. Metodología empleada en la prueba de activación de basófilos como medida de actividad biológica del veneno de *Vespa velutina* y sus componentes moleculares 40
4. Seguimiento de la sensibilización mediada por IgE de los pacientes con anafilaxia por veneno de *Vespa velutina* y tratados con veneno de *Vespula* spp como medida de control de la respuesta inmunológica 42
4.1. Administración de inmunoterapia 42
4.2. Estudios de seguimiento de laboratorio 43
5. Análisis de los datos: estudio estadístico aplicado en los sucesivos estudios 43
6 Aspectos éticos y financiación 44
Resultados 45
1. Estudio del perfil de sensibilización de pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* y su comparación con el perfil de pacientes con anafilaxia debida al veneno de otros himenópteros 47
1.1. Datos clínicos 48
1.2. Estudios de laboratorio 48
2. Identificación de Vesp v 1 y Vesp v 5 como alérgenos en la sensibilización al veneno de *Vespa velutina* 52

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Identificación de la actividad biológica del veneno de *Vespa velutina* y sus componentes moleculares Vesp v 1 y Vesp v 5 mediante la prueba de activación de basófilos	**56**
3.1. Revisión de la utilidad de la prueba de activación de basófilos en el diagnóstico de la alergia al veneno de los himenópteros aplicado al seguimiento de la inmunoterapia específica con estos alérgenos	**57**
3.2. La prueba de activación de basófilos como medida de actividad biológica del veneno de *Vespa velutina* y sus componentes moleculares	**59**
4. Seguimiento de la sensibilización mediada por IgE de los pacientes con anafilaxia por veneno de *Vespa velutina* y tratados con veneno de *Vespula* spp	**64**
Discusión	**67**
1. **Perfiles de sensibilización de los pacientes**	**69**
2. Actividad biológica de *Vespa velutina* y sus componentes, Vesp v 1 y Vesp v 5, medida por activación de basófilos y utilidad general en el seguimiento de la alergia al veneno de los himenópteros	**71**
3. Evaluación de la gravedad clínica y seguimiento de la inmunoterapia específica	**72**
4. **Fortalezas y limitaciones del estudio**	**74**
Conclusiones	**77**
Bibliografía	**81**
Anexos	
Anexo I: Vía rápida de anafilaxia por veneno de himenópteros	**93**
Anexo II: Consentimiento Informado	**97**
Anexo III: Cuaderno de Recogida de Datos (CRD)	**103**
Anexo IV: Autorización del Comité Ético de Investigación de Galicia	**109**
Anexo V: Listado de verificación STROBE	**113**
Publicaciones	**117**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de Figuras

Figura 1. Variantes de coloración de *Vespa velutina*	4
Figura 2. Imagen de sendos ejemplares (macho y hembra) de Vespa velutina	5
Figura 3. Fotografía original de un nido secundario	6
Figura 4. Número de nidos de *Vespa velutina* identificados y retirados (2015-2018)	8
Figura 5. Recomendaciones para atrapar ejemplares de *Vespa velutina*	10
Figura 6. Cartel informativo de la Xunta de Galicia	11
Figura 7. Imagen de la forma del aguijón de abejas y avispas	17
Figura 8. Diferentes tipos de nidos construidos por véspidos	18
Figura 9. Diagrama de flujo de la selección de revisión bibliográfica	40
Figura 10. Porcentaje de pacientes con anafilaxia por Vespa velutina con sIgE positiva a venenos de himenópteros	49
Figura 11. Porcentaje de inhibición de la unión de seuro al ImmunoCAP *de Vespa velutina*, Vesp v 5 y Vesp v 1 por el veneno de *Vespula* spp	54
Figura 12. SDS-PAGE teñido para detectar glicoproteínas	55
Figura 13. Representación y datos del porcentaje de activación de la expresión de CD63 en la superficie de los basófilos tras la exposición a Vespa velutina, Vesp v 1 y Vesp v 5.	60
Figura 14. Imagen del citómetro con resultados de 3 pacientes con distinto perfil de activación	63
Figura 15. Evolución de la sIgE y sIgG4 frente al veneno de Vespula spp y Vespa velutina tras inmunoterapia	64

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de Tablas

Tabla 1. Gravedad de la anafilaxia según Mueller	13
Tabla 2.Componentes alergénicos identificados en *Apis mellifera, Vespula vulgaris* y *Polistes dominula*	19
Tabla 3. Gravedad de la anafilaxia (adaptada de Brown)	36
Tabla 4. Cálculo del riesgo de padecer un síndrome de activación mastocitaria (REMA)	37
Tabla 5. Cuadro resumen de los reactivos utilizados en el TAB con Basotest-kit©	41
Tabla 6. Concentraciones del veneno *Vespa velutina* y sus componentes moleculares	42
Tabla 7. Datos clínicos de los pacientes estratificados por el insecto responsable	49
Tabla 8. Resultados de laboratorio de los pacientes en función del insecto responsable	50
Tabla 9. Cociente sIgE e IgE total en los pacientes del estudio	51
Tabla 10. Estudios de la inhibición de la unión de la IgE en 5 pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina*	53
Tabla 11.Estudios de la inhibición de la unión de IgE a Vesp v 1 por CCD	52
Tabla 12.Resultados del laboratorio y datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio de TAB	59
Tabla 13.Resultados individuales de la prueba de TAB con el veneno de *Vespa velutina* y sus componentes moleculares	61

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Los véspidos: una aproximación entomológica

Los himenópteros, pertenecientes al filo artrópodos, son animales invertebrados caracterizados por tener extremidades articuladas, cuerpo con exoesqueleto o cutícula y segmentos repetitivos. La clase predominante en los artrópodos son los insectos que, además, son los organismos con mayor variedad de especies en el planeta. Por último, dentro de la clase de los insectos, se encuentra el orden Hymenoptera, cuyo término procede del griego "*hymen*" (membrana) y "*pteros*" (alas), y el suborden apocrita que incluye a las abejas (Apoidea), las avispas (Vespoidea) y las hormigas (Formicidae), consideradas como las formas más avanzadas de himenópteros. Característicamente, presentan una estrecha cintura entre los dos segmentos del abdomen, el primero de los cuales está unido al tórax [Aguiar et al., 2013]. Múltiples variaciones morfológicas definen las más de 125.000 especies de himenópteros [Brusca & Brusca, 2005].

Los himenópteros sociales viven en colonias altamente organizadas, con tres tipos de individuos o castas diferenciadas tanto morfológicamente como por su comportamiento: los zánganos (machos), la reina y las obreras (hembras). La reina, diploide, es el único individuo fecundo en la colonia y es capaz de producir progenie tanto diploide fértil (reina) como infértil (obreras), y haploide (zánganos). Los cambios de conducta en la colonia se rigen por diferentes estímulos que pueden ser químicos, las feromonas, o visuales, por ejemplo, la danza de las abejas para indicar la dirección del alimento.

En España, y en general en toda Europa, la superfamilia Vespoidea está representada por los cuatro géneros: *Polistes*, *Vespula*, *Dolichovespula* y *Vespa,* con una distribución geográfica diferente para cada una de ellas.

Las avispas del género *Polistes* se les conoce vulgarmente como "tabarros". Viven en pequeñas colmenas o *tabarreras* de decenas de individuos, localizadas en tejados o en los alrededores de charcas o piscinas. La especie que predomina en España es *Polistes dominula*, siendo muy común su presencia en el Sur de nuestro país. Es interesante destacar que pueden coexistir varias especies de avispas de este género en una misma tabarrera [Ortiz, 2013].

En el Centro y Norte de Europa y en nuestra Comunidad Autónoma, la avispa del género *Vespula* es la más frecuente. Existen muchas especies, siendo *Vespula germánica* la mejor estudiada. Viven en colmenas denominadas "terrizos" por ser frecuentes su localización bajo tierra. En cada nido o colmena pueden convivir miles de individuos.

En el género *Vespa* cabe destacar la presencia de *Vespa crabro* o avispón europeo que suele habitar en zonas de mayor altitud y, habitualmente, construye sus colmenas en troncos huecos y, por último, la protagonista de la presente Tesis Doctoral, la *Vespa velutina nigrithorax.*

Conviene destacar, en este punto, que los véspidos son carnívoros, especialmente sus larvas, y las especies del género *Vespa* son depredadoras, llegando a atacar a otros himenópteros y explicando el comportamiento agresivo de estos himenópteros respecto a otros insectos.

USC UNIVERSIDADE

Desde un punto de vista alergológico, los véspidos son importantes por causar reacciones a sujetos que sufren sus picaduras por el hecho de que, al hacerlo, inyectan

en la piel parte o la totalidad del veneno que llevan en sus sacos. Estos venenos, como se verá más adelante, contienen sustancias tóxicas algunas de las cuales son proteínas frente a las que los pacientes podrían estar sensibilizados, pudiendo provocar en ellos reacciones exageradas e, incluso, la muerte.

2. *Vespa velutina nigrithorax*: una especie invasora

La *Vespa velutina nigrithorax* (en adelante, *Vespa velutina*) es conocida popularmente como avispón asiático (del inglés "Asian hornet"), avispa depredadora asiática, o avispón de patas amarillas. Es una especie invasora en nuestro país, procedente del Sureste de Asia, una región de clima tropical que comprende el norte de India, Pakistán, China, Taiwan, Tailandia, la península de Indochina y las islas de Indonesia. El entomólogo francés Amédée Louis Michel Lepeletier [van der Vecht, 1959; Haxaire et al., 2006; Villemant et al., 2006; Rome et al., 2011; Rome et al., 2012; Archer, 2012; Vidal, 2021] fue el primero en describirla en 1836. En su honor se la conoce como *Vespa velutina* Lepetelier. Se han identificado múltiples variantes con diferente color en distintas regiones de Asia y esto ha motivado su clasificación como subespecies. En la Figura 1 se presenta la distinta distribución geográfica de algunas de ellas.

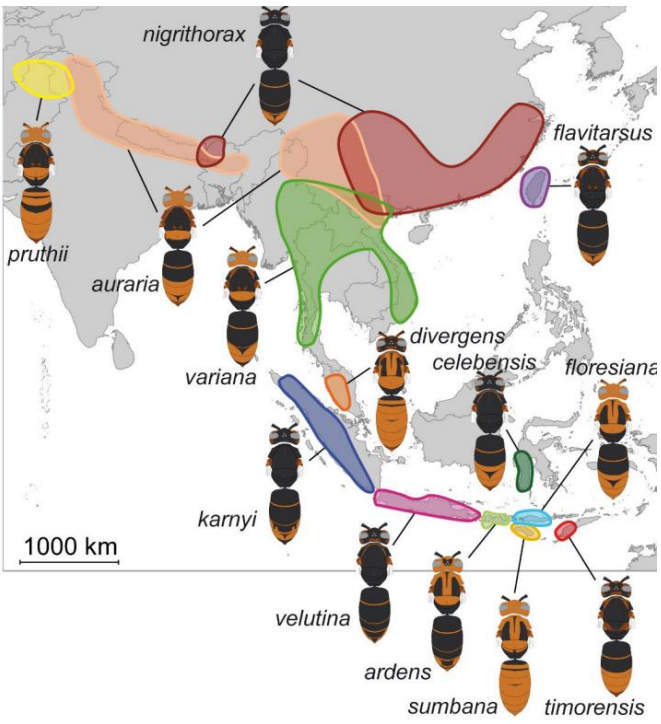


Figura 1. Variantes de coloración de *Vespa velutina* (imagen tomada de [Perrard et al., 2014]. Creative Commons Attribution 4.0 International License).

Las variaciones en la coloración de sus segmentos se consideran una señal aposemática visual que las especies emplean para advertir a sus depredadores potenciales. En las avispas los patrones de color de los segmentos van desde las bandas claras en amarillo o naranja a oscuras hasta negras. Estas variaciones no son debidas a diferencias

climatológicas, geográficas o moleculares, sino que están determinadas por genes con influencia ambiental [Perrard et al., 2014].

La variante que causó la invasión europea es la *Vespa velutina* du Buysson 1905, que fue vista por primera vez en el suroeste de Francia en 2005, [Haxaire et al., 2006; Villemant et al., 2006] y de ahí se ha ido expandiendo por el resto de Europa.

La *Vespa velutina* tiene un tamaño mayor que las avispas comunes del género *Vespula* y *Polistes*, pero es menor que el avispón europeo o *Vespa crabro.* Tiene unas patas amarillas distintivas, una cabeza negra con cara naranja-amarilla, y un tórax aterciopelado marrón oscuro, casi negro. El abdomen es marrón, con segmentos delimitados por una fina banda amarilla en la parte dorsal, menos definida en la parte ventral, y con un último segmento casi totalmente naranja-amarillo (Figura 2).

Figura 2. Imagen de sendos ejemplares (macho y hembra) de *Vespa velutina* (imágenes cedidas por Don Antonio Martínez Pernas)

2.1. Ciclo biológico

Las avispas asiáticas son insectos sociales que viven en colonias de varios cientos a miles de individuos, con un sistema social basado en castas, y compuesto de reinas, obreras y machos [Feás & Charles, 2019]. Cada colonia se forma de una única reina fundadora y desaparece con su fallecimiento en la época invernal.

Su ciclo biológico comienza cuando una reina fundadora apareada sale de su hibernación en los primeros días calurosos de la primavera. La reina construye un pequeño nido primario con pulpa de madera y hojas, en un lugar protegido para asegurar una temperatura adecuada y la proximidad a una fuente de alimento [Feás & Charles, 2019], siendo las abejas de la miel la dieta fundamental de las larvas de la avispa asiática [Muller et al., 2009]. Después de cuatro o cinco semanas, apenas una veintena

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

de las primeras obreras emergen y construyen un nido secundario, que se localiza generalmente en la copa de los árboles, aunque puede estar en zonas más bajas e incluso enterrados y en hábitats urbanos [López et al., 2011; Choi et al., 2012; Monceau et al., 2012]. Este nido con forma esférica tiene una salida única lateral, un tamaño de hasta medio metro, y está habitado por 1000-1500 obreras (Figura 3). A finales del verano, salen las hembras (100-300) y los machos. Cada reina es apareada por uno o dos machos, almacenando los espermatozoides en su abdomen para, en su momento, poner cientos de huevos fertilizados. Las hembras fecundadas, que son las futuras reinas, abandonan el nido al final del verano, y comienzan su hibernación en solitario o en pequeños grupos, aprovechando cavidades o grietas. En otoño, la actividad del nido cesa, y los individuos fallecen, si bien un estudio reciente mostró la presencia de individuos vivos de todas las castas, así como crías y huevos, en algunos de estos nidos [Feás et al., 2019]. Esta evolución de nidos primario y secundario explica la recomendación de retirar los nidos secundarios en invierno para deshacerse de la colonia residual, y se evite un posible rebrote durante la siguiente primavera [Kennedy et al., 2018].

Cada colonia tiene un territorio de presa, con un radio de acción alrededor de su nido de unos 700 metros, en la época de mayor actividad [Sauvard et al., 2018]. La distancia habitual entre los nidos es de unos 250 metros, pero puede ser menor si la zona es favorable para el desarrollo de la especie [Monceau & Thiéry, 2017].

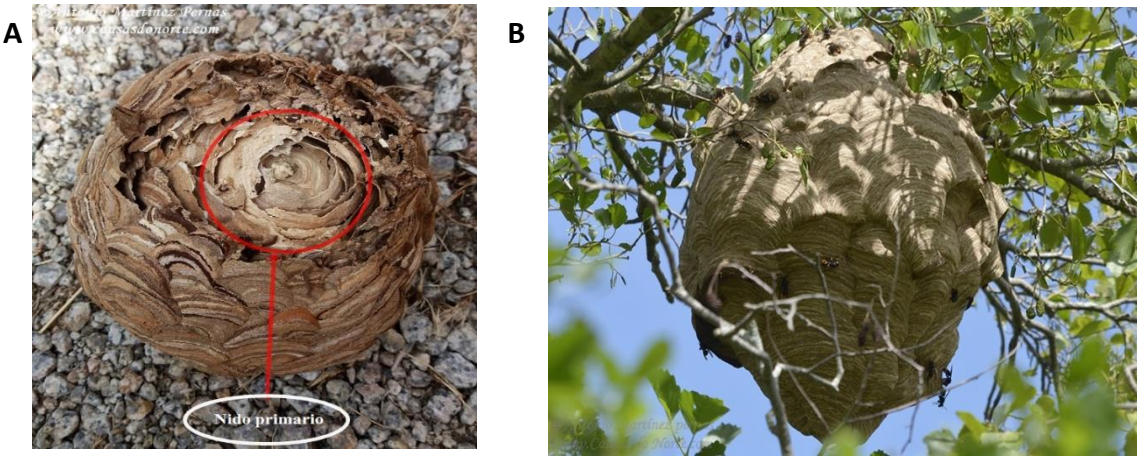


Figura 3. Fotografía original de un nido secundario con su nido primario central (A) y un nido ubicado a gran altura en un árbol (B) (imágenes cedidas por Don Antonio Martínez Pernas)

La capacidad para aprender, memorizar y comunicarse es otra de las claves del éxito de los avispones. Poseen un elaborado y eficiente mecanismo de comunicación química con un gran repertorio de señales olfativas relacionadas con aspectos del comportamiento como el reconocimiento de individuos, el cuidado de la cría, la defensa o el forrajeo [Couto et al. 2014].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2. Expansión de la *Vespa velutina* y sus consecuencias

Desde China, la *Vespa velutina* se introdujo, accidentalmente, en Corea del Sur en 2003 [Kim et al., 2006; Choi et al., 2012], en Europa en 2004 [Haxaire et al., 2006] y en Japón en 2010 [Minoshima et al., 2015]. La incursión en Europa parece ser resultado de la importación accidental de China de una reina fundadora hibernando en una cerámica o en productos de horticultura [Villemant et al., 2006; Arca et al., 2015].

El primer registro de la presencia de *Vespa velutina* en Francia corresponde a la región de Bordeaux en el año 2004. A finales del 2011 se había confirmado su presencia en el 50% de las 101 regiones existentes [Rome et al., 2012] y en 2015, la *Vespa velutina* se había extendido por prácticamente por todo el país. En el año 2011 se publicó un modelo de la posible futura invasión de *Vespa velutina*, prediciendo que muchos países de la Europa occidental tenían una alta probabilidad de invasión, con mayor riesgo el Atlántico y la costa norte del Mediterráneo [Villemant et al., 2011]. De hecho, desde Francia se propagó por los valles fluviales y carreteras a una velocidad de 80 km por año [van der Brempt, 2022], alcanzando España en 2010 [Castro & Pagola-Carte, 2010], Portugal [Grosso-Silva & Maia, 2012] y Bélgica [Rome et al., 2013] en 2011, Italia en 2012 [Bertolino et al., 2016], Alemania en 2014 [Witt, 2015], Inglaterra en 2016 [Budge et al., 2017; Keeling et al., 2017], Países Bajos en 2017 [Monceau et al., 2017; Smit et al., 2018], y Luxemburgo en 2020 [Carvalho et al., 2020]. Además de la dispersión natural, se han documentado casos de nuevas y reiteradas introducciones accidentales a través del transporte humano, por vía marítima y terrestre dentro de Europa continental e insular.

En España la primera vista confirmada se realizó en agosto de 2010 en Amaiur, población de la comarca Navarra del Baztán [Castro & Pagola-Carte, 2010]. Ese mismo año fue detectada, también, en el País Vasco, en Guipúzcoa [López et al., 2011]. En Cataluña se avistó en 2012, en particular en la comarca de la Garrotxa y L'Alt Empordà, y en Cantabria y Asturias en 2014. Desde la cornisa cantábrica, se ha extendido hacia el oeste y meridionalmente, e incluso se han encontrado individuos en las islas Baleares [Leza et al., 2018]. Las dos primeras colonias en Galicia fueron encontradas simultáneamente en 2012 en la zona de Burela y O Rosal [Feás & Charles, 2019]. En 2013 se localizaron 17 nidos, 769 en 2014 y desde entonces ha habido un crecimiento exponencial, retirándose en 2019 aproximadamente 25000 nidos dispersos por toda la comunidad [Feás, 2021] (Figura 4).

La colonización en Europa ha podido ser por una sola hembra fecundada por varios machos, según se deduce de los estudios genéticos realizados [Arca et al., 2015]. Los especímenes europeos muestran características genéticas comunes, y sitúan a sus progenitores en las provincias de Zhejiang y Jiangsu al sureste de China. En general, cualquier zona del mundo con clima idóneo puede ser colonizable por *Vespa velutina*, si está abierta al comercio internacional [Keeling et al., 2017; Villemant et al., 2011], debido a que es habitual que las reinas se resguarden en infraestructuras humanas o mercancías. Las introducciones accidentales son abundantes pero pocas poblaciones se establecen y llegan a considerarse invasoras, es decir, producir impactos para la biodiversidad (Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad). El intercambio comercial sigue permitiendo la entrada de otras especies

USC DE COMPOSTELA

de himenópteros invasores, como se ha descrito recientemente con *Vespa orientalis* en Francia y sur de España [Brunet et al., 2022; Hernández et al., 2013].

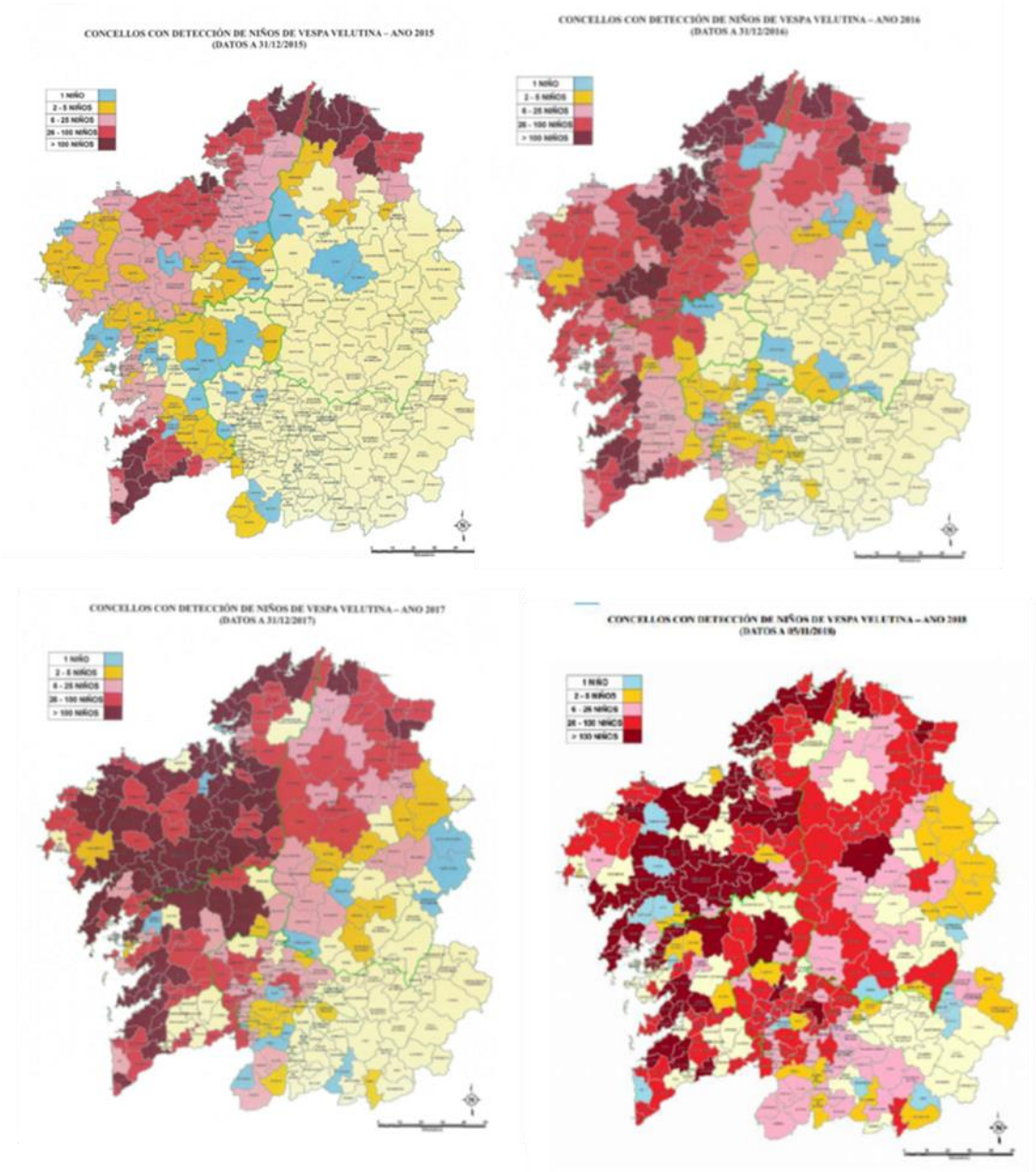


Figura 4. Número de nidos de *Vespa velutina* identificados y retirados entre 2015 y 2018. http://mediorural.xuntua.gal/es/areas/ganaderia/apicultura/vespa_velutina/ (acceso libre Xunta de Galicia)

Las especies exóticas invasoras constituyen la segunda causa de la pérdida de biodiversidad en el mundo, tras la modificación del entorno. La Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad, define una especie exótica invasora como "*aquella que se introduce o establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural y que es un agente de cambio y amenaza para la diversidad biológica nativa, ya sea por su comportamiento invasor, o por el riesgo de contaminación genética*". Se ha incluido a la *Vespa velutina* en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras (Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto), y desde 2016 también en Europa, en el Listado de especies foráneas invasoras, lo que implica que "l*as especies no pueden ser importadas, criadas, transportadas, comercializadas, o intencionalmente liberadas en el entorno de la Unión Europea*".

Las principales consecuencias de la invasión de *Vespa velutina* son:

a) **Ecológica,** por su capacidad depredadora de los insectos polinizadores y de modificar la biodiversidad. La fuente proteica principal para las larvas de *Vespa velutina* son los himenópteros y los dípteros, mientras que recurren a azúcares como frutas maduras y néctar para cubrir sus necesidades energéticas [Muller et al., 2009]. Al igual que otros insectos invasores sociales, son muy eficientes por su gran plasticidad en el comportamiento gracias a sus habilidades cognitivas y de comunicación [D´Adamo & Lozada, 2011] lo que, como ya se ha comentado, les confiere mecanismos de defensa que les ayudan a sobrevivir [Couto et al., 2014]. Los odorantes más atractivos para *Vespa velutina* son la miel, el polen y el geraniol según se desprende del comportamiento de su en condiciones experimentales [Couto et al., 2014].
b) **Económica,** por su influencia en la actividad apícola y, posiblemente, en la agricultura. Debido a la depredación de abejas, la *Vespa velutina* ha producido un importante efecto en la industria apicultora. Una sola avispa puede capturar entre 25 a 50 abejas por día, atrapando inicialmente a las obreras, para después entrar a la colmena y proceder a la captura de las crías y a alimentarse de la propia miel. La *Vespa velutina* podría ser responsable de la pérdida de hasta un 65% de las colonias de abejas melíferas en zonas invadidas [Fedele et al. 2019]. Los niveles de depredación son más altos en la mañana y por la tarde, correspondiente al ritmo diario de los vuelos de las abejas. Además de su ataque directo, la *Vespa velutina* ha producido un cambio en el comportamiento de las colonias, que pasan menos tiempo alimentándose de néctar, conduciendo a un menor transporte de polen, por temor a ser víctimas de la *Vespa velutina* [Tan et al., 2013]. Menos se conoce del papel de la *Vespa velutina* sobre la polinización y su efecto en los productos agrícolas, pero se han señalado daños importantes en algunos cultivos de vid, manzana y arándanos, aunque estos efectos no se han cuantificado en términos económicos de una forma precisa [Jones et al., 2020].
c) **Sanitaria,** por los efectos de la inyección de veneno en las personas. La cepa importada en Europa no parece ser particularmente agresiva para el hombre [Villemant et al., 2006] y, así, se pueden observar los nidos a 4-5 metros de distancia sin riesgo de ataque. Sin embargo, y al igual que otros himenópteros sociales, pueden atacar en manada si perciben peligro para la supervivencia del nido.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El veneno de los himenópteros es una mezcla de compuestos de bajo peso molecular, péptidos y proteínas, que pueden actuar como feromonas, toxinas y alérgenos. Las feromonas de *Vespa velutina* que se liberan por las hembras para atraer a los machos homólogos favoreciendo la reproducción especie-específica [Cappa et al., 2019], no son peligrosas para los humanos [Cheng et al., 2017]. Los efectos de las toxinas son la principal causa de la mortalidad asociada a las picaduras de las avispas en China, especialmente cuando son múltiples [Xie et al., 2013]. Las toxinas de *Vespa velutina* se agrupan en 8 clases, siendo las neurotoxinas y las que alteran la hemostasia las más peligrosas. El efecto hemolítico es probablemente el principal factor letal del fallo multiorgánico producido por las picaduras de este himenóptero [Liu Z et al., 2015]. El fallo renal por necrosis tubular por rabdomiólisis o nefrotoxicidad aguda es más común tras picaduras múltiples de avispas [das RN & Mukherjee K, 2008; de Haro et al., 2010; Xie et al., 2013].

Consecuencia de todos estos efectos perjudiciales, se han desarrollado campañas específicas dirigidas a controlar, en la medida de lo posible, la expansión de este himenóptero [Jones et al., 2020; Leza et al., 2021]. Alguna de estas campañas en la Comunidad Autónoma de Galicia en donde este problema es, años tras año, más acuciante. En la Figura 5 y 6 se muestran dos ejemplos de este tipo de iniciativas.

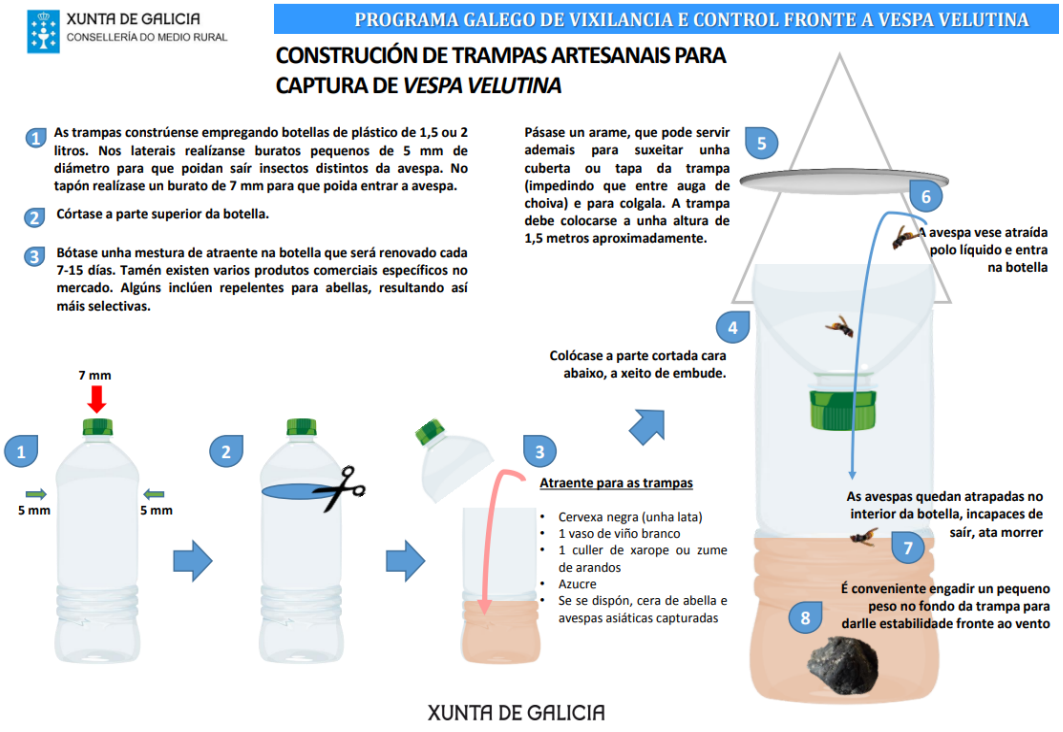


Figura 5. Recomendaciones para atrapar ejemplares de *Vespa velutina* distribuidos por la Xunta de Galicia (https://www.politecnicodesantiago.es/system/files/arquivos_dir/ficha_elaboracion_trampas_vespa_velutina.pdf) (acceso libre Xunta de Galicia)

Figura 6. Cartel informativo de la Xunta de Galicia (Convenio Xunta de Galicia con FEGAMP -Federación Gallega de Municipios y Provincias-) (acceso libre Xunta de Galicia).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Las picaduras de los himenópteros como causa de enfermedad

La inyección por parte del himenóptero del veneno que lleva en su saco puede producir reacciones diversas en los sujetos.

3.1. Tipos de manifestaciones clínicas tras la picadura de los himenópteros

Las principales formas o fenotipos de reacciones adversas tras la inyección del veneno de un himenóptero son:

a) **Reacciones locales normales.** Se trata de reacciones de inflamación y edema bien delimitado que se presenta en individuos no sensibilizados. Suele tratarse de reacciones de un tamaño inferior a 10 cm de diámetro mayor que tiende a ceder en 24-48 horas, aunque, si afecta a tejidos profundos y especialmente en las extremidades, puede ser más duradera. Es una reacción que se produce como consecuencia del contacto con los componentes vasoactivos del veneno.

b) **Reacciones locales extensas.** Son reacciones inflamatorias que superan los 10 centímetros de diámetro mayor, aparecen tras 12 a 24 h y persisten varios días. En cara y extremidades pueden ser muy intensas, pudiendo sobrepasar las articulaciones proximales en miembros e incluaAso afectarlas por completo. En estos casos, a los síntomas locales pueden acompañarlos otros como malestar, mareo, fiebre o escalofríos. El mecanismo es inmunológico, y se ha sugerido que es una reacción inflamatoria tardía dependiente de IgE, pues en casi el 90% de los pacientes se detecta IgE específica sérica a algún componente del veneno [Bilò et al., 2005; Tripolt et al., 2020]. Estas reacciones locales extensas no son graves, salvo que se localicen próximas al territorio orofaríngeo o en cuello, ya que en ese caso podrían producir un estrechamiento de la vía aérea. Los pacientes deben saber que tienen alta probabilidad de desarrollar nuevas reacciones locales extensas en sucesivas picaduras, pero no existe información concreta que permita deducir el riesgo de una reacción sistémica en futuras exposiciones. Algunos autores estiman que hasta un 15% de los pacientes con reacciones locales extensas podrían presentar una reacción sistémica [Bilò & Bonifazi, 2009]. Estudios en vida real analizando repicaduras espontáneas, eleva la cifra a un 24%, con un riesgo mayor en los pacientes con IgE positiva a *Apis mellifera* y *Vespula spp* detectada por prueba cutánea (OR 2.1 y 3.8, respectivamente) y, particularmente, si el resultado es positivo a la concentración de 0.001 µg/mL (OR 13.4 y 16.5, respectivamente) [Bilò et al., 2019a]. Otros autores, sin embargo, discrepan de estos resultados e indican un menor riesgo de producir reacción sistémica si el sujeto ha padecido previamente una reacción local aumentada [Pucci et al., 2015].

c) **Reacciones sistémicas alérgicas o mediadas por IgE.** Se trata de reacciones en la que los pacientes presentan síntomas más allá de la zona de la picadura, pudiendo llegar a provocar una anafilaxia, shock e incluso muerte. En la mayoría de los casos son reacciones mediadas por IgE, debido a alergia a los componentes del veneno [Bilò & Bonifazi, 2009]. En función del número de órganos afectados y la presencia o no de compromiso vital, las reacciones sistémicas se clasifican por grados de gravedad. Las dos clasificaciones más utilizadas son la clasificación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de Mueller (Tabla 1) y la clasificación de Brown (clasificación utilizada en la presente Tesis Doctoral, ver Sección de Pacientes, Material y Métodos, Tabla 3). Hasta el 25% de las reacciones sistémicas se clasifican como graves [Ruëff et al., 2009]. La gravedad se asocia al compromiso respiratorio o cardiovascular, siendo las principales causas de muerte el edema de vía respiratoria superior, el broncoespasmo, y el colapso cardiovascular. Los síntomas más frecuentemente referidos son los cutáneos (prurito, eritema, urticaria, angioedema), y están presentes en el 80% de los adultos, y más en niños [Bilò et al., 2019a]. Le siguen en frecuencia los síntomas respiratorios que aparecen en la mitad de las reacciones sistémicas [Bilò et al., 2005]. La hipotensión es la manifestación cardiovascular más frecuente. Se produce por la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular secundaria a la liberación de los mediadores si bien podría ser debida a la disminución del gasto cardiaco por la hipoxia secundaria a la obstrucción bronquial. El mareo, las palpitaciones y la opresión torácica preceden habitualmente a la pérdida de conocimiento y al shock. La ausencia de manifestaciones cutáneas o respiratorios complica el diagnóstico diferencial. Esta forma de presentación con síntomas cardiovasculares aislados es más frecuente en adultos que en niños, y en pacientes con síndrome de activación mastocitaria [Bilò et al., 2019a]. Otras complicaciones cardiovasculares son la hipertensión, debido a las catecolaminas endógenas, la isquemia cardiaca y diferentes alteraciones del ritmo. En un tercio de las reacciones sistémicas refieren síntomas gastrointestinales como náuseas, dolor abdominal, o diarrea, generalmente en el contexto de una anafilaxia y con otros síntomas acompañantes. Más raramente aparecen manifestaciones del sistema neurológico, en forma de parestesias, cefalea, o convulsiones, y se han descrito contracciones uterinas en mujeres, incluso con sangrado [Bilò et al., 2005]. Es importante la vigilancia de reaparición de los síntomas, entre 4-12 horas después de la resolución del evento, pues en hasta un 14 % de las anafilaxias por alergia por veneno de los himenópteros son bifásicas [Bilò MB, et al., 2019a; Dribin et al., 2020].

Tabla 1. Gravedad de la anafilaxia según Mueller [Mueller et al., 1996].

Clasificación de las reacciones anafilácticas según su gravedad
Grado I
Urticaria generalizada, prurito, ansiedad y malestar general
Grado II
Angioedema (por sí solo), o cualquiera de las anteriores más dos de las siguientes: opresión torácica, nauseas, vómitos, diarrea, mareo, dolor abdominal
Grado III
Disnea, broncoespasmo, estridor, o cualquiera de las anteriores más dos de las siguientes: disfagia, disartria, disfonía, debilidad, confusión, sensación de muerte inminente
Grado IV
Cualquiera de las anteriores más dos de las siguientes: hipotensión, shock, pérdida de conocimiento, incontinencia de esfínteres, cianosis. Exitus

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Un capítulo aparte lo constituyen las reacciones sistémicas por picaduras múltiples (más de 50 individuos) que son debidas a un efecto tóxico y no a una reacción alérgica.

3.2. Prevalencia de las reacciones adversas al veneno de los himenópteros

Entre un 56.6% y un 94.5% de la población recuerda haber sufrido al menos una picadura de un himenóptero en su vida [Bilò & Bonifazi, 2009]. Por definición, y de acuerdo con el mecanismo fisiopatológico implicado en las reacciones de alergia, los pacientes alérgicos deben tener IgE específica frente al alérgeno que se supone responsable de la reacción. Además, y para poder desarrollar IgE específica, los sujetos deben exponerse a la fuente alergénica para que, de esa forma, se pueda producir el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. En la alergia al veneno de los himenópteros, igual que sucede con cualquier otro tipo de alergia, es imprescindible una exposición previa que se traduce en la necesidad de haber sufrido alguna picadura previa. Esta picadura sería la responsable de la producción de IgE específica. Se consideraría causa necesaria pero, a la vez, no suficiente y explica la alta prevalencia de sensibilización o presencia de IgE que no es paralea a la significación clínica. De esta forma, la IgE podría considerase como un marcador de exposición pues solo los sujetos expuestos y que han sufrido esa picadura previa pueden llegar a reaccionar posteriormente a picaduras subsiguientes.

La prevalencia de determinación positiva de IgE frente a alguno de los componentes del veneno de los himenópteros se sitúa entre un 6 y un 20% de la población general por pruebas *in vivo o in vitro*, sin que haya presentado síntomas relevantes tras la picadura. Esta población se considera como "sensibilizados asintomáticos" [Schäfer & Przybilla, 1996; Nittner-Marszalska et al., 2004; Fernandez et al., 2005]. El riesgo de reacción entre la población con IgE positiva y la que no presenta esta sensibilización, es 9,5 veces mayor para la aparición de reacciones locales pero no se asocia a una mayor prevalencia de reacción sistémica [Sturm et al., 2014]. Tampoco se ha podido identificar factor alguno que permita predecir la aparición de una reacción futura en un paciente sensibilizado [Bilò & Bonifazi, 2009]. El aumento del nivel de IgE después de la picadura no fue un indicador de conversión en los sensibilizados asintomáticos, y las pruebas disponibles actualmente (pruebas cutáneas, IgE específica sérica, test de activación de basófilos) no pudieron distinguir entre sensibilización asintomática, y la aparición de reacción local extensa o reacción sistémica [Sturm et al., 2014]. La situación es aún más complicada cuando se analiza que hasta la mitad de los sujetos con reacciones sistémicas fatales no tenían antecedente documentado de alergia al mismo insecto [Bilò & Bonifazi, 2009; Xu et al., 2014; Mullins et al., 2016].

La alergia al veneno de los himenópteros es una causa frecuente de anafilaxia, ocupando el tercer lugar tras la alergia a los alimentos y a los medicamentos, en la mayoría de las series [Muraro et al., 2014; Grabenhenrich et al., 2016]. Se estima que entre un 0.3 y un 7.5% de la población adulta y un 3.4% de la población en edad pediátrica han padecido una reacción sistémica por alergia al veneno de los himenópteros [Bilò & Bonifazi, 2009]. En las últimas décadas se ha producido un incremento de las visitas a urgencias por anafilaxia debido a las picaduras de los himenópteros [Estelle et al., 2015], siendo culpables del 10-20% de los casos totales de anafilaxia, aunque en los registros europeos se sitúa próximo al 50% de los casos en adultos [Worm et al., 2014; Grabenhenrich et al., 2016].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La prevalencia global aumenta con el número de picaduras que recibe una persona, y así, en apicultores puede superar al 30 % de la población estudiada [García-Robaina et al., 1997; Ediger et al., 2018]. Las reacciones sistémicas son más frecuentes en población adulta que en joven y se ha observado una preponderancia del sexo masculino de aproximadamente 2:1 [Fernández et al., 2005; Golden et al., 2011], hallazgos probablemente debidos también a una mayor exposición y mayor número de picaduras a lo largo de la vida. Existe una mayor prevalencia en habitantes de zonas rurales, unas 2.69 veces más que en zonas urbanas [Grigoreas et al., 1997]. Respecto a la atopia, se ha encontrado que el riesgo de desarrollar una reacción sistémica es mayor en atópicos [Schäfer & Przybilla, 1996; Münstedt et al., 2008] y la probabilidad aumenta cuantas más enfermedades atópicas estén presentes en el individuo [Celikel et al., 2006], aunque hay estudios que no han encontrado esta asociación. Otro factor que influye en el resultado de los estudios de prevalencia es el criterio empleado para diagnosticar una reacción alérgica, dependiendo si se emplea un cuestionario o se utilizan pruebas diagnósticas de confirmación, como son las pruebas cutáneas y serológicas. Con estos condicionantes, en España, la prevalencia de reacción sistémica se sitúa entre el 2.3% [Navarro et al., 2004] y el 2.8% [Fernández et al., 2005] en población general y rural, respectivamente. La prevalencia de reacciones locales extensas se sitúa entre el 5.3% en población general [Navarro et al., 2004] y el 15.8% en población rural [Fernández et al., 2005].

La incidencia de mortalidad tras una picadura de un himenóptero parece ser baja, en un rango de 0.03 al 0.48 muertes por millón de habitantes al año [Bilò & Bonifazi, 2009], pero probablemente esté subestimada o mal documentada. De hecho, hasta el 23% de sueros analizados *post mortem* de decesos súbitos e inexplicables ocurridos en exterior, en los meses de mayo a noviembre presentaban IgE específica positiva lo que podría orientar a una posible causa [Schwartz et al., 1986]. Tras el análisis de los registros oficiales de 32 países europeos, se estima una mortalidad asociada a picaduras de himenóptero (abejas, avispas, y avispones) para el periodo entre 1994-2016, de 0.26 (0-2.24) por millón de habitantes [Feás et al., 2022]. En España la mortalidad por picaduras de himenópteros en los últimos 20 años (n=78) se asoció estrechamente al género masculino (85.9%), edad mayor a 65 años (52.6%), y a los meses de julio y agosto (50%). En esta revisión, Galicia es la comunidad con mayor número de casos (35.8%), y con la mayor incidencia (2.22 por millón de habitantes en el año 2018), produciéndose 8 muertes para el periodo 2014-2018 [Feás, 2021].

3.3. Historia natural y factores de riesgo en las reacciones por picaduras de himenópteros

Conocer la historia natural de la alergia al veneno de los himenópteros es fundamental para evaluar el riesgo de un alérgico ante una nueva picadura y tomar la decisión de iniciar o no una inmunoterapia específica. Teniendo en cuenta que el 60% de los pacientes que han presentado una reacción sistémica, repetirán reacción de igual o superior gravedad en caso de una nueva picadura, la protección que la inmunoterapia específica confiere resulta fundamental [Bonifazi et al., 2005]. En un estudio observacional multicéntrico sobre 962 pacientes con alergia confirmada al veneno de abeja o avispa que habían padecido una reacción sistémica tras la picadura espontánea, la frecuencia de presentación de una nueva reacción sistémica fue significativamente

USC DE COMPOSTELA

mayor en los sujetos con valores de triptasa sérica más elevados [Bonadona et al., 2009; Ruëff et al., 2009]. Otros factores identificados en dicha serie fueron la alergia al veneno de véspidos, la edad avanzada, el sexo masculino, el uso de IECAs (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) y el antecedente de reacciones sistémicas [Ruëff et al., 2009]. Llama la atención el hecho de que el tiempo transcurrido entre dos picaduras influye de manera inversa en el riesgo de desarrollar una nueva reacción sistémica. El 60% de los pacientes con una reacción sistémica había padecido una picadura en los dos meses previos con buena tolerancia [Pucci S et al., 1994]. En relación con esto, y en caso de múltiples picaduras consecutivas en un intervalo corto de tiempo se podría ejercer un efecto de protección al inducir tolerancia por un mecanismo equiparable al que se trata de inducir con la inmunoterapia específica [Carballada et al, 2011; Carballo et al., 2017].

A modo de resumen se podrían establecer como factores de riesgo que influyen en la gravedad de una reacción a la picadura de un himenóptero en los pacientes sensibilizados los siguientes:

1. Grado de exposición, definido por la profesión y el medio en que vive en paciente. Los pacientes que viven o trabajan en el medio rural tienen más probabilidades de ser picados en reiteradas ocasiones [de la Torre-Morin F et al., 1995; Carballada et al, 2011; Carballo et al., 2017].

2. Gravedad de la reacción previa. A mayor gravedad previa, mayor probabilidad de reacciones de igual o mayor gravedad que la anterior.

3. Edad. En niños, las reacciones sistémicas son raras, de intensidad leve en un 0.9-3.4%. y en menos del 1% son graves [Jennings et al., 2010]. El pronóstico en los niños es mejor que en los adultos, ya que la mayoría de ellos con reacciones sistémicas superan su alergia a los himenópteros espontáneamente. Solo en el caso de una reacción sistémica grave, la probabilidad de repetir una reacción de similar gravedad con la repicadura aumenta [Lange et al., 2016]. Según datos del registro europeo [Worm et al., 2014], la alergia a los himenópteros es la segunda causa de anafilaxia en niños (20%), tras la alergia a los alimentos.

4. Triptasa basal elevada y posibilidad de padecer una mastocitosis indolente o un síndrome de activación mastocitaria [Bonadona et al., 2009].

5. Comorbilidades del paciente. El empleo de fármacos beta-bloqueantes o IECAS, enfermedades cardíacas o pulmonares previas aumentan la gravedad de la reacción.

3.4. Datos diferenciales en las picaduras que orientan al himenóptero implicado en la reacción

En la evaluación de los pacientes que han sufrido reacciones sistémicas tras la picadura de los himenópteros, resulta fundamental la correcta identificación del insecto por parte del paciente. Curiosamente, para el caso de las picaduras por *Vespa velutina*, los pacientes muestran un elevado grado de identificación, probablemente, por la publicidad que se ha hecho de las mismas, el trabajo o vivienda en el medio rural y el tamaño y características morfológicas propias de este himenóptero.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Algunos pacientes muestran dificultades en la identificación de véspidos comunes, como los del género *Polistes* o *Vespula* pues sus rasgos diferenciales son más sutiles. Por ejemplo, los himenópteros del género *Polistes* tienen en el abdomen un estrechamiento suave y progresivo mientras que en las *Vespula* es muy marcado y brusco. El vuelo de *Polistes* es lento y, característicamente, siempre llevan las patas traseras colgando (https://www.seaic.org/alergia-abejas-y-avispas/vespidos-sociales-en-europa/claves-de-especies/genero-vespa-y-vespula). La época del año en que se ha producido la picadura puede ayudar en la identificación, pues *Polistes* aparecen en primavera y verano mientras que la *Vespula* suelen aparecer en agosto y resiste mejor a las inclemencias climatológicas, sobreviviendo hasta ya iniciado el invierno.

En caso de dudas en la diferenciación de las superfamilias *Vespidae* y *Apidae,* el aguijón puede orientar al agente causal. Mientras que en las avispas es liso y permite que un mismo individuo pueda picar varias veces, en las abejas es aserrado y queda clavado en el punto de picadura produciendo la evisceración del insecto al levantar éste el vuelo. El aguijón es el aparato ovopositor modificado de las hembras, que usan tanto para atacar como para defenderse de sus potenciales enemigos (Figura 7).

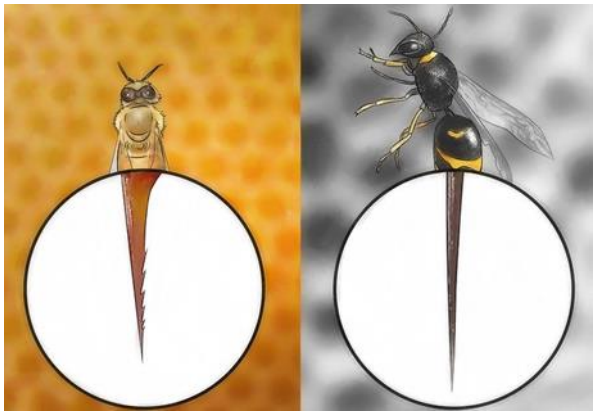


Figura 7. Imagen de la forma del aguijón de abejas y avispas tomada de: https://es.wikihow.com/tratar-una-picadura-de-abeja-o-de-avispa, con acceso abril 2019) (Creative commons BY-NC-SA 3.0)

La forma del aguijón y el hecho de que quede o no clavado en la piel del sujeto al que han picado tiene, además, consecuencias en la cantidad de veneno inyectado. Así, la cantidad de veneno que suelen inocular las abejas es más o menos constante y de alrededor de unos 40-50 µg. Por su parte, las avispas al poder picar a más de una persona inyectan una cantidad variable de veneno. Por último, la posibilidad de sobreinfección es más alta con las picaduras de avispas que con las de las abejas.

En ocasiones, los pacientes son capaces de identificar el tipo de nido o colmena en donde se encontraba el insecto (Figura 8) pero, en otras, la picadura ocurre en un lugar geográfico alejado del propio nido.

Figura 8. Diferentes tipos de nidos construidos por véspidos. Reproducido con permiso de su autor (Antonio Martínez Pernas. www.cousasdonorte.com).

3.5. Componentes moleculares alergénicos del veneno de los himenópteros y detección de IgE específica (sIgE) frente a los mismos

El veneno de los himenópteros es una mezcla de compuestos de bajo peso molecular, péptidos y proteínas/glicoproteínas. Los componentes de baja masa molecular (aminas, azúcares, aminoácidos…) son el 20-25 % del peso seco, y no suelen ser alergénicos. Sin embargo, estas aminas causan vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, con una reacción inflamatoria local normal, que puede facilitar la sensibilización al favorecer la absorción de proteínas y la distribución del veneno por todo el cuerpo de la víctima. Los compuestos de masa molecular elevada, péptidos y proteínas, producen diferentes efectos: tóxico, quimiotáctico, antibacteriano, enzimático… y algunos de ellos son alergénicos.

La composición del veneno puede variar entre los individuos en función de la casta, edad, y época del año. Se conoce mejor el veneno de las abejas que el de las avispas. Las principales proteínas alergénicas identificadas en los venenos de abejas y avispas se recogen en la Tabla 2.

Respecto al veneno de abeja, y en concreto para la especie dominante europea *Apis mellifera*, los péptidos predominantes son la apamina, una neurotoxina, y la melitina (denominado Api m4), que produce contracción muscular y es una de las causas del dolor provocado por la picadura. Muchos de los componentes de masa molecular elevada son enzimas (como la fosfolipasa y hialuronidasa) que permiten la penetración del veneno en tejidos, siendo la fosfolipasa A2, la más abundante y el alérgeno mejor conocido (Api m 1). Otras enzimas alergénicas son la hialuronidasa (Api m 2), la fosfatasa ácida (Api m 3), y la dipeptidilpeptidasa IV (Api m 5). Actualmente se han identificado 5 alérgenos mayores, Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, y Api m 10 (icarapina), con reconocimiento de sIgE en más del 50% de los sueros de alérgicos a veneno de abeja.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las acciones de los dos componentes principales, la melitina y la fosfolipasa A2, son a nivel local por su capacidad para dañar directamente a las células, pero en casos de picaduras múltiples pueden originar daño a distancia con la destrucción de células sanguíneas y afectación renal.

Tabla 2. Componentes alergénicos identificados en *Apis mellifera, Vespula vulgaris* y *Polistes dominula* [Antolín-Amérigo et al. 2018].

Himenópteros	Proteína	Función biológica	PM (kD)	sIgE presente
Apis mellifera	Api m 1	Fosfolipasa A2	16	95%
	Api m 2	Hialuronidasa	43	50%
	Api m 3	Fosfatasa ácida	45	37%
	Api m 4	Melitina	2.8	29-56%
	Api m 5	Dipeptidil-peptidasa 4	102	60%
	Api m 6	Inhibidor de proteasa	8	42%
	Api m 7	Proteasa	39	80%
	Api m 8	Carboxilesterasa	70	?
	Api m 9	Carboxipeptidasa	60	?
	Api m 10	Icarpina	50-55	50%
	Api m 11	Proteína mayor	50-60	15/34%
	Api m 12	Vitelogenina	200	40%
Vespula vulgaris	Ves v 1	Fosfolipasa A1	35	46%
	Ves v 2	Hialuronidasa	45	?
	Ves v 3	Dipeptidil-peptidasa 4	100	?
	Ves v 5	Antígeno 5	25	65%
	Ves v 6	Vitelogenina	200	?
Polistes dominula	Pol d 1	Fosfolipasa A1	34	?
	Pol d 5	Antígeno 5	23	57%

Los venenos de véspidos son similares entre sí y, en algún componente, también semejante al de la abeja. No contienen melitina, pero sí otros péptidos como el antígeno 5, cuya acción farmacológica es desconocida y es el alérgeno principal en véspidos, Ves v 5, Pol d 5 de *Vespula vulgaris* y *Polistes dominula,* respectivamente. Este antígeno 5 es una proteína no glicosilada de 23 Kda, con alta homología de secuencia entre individuos del mismo género pero menor entre véspidos de géneros distintos [Blank et al., 2020]. Otras enzimas de interés en alergia son la fosfolipasa A1 (Ves v 1, Pol d 1), la hialuronidasa (Ves v 2, Pol d 2), la proteasa (Ves v 4 y Pol d 4) y la dipeptidilpeptidasa IV (Ves v 3). Son alérgenos mayores los grupos 5, 1 y 3 [Blank et al., 2013].

En el campo de la Alergología se dispone de plataformas que nos permiten realizar la detección de sIgE en el suero de los pacientes frente a la mayoría de estos componentes moleculares. En concreto, en la EOXI de Santiago se utiliza la plataforma ImmunoCAP® (Laboratorio Thermo-Fisher, Uppsala, Suecia). No existen CAPs frente a todas las moléculas o proteínas alergénicas de los himenópteros mostradas en la Tabla 2, pero sí frente a las consideradas como alérgenos mayores y que detectan sensibilización genuina o primaria frente al himenóptero. Los venenos naturales de los himenópteros cuentan con proteínas que están glicosiladas, lo que puede suponer un problema diagnóstico en los pacientes bebedores excesivos de alcohol dado que pueden ocurrir

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

resultados falsamente positivos que induzcan a error de interpretación. Este problema se subsana con las moléculas obtenidas por tecnología recombinante, que no se ven interferidas por la ingesta de alcohol. Como se ve en la Tabla 2, algunas moléculas de los distintos himenópteros son similares, por lo que podrían dar lugar a fenómenos de reactividad cruzada y, una vez más, complicar el diagnóstico. Se define como "reactividad cruzada" la capacidad de interaccionar con la sIgE por la identificación de epítopos, lo que se traduce en una posible activación de las células efectoras debido al contacto con el veneno de distintas especies. Los alérgenos más relevantes que indican sensibilización genuina son: Api m 1 para *Apis mellifera*, Ves v 1 y Ves v 5 para *Vespula vulgaris* y Pol d 5 para *Polistes dominula.* En concreto, para el diagnóstico de sensibilización mediada por sIgE a *Vespula spp*, el 87% de los sueros de pacientes alérgicos a este himenóptero reconocen sIgE frente a Ves v 5, aumentando la sensibilidad diagnóstica un 8% adicional al añadir Ves v 1 [Korosec et al., 2012].

3.6. No disponemos de sIgE frente a *Vespa velutina* ni sus componentes moleculares

Como ya se ha comentado antes, *Vespa velutina* irrumpe en nuestro país en los últimos años y no conocemos cuáles son sus componentes moleculares alergénicos. De hecho, tampoco disponemos de veneno completo de *Vespa velutina* para tratar a los pacientes alérgicos. En un intento de aproximación al diagnóstico de la alergia a este himenóptero, se ha de recurrir al uso de veneno de los otros himenópteros conocidos y bien estudiados (*Apis mellifera, Vespula vulgaris o Polistes dominula*) con la finalidad de protegerlos con inmunoterapia frente a nuevas picaduras, seleccionando así el veneno que podría ser el más parecido al que ha desencadenado la clínica de los pacientes mediante la identificación de la sIgE que reconocen los pacientes picados por *Vespa velutina*. En la selección de este veneno es crucial identificar el reconocimiento molecular de cada paciente.

3.7. Se ha identificado el transcriptoma de *Vespa velutina* pero no se han identificado las moléculas alergénicas ni se dispone de vacuna para tratar a los pacientes

En el año 2015 se descifró el transcriptoma del veneno de *Vespa velutina* e identificaron un panel de proteínas, algunas de las cuales tienen alta capacidad tóxica que podría conducir a la muerte de los pacientes por mecanismos diversos que van desde coagulación intravascular diseminada, efectos neurotóxicos, cardiotóxicos y, por supuesto, alérgicos [Liu et al., 2015]. A pesar de la importancia de este véspido en Asia (en donde se la conoce como "avispa asesina"), nunca se ha estudiado su capacidad como agente sensibilizante e inductor de alergia.

3.8. La prueba de activación de basófilos (TAB) como método diagnóstico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

En aquellos pacientes con antecedentes de reacción sistémica, pero con resultados negativos de sIgE del veneno e, incluso, pruebas cutáneas, el TAB se ha propuesto como alternativa diagnóstica [Korosec et al., 2009]. El TAB valora de manera funcional la respuesta de activación del basófilo tras la exposición con el alérgeno, en lo que podría

considerarse como una provocación *ex vivo.* La técnica se basa en la cuantificación de los cambios en la expresión de marcadores de activación del basófilo tras una estimulación específica con el alérgeno a estudio. En la mayoría de los protocolos se mide el marcador CD63, situado en la membrana de los gránulos intracitoplasmáticos en reposo y que solo es accesible a su detección en la superficie celular tras la activación por la unión con la membrana celular. Dado que CD63 no es un marcador exclusivo de basófilos, puede ser necesario emplear marcadores adicionales para diferenciarlos de otras células sanguíneas [Sabogal-Cuadro & Zakzuk, 2018].

La prueba de TAB es muy específica y resulta especialmente útil en casos en los que existe una discordancia entre las manifestaciones clínicas y los resultados de otras técnicas diagnósticas, cuando no existe una fuente alergénica adecuada para la realización de pruebas cutáneas o de provocación, o en situaciones en las que una nueva exposición pueda suponer un riesgo [Hoffmann et al., 2015].

La principal desventaja de la TAB es que se trata de un método complejo que requiere unos medios técnicos específicos, concretamente, la disponibilidad de un citómetro de flujo que no siempre se encuentra al alcance de todos los centros asistenciales. Es, además, difícil de interpretar si no se conoce la respuesta tipo para cada alérgeno o el punto de corte que indique una clara activación. La principal utilidad de la medida de la reactividad del basófilo es el diagnóstico de la patología alérgica, alcanzando una sensibilidad del 85-100% y una especificidad del 83-100% para el veneno de himenóptero, cuando se usa CD63 como marcador de activación [Sainte-Laudy et al., 2000; Eberlein-König et al., 2006; Ebo et al., 2006]. En el caso concreto de los pacientes con anamnesis de anafilaxia por veneno de himenóptero en los que el resultado de la sIgE es negativo, el TAB aporta una mayor sensibilidad que no se ve afectada por el tiempo transcurrido entre la reacción y la prueba [Korosec et al., 2009] especialmente en pacientes con valores bajos de IgE total. Es también una herramienta precisa y segura en el diagnóstico de alergia a himenópteros en pacientes con mastocitosis [González de Olano et al., 2011]. Además, es especialmente útil para identificar el himenóptero responsable en caso de doble sensibilización y falta de reconocimiento por parte del paciente, evitando así una doble inmunoterapia [Eberlein-König et al., 2004; Eberlein et al., 2012].

4. Tratamiento específico de la alergia al veneno de los himenópteros: inmunoterapia

La inmunoterapia con veneno de himenópteros es el tratamiento de elección para evitar nuevas reacciones sistémicas moderadas-graves tras contactos posteriores con el insecto [Dhami et al., 2017; Sturm et al., 2018]. A largo plazo, es un tratamiento eficaz, pues entre el 75% y el 85% de los pacientes con alergia al veneno de *Apis mellifera* y entre el 90% y el 95% de los alérgicos al veneno de los véspidos (*Vespula spp* o *Polistes spp*) consiguen protección tras realizar un ciclo de tratamiento [Müller., 1992] cuya duración recomendada es de entre 3 a 5 años. Consiste en la administración de dosis repetidas del veneno purificado del himenóptero que fue responsable de la reacción y frente al que tuvo que haberse demostrado la presencia de sIgE con la finalidad de

USC DE COMPOSTELA

inducir una serie de cambios inmunológicos que conduzcan a un estado de tolerancia o hiposensibilización.

La inmunoterapia modifica la respuesta inmunológica específica frente al alérgeno, promoviendo el cambio de una respuesta alérgica a tolerancia a largo plazo. El desarrollo de tolerancia periférica es el objetico principal de la inmunoterapia, y en la adquisición de este estado participan diferentes mecanismos a nivel celular y humoral. La generación de células T reguladoras específicas de antígeno, que producen IL-10, suprimen la inmunidad Th2 y la cambian hacia una respuesta de tipo Th1. Los anticuerpos bloqueantes IgG4 pueden inhibir las reacciones dependientes de IgE a través de receptores IgE en mastocitos, basófilos y células B. El número de células efectoras en los órganos diana también disminuye, como los mastocitos, los basófilos, los linfocitos innatos tipo 2 y los eosinófilos. Otros mecanismos, como las células B reguladoras, las células dendríticas y varias citocinas están involucradas en la producción de la tolerancia inmune a largo plazo. [Akdis & Akdis, 2015; Shamji & Durham, 2017; Sahiner et al, 2019].

4.1 Elección del veneno

Establecer la verdadera fuente de sensibilización es esencial para garantizar la eficacia de la inmunoterapia con veneno, pero esta selección puede ser difícil ya que es frecuente el hallazgo de resultados positivos a varios venenos. Y es especialmente compleja para el caso de los véspidos, pues en España hay un solapamiento variable entre especies de *Polistes* y *Vespula* en todo el territorio, y a éstas hay que añadir las otras especies de himenópteros que sean clínicamente relevantes en la zona. La reactividad cruzada entre las especies de himenópteros es muy variable, dependiendo de los componentes alergénicos del veneno, bien por homología de secuencia péptidica o debido a los CCDs. El diagnóstico por componentes ha sido de gran ayuda para la precisión diagnóstica, posibilitando diferenciar entre reactividad cruzada y doble sensibilización en un gran número de casos, y permitiendo seleccionar la inmunoterapia más adecuada [Sturm et al., 2017; Blank et al., 2018]. En esta línea, Monsalve et al, utilizaron un panel de los principales alérgenos del veneno de véspidos (*Vespula y Polistes spp*) para investigar si la sIgE pudiera usarse para distinguir la sensibilización a cualquiera de ambos véspidos. La sIgE es más sensible frente al antígeno natural 5 s que el mismo recombinante, y aumenta al 100% con el panel completo de componentes naturales purificados, antígeno 5 s (Pol d 5/Ves v 5) o las fosfolipasas (Pol d 1/Ves v 1). En el 69% de los casos, fue posible definir el insecto sensibilizante más probable, y en el resto, no se pudo excluir la posible doble sensibilización [Monsalve et al., 2012]. Por último, en aquellos casos en los que no existe el veneno de la especie concreta implicada en la reacción para su tratamiento, se puede emplear con éxito el de una especie relacionada. Tal ha sido el caso en la alergia a la *Vespa orientalis* tratada con veneno de *Vespula spp* [Goldberg et al., 2013].

4.2. Seguimiento de los pacientes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

La inmunoterapia con veneno es un tratamiento eficaz para disminuir el riesgo de anafilaxia en personas que han presentado una reacción sistémica, incluso después de

la interrupción de la terapia. Se consideran factores de buen pronóstico para la suspensión de la inmunoterapia, la pérdida de sensibilización, evidenciada por una negativización de la sIgE, la ausencia de reacciones sistémicas durante la administración de las dosis de la vacuna, y la buena tolerancia a las picaduras espontáneas o controladas en medio hospitalario, la llamada prueba de repicadura [Müller& Ring, 2015; Bilò et al., 2019b]. La prueba de repicadura controlada, si bien no es recomendable realizarla con fin diagnóstico en pacientes no tratados por el elevado riesgo de anafilaxia, se considera el patrón oro para el seguimiento de la inmunoterapia con venenos de himenópteros [Ruëff et al., 1996]. Aun así, no posee una especificidad del 100%, y su uso en la práctica clínica no se ha generalizado principalmente por motivos técnicos. Por esta razón se han propuesto métodos alternativos, exentos de riesgo, que permitan predecir el éxito del tratamiento y así, poder diferenciar a pacientes tolerantes de los que precisen un tratamiento más prolongado o con mayores concentraciones [Sturm et al., 2018; Sahiner et al., 2019]. La prueba cutánea intradérmica no es predictiva, ya que un resultado negativo no puede excluir una reacción sistémica grave. La determinación de la sIgE al veneno de himenópteros es una prueba útil para detectar la sensibilización a himenópteros, pero, sin embargo, la evolución de los valores tras la inmunoterapia no se correlaciona con el estado de tolerancia, ya que en hasta el 50% de los casos, no llegan a negativizarse aun tolerando el paciente la exposición [Pravettoni et al., 2015]. Los niveles de IgG4 aumentan durante la inmunoterapia, pero, sin embargo, la protección de la inmunoterapia continúa aunque la IgG4 disminuya después de suspender el tratamiento [Müller et al., 1989]. Por otro lado, los niveles de sIgE y sIgG4 y sus ratios no son fiables para predecir la protección individual. Otra técnica *in vitro* propuesta es el TAB, y entre sus medidas, la sensibilidad parece ser más útil que la reactividad para monitorizar el efecto de la inmunoterapia, pues es capaz de detectar cambios en el umbral de respuestas de modo que un descenso en la sensibilidad del basófilo se ha asociado con tolerancia a largo plazo tras finalizar la inmunoterapia [Blank, et al., 2020].

Para el caso concreto de la *Vespa velutina* y teniendo en cuenta que no existe un estudio completo proteómico de su veneno, y ante la posibilidad de que alguno de sus componentes sea tóxico, no parece prudente plantear una prueba de exposición mientras no se pueda garantizar la no toxicidad del procedimiento en los pacientes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

JUSTIFICACIÓN

La alergia al veneno de *Vespa velutina* es un problema emergente y potencialmente grave para el que no se dispone de las herramientas diagnósticas y terapéuticas específicas que sí existen para la alergia a otros himenópteros.

Resulta de especial interés, desde el punto de vista alergológico, realizar un estudio de sensibilización alérgica de los pacientes que sufren una anafilaxia tras la picadura de uno de estos himenópteros con el fin de reconocer el componente molecular responsable, su grado de similitud con los componentes moleculares de otros himenópteros mejor estudiados con finalidad tanto diagnóstica como terapéutica.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

1.Objetivo principal

El objetivo principal es conocer el perfil molecular de sensibilización sIgE que presentan los pacientes que han padecido una reacción sistémica alérgica tras la picadura de *Vespa velutina.*

2.Objetivos secundarios

1. En pacientes con anafilaxia por alergia al veneno de los himenópteros, conocer la proporción de sIgE que va dirigida frente a los componentes moleculares disponibles (Api m 1, Api m 5, Api m 10, Ves v 1, Ves v 5, Pol d 5) respecto a la IgE que se dirige al veneno total de *Vespula, Vespa crabro o Dolichovespula*
2. Investigar la relación de la sensibilización mediada por IgE frente a los componentes moleculares disponibles con el antecedente de picaduras previas, grado de exposición, el sexo, la edad, el hábitat y la presencia de sIgE frente a CCDs.
3. Identificar cual de estos componentes moleculares es capaz de producir mayor sIgE en los pacientes con anafilaxia por V*espa velutina.*
4. Disponer de veneno de V*espa velutina* para poder determinar la existencia o no de sIgE frente al mismo en los pacientes con anafilaxia tras la picadura de este himenóptero y, en su caso, identificar sus componentes moleculares más relevantes.
5. Conocer la actividad biológica del veneno de *Vespa velutina* de forma indirecta a través de la activación de los basófilos de sujetos con anafilaxia por este himenóptero.
6. Evaluar la respuesta al veneno de *Vespula spp* en términos de evolución clínica e inmunológica (sIgE y sIgG4) en pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* durante el primer año de inmunoterapia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Estudio del perfil de sensibilización de pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* y su comparación con el perfil de pacientes con anafilaxia debida al veneno de otros himenópteros

Estudio transversal en el que se incluyeron de forma prospectiva todos los pacientes adultos con anafilaxia por veneno de himenóptero que fueron atendidos, por primera vez, en el Servicio de Alergología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), perteneciente a la *Estructura de Organización de Xestión Integrada* (EOXI) de Santiago de Compostela, (480.000 habitantes, de los que 400.000 viven en el medio rural) desde diciembre de 2017 a junio de 2019. Los pacientes son remitidos desde los servicios de atención primaria o el Servicio de Urgencias del CHUS tras haber sufrido una reacción anafiláctica por la picadura de un himenóptero. Desde el mes de agosto de 2018, los pacientes acuden a través de la vía rápida de acceso que se ha puesto en marcha en el ámbito del *Servizo Galego de Saúde* (https://www.sergas.es/Asistencia-sanitaria/Via-rapida-para-o-manexo-da-anafilaxia-por-veleno-de-himenopteros-en-adultos?idioma=es) (Anexo I). Los pacientes con reacciones locales aumentadas u otro tipo de reacciones adversas no alérgicas no fueron incluidos en el estudio. Todos los pacientes incluidos en el estudio dieron su autorización a través de la firma del consentimiento informado (Anexo II).

En esta fase del estudio, se incluyó a un total de 100 pacientes cuya mediana de edad fue de 63 años (rango 20-90 años), siendo, en su mayoría, hombres (87, 87%). La mayoría de los pacientes (97, 97%) vivían en un ambiente rural, y 57 (57%) trabajaban al aire libre, considerando ésta, una actividad de alto riesgo. Para el cálculo del tamaño muestral se tuvo en cuenta el perfil no confirmado de sensibilización a componentes moleculares en los primeros pacientes que acudieron por anafilaxia tras la picadura de una *Vespa velutina*. Así, habíamos observado una tendencia a presentar mayor IgE específica frente a Api m 5, siendo de, al menos, el doble de la concentración que tienen los pacientes alérgicos a otros himenópteros (media 10 kU_A/L y media 5 kU_A/L, respectivamente, con una desviación estándar de 10 kU_A/L). Con estos presupuestos y con una proporción de pacientes alérgicos a *Vespa velutina* frente a pacientes alérgicos a otros himenópteros entre 1:1, el tamaño muestral para un estudio con una potencia del 80% para encontrar diferencias con un riesgo alfa del 5% sería de 120 pacientes (60 pacientes con historia de alergia a *Vespa velutina* y 60 pacientes con historia de alergia a *Vespula spp*). En el caso de comparar el perfil molecular con pacientes con historia de alergia a *Apis mellífera*, la muestra se incrementaría en 60 pacientes adicionales (dada la dificultad de conseguir 60 nuevos pacientes con historia de alergia *Apis mellífera*, se podría contar con la colaboración de otros centros en Galicia lo que se tuvo en cuenta en el segundo estudio). No es posible comparar los resultados con pacientes con alergia a *Polistes dominula* por el escaso número de pacientes sensibilizados a este himenóptero. Finalmente, el número de pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* resultó ser proporcionalmente más alto que frente al resto de anafilaxia por otros himenópteros.

1.1. Determinaciones

1.1.1. *Cuaderno de recogida de datos (CRD) (Anexo III)*

Se recogió la información en el cuaderno de recogida de datos (CRD) de forma seudoanonimizada en una base de datos, identificando a los pacientes mediante un código alfanumérico, sin datos personales. La información se recogió entre 15 y 30 días después de la reacción de acuerdo con el protocolo de atención de la vía rápida mencionado anteriormente. Los datos recogidos en el CRD fueron:

- **Variables epidemiológicas:** (a) sociodemográficas (edad, sexo), (b) hábitat (rural o urbano [se consideran urbanos los que viven en la ciudad de Santiago de Compostela y rurales el resto]), (c) grado de exposición en función del trabajo y del medio en el que viven, (d) antecedente de picaduras previas (abeja, avispa y *Vespa velutina*) con reconocimiento del insecto y número de insectos implicados en la reacción, (d) consumo de alcohol [en gramos de alcohol a la semana].

- **Variables clínicas:** (a) diagnóstico de anafilaxia según los criterios recogidos en la vía rápida, (b) escala de gravedad de la anafilaxia (Tabla 3), (c) tipo de reacción con las picaduras anteriores (local o sistémica), (d) administración de adrenalina necesaria para revertir el cuadro clínico, (e) enfermedades concomitantes (hipertensión arterial, enfermedad cardíaca previa, enfermedad pulmonar, diabetes), (f) tratamientos que emplee de forma habitual y (g) valoración de riesgo de padecer un síndrome de activación mastocitaria como factor de riesgo de una futura reacción sistémica anafiláctica, según criterios de la REMA (Red Española de Mastocitosis) [Álvarez-Twose et al., 2012] (Tabla 4).

Tabla 3. Gravedad de la anafilaxia (adaptada de la Clasificación de Brown) [Brown, 2004]

Clasificación de las reacciones anafilácticas según su gravedad
Grado I. Leve
Afectación cutánea en forma de eritema, urticaria y/o angioedema con malestar general sin datos objetivos de afectación de otros órganos
Grado II. Moderada
Afectación respiratoria (disnea, estridor, sibilancias), cardiovascular (mareo, sudoración, opresión torácica) y/o gastrointestinal (vómitos, diarrea, dolor abdominal)
Grado III. Grave
Presencia de cianosis, saturación de O2 por debajo del 92%, hipotensión, confusión, hipotonía y/o pérdida de conocimiento

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Cálculo del riesgo de padecer un síndrome de activación mastocitaria según REMA. En caso de puntuación global inferior a 2, la probabilidad de padecer un Síndrome de activación mastocitaria es baja. En caso de que la puntuación global sea igual o superior a 2, se considera que existe una alta probabilidad de padecer un Síndrome de activación mastocitaria [Álvarez-Twose et al., 2012].

Variable	Puntuación
Género:	
Hombre	**+1**
Mujer	**- 1**
Sintomatología:	
Ausencia de urticaria / angioedema	**+1**
Presencia de urticaria y/o angioedema	**- 2**
Presíncope o síncope	**+3**
Triptasa en suero:	
< 15 ng/mL	**-1**
> 25 ng/mL	**+2**

1.1.2. *Estudios de laboratorio*

- **Determinaciones de IgE específica disponible comercialmente**: valor de la sIgE comercial frente a *Vespula vulgaris, Polistes dominula, Apis mellifera, Vespa crabro y Dolichovespula,* rApi m 1, rApi m 5, rApi m 10, rVes v 1, rVes v 5, rPol d 5, MUXF mediante la plataforma ImmunoCAP® (Thermo-Fisher).

- **Determinación de sIgE frente al veneno de *Vespa velutina:*** con la finalidad de hacer un cálculo de la sIgE frente a veneno de la *Vespa velutina*, se realizó un ensayo con ImmunoCAP® o212 (Streptavidina) a los que se unió un extracto completo de *Vespa velut*ina y nVesp v 5 durante 60 minutos a 37º C. Estos InmunoCAPs® fueron preparados por el Dr. Rafael Monsalve de equipo de Investigación Aplicada de ALK-Abelló® en Madrid y medidos en una submuestra de 15 pacientes que habían padecido una anafilaxia por *Vespa velutina* como estudio preliminar. El componente nVesp v 5 de *Vespa velutina* fue purificado de un extracto completo de *Vespa velutina* (ALK-Source Materials) por sucesivos pasos de cromatografía en un proceso similar al empleado para la purificación de los componentes moleculares de los venenos de *Vespula spp* y *Polistes dominula* previamente publicado [Monsalve et al., 2012; Monsalve et al., 2019].

A la hora de transformación en variable binaria (sensibilización o no) se considerarán positivas aquellas mayores o iguales a 0.35 kU_A/L y se valorarán las diferencias de sensibilización en los puntos de corte de 0.35 y 3.5 kU_A/L. El valor de 3.5 kU_A/L es el que se utiliza habitualmente en los ensayos clínicos de inmunoterapia específica para definir así sensibilización relevante. Se calculará la proporción de sIgE frente a los venenos de himenópteros respecto a la IgE total.

- **Determinación de IgE total:** La determinación de la IgE total se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia en el analizador Centaur XP System (Siemens™).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Determinación de la triptasa sérica: determinada en muestras de suero obtenidas un mes después de la reacción como marcador de triptasa basal en el sistema ImmunoCAP 250 tryptase assay® (Thermo Fisher Scientific).

2. Identificación de Vesp v 1 y Vesp v 5 como alérgenos en la sensibilización al veneno de *Vespa velutina*

Segunda parte del estudio transversal que incluyó de forma prospectiva a 79 pacientes adultos que habían padecido una reacción anafiláctica tras la picadura de *Vespa velutina*. En este estudio se incluyó a 60 pacientes del área de la EOXI de Santiago de Compostela, 34 de los cuales (43.3%) habían participado previamente en la fase anterior y 19 pacientes del área sanitaria del Hospital da Costa de Burela, Lugo que accedieron a participar en el estudio y para los que se obtuvo la misma información clínico-epidemiológica recogida en el CRD. El estudio se realizó entre octubre de 2018 y diciembre de 2019. Solo los pacientes con reconocimiento de *Vespa velutina* como himenóptero responsable fueron incluidos en este estudio. La edad mediana de los pacientes incluidos en esta fase fue de 57 años (rango, 20–82 años) y 69 (87.3%) eran hombres. La mayoría de los pacientes (97.5%) vivían en el medio rural y 56 (70.9%) trabajaban al aire libre por lo que se consideraron, en ambos casos, como exposiciones de riesgo.

2.1. Determinaciones

2.1.1. *Cuaderno de recogida de datos (CRD)*

El CRD recogido en el Anexo III fue el empleado en todos los estudios que se recogen en la presente Tesis Doctoral.

2.1.2. *Estudios de laboratorio*

- **Determinaciones de sIgE disponible comercialmente: s**IgE comercial medida por el sistema ImmunoCAP-250®(Thermo Fisher Scientific) y dirigida exclusivamente frente *Vespula* spp.*,* rVes v 1, rVes v 5, y el marcador de carbohidratos con reactividad cruzada (CCD) (MUXF^3 Bromelina, o214). Si bien los resultados, de acuerdo con el fabricante, serían positivos tras superar el límite de ≥0.1 kU_A/L, los análisis se realizaron con el punto de corte clásico establecido en 0.35 kU_A/L.

- **Determinación de sIgE frente al veneno de *Vespa velutina:*** en esta ocasión se realizó la determinación de sIgE frente al veneno de la *Vespa velutina* y su componente molecular nVesp v 5 siguiendo los pasos descritos en el estudio previo y añadiendo nVesp v 1 obtenido con la misma metodología y en todos los pacientes.

- Determinación de IgE total: la determinación de la IgE total se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia en el analizador Centaur XP (Siemens™).

- Determinación de la triptasa sérica: determinada en muestras de suero obtenidas un mes después de la reacción como marcador de triptasa basal en el sistema ImmunoCAP 250 tryptase assay® (Thermo Fisher Scientific).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Estudios de CAP-inhibición: los estudios de inhibición del CAP frente a *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5 se realizaron para identificar el alérgeno dominante utilizando el veneno completo de *Vespula* spp en una muestra de 10 de los pacientes incluidos en el estudio. Se realizaron, además, estudios de inhibición con los glicanos (carbohidratos con reactividad cruzada) para tratar de identificar el grado de reactividad mediada por IgE frente a la porción proteica o glicada del veneno. La prueba implica una fase sólida en la que se encuentra el InmunoCAP® unido al veneno completo de *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5 y un inhibidor en fase líquida con V*espula* spp. (ALK Laboratory, Madrid, Spain) y una neoglicoproteína que consiste en un inhibidor de CCD de segunda generación denominado ProGlycAn CCD-Blocker® (HÄMOSAN, Vienna, Austria).

En una primera fase, 100 µL del suero de los pacientes se preincuba con 100 µL de una solución de veneno de *Vespula* spp. a concentraciones de 25, 50 y 100 µL/mL en suspensión de PBS (Phosphate-buffered saline). Otra muestra de suero se preincuba con el inhibidor de CCD a la concentración recomendada por el proveedor de 40 µg/mL. Este proceso de preincubación se mantiene toda la noche a 4ºC, y tras esto se procede a la determinación de la sIgE mediante CAP. Como control negativo se emplea la albúmina bovina. El grado de inhibición se expresa como el porcentaje de descenso en el valor del CAP respecto al valor inicial (1-sIgE tras la inhibición/sIgE valor basal previo a la inhibición) X 100.

- Tinción de glicoproteína: para comprobar si los alérgenos obtenidos de *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5 están o no glicosilados, se realizó una tinción especial del gel de electrophoresis (SDS-PAGE) con Pierce Glycoprotein Staining Kit (Thermofisher Sci., cat.#24562) de forma que la presencia de una coloración magenta del gel indica la presencia de una proteína glicosilada. El kit de diagnóstico proporciona un control positivo que se corresponde con la peroxidasa y un control negativo que se corresponde con el inhibidor de la tripsina de la soja. Esta tinción fue realizada en el laboratorio ALK-Abelló de Madrid por el Dr Rafael Monsalve siguiendo las recomendaciones establecidas [Morrissey et al., 1981].

3. Identificación de la actividad biológica del veneno de *Vespa velutina* y sus componentes moleculares Vesp v 1 y Vesp v 5 mediante la prueba de activación de basófilos (TAB)

3.1. *Revisión de la utilidad de la TAB en el diagnóstico de la alergia al veneno de los himenópteros aplicado al seguimiento de la inmunoterapia específica con estos alérgenos*

Se realizó una revisión de la literatura mediante la búsqueda electrónica en bases de datos y metabuscadores MEDLINE, Cochrane y clinicaltrials.gov, con límite temporal desde 1990, año en que se desarrolló la técnica, hasta el 8 de enero de 2021. Las palabras clave empleadas fueron "*basophil activation test*" *OR "basophil reactivity" AND "hymenoptera venom immunotherapy*". No se limitó la búsqueda por veneno de himenóptero específico, para evitar la exclusión de artículos en los que se hubiesen empleado varios venenos de diferentes especies no claramente especificadas en el título, resumen o palabras clave. Tampoco se limitó la búsqueda por tipo de artículo o

idioma, pero se descartaron aquellos que no estuviesen escritos en inglés o español. Se investigó la presencia de referencias adicionales en los propios artículos resultado de la búsqueda. Se examinaron todos los artículos seleccionados por título y resumen, y todos los autores de esta revisión evaluaron de forma pormenorizada aquellos estudios que incluían datos de TAB, con independencia del momento en que se había realizado la técnica y la duración de la inmunoterapia. El diagrama de flujo de la búsqueda se representa en la Figura 9. En los artículos incluidos en la revisión se analizaron:

a) el número de pacientes incluidos en el estudio y su edad (expresada como edad media, rango, o mediana, según se detalle en los estudios);
b) el punto de corte seleccionado para definir un resultado positivo en el TAB;
c) la dosis y el alérgeno (veneno de *Apis mellifera, Vespula spp*, *Polistes spp*) con los que se realizaron los estudios de TAB;
d) los tiempos de monitorización de la inmunoterapia respecto al basal (antes de iniciar el tratamiento);
e) los resultados clínicos obtenidos;
f) la realización o no de la prueba de repicadura; y
g) la tolerancia a picaduras espontáneas, en los estudios que proporcionaban este dato.

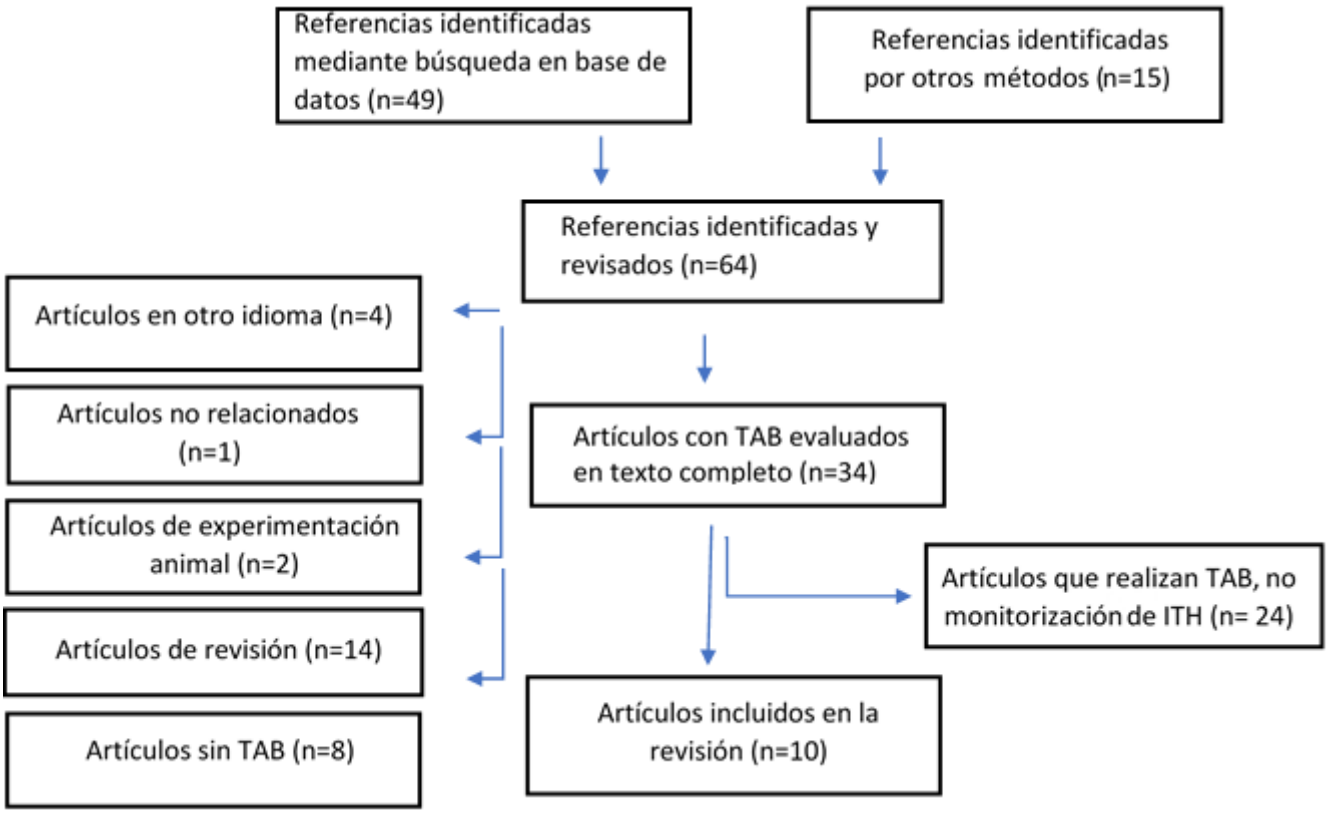


Figura 9. Diagrama de flujo en el que se detallan los artículos relacionados con este tema y el proceso de selección

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2. *Metodología empleada en la TAB como medida de actividad biológica del veneno de Vespa velutina y sus componentes moleculares*

Estudio realizado de forma prospectiva sobre 10 nuevos pacientes diagnosticados de anafilaxia tras la picadura de *Vespa velutina* en el Servicio de Alergología de la EOXI de Santiago de Compostela, entre diciembre de 2020 y febrero de 2021. Se trató de 10 varones con una edad mediana de 57 años (rango, 26-81 años) que vivían en el medio rural con alto nivel de exposición. Los pacientes referían una reacción de anafilaxia que había ocurrido antes de 30 minutos tras la picadura de una mediana de dos *Vespa velutina* (rango, 1-13) y frente a los que se había demostrado la existencia de sIgE positiva al veneno de *Vespa velutina* y/o alguno de sus componentes moleculares nVesp v 1 o nVesp v 5.

Las TABs se realizaron entre 3 y 4 meses tras la reacción anafiláctica y se utilizó para ello el kit comercial BASOTEST® (Celonic™ Deutschland) que detecta la traslocación de CD63 desde los lisosomas citoplasmáticos a la superficie de los basófilos en muestras de sangre heparinizada, siguiendo la siguiente metodología:

En el BASOTEST Kit® se determina el porcentaje de granulocitos basófilos CD63 +, que se han degranulado tras la incubación con el alérgeno o fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina)

La prueba requiere de la presencia de controles de activación positivos y negativos. El control negativo mide la activación basal, que sería óptima entre 1.8-9.5 5%, según información del kit. Como control negativo se empleará el PBS (Phosphate-Buffered-Saline). El control positivo trata de medir la capacidad de los basófilos de responder a estímulos. En el BASOTEST Kit® se utiliza el fMLP, que activa a los basófilos por la vía de las fosfolipasas C y las MAPK y no por IgE. El porcentaje de basófilos activados con el control positivo debe ser entre 25.2 y 59.5%, según la información del fabricante. Se estima que entre un 10 y un 15% de los individuos son no respondedores [Hoffmann et al., 2015]. En la Tabla 5 se muestran los reactivos empleados en el estudio, incluyendo los propios del BASOTEST Kit® y los venenos de *Vespa velutina* y sus componentes moleculares identificados.

Tabla 5. Cuadro resumen de los reactivos utilizados en el TAB con BASOTEST kit®.

REACTIVOS	
CONTROL POSITIVO	fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina)
CONTROL NEGATIVO	PBS: Suero salino buffer fosfato
MARCADORES DE ACTIVACIÓN	CD63
MARCADORES IDENTIFICACIÓN BASÓFILOS	Anti-IgE-PE conjugada con ficoeritrina Anti-CD63-FITC conjugado con fluoresceína
REACTIVOS DE *Vespa velutina*	nVesp v1, nVesp v5, Veneno completo de *Vespa velutina*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Etapas del procedimiento

Tras la extracción de sangre completa en tubos con heparina litio a los pacientes del estudio, se trasladaron los tubos de forma inmediata desde el Hospital de Conxo al Laboratorio de Inmunología en el Hospital Clínico de la EOXI de Santiago. La extracción en tubos con heparina es fundamental pues otros anticoagulantes como el EDTA o ácido cítrico provocarían interferencias con la consiguiente disminución de la activación celular.

Una vez en el laboratorio, se siguieron los pasos indicados en el procedimiento por el fabricante, incluyendo la preparación de los extractos problema cuyas concentraciones se recogen en la Tabla 6, la identificación de los basófilos, la incubación y procesado final con el análisis de las células en el citómetro de flujo, utilizando luz de excitación azul-verde (láser de ion argón de 488 nm), utilizando un FACScan™ (Sistema de Inmuno-citometría Becton-Dickinson) y el software CellQuest™.

Tabla 6. Concentraciones del veneno de *Vespa velutina* y de sus componentes moleculares empleados en el estudio.

Concentración		
Vespa velutina	**nVesp v 1**	**nVesp v 5**
10 µg/mL	10 ng/mL	10 ng/mL
1 µg/mL	1 ng/mL	1 ng/mL
0.1 µg/mL	0.1 ng/mL	0.1 ng/mL
0.01 µg/mL	0.01 ng/mL	0.01 ng/mL

Los resultados del TAB se expresaron, en este estudio, como reactividad o número de basófilos respondedores (CD63+) tras el estímulo con el alérgeno, correspondiendo a la máxima respuesta alcanzada tras llegar a un p*lateau* en una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones. Se considera positiva toda activación que incremente en un 15% los basófilos activados.

Cinco individuos sanos (4 atópicos y uno no atópico) con antecedentes negativos de alergia al veneno de los himenópteros y ausencia de sIgE fueron reclutados como controles.

4. Seguimiento de la sensibilización mediada por IgE de los pacientes con anafilaxia por veneno de *Vespa velutina* y tratados con veneno de *Vespula* spp como medida de control de la respuesta inmunológica

USC UNIVERSIDADE

Estudio realizado de forma prospectivo en 46 pacientes diagnosticados de padecer una anafilaxia por alergia al veneno de *Vespa velutina* que iniciaron inmunoterapia con veneno de *Vespula* spp entre noviembre de 2019 y mayo de 2020. La selección del veneno se realizó por el reconocimiento de sIgE frente al veneno de *Vespula* spp y al no

disponer comercialmente de un veneno de *Vespa velutina* aprobado por la AEMPS (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) para su uso en esta población. Si bien la muestra de pacientes que se encuentran, actualmente, en seguimiento con esta inmunoterapia es superior, el estudio se realizó con determinaciones seriadas en estos pacientes. La mediana de edad de la muestra fue de 61 años (rango, 20-78 años) y 39 (84.8%) eran hombres. La mayoría de los pacientes (93.5%) informaron picaduras previas de *Vespula* spp y/o *Apis mellifera* (31, 67.4%) y solo 10 (21.7%) informaron picaduras previas por *Vespa velutina*.

4.1. Administración de inmunoterapia

El veneno de *Vespula* spp (Pharmalgen® ALK), se administró en un programa *clúster* de inducción de cinco dosis y 2 días. El día 0, los pacientes recibieron inyecciones subcutáneas (10 µg, 20 µg y 30 µg) del extracto de veneno (vial 4 a una concentración de 100 µg/mL) en brazos alternos a intervalos de 30 minutos para las dos primeras dosis, y con observación de 60 minutos tras la tercera dosis. El día 7, cada paciente recibió dos inyecciones subcutáneas con 50 µg en brazos alternos a intervalos de 60 minutos. Esto fue seguido por la administración mensual de 100 µg de extracto del veneno de *Vespula* spp.

4.2. Estudios de seguimiento de laboratorio

- **Determinaciones de sIgE y sIgG4:** se midieron sIgE y sIgG4 frente a *Vespa velutina* (disponible comercialmente como «alérgeno de investigación U1223», Thermo Fisher Scientific™ desde mayo de 2020) y *Vespula* spp, utilizando el sistema ImmunoCAP-250™ (Thermo Fisher Scientific™™) antes de iniciar la inmunoterapia con alérgenos, y 6 y 12 meses después.

5. Análisis de los datos: estudio estadístico aplicado en los sucesivos estudios

Los datos fueron analizados usando el software Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, USA). Los pacientes con valores perdidos no fueron eliminados del estudio por lo que, en las tablas, se especifica sobre cuántos pacientes se ha realizado cada determinación en función de la disponibilidad del dato.

Estadística descriptiva: Las variables categóricas se representaron por su número absoluto y su porcentaje. Para las variables cuantitativas, dada la distribución no-normal en la gran mayoría de ellas, se utilizó la mediana como representación de la tendencia central y los intervalos (*rangos*, intercuartil o absoluto) como representación de la dispersión.

Estadística analítica: Para la comparación de proporciones se utilizó la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates, cuando fue necesario. La prueba de Chi-cuadrado de

USC DE COMPOSTELA

tendencia se empleó para investigar las tendencias de proporciones relativas a variables independientes en categorías ordinales. Para la comparación de variables numéricas emplearon pruebas estadísticas no paramétricas. Para la comparación de dos grupos independientes se empleó el test de Mann-Whitney. Se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparar muestras pareadas. Se empleó el test de Jonckheere-Terpstra para el análisis de tendencia de una variable numérica entre más de dos categorías ordinales. Se utilizó la prueba de rangos de Spearman para evaluar la correlación entre variables. Para los análisis multivariantes, se establecieron modelos de regresión múltiple. Cuando la variable dependiente era cuantitativa se emplearon modelos de regresión lineal. Dada la distribución no-normal de la IgE sérica, se procedió a su transformación logarítmica previa para garantizar el ajuste a la normalidad entre los requerimientos del modelo. Cuando la variable dependiente fue categórica binaria, se emplearon modelos de regresión logística. Cuando alguna de las covariables era categórica con más de dos categorías, se diseñaron variables *dummy* para las mismas, estableciendo previamente la categoría de referencia. En todos los modelos se forzó la entrada de las covariables en la ecuación. Se consideraron significativos los valores de P menores de 0.05. Se aportaron siempre los valores exactos de P.

6. Aspectos éticos y financiación

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia (Sección Santiago-Lugo) con el código 2018-622 (Anexo IV).

El Proyecto se realizó respetando la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1964 y la ratificación de las siguientes asambleas, la Orden SCO/256/2007, por la que se establecen los Principios y las directrices detalladas de Buena Práctica Clínica, el Convenio relativo a los derechos humanos y a la Biomedicina (Oviedo, 1997), la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, la Ley 3/2018 de Protección de Datos de Carácter Personal y Derechos Digitales, la Ley 41/2002 (Básica Reguladora de la Autonomía del Paciente y de Derechos y Obligaciones en Materia de Información y Documentación Clínica), la Ley 3/2001 (Reguladora del Consentimiento Informado y de la Historia Clínica de los Pacientes), la Ley 3/2005 de modificación de la Ley 3/2001 y el Decreto 29/2009, por el que se regula el Acceso a la Historia Clínica Electrónica.

El estudio fue financiado por el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad, PI16/1401 y PI19/01023) y una Beca de investigación de la Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESULTADOS

1. Estudio del perfil de sensibilización de pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* y su comparación con el perfil de pacientes con anafilaxia debida al veneno de otros himenópteros

Los resultados de este capítulo han sido publicados por: Carmen Vidal[1,2], Margarita Armisén[1], Rafael Monsalve[3], Tomás González-Vidal[1], Santiago Lojo[4], Sara López-Freire[1], Paula Méndez[1], Virginia Rodríguez[1], Laura Romero[1], Agustín Galán[3], Arturo González-Quintela[2,5].

Anaphylaxis to Vespa velutina nigrithorax: pattern of sensitization for an emerging problem in Western countries. J Investig Allegol Clin Immunol 2021,31:228-35.

1. Servicio de Alergia, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España

2. Red de Trastornos Adictivos, RD16/0017/0018), España

3. Chemistry, Manufacturing and Control Research and Development, ALK-Abelló, Madrid, España

4. Departamento de Bioquímica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, España.

5. Departamento de Medicina, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1. *Datos clínicos*

Un total de 100 pacientes consecutivos fueron incluidos en esta primera parte del estudio. De ellos, 77 (77%) identificaron *Vespa velutina* como el insecto culpable de la reacción, 11 pacientes identificaron *Vespula spp*, 10 pacientes *Apis mellifera* y 2 pacientes no fueron capaces de identificar el insecto responsable.

Todos los pacientes con anafilaxia por *Vespula spp* y *Apis mellifera* recordaban picaduras previas con los insectos respectivos mientras que tan solo el 20.8% (16/77) de los pacientes con anafilaxia por la picadura de *Vespa velutina* reconocían haber sido picados previamente por otro ejemplar de la misma especie. Por el contrario, todos estos pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* referían picaduras previas por *Vespula spp* (75/77, 97.4%) o *Apis mellifera* (41/77, 53.2%). Veintitrés pacientes relataron episodios pasados de anafilaxia antes de la presente picadura, pero no habían sido enviados para evaluación (14 episodios relacionados con *Vespula s*pp, 5 con *Vespa velutina* y 4 a *Apis mellifera*). No se registraron picaduras adicionales en el periodo entre la reacción sistémica y la inclusión en el estudio. En la Tabla 7 se muestran estos resultados junto a otros datos epidemiológicos.

La mayoría de las reacciones ocurrieron en los primeros 15 minutos tras producirse la picadura, sin diferencias con respecto al insecto culpable. La reacción anafiláctica fue leve en 17 casos (17%), moderada en 45 (45%) y grave en 38 (38%) casos. La gravedad de la anafilaxia producida por *Vespa velutina* fue similar a la de la anafilaxia por *Vespula spp* o por *Apis mellifera* (Tabla 7). La adrenalina se utilizó en 48 pacientes (48%). A mayor gravedad de la reacción, más frecuente fue el uso de adrenalina (17.6% en reacciones leves; 44.4% en moderadas y 65.8% en graves; P<0.001, test de tendencia).

1.2. *Estudios de laboratorio*

- **Determinaciones de IgE total y específica disponible comercialmente.** La sIgE frente a *Vespula spp* estuvo disponible en 76/77 pacientes con anafilaxia a *Vespa velutina* y todos ellos mostraron un resultado positivo (>0,35 kU_A/L). La mayoría (>70%) de los pacientes con anafilaxia a *Vespa velutina* también mostraron sIgE positiva a todo el extracto de veneno de *Dolichovespula maculata*, *Polistes dominula*, *Vespa crabro* y *Apis mellifera*, en ese orden (Figura 10). En cuanto a los componentes moleculares, los pacientes con anafilaxia a *Vespa velutina* mostraron positividad sIgE a rVes v 5 con mayor frecuencia que a rVes v 1. La sIgE a rPol d 5 estuvo presente en la mayoría de los pacientes con anafilaxia a *Vespa velutina.* El único componente molecular de *Apis mellifera* que mostró una tasa de positividad de sIgE >50% en pacientes con anafilaxia a *Vespa velutina* fue rApi m 5.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Datos clínicos de los pacientes estratificados por el insecto responsable.

	Insecto responsable			Valor de P	
	Vespula spp (n=11)	***Vespa velutina*** (n=77)	***Apis mellifera*** (n=10)	VVN *vs* VV	VVN *vs* AM
Edad (años)	58 (56-65)	63 (54-69)	54 (41-68)	0.618	0.348
Género (hombre)	11 (100)	66 (85.7)	9 (90.0)	0.394	0.712
Picaduras previas					
Vespula vulgaris	11 (100)	75 (97.4)	8 (80.0)	0.999	0.095
Vespa velutina	2 (18.2)	16 (20.8)	0 (0.0)	0.999	0.245
Apis mellifera	6 (54.5)	41 (53.2)	10 (100)	0.936	0.013
Reacción sistémica previa					
Vespula vulgaris	1 (9.1)	13 (16.9)	0 (0.0)	0.826	0.349
Vespa velutina	0 (0.0)	5 (6.5)	0 (0.0)	0.862	0.914
Apis mellifera	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (30.0)	0.999	<0.001
Habitat (rural)	11 (100)	75 (97.4)	9 (90.0)	0.999	0.775
Exposición laboral (exterior)	8 (72.7)	43 (55.8)	5 (50.0)	0.463	0.991
Grado de anafilaxia					
Grado I	3 (27.3)	12 (15.6)	2 (20.0)	0.628	0.419
Grado II	4 (36.4)	33 (42.9)	6 (60.0)		
Grado III	4 (36.4)	32 (41.6)	2 (20.0)		
Período de latencia					
Menos de 15 minutos	7 (63.6)	61 (79.2)	7 (70.0)	0.514	0.431
15-30 minutos	3 (27.3)	12 (15.6)	3 (30.0)		
Mas de 30 minutos	1 (9.1)	4 (5.2)	0 (0.0)		
Uso de adrenalina	5 (45.5)	37 (48.1)	5 (50.0)	0.872	0.908

La edad aparece como mediana y (rango intercuartil). El resto son números absolutos y (porcentajes). VVN vs VV: comparación de *Vespa velutina* con *Vespula vulgaris*. VVN vs AM: comparación de *Vespa velutina* con *Apis mellifera*.

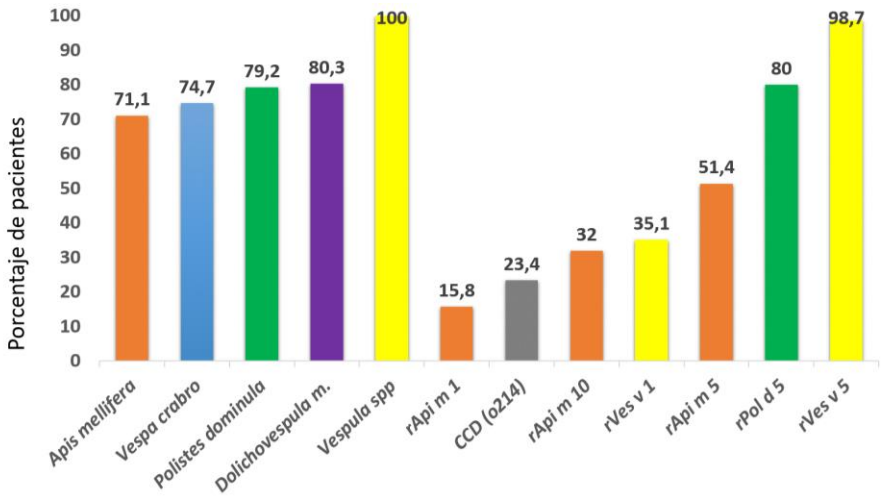


Figura 10. Porcentaje de pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* con sIgE positiva (>0,35 kU_A/L) a venenos de himenópteros enteros (*Vespula spp* [n=76], *Polistes dominula* [n=77], *Apis mellifera* [n=76], *Vespa crabro* [n=75] y *Dolichovespula maculata.* [n=76] (a la izquierda), y sus componentes moleculares (rApi m 1 [n=76], rApi m 5 [n=72], rApi m 10 [n=75], rVes v 1 [n=77], rVes v 5 [n=76], rPol d 5 [n=75], y o214 [MUXF, como marcador CCD, n=77] (a la derecha). Cada veneno y sus componentes moleculares se representan con el mismo color para facilitar la identificación (imagen de Vidal et al 2021 con autorización de ESMON, editorial de JIACI. Ver publicaciones en Anexo).

USC DE SANTIAGO

Tabla 8. Resultados de laboratorio de los pacientes incluídos en el estudio en función del insecto responsable de la reacción.

	Insecto responsable						Valor de P	
	Vespula spp		***Vespa velutina***		***Apis mellifera***			
	n	Mediana (rango IQR)	n	Mediana (rango IQR)	n	Mediana (rango IQR)	*VNN vs VV*	*VVN vs AM*
sIgE en suero (kU_A/L)								
MUXF	11	0.20 (0.00-0.92)	77	0.05 (0.00-0.34)	10	0.09 (0.00-1.55)	0.362	0.562
Apis mellifera	11	1.12 (0.31-3.79)	76	0.91 (0.22-3.67)	10	7.48 (2.88-27.4)	0.655	<0.001
rApi m 1	10	0.07 (0.00-0.35)	76	0.01 (0.00-0.12)	10	2.45 (1.50-7.79)	0.332	<0.001
rApi m 5	10	1.17 (0.11-10.2)	72	0.50 (0.00-3.93)	9	1.15 (0.02-15.4)	0.432	0.710
rApi m 10	10	0.04 (0.01-0.07)	75	0.03 (0.00-0.86)	10	0.31 (0.04-2.25)	0.802	0.053
Vespula vulgaris	11	14.0 (8.51-57.3)	76	5.38 (2.03-14.2)	9	0.08 (0.00-7.23)	0.019	0.007
rVes v 1	11	0.07 (0.03-5.98)	77	0.15 (0.03-1.44)	9	0.00 (0.00-1.29)	0.870	0.820
rVes v 5	11	12.4 (0.52-65.0)	76	4.45 (1.48-12.3)	9	0.00 (0.00-0.75)	0.322	<0.001
Polistes dominula	11	4.22 (2.95-36.1)	77	1.54 (0.41-6.72)	9	0.06 (0.00-2.43)	0.060	0.024
rPol d 5	11	6.89 (0.85-15.7)	75	1.65 (0.50-8.31)	9	0.01 (0.00-0.57)	0.151	0.001
Dolichovespula sp	7	4.78 (1.10-13.5)	76	1.34 (0.42-4.05)	8	0.15 (0.00-8.85)	0.046	0.185
Vespa crabro	7	2.98 (0.98-3.79)	75	0.93 (0.34-3.34)	9	0.02 (0.00-8.48)	0.137	0.073
IgE total (UI/mL)	11	189 (126-264)	76	78.5 (33.0-198)	10	45.0 (16.2-182)	0.017	0.247
Triptasa basal (ng/mL)	11	4.3 (3.5-5.2)	77	5.1 (3.9-6.4)	10	4.5 (4.1-6.3)	0.304	0.868

n, número de pacientes con la determinación. IQR, rango intercuartílico.
MUXF (o214), marcador de reactividad cruzada en los carbohidratos.
VVN vs VV: comparación entre *Vespa velutina* y *Vespula vulgaris*. VVN vs AM: comparación entre *Vespa velutina* y *Apis mellifera*.

Cuando se analizaron las concentraciones de sIgE a venenos en relación con la IgE total, se observó un perfil similar, es decir, los pacientes con anafilaxia a *Vespa velutina* mostraron un patrón de sensibilización a sIgE similar al de los pacientes con anafilaxia a *Vespula spp* y diferente al de los pacientes con anafilaxia a *Apis mellifera* (Tabla 9).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Cociente sIgE específica e IgE total en los pacientes del estudio, estratificado por el insecto responsable.

	Insecto responsable						Valor de P	
	Vespula spp		***Vespa velutina***		***Apis mellifera***			
sIgE (kU_A/L)/ IgE total (kU/L) (x100)	n	Mediana (IQR)	n	Mediana (IQR)	n	Mediana (IQR)	*VNN vs VV*	*VVN vs AM*
Apis mellifera	11	0.51 (0.34-1.43)	76	1.07 (0.31-2.92)	10	16.7 (12.3-38.3)	0.358	<0.001
Vespula vulgaris	11	8.45 (5.93-21.0)	75	5.54 (3.12-15.7)	9	0.22 (0.0-1.64)	0.419	<0.001
Polistes dominula	11	3.27 (1.01-13.8)	76	2.02 (0.84-5.63)	9	0.18 (0.0-4.16)	0.319	0.040
Vespa crabro	7	1.12 (0.58-3.46)	74	1.91 (0.59-3.35)	9	0.11 (0.0-1.81)	0.814	0.043
Dolichovespula spp.	7	1.83 (1.25-7.11)	75	1.97 (0.85-3.35)	8	0.83 (0.0-2.52)	0.578	0.112

n, número de pacientes con determinación disponible. IQR: rango intercuartílico.
VVN vs VV: comparación entre *Vespa velutina* y *Vespula spp*. VVN vs AM: comparación entre *Vespa velutina* y *Apis mellifera*.

- **Determinación de sIgE frente al veneno de *Vespa velutina***.

En una submuestra de 15 pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina*, 13 (86.6%) pacientes mostraron sIgE positiva (>0.35 kU_A/L) frente a un extracto de veneno entero de *Vespa velutina.* Los niveles de sIgE a *Vespa velutina* fueron bajos (mediana 1.1 kU_A/L, [IQR] 0.12-20.5 kU_A/L). Utilizando la misma metodología, el 100% de estos pacientes presentaron sIgE positiva a nVesp v 5, mientras que solo el 28.8% presentó niveles positivos de sIgE a nVesp v 1. Los niveles de sIgE a nVesp v 5 (mediana 2.71, [IQR] 0.52-37.2 kU_A/L, -n=15-) tendían a ser más altos que los de sIgE a nVesp v 1 (mediana 0.17 kU_A/L, [IQR] 0.99-27.1 kU_A/L, -n=14-) y también tendían a ser más altos que los de sIgE al extracto de veneno entero de *Vespa velutina* (mediana 2.71, [IQR] 0.52-37.2 kU_A/L, n=15). Se encontró correlación significativa entre sIgE a *Vespa velutina* y sIgE a Vespula spp (r=0.669, P=0,009), *Polistes dominula* (r=0.620, P=0,014), *D. maculata* (r=0.973, P<0.001) y *Vespa crabro* (r=0.968, P<0.001)

- **Determinación de triptasa sérica basal y cálculo del REMA**

Los niveles séricos de triptasa basal (disponibles en todos los pacientes) tendieron a aumentar en relación con la gravedad de la reacción anafiláctica. Así, el valor mediano y su rango intercuartílico fue de 3.9 ng/mL (3.6-5.4 ng/mL), 4.5 ng/mL (3.5-5.9 ng/mL) y 5.4 ng/mL (4.3-6.7 ng/mL), en pacientes con reacción leve, moderada y grave, respectivamente (P=0.015, test de tendencia). No hubo diferencia en los valores de triptasa en función del insecto responsable de la reacción (Tabla 8). La puntuación REMA fue inferior a 2 en 98 pacientes. Sólo dos pacientes, que pertenecían al grupo de *Vespa velutina*, presentaron un REMA calculado superior a 2, pero el estudio hematológico realizado (c-kit) permitió descartar la presencia de un trastorno clonal de mastocitos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

2. Identificación de nVesp v 1 y nVesp v 5 como alérgenos en la sensibilización al veneno de *Vespa velutina*

Se encontró sIgE positiva (>0.35 kU_A/L) a veneno entero de *Vespa velutina,* a nVesp v 5 y a nVesp v 1 en 51 (79.7%), 55 (85.9%) y 26 (40.6%) de 64 pacientes, respectivamente. Los niveles de sIgE a *Vespa velutina* (mediana 0.99 kU_A/L, IQR 0.38–2.08 kU_A/L) tendían a ser más bajos que los de sIgE a nVesp v 5 (mediana 1.34 kU_A/L, IQR 0.57–3.05 kU_A/L) pero más altos que los de sIgE a nVesp v 1 (mediana 0.24 kU_A/L, IQR 0.05–0.70 kU_A/L). Para analizar el grado de correlación entre los alérgenos *Vespa velutina* y los alérgenos de *Vespula spp*, se midió sIgE a *Vespula spp,* rVes v 1 y rVes v 5 mediante ensayos disponibles comercialmente (Thermo Fisher Scientific). También se midió sIgE a $MUXF^3$ (o214) como marcador de carbohidratos de reacción cruzada (CCD).

Se encontró una correlación significativa entre sIgE a *Vespa velutina* y sIgE a *Vespula spp* (r= 0.781, P<0.001), entre sIgE a nVesp v 5 y sIgE a rVes v 5 (r= 0.780, P<0.001) y entre sIgE a nVesp v 1 y rVes v 1 (r= 0.556, P<0.001). Además, también se encontró una fuerte correlación entre nVesp v 1 y el marcador CCD (r= 0,698, P<0,001).

- Estudios de CAP-inhibición

Los estudios de inhibición mostraron un mejor rendimiento del veneno de *Vespula spp* para inhibir la unión de sIgE a *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5 (porcentaje medio de inhibición a la concentración más alta del inhibidor de 96.7%, 88.3% y 95.5%, respectivamente) que de *Vespa velutina* para *Vespula spp*, rVes v 1 y rVes v 5 (63%, 29.1% y 65.8%, respectivamente) (Tabla 10 y Figura 11, en siguientes páginas). La inhibición de CAP con un inhibidor de CCD a 40 µg/mL en 5 pacientes representativos con sIgE positiva a CCD mostró una reducción extensa (≥90%) de la reactividad de sIgE a nVesp v 1. En 2 pacientes con sIgE positiva a nVesp v 1 y sIgE negativa a CCD, el inhibidor no indujo ninguna reducción de la reactividad de sIgE a nVesp v 1 (inhibición inferior al 4%) (Tabla 11).

Tabla 11. Estudios de inhibición de la unión de IgE en cinco pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* con sIgE positiva a nVesp v 1 en los que se muestra el efecto del inhibidor de CCD, sugiriendo el carácter glicoprotéico de nVesp v 1.

	sIgE (kU_A/L)		CAP-inhibición con ProGlycAn CCD-Blocker®	
Paciente	$MUXF^3$ Bromelain	nVesp v 1	nVesp v 1 (kU_A/L)	nVesp v 1 (%)
#6	59.9	27.12	0.82	96.9
#7	19.8	19.6	0.15	99.2
#8	3.05	4.81	0.07	98.5
#9	0.17	4.79	4.62	3.5
#10	0.17	2.13	2.06	3.2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Estudios de inhibición de la unión de IgE en cinco pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina*.

	CAP-Inhibition with *Vespula* spp venom					CAP-Inhibition with *VVN* venom				
ID	**Alérgeno**	Basal kU_A/L	25 µg/mL kU_A/L (%)	50 µg/mL kU_A/L (%)	100 µg/mL kU_A/L (%)	**Alérgeno**	Basal kU_A/L	25 µg/mL kU_A/L (%)	50 µg/mL kU_A/L (%)	100 µg/mL kU_A/L (%)
#1	***VVN***	5.20	0.16 (96.9)	0.07 (98.6)	0.04 (99.2)	***Vespula* spp**	15.6	5.29 (66.0)	4.72 (69.7)	3.84 (75.3)
	nVesp v 1	2.25	0.15 (93.3)	0.07 (96.8)	0.05 (97.7)	**rVes v 1**	8.72	5.93 (31.9)	5.86 (32.7)	5.57 (36.1)
	nVesp v 5	5.64	0.30 (94.6)	0.16 (97.1)	0.12 (97.8)	**rVes v 5**	8.51	2.49 (70.7)	2.16 (74.6)	1.74 (79.5)
#2	***VVN***	1.94	1.21 (37.6)	0.17 (91.2)	0.11 (94.3)	***Vespula* spp**	16.8	7.23 (56.9)	6.99 (58.3)	5.33 (68.2)
	nVesp v 1	0.01	ND	ND	ND	**rVes v 1**	0.02	ND	ND	ND
	nVesp v 5	8.11	4.14 (48.5)	0.75 (90.7)	0.66 (91.8)	**rVes v 5**	27.1	12.0 (55.7)	10.3 (61.9)	9.12 (66.3)
#3	***VVN***	1.58	0.47 (70.2)	0.20 (87.3)	0.10 (93.6)	***Vespula* spp**	5.44	2.39 (56.0)	2.21 (59.3)	1.89 (34.7)
	nVesp v 1	2.84	1.36 (52.1)	0.72 (74.6)	0.37 (86.9)	**rVes v 1**	1.13	0.98 (13.2)	0.99 (12.3)	0.88 (22.1)
	nVesp v 5	0.67	0.15 (77.6)	0.08 (88.0)	0.05 (92.5)	**rVes v 5**	1.32	0.56 (57.5)	0.55 (58.3)	0.50 (62.1)
#4	***VVN***	2.93	0.74 (74.7)	0.32 (89.1)	0.23 (92.1)	***Vespula* spp**	25.4	14.1 (44.4)	14.4 (43.3)	14.5 (43.3)
	nVesp v 1	1.83	0.87 (52.4)	0.51 (72.1)	0.36 (80.3)	**rVes v 1**	0.12	0.06 (50.0)	0.04 (66.6)	0.04 (66.6)
	nVesp v 5	5.38	1.04 (80.6)	0.24 (95.5)	0.22 (95.9)	**rVes v 5**	37.1	24.3 (34.5)	24.5 (34.0)	25.0 (32.6)
#5	***VVN***	3.77	0.02 (98.9)	0.01 (98.9)	0.02 (98.3)	***Vespula* spp**	16.5	5.95 (64.0)	6.25 (62.1)	6.12 (63.0)
	nVesp v 1	0.02	ND	ND	ND	**rVes v 1**	0.04	ND	ND	ND
	nVesp v 5	6.47	0.07 (99.4)	0.07 (99.7)	0.04 (98.4)	**rVes v 5**	17.1	7.69 (55.0)	8.3 (51.4)	7.9 (53.8)

Inhibición con veneno de *Vespula* spp. 100 µL del suero se preincuba con 100 µL de veneno de *Vespula* spp en PBS a distintas concentraciones (25, 50, and 100 µL/mL). Tras la incubación toda la noche a 4ºC, se mide el CAP frente al veneno de *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5 en ImmunoCAPs activados con estreptavidina.

Inhibición con veneno de *Vespa velutina*. 100 µL del suero se preincuba con 100 µL de veneno de *Vespa velutina* en PBS a distintas concentraciones (25, 50, and 100 µL/mL). Tras la incubación toda la noche a 4ºC, se mide el CAP frente al veneno de *Vesula spp*, rVes v 1 y rVes v 5 comerciales.

Albúmina bovina sérica (BSA), control negative. El grado de inhibición se expresa como el porcentaje con respecto al valor basal inicial considerado como control (1-sIgE tras inhibición/sIgE antes de inhibición) X 100. Las cifras representan la reactividad sIgE y (porcentaje de inhibición) para cada concentración del inhibidor.

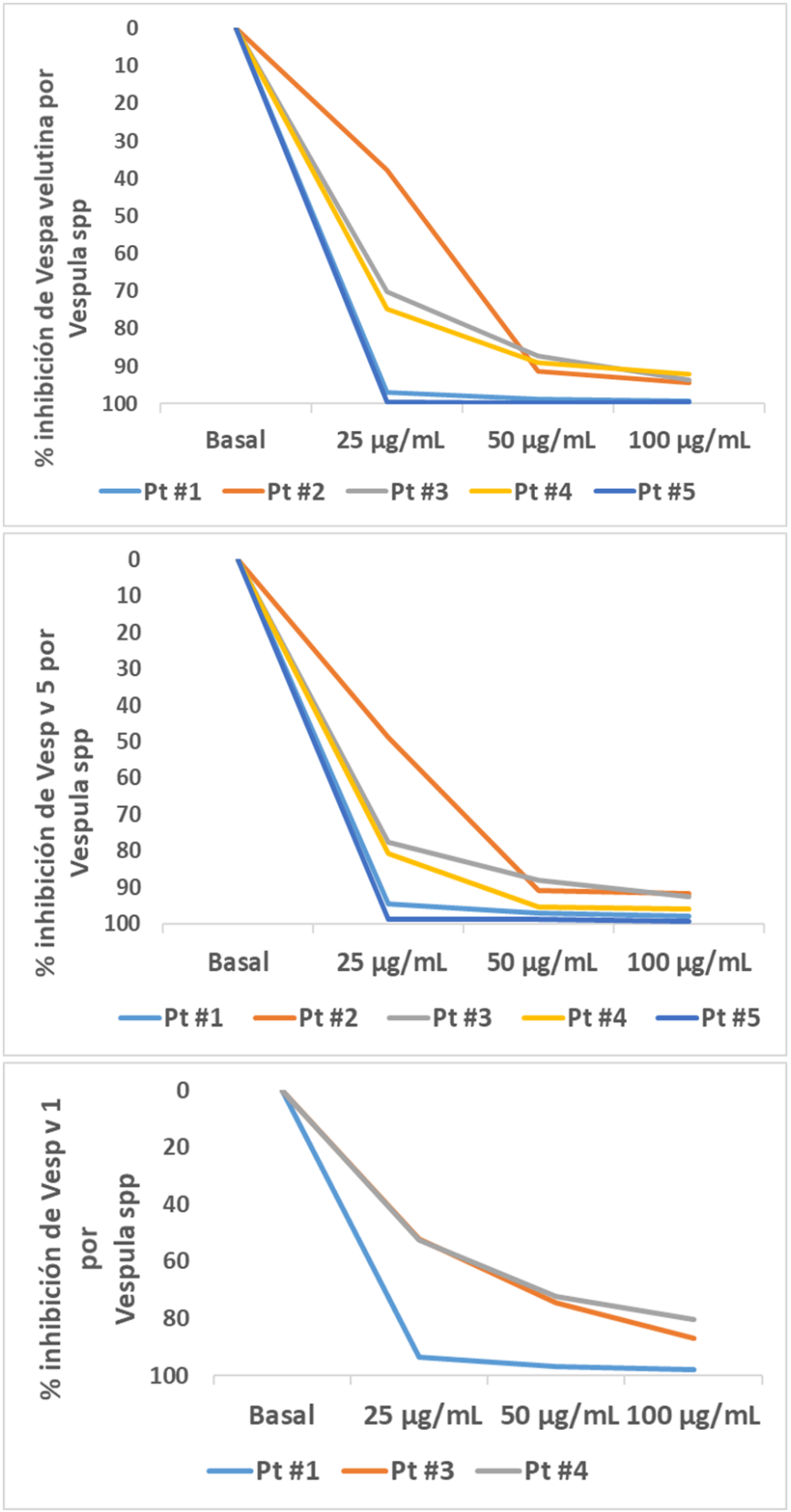


Figura 11. Porcentaje de inhibición de la unión de suero al ImmunoCAP® de *Vespa velutina*, Vesp v 5 (antígeno 5) y Vesp v 1 (fosfolipasa A1) por el veneno de *Vespula* spp (imagen elaboración propia).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Tinción de glicoproteína

Mediante la tinción específica para detectar glicoproteínas del SDS-PAGE realizado con nVesp v 5, nVesp v1 y nVes v 1 se demostró que, al contrario que nVesp v 5 y nVes v 1, nVesp v 1 es un alérgeno glicosilado (Figura 12). Las bandas en color magenta indican la presencia de glicoproteínas basado en la tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). Los alérgenos nVes v 5 y nVes v 1 se obtuvieron de la fuente nativa y no son recombinantes por lo que la ausencia de reconocimiento glicoproteíco confirma la naturaleza no glicídica de las moléculas.

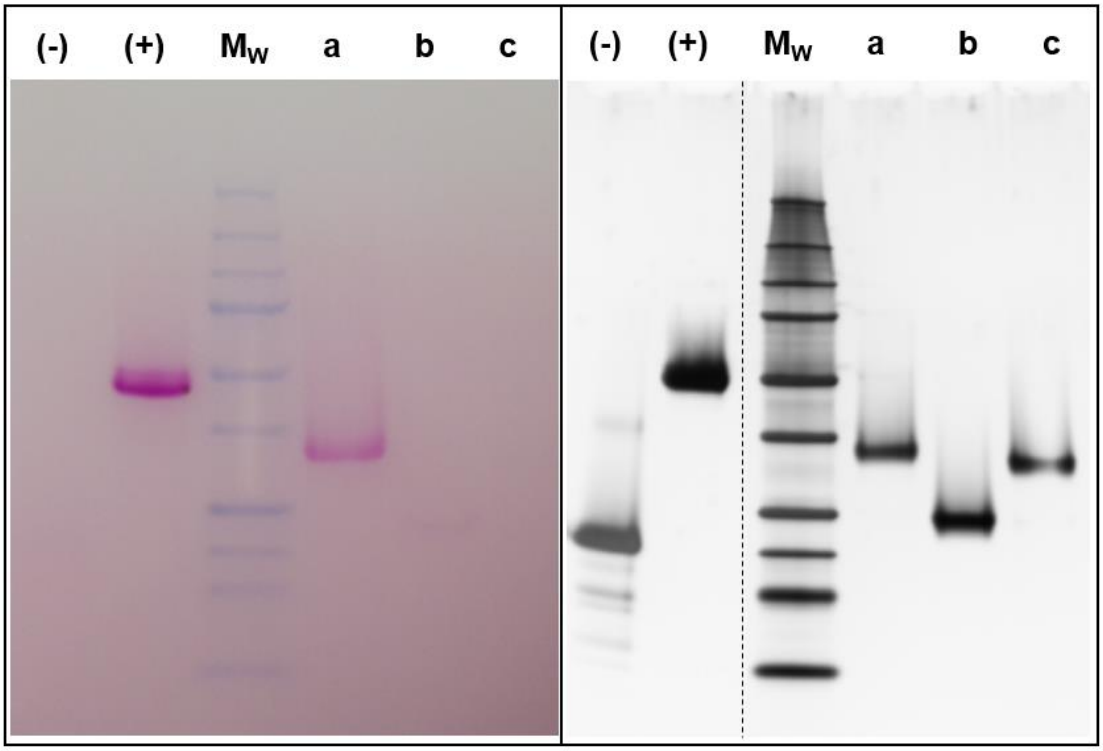


Figura 12. SDS-PAGE teñido específicamente para detector glicoproteínas (panel coloreado de la izquierda) y tinción de plata (panel a la derecha) que demuestra la presencia de las proteínas analizadas. Las bandas coloreadas en magenta se corresponden con proteínas glicosiladas, siendo exactamente las mismas que aparecen en la tinción de plata marcadas como "a, b y c" y que se corresponden con Vesp v 1, Vesp v 5 y Ves v 1, respectivamente. Los signos (-) y (+) representan los controles positivo y negativo del kit de glicoproteínas (Soybean Trypsin Inhibitor y Horse Radish Peroxidase, respectivamente). Mw se corresponde con los marcadores de pesos moleculares (BioRad Precision-Plus Protein All Blue Standards) con pesos de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa, visibles como marcas de color azul en el panel de la izquierda y en el medio del panel de la derecha. La línea punteada en el panel de la derecha indica, únicamente, que la imagen es una composición del panel original de SDS-PAGE, para mostrar el mismo orden de las muestras en ambos paneles, derecha e izquierda (imagen elaboración propia).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Identificación de la actividad biológica del veneno de *Vespa velutina* y sus componentes moleculares Vesp v 1 y Vesp v 5 mediante la prueba de activación de basófilos

Los resultados de este capítulo (3.1) han sido publicados por: Virginia Rodríguez-Vázquez, Sara López-Freire, Paula Méndez-Brea, Teresa González-Fernández, Cristian Hernández-Pérez[1], Carmen Vidal.

La prueba de activación de basófilos en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros: una revisión de la evidencia actual. Rev Alerg Mex 2022;69:102-12.

Servicio de Alergia, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España

1. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

Los resultados de este capítulo (3.2) han sido publicados por: Virginia Rodríguez-Vázquez[1], Jose Gómez-Rial[2], Rafael Monsalve[3], Carmen Vidal[1].

Consistency of determination of sIgE and the basophil activation test in Vespa velutina nigrithorax allergy. J Investig Allegol Clin Immunol 2022,32:143-5.

1. Servicio de Alergia, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España

2. Laboratorio de Inmunología, Servicio de Análisis Clínicos. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, España.

3. Chemistry, Manufacturing and Control Research and Development, ALK-Abelló, Madrid, España

3.1. *Revisión de la utilidad de la prueba de activación de basófilos en el diagnóstico de la alergia al veneno de los himenópteros aplicado al seguimiento de la inmunoterapia específica con estos alérgenos*

En la revisión se incluyeron 10 estudios, [Erdmann et al., 2004; Ebo et al., 2007; Mikkelsen et al., 2010; Cichocka-Jarosz et al., 2011; Eržen et al., 2012; Žitnik et al., 2012; Bidad et al., 2013; Rodríguez Trabado et al., 2016; Sainte-Laudy et al., 2016; Urra et al., 2016] con datos de 182 pacientes que habían presentado una reacción sistémica tras la picadura de los himenópteros y que, además, estaban en tratamiento con veneno de himenóptero. Para el análisis se consideraron sólo los pacientes que realizaron todo el periodo de seguimiento planteado en el estudio, y que tuvieran los resultados de un TAB basal, previo al inicio de la inmunoterapia, positivo al veneno y al menos otro TAB más en diferentes momentos de la fase de inicio o mantenimiento.

De esta selección resultó un total de 167 pacientes, de los que 137 eran adultos y 30 menores de 18 años en el momento de la inclusión en los diferentes estudios. Respecto al himenóptero responsable de la reacción, 46 pacientes eran alérgicos a *Apis mellifera* y 121 a véspidos: 102 a *Vespula spp*, 15 a *Polistes spp (Polistes dominulus),* 3 *a Vespa crabro* y un paciente tenía doble sensibilización a *Vespula spp* y *Polistes spp.* En la muestra se incluyeron 11 pacientes con mastocitosis sistémica que procedían de un único estudio [Bidad et al., 2013].

En todos los estudios se cuantificó CD63 por citometría de flujo, mientras que en 2 trabajos [Mikkelsen et al., 2010; Bidad et al., 2013] se utilizó CD203c como marcador de activación complementario. No se analizó el método empleado para la técnica de activación o para la selección de la población de basófilos, pero los estudios revisados debían disponer de datos de una activación espontánea (control negativo) y de una activación como control positivo (con anti-IgE, anti-FcεRI, o fMLP). Para la activación con el alérgeno se emplearon al menos dos concentraciones del veneno implicado, seleccionadas tras la realización de una curva dosis-respuesta. En varios estudios [Cichocka-Jarosz et al., 2011; Žitnik et al., 2012; Bidad et al., 2013] se especificó que el TAB se realizaba previo a la administración de la dosis de inmunoterapia para evitar el efecto de degranulación de los basófilos tras la inyección subcutánea del alérgeno.

El umbral de reactividad o positividad establecido por la mayor parte de los autores fue >15% de células CD63+, salvo en el trabajo de Cichocka-Jarosz et al. que fue del 10% [Cichocka-Jarosz et al., 2011] y en tres de ellos que no se especificó el umbral de positividad [Ebo et al., 2007; Mikkelsen et al., 2010; Bidad et al., 2013]. El umbral de sensibilidad se expresó en 2 estudios como LC50 [Mikkelsen et al., 2010; Bidad et al., 2013]. Los estudios de Zitnik y cols. sugieren que la sensibilidad del basófilo, expresada como ratio 0.1/1, es de utilidad para predecir la aparición de efectos secundarios durante la fase de incremento de la dosis de la inmunoterapia [Žitnik et al., 2012]. Sin embargo, en otros estudios no se confirma la utilidad de la ratio para este fin [Mikkelsen et al., 2010].

En dos de los estudios revisados [Erdmann et al., 2004; Eržen et al., 2012], los pacientes se sometieron a prueba de la repicadura controlada, haciendo un total de 48 pacientes sometidos a esta exposición, siendo negativo el resultado en todos ellos excepto uno. En tres estudios [Ebo et al., 2007; Zitnik et al., 2012; Rodríguez-Trabado et al., 2016], se

USC DE SANTIAGO

registró la concurrencia de picaduras espontáneas en el curso del tratamiento, siendo todas ellas bien toleradas.

Las variables analizadas en cada uno de los estudios fueron:

a) Concentración del veneno de himenóptero empleada en el TAB

En la mayoría de los estudios revisados se presentó la curva dosis-respuesta frente a diferentes concentraciones del alérgeno hasta alcanzar el *plateau* de respuesta máxima, lo que permitió la validación de la técnica para los estudios posteriores. En la fase de estudio longitudinal se utilizaron al menos dos concentraciones, incluyendo la respuesta máxima. La concentración óptima del alérgeno parece depender del uso que se le quiera dar a la técnica: diagnóstico o de seguimiento de vacunación. En el primer caso, la concentración utilizada debe ser capaz de discriminar entre pacientes y controles. Ebo y cols. encontraron que la concentración de 10 µg/mL de veneno presentaba una sensibilidad del 83.8% y una especificidad del 100% si bien en otros estudios, se utilizaron concentraciones inferiores con menor éxito [Erdmann et al., 2004; Ebo et al., 2007], 0.1 µg/mL [Mikkelsen et al., 2010; Bidad et al., 2013; Urra et al., 2016]. Concentraciones altas sirven en la fase de diagnóstico pero no marcan diferencias en la evolución. El empleo de concentraciones submáximas como 0.1 µg/mL [Eržen et al., 2012; Žitnik et al., 2012; Rodríguez Trabado et al., 2016], 0.05 µg/mL [Bidad et al., 2013] y 0.01 µg/mL [Ebo et al., 2007] permite, por el contrario, detectar diferente grado de activación a lo largo del tiempo.

b) Momento de la inmunoterapia en que se analiza la prueba de TAB

Durante las fases iniciales de tratamiento no se detectan cambios significativos ni permanentes en la respuesta de activación alérgeno-específica del basófilo. El empleo de pautas rápidas de inicio no parece acelerar los cambios en la activación de los basófilos [Ebo et al., 2007; Cichocka-Jarosz et al., 2011].
Los principales cambios en la activación de los basófilos se concentraron en la fase de mantenimiento y, especialmente, en los últimos años de tratamiento. Para Rodríguez-Trabado y cols. una primera determinación a los 3 meses de iniciar la vacunación es capaz de detectar un descenso significativo en la activación de los basófilos (tras una pauta de incremento semanal en 6 semanas y primeras dosis de mantenimiento) pero la activación decae definitivamente tras dos años de tratamiento. En todos los estudios en los que se valoró la respuesta del basófilo al final del tratamiento [Eržen et al., 2012; Žitnik et al., 2012; Rodríguez Trabado et al., 2016; Sainte-Laudy et al., 2016] se encontraron cambios significativos respecto al basal en el TAB.

c) Edad de los pacientes

Se han incluido en esta revisión dos artículos [Cichocka-Jarosz et al., 2011; Žitnik et al., 2012] que emplearon el TAB en el seguimiento de la inmunoterapia en la población infantil, incluyendo un total de 30 pacientes que representan el 18% del total de la muestra revisada. En ambos casos, los pacientes eran alérgicos al veneno de *Apis mellifera*. Cabe remarcar que no se encontraron cambios sustanciales en los resultados respecto a los encontrados en la población adulta de modo que el 80% de los pacientes mostraron una disminución de la activación de basófilos al finalizar el tratamiento. Estos

USC
DE COMPOSTELA

estudios no incluyeron la realización de prueba de repicadura pero sí control de los eventos tras repicaduras espontáneas que se dio en el 45% de los pacientes, siendo toleradas en todos ellos.

3.2. La prueba de activación de basófilos como medida de actividad biológica del veneno de Vespa velutina y sus componentes moleculares

Los 10 pacientes analizados mediante la prueba de TAB presentaron un resultado positivo de sIgE (≥0,35 kU_A/L) a *Vespa velutina* y al veneno de *Vespula spp.* En 9 de estos pacientes se detectó sIgE a *Vespa crabro* y *Polistes dominula*. Los niveles de sIgE frente a *Vespula spp* fueron más altos que los niveles de sIgE a *Vespa velutina.* Estos resultados se muestran en la Tabla 12 junto al resto de evaluaciones de sIgE y otros parámetros de manera individualizada para cada uno de los pacientes.

Tabla 12. Resultados de laboratorio y datos clínicos de los pacientes incluídos en el estudio de TAB.

Parámetro	Paciente									
	#1	**#2**	**#3**	**#4**	**#5**	**#6**	**#7**	**#8**	**#9**	**#10**
Edad (años)	26	48	59	64	79	74	81	36	45	55
Grado anafilaxia	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2
REMA	1	0	1	0	1	-2	1	-2	-2	-2
IgE total (UI/mL)	172	356	496	1134	91	488	88	167	119	70
Triptasa basal (ng/mL)	14.5	4.8	11.1	4.7	4.2	6.7	4.9	5.7	5.2	2.1
sIgE MUXF3 (kU_A/L)	0.15	0.32	0.02	0.13	0.07	8.03	0.01	0.01	0.10	0.07
sIgE *Apis mellifera* (kU_A/L)	0.44	0.63	4.64	1.63	0.60	60.90	0.36	0.03	0.11	1.48
sIgE rApi m 1 (kU_A/L)	0.04	0.02	0.65	0.03	0.04	22.20	0.29	0.00	0.00	0.00
sIgE rApi m 5 (kU_A/L)	0.03	2.20	0.18	10.40	0.99	30.60	0.01	0.02	0.37	2.70
sIgE rApi m 10 (kU_A/L)	0.00	0.10	12.30	0.02	0.15	6.89	0.00	0.04	0.00	0.00
sIgE *Vespula spp* (kU_A/L)	3.35	16.70	>100	>100	8.77	35.30	6.44	9.82	6.84	6.37
sIgE rVes v 1 (kU_A/L)	2.77	19.50	0.40	1.42	0.02	0.78	0.03	12.50	0.02	6.89
sIgE rVes v 5 (kU_A/L)	0.13	1.21	>100	>100	12.30	20.40	4.13	0.60	7.25	0.11
sIgE *Polistes dominula* (kU_A/L)	0.14	36.00	48.80	>100	1.56	28.60	3.30	10.30	3.47	19.9
sIgE rPol d 5 (kU_A/L)	0.19	14.80	83.20	>100	2.00	23.30	1.42	1.44	5.17	0.77
sIgE *Vespa crabro* (kU_A/L)	0.87	5.82	2.94	7.79	0.30	24.10	3.39	8.02	0.87	1.87
sIgE *Vespa velutina* (kU_A/L)	1.11	4.93	8.29	2.42	0.41	32.60	2.80	7.66	2.25	1.63
sIgE nVesp v 1 (kU_A/L)	0.70	1.12	0.56	0.53	0.07	9.44	0.12	1.17	0.05	0.91
sIgE nVesp v 5 (kU_A/L)	0.03	1.71	26.90	62.40	1.51	14.20	1.36	0.16	5.41	0.07

-Prueba de activación de basófilos.

Como se puede ver en la Figura 13 y la Tabla 13, todos menos 1 paciente (# 3) presentaron un resultado positivo en los experimentos TAB con, al menos, 1 de los

alérgenos probados. Los componentes alergénicos nVesp v 1 y nVesp v 5 activaron los basófilos en 5 y 7 pacientes, respectivamente (las imágenes de 3 pacientes representativos se pueden ver en la Figura 14. Cuando fueron positivos, los porcentajes de basófilos activados con veneno entero de *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5 fueron similares. La prueba de rango de Spearman no reveló correlaciones entre el porcentaje máximo de basófilos activados y las concentraciones de sIgE contra ningún alérgeno probado (r = 0.103, P = 0.777 para el veneno entero de *Vespa velutina*; r = 0.055, P = 0.881 para nVesp v 1; y r = 0.067, P = 0.885 para nVesp v 5) o la gravedad de la reacción anafiláctica. Los 5 controles sanos presentaron resultados negativos en la prueba de activación (Tabla 14).

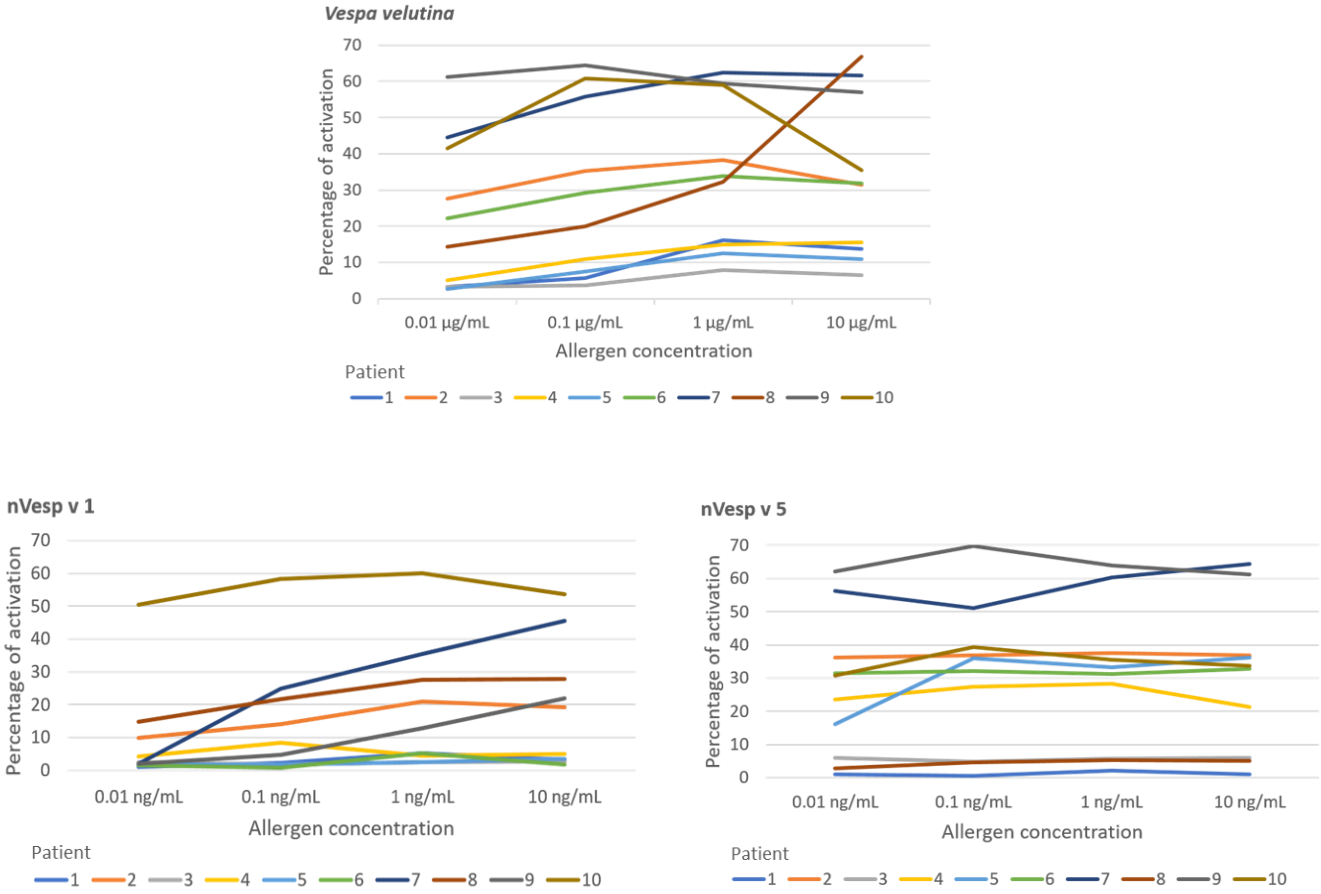


Figura 13. Representación y datos del porcentaje de activación de la expresión de CD63 en la superficie de los basófilos tras la exposición a diferentes concentraciones del veneno completo de *Vespa velutina*, nVesp v 1 (fosfolipasa A1), y nVesp v 5 (antígeno 5) en cada paciente (imagen de Rodriguez-Vázquez et al. 2022 con autorización de ESMON, editorial de JIACI. Ver publicaciones en Anexo).

Tabla 13. Resultados individuales de la prueba de TAB con el veneno completo *Vespa velutina* y con sus componentes moleculares (nVesp v 1 and nVesp v 5) en los 10 pacientes estudiados

			Alérgeno											
Paciente	**Basal (-)**	**fMLP (+)**	***Vespa velutina*** 10µg/mL	***Vespa velutina*** 1µg/mL	***Vespa velutina*** 0.1µg/mL	***Vespa velutina*** 0.01µg/mL	**Vesp v 1** 10ng/mL	**Vesp v 1** 1ng/mL	**Vesp v 1** 0.1ng/mL	**Vesp v 1** 0.01ng/mL	**Vesp v 5** 10ng/mL	**Vesp v 5** 1ng/mL	**Vesp v 5** 0.1ng/mL	**Vesp v 5** 0.01ng/mL
#1	1.78	30.75	13.70	16.10	5.61	3.34	3.25	5.18	2.16	1.02	1.06	2.08	0.53	1.14
#2	5.88	36.21	31.36	38.21	35.29	27.64	19.26	20.99	13.97	9.75	36.9	37.57	36.92	36.19
#3	1.61	47.10	6.59	7.93	3.72	3.30	2.63	2.52	1.69	2.51	5.98	5.71	4.93	6.10
#4	3.69	30.43	15.54	14.98	10.96	5.11	4.88	4.34	8.43	4.17	21.31	28.33	27.41	23.6
#5	4.27	43.37	10.87	12.55	7.50	2.60	3.40	2.45	1.64	1.66	36.12	33.27	36.00	16.16
#6	1.26	25.00	31.78	33.79	29.18	22.25	1.85	5.15	0.82	1.54	32.87	31.13	32.23	31.37
#7	2.13	16.44	61.63	62.50	55.75	44.60	45.44	35.32	24.90	2.00	64.34	60.37	50.99	56.19
#8	4.81	27.37	66.88	32.24	20.04	14.44	27.75	27.61	21.63	14.80	5.05	5.34	4.63	2.94
#9	1.73	31.40	57.04	59.35	64.34	61.27	21.89	12.90	4.63	2.09	61.18	63.88	69.8	62.01
#10	4.00	45.41	35.38	59.00	60.82	41.43	53.60	60.00	58.19	50.39	33.73	35.56	39.38	30.67

Los datos se presentan como porcentajes de activación en la prueba de TAB a cada concentración del alérgeno y utilizando el kit Basotest®. Control negativo, solución de lavado. Control positive, n-formyl-Met-Leu-Phe peptide (fMLP).

Los resultados del TAB fueron consistentes con la presencia de sIgE específica de modo que todos los pacientes excepto uno (#3) con una sIgE específica positiva al veneno completo de *Vespa velutina* presentaron una activación positiva al exponerse al veneno completo de *Vespa velutina* o a sus componentes moleculares (nVesp v 1 or nVesp v 5). Sin embargo, no se encontró una correlación entre el grado de activación de los basófilos y el nivel de sIgE. Considerando una variable dicotómica tanto para la presencia o no de sIgE como para la activación o no de los basófilos (positivo frente a negativo), el veneno completo de *Vespa velutina* y nVesp v 5 se comportaron mejor que nVesp v 1 (Tabla 14).

Tabla 14. Concordancia entre los resultados de CAP (sIgE) y TAB con veneno entero de *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5

	Vespa velutina			**nVesp en 1**			**nVesp v 5**		
Paciente	**sIgE>0,35**	**BAT>15%**	**Concordancia**	**sIgE>0,35**	**BAT>15%**	**Concordancia**	**sIgE>0,35**	**BAT>15%**	**Concordancia**
#1	Positivo	Positivo	Sí	Positivo	Negativo	No	Negativo	Negativo	Sí
#2	Positivo	Positivo	Sí	Positivo	Positivo	Sí	Positivo	Positivo	Sí
#3	Positivo	Negativo	No	Positivo	Negativo	No	Positivo	Negativo	No
#4	Positivo	Positivo	Sí	Positivo	Negativo	No	Positivo	Positivo	Sí
#5	Positivo	Negativo	No	Negativo	Negativo	Sí	Positivo	Positivo	Sí
#6	Positivo	Positivo	Sí	Positivo	Negativo	No	Positivo	Positivo	Sí
#7	Positivo	Positivo	Sí	Negativo	Positivo	No	Positivo	Positivo	Sí
#8	Positivo	Positivo	Sí	Positivo	Positivo	Sí	Negativo	Negativo	Sí
#9	Positivo	Positivo	Sí	Negativo	Positivo	No	Positivo	Positivo	Sí
#10	Positivo	Positivo	Sí	Positivo	Positivo	Sí	Negativo	Positivo	No

A modo ilustrativo, se presenta en la siguiente figura un ejemplo de la visualización de la activación de CD63 en tres pacientes y un control.

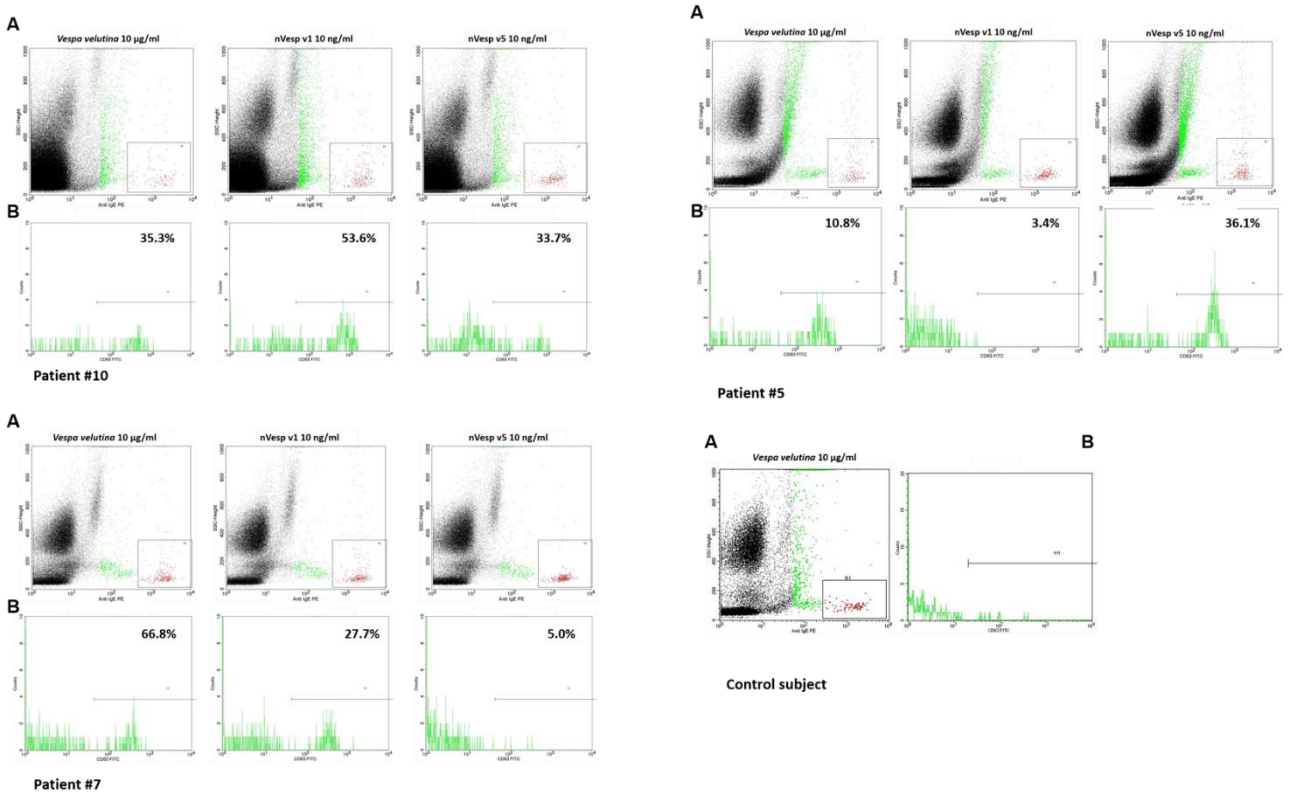


Figura 14. Imagen del citómetro en donde se presentan los resultados de 3 pacientes con distintos modelos de activación. #10 se activa con *Vespa velutina*, nVesp v 1 y nVesp v 5; #7 se activa con *Vespa velutina* y con nVesp v 1; # se activa solo con nVesp v 5 y paciente control no activado (imagen de Vidal et al 2021 con autorización de ESMON, editorial de JIACI. Ver publicaciones en Anexo).

4. Seguimiento de la sensibilización mediada por IgE de los pacientes con anafilaxia por veneno de *Vespa velutina* y tratados con veneno de *Vespula* spp

Los resultados de este capítulo han sido publicados por: Virginia Rodríguez-Vázquez[1], Margarita Armisén[1], Jose Gómez-Rial[2], Beatriz Lámas-Vázquez[2], Carmen Vidal[1].

Immunotherapy with Vespula venom for Vespa velutina nigrithorax anaphylaxis: preliminary clinical and immunological results. Clin Exp Allergy 2022;52:345-7.

1. Servicio de Alergia, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España

2. Laboratorio de Inmunología. Servicio de Análisis Clínicos, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, España.

Se realizó un análisis de la evolución de la sIgE y sIgG4 en 46 pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* y tratados con veneno de *Vespula* spp. La edad mediana de estos pacientes fue de 61 años (rango, 20–78 años) and 39 (84.8%) eran hombres. Al igual que en el resto de los estudios realizados, la mayoría de los pacientes (93.5%) había comunicado picaduras previas de *Vespula* spp y/o *Apis mellifera* (31, 67.4%) y en solo 10 casos (21.7%) habían comunicado picaduras previas por *Vespa velutina.* Todos los pacientes que iniciaron inmunoterapia específica entre noviembre de 2019 y mayo de 2020 participaron en el estudio.

En la Figura 15 se representan los cambios en sIgE y sIgG4 en estos pacientes desde la situación basal a los 6 y 12 meses tras el inicio de la inmunoterapia específica. Se observó una reducción significativa de la sIgE frente a *Vespa velutina* y *Vespula spp* (mediana de reducción, 10.4% y 25% respectivamente) después de 12 meses. No se detectaron cambios significativos a los 6 meses. En cuanto a la sIgG4 se detectó un aumento significativo tanto frente a *Vespa velutina* como a *Vespula spp* (mediana de aumento. 25.3% y 30.8% respectivamente) a los 12 meses. Contrariamente a lo que había sucedido con la sIgE, los cambios en la sIgG4 fueron significativos a los 6 meses. La disminución de la sIgE a los 12 meses se observó en 35 pacientes (76.1%), mientras que el aumento de la sIgG4 se observó en 37 pacientes (80.4%).

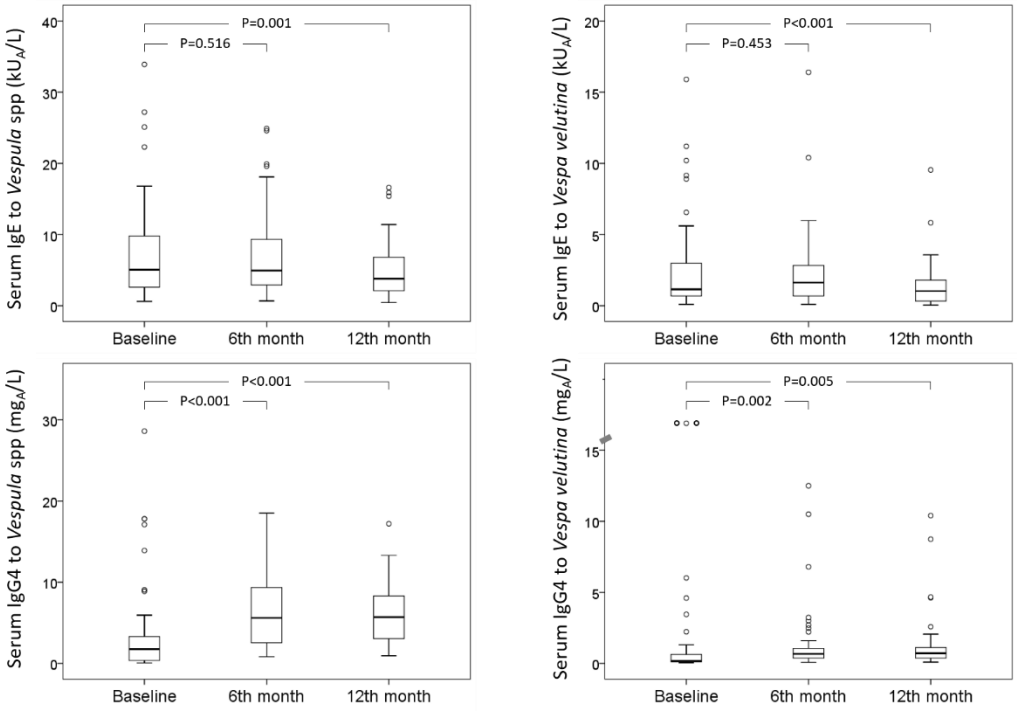


Figura 15. Evolución de la sIgE y sIgG4 frente a veneno de *Vespula* spp y *Vespa velutina* en los pacientes del estudio (imagen tomada de la publicación de los resultados en Rodriguez-Vázquez et al, 2022 con autorización de Wiley, editorial de Clinical and Experimental Allergy).

USC
DE COMPOSTELA

No se pudo encontrar ninguna diferencia basal entre los pacientes que presentaron cambios con respecto a los que no lo hicieron en cuanto a la edad, la gravedad de la

reacción o los niveles basales de sIgE a *Vespa velutina* o *Vespula spp.* No se realizó prueba de repicadura con *Vespa velutina*, pero 13 pacientes (28.2%) sufrieron picaduras de campo sin reacciones sistémicas después de una mediana de 9 meses (rango, 4-12 meses) después de comenzar la inmunoterapia. Doce de estos pacientes presentaron un aumento de la sIgG4 o una disminución de la sIgE o ambas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La especie invasora, *Vespa velutina,* está asentada en nuestra Comunidad Autónoma y no parece probable que vaya a desaparecer en los próximos años dada la potencial multiplicación de nidos y ejemplares por todo el territorio. Consecuencia de ello, es esperable que los problemas en el ecosistema y en la salud que su presencia acarrea se mantengan o, incluso, experimenten un aumento en su prevalencia.

Desde la esfera alergológica, la presencia de la *Vespa velutina* ha provocado un giro en la causalidad de las reacciones anafilácticas en las que los himenópteros se encuentran implicados. Sirva como ejemplo el hecho de que, desde el primer caso descrito en 2015, el número de casos de anafilaxia por picadura de *Vespa velutina* se ha incrementado exponencialmente. Considerando el número de pacientes que estaban recibiendo inmunoterapia con veneno en nuestro centro, en el año 2015 el 60.3% (de un total de 126) estaban siendo tratados con veneno de *Apis mellifera* al ser las picaduras por abejas las que con más frecuencia ocasionaban este tipo de reacciones. En junio de 2019 el 68.2% sobre un total de 245 pacientes estaban siendo tratados con veneno de *Vespula spp*, siendo en su mayoría pacientes con sintomatología tras la exposición a *Vespa velutina*. Así, en el primero de los trabajos realizados sobre un total de 100 pacientes consecutivos remitidos a nuestro Servicio de Alergología, identificamos que el 77 % de ellos se relacionaron con la *Vespa velutina* como el insecto culpable de la reacción, frente al 11% y 10% de pacientes que identificaron *Vespula spp*, y *Apis mellifera,* respectivamente. Por lo tanto, los casos de anafilaxia por el veneno de los himenópteros en general han aumentado considerablemente y, en particular, secundario a la presencia de *Vespa velutina*.

Perfiles de sensibilización de los pacientes

Al analizar el perfil de sensibilización de estos pacientes hemos podido comprobar que se detecta sIgE frente a venenos de otros himenópteros, lo que revela la bien conocida reactividad cruzada que existe entre las distintas especies [Bilò et al., 2019c]. De hecho, más del 70% de los pacientes estudiados presentaron sIgE frente a todos los venenos estudiados, siendo más frecuente el reconocimiento de alérgenos de otros véspidos, pero hasta el 50% de ellos reconocen Api m 5 (dipeptidilpeptidasa IV homóloga a Ves v 3 de *Vespula spp*), alérgeno identificado tanto en abejas como en avispas [Blank et al., 2010]. De todas las fuentes alergénicas estudiadas, es de destacar el elevado reconocimiento de *Vespula spp* como fuente alergénica total y de Ves v 5 como alérgeno mayoritario. Por su parte, el elevado reconocimiento de Pol d 5 no es de extrañar habida cuenta de la elevada reactividad cruzada que existe entre Ves v 5 y Pol d 5 [Monsalve et al., 2012]. Este reconocimiento puede ser debido al hecho de que los pacientes se hayan sensibilizado a través de picaduras previas de otros himenópteros, concretamente véspidos, y tras el contacto con el veneno de *Vespa velutina*, se haya desencadenado la reacción. Llama la atención que el reconocimiento de sIgE frente a *Vespula spp* fue más frecuente que el de *Vespa crabro*, especie más cercana a *Vespa velutina* desde un punto de vista filogenético que *Vespula s*pp.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Para detectar sIgE frente al veneno de *Vespa velutina* y previo a la comercialización de este veneno por parte del laboratorio ThermoFisher como “Asian Hornet” para uso en

investigación, conseguimos ImmunoCAPS activados a los que se unió el veneno completo de *Vespa velutina*. Esta metodología se emplea en alergología cuando no se dispone de CAPs comerciales para su identificación. La posibilidad de utilizar estos ImmunoCAPs activados nos permitió medir la sIgE frente a este veneno completo y, también, frente a sus dos alérgenos principales Vesp v 5 (ya identificado en la base de datos de componentes moleculares Allergen.org) y Vesp v 1, fosfolipasa A 1 del veneno de *Vespa velutina,* que se identificó como alérgeno por nuestro grupo.

El empleo de este tipo de CAPs suele provocar respuestas más débiles que las que producen los ImmunoCAPs comerciales por estar, estos últimos, enriquecidos con algunos componentes moleculares concretos y aumentar así la sensibilidad de la técnica. Por ello, no fue de extrañar que los niveles de sIgE que se pudieron detectar frente a *Vespa velutina* fueron inferiores a los de *Vespula* spp cuando se analizó la fuente alergénica completa y a los de Ves v 1 y Ves v 5 cuando se analizaron los respectivos componentes moleculares Vesp v 1 y Vesp v 5. Aun así, los estudios de correlación de los niveles de sIgE tanto de fuentes alergénicas completas de *Vespa velutina* y *Vespula spp* como de sus componentes respectivos en cada una de las especies, mostró un elevado grado de correlación. Esto apoyaría la hipótesis de que, efectivamente, si bien la sensibilización pudo haberse producido a través de picaduras de véspidos, la reacción se desencadenaría por el elevado reconocimiento de la sIgE a los componentes de *Vespa velutina*.

Un hallazgo relevante fue el de la glicosilación de Vesp v 1. Vesp v 1 es una fosfolipasa A 1 que, en otras especies de véspidos, por ejemplo, Ves v 1 o Pol d 1, no se encuentra glicosilada. La glicosilación tiene importancia desde el punto de vista alergológico por las posibles interferencias debidas al reconocimiento de sIgE de los llamados CCDs (carbohidratos con reactividad cruzada). Estudios previos de nuestro grupo demostraron que, por ejemplo, la ingesta de alcohol provocaba respuestas de IgE positivas frente a componentes moleculares glicosilados [González-Quintela et al.,2008; 2011; Carballada et al., 2010]. De hecho, en algún caso, hemos podido comprobar que la ingesta exagerada de alcohol puede llegar a conducir a algún error diagnóstico en la alergia al veneno de los himenópteros con consecuencias en las decisiones terapéuticas como en el caso de dos pacientes con anafilaxia por veneno de Apis mellifera que llegaron a recibir inmunoterapia específica cuando, estudios de inhibición, demostraron, posteriormente, que la sensibilización era consecuencia de la presencia de esas moléculas glicosiladas [Valcarcel et al., 2012]. En línea con esto, demostramos una gran correlación entre los niveles de sIgE a los CCDs y a Vesp v 1, siendo necesario comprobar la naturaleza glicosilada de esta molécula a través de una tinción específica. Previo a esta identificación, realizamos un estudio de inhibición en el que comprobamos que la sIgE dirigida frente a Vesp v 1 se inhibía con los CCDs. Se trata, por tanto, de un hallazgo relevante puesto que, hasta la fecha, el resto de las moléculas de tipo fosfolipasa A 1, no habían sido descritas como glicosiladas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los estudios de inhibición practicados no fueron, únicamente, útiles en el reconocimiento de la naturaleza glicosilada de Vesp v 1, fueron también realizados para

identificar el sensibilizante primario en los pacientes con sIgE positiva frente a Vespula spp y *Vespa velutina*. Este método se basa en la capacidad de unión del alérgeno a la IgE de forma que, si se bloquea gran parte de esa IgE con una incubación previa de otro alérgeno, se sugiere que el primero es el sensibilizante primario y la reactividad frente al segundo es debida a similitud molecular o reactividad cruzada. Así, los estudios de inhibición demostraron que el veneno de *Vespula spp* es un potente inhibidor de la unión de la sIgE al veneno de *Vespa velutina*. La inhibición contraria, aunuqe también se produce, es de menor intensidad. Estos mismos ensayos llevados a cabo con los componentes Vesp v 1 y Vesp v 5 apuntan a la naturaleza primaria de Ves v 1 y Ves v 5 en *Vespula spp*.

Actividad biológica de *Vespa velutina* y sus componentes, Vesp v 1 y Vesp v 5, medida por activación de basófilos y utilidad general en el seguimiento de la alergia al veneno de los himenópteros

La prueba TAB se utiliza en investigación en alergología. Es una prueba compleja en su realización e interpretación y que no se encuentra disponible en muchos centros. La prueba se podría equiparar a una provocación *in vitro* en la que los basófilos de los pacientes se exponen al alérgeno en estudio sin los riesgos de una prueba de exposición. En el presente estudio, se ha utilizado con finalidad diagnóstica y para conocer el grado de actividad biológica de estos extractos no comerciales de *Vespa velutina*, Vesp v 1 y Vesp v 5. El número de muestras fue pequeño por la complejidad expuesta y porque la finalidad era la de demostrar esa actividad biológica y no un seguimiento, si bien se realizó el estudio se revisión bibliográfica de la utilidad de esta prueba en el seguimiento de los sujetos sometidos a inmunoterapia específica.

El método que empleamos fue el Basotest® pero existen otros disponibles comercialmente. De hecho, los primeros experimentos se intentaron con la plataforma Basostep® pero, al observar, una gran variabilidad en controles, se descartó su uso para el estudio.

Utilizando un punto de corte del 15% de basófilos activados, la mayoría de los pacientes respondió positivamente a uno o varios de los alérgenos probados, siendo el veneno completo de *Vespa velutina* el de mayor rentabilidad diagnóstica. Por ello, y teniendo en cuenta, las posibles dificultades en obtener los componentes moleculares por separado, Vesp v 1 y Vesp v 5, la recomendación que se extrae del estudio es la del empleo del veneno completo de *Vespa velutina* para experimentos similares. Las concentraciones recomendadas varían en función del alérgeno [Hoffmann et al., 2015]. La concentración más alta empleada fue de 10 µg/mL, pero, de estos resultados, se desprende que la concentración de 1 µg/mL puede ser suficiente lo que, en términos de consumo de veneno resulta muy favorable. De esta manera parece que *Vespa velutina* genera sIgE y que su interacción con los receptores de alta afinidad en la superficie de los basófilos es capaz de expresar CD63 de los gránulos citoplasmáticos a la superficie celular. La correlación entre los resultados de la IgE y la activación es buena por lo que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

una sIgE positiva se seguirá, en la mayor parte de los casos, de una activación positiva también. Esto, a fines prácticos, implica que, ante un paciente con una clínica de anafilaxia y el reconocimiento del insecto, *Vespa velutina* en este caso, la detección de sIgE frente al mismo es útil para el diagnóstico, considerando dicotómica la variable sIgE positiva-negativa. Sin embargo, al contrario de lo que otros autores han demostrado, no hemos podido establecer una relación directa entre el nivel de sIgE positivo y el grado de activación de los basófilos [Erdmann et al., 2004].

Por último, y en relación a la aplicación de la TAB para el posible diagnóstico y seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenóptero y que resulta del análisis de los trabajos publicados y que utilizan esta prueba como método diagnóstico, se puede concluir que el TAB puede emplearse como herramienta diagnóstica, por su alta sensibilidad y un valor predictivo positivo similar o superior al de las pruebas cutáneas o la sIgE [Sainte-laudy et al., 2000; Peternelj et al., 2007]. La selección de las concentraciones más adecuadas para valorar la respuesta específica del basófilo se debe realizar en base a una curva dosis-respuesta, que permita identificar la concentración máxima y submáxima, la que consigue la activación del 50% de los basófilos. La discriminación entre reactividad y sensibilidad es esencial para la interpretación del TAB, pues mientras que la principal utilidad de la medida de la reactividad del basófilo es el diagnóstico, los cambios en la sensibilidad del basófilo son más adecuados para monitorizar la eficacia de la inmunoterapia [Blank et al., 2020]. Los cambios se pueden observar tras un período prolongado de mantenimiento de entre 18-24 meses, según se describe en la mayoría de los estudios. El TAB se puede utilizar en el seguimiento de la inmunoterapia con venenos de himenópteros como indicador de eficacia del tratamiento, con resultados consistentes con los obtenidos en la prueba de la repicadura.

Evaluación de la gravedad clínica y seguimiento de la inmunoterapia específica

En esta población, la mayoría de las reacciones anafilácticas referidas tras la picadura de himenópteros fueron moderadas a graves (83%), pero no hemos encontrado diferencias significativas respecto a los casos de anafilaxia debido a *Vespa velutina*, *Vespula spp* o *Apis mellifera*. Tampoco hay un dato diferenciador con respecto al periodo de inicio de la reacción o el empleo de adrenalina entre los grupos. Un dato destacable es que casi 1 de cada 4 pacientes relataron episodios pasados de anafilaxia antes de la presente picadura, pero no habían sido enviados para evaluación. No había diferencias entre las características demográficas de la población con anafilaxia por *Vespa velutina* y la del resto de las especies respecto al sexo, edad, hábitat u ocupación laboral, ni tampoco en los niveles de triptasa basal. Nuestro estudio, por tanto, no puede responder a la pregunta de porque hay un mayor número de anafilaxias tras la picadura de *Vespa velutina* o si hay una susceptibilidad potencialmente mayor a la anafilaxia con respecto a otras especies de himenópteros ni definir un factor de riesgo concreto asociado a esto.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

El grupo de estudio de alergia al veneno de himenópteros de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica destaca la elevada prevalencia de síndromes de activación mastocitaria entre los pacientes con anafilaxia por veneno de himenóptero. Se ha llegado a sugerir que cerca del 20 % de los pacientes con esta clínica y diagnóstico de anafilaxia por veneno de himenóptero padecen un síndrome de activación mastocitaria [González de Olano et al., 2007; Vázquez-Revuelta, 2018]. Esta cifra contrasta con el bajo número de pacientes con criterios clínicos de activación mastocitaria en nuestra serie. Utilizando como primera aproximación diagnóstica el cálculo del REMA, un 2% de los pacientes de nuestra área sanitaria con anafilaxia tienen un valor de REMA igual o superior a 2. En estos pacientes es necesario completar el estudio mediante una determinación genética que se conoce como c-kit y que, en nuestros pacientes, fue negativa. El hecho de padecer o no este síndrome de activación mastocitaria, tiene implicaciones terapéuticas dado que los pacientes deben mantener la inmunoterapia específica toda su vida. Cuando esto no sucede, la duración estimada del tratamiento es de 3 a 5 años [González de Olano et al., 2007; Bonadona et al., 2009].

Como se ha comentado en el correspondiente apartado de la INTRODUCCIÓN las reacciones a los venenos de los himenópteros varían en su intensidad desde reacciones locales a sistémicas. Solo las reacciones sistémicas con demostrada presencia de sIgE frente al insecto implicado son subsidiarias de vacunación [Dhami et al., 2016; Sturm et al.,2018]. Los pacientes incluidos en estos estudios lo fueron por haber padecido reacciones sistémicas y, por tanto, con indicación de inmunoterapia específica.

La selección del veneno para la inmunoterapia depende del reconocimiento del insecto y del perfil de sensibilización de los pacientes. Sobre el reconocimiento de *Vespa velutina*, la mayoría de los pacientes han reconocido el insecto responsable. Esto se ve reforzado por las campañas de información que favorecen el reconocimiento de *Vespa velutina.* A esto se suma, el medio rural en el que los pacientes del área viven o trabajan que facilita tanto la exposición, por tanto, la picadura, como su reconocimiento.

El veneno empleado fue el de *Vespula spp*. La razón de su selección fue la falta de un extracto adecuado, en aquel momento, de *Vespa velutina* y la elevada reactividad cruzada entre ambas especies. Todo esto apoyado por los estudios de inhibición que mostraron una sensibilización primaria o genuina frente a *Vespula spp*.

El seguimiento se realizó con las determinaciones de sIgE y sIgG4. En este estudio no se realizaron pruebas de exposición o repicaduras que se sugieren como patrón oro de seguimiento oro [Ruiz-León B et al., 2022]. Una de las razones por las que esta prueba no se llevó a cabo fue por las descripciones previas de la transcriptómica del veneno de *Vespa velutina* que orientaban a ciertos componentes tóxicos que podrían contraindicar la prueba. Se decidió, por tanto, un seguimiento de seroconversión y control de repicaduras espontáneas. De acuerdo con lo que cabría esperar, la sIgE descendió tras unos meses de tratamiento y se produjo una elevación de la IgG4 específica. Estudios previos realizados sobre el mecanismo de acción de la inmunoterapia ya apuntaron que estos cambios inmunológicos no necesariamente se acompañan de mejoría clínica; es decir, no existe una correlación directa entre los niveles de sIgE y sIgG4 y la tolerancia o

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

no de la exposición al alérgeno [Rueff et al., 2014; Shamji et al., 2017]. En cualquier caso, los cambios detectados son acordes con los esperados según estudios previos [Müller U et al., 1989; Michils et al., 2000]. Tan solo un cuarto de los pacientes había padecido repicaduras espontáneas, pero, ninguno de ellos, presentó reacción sistémica tras las mismas.

Fortalezas y limitaciones del estudio

Limitaciones del estudio

Las limitaciones de todo estudio pueden referirse a su validez interna (sesgos de confusión, de selección, de medición-clasificación o de especificación) o a su validez externa (posibilidad de generalización de los resultados).

Problemas de confusión

El fenómeno de la confusión (distorsión de la asociación causal entre una variable de exposición y un efecto por una tercera variable que se asocia con la exposición y, causalmente, con el efecto) es una constante en los estudios observacionales y puede considerarse un sesgo cuando se investiga causalidad, como es el caso de los trabajos presentados. El fenómeno de la confusión puede controlarse en el análisis si se han recogido las variables necesarias. En el presente estudio la identificación del insecto puede llevar a problemas de interpretación habida cuenta de la gran reactividad cruzada que parece existir entre las distintas especies. La causa de la anafilaxia se clasificó de acuerdo con la identificación del insecto culpable proporcionada por los pacientes porque las muestras de los insectos no estaban disponibles. Este problema de clasificación siempre está presente cuando se trata de anafilaxia debida a especies de himenópteros. Sin embargo, el hecho de que casi todos los pacientes vivan o trabajen en un entorno rural donde están acostumbrados a reconocer himenópteros disminuye el riesgo de identificación errónea. Además, *Vespa velutina* se ha vuelto muy popular en nuestra región después de su proliferación, por lo tanto, las fotografías de ellos y sus nidos se muestran con frecuencia en los periódicos locales y en la televisión. Solo dos pacientes no consiguieron ver el insecto culpable.

Sesgos de selección

El estudio se ha realizado en una población seleccionada, como es la que acude a un Servicio de Alergología para estudio de una reacción que, en otro centro (Atención Primaria, Servicio de Urgencias, entre otros), se ha considerado como anafiláctica y la derivación se ha producido a través de la Vía rápida de la anafilaxia (Anexo I). Existe la posibilidad de que la reacción padecida en origen haya sido malinterpretada y que la existencia de sIgE solo sea un indicador de exposición. El hecho de contar con un sistema informatizado de historia electrónica como es IANUS, en nuestra Comunidad Autónoma, permite comprobar los datos clínicos del día de la reacción, siendo más difícil que este sesgo se produzca por una errónea identificación de la reacción al poder ser analizado por los facultativos del Servicio de Alergología e, incluso, comentados en sesión.

Sesgos de medición (clasificación)

Las variables de efecto (IgE total, IgE sérica frente a las fuentes alergénicas y frente a los componentes moleculares disponibles en plataformas) fueron determinadas con técnicas

comerciales estándar, adecuadamente validadas y con controles de calidad, por lo que es poco probable que en este aspecto hayan existido problemas de medición o clasificación. No ocurre lo mismo en el caso de la determinación de sIgE frente al veneno completo de Vespa velutina en los estudios en los que se realizó una técnica customizada o con las determinaciones de nVesp v 1 y nVesp v 5. En estos casos se trata de un método manual en el que la posibilidad de cometer un error es mayor, sin embargo, la buena correlación entre los distintos resultados obtenidos apunta a que sea poco probable que se haya incurrido en errores en el procedimiento.

Sesgos de especificación

Suelen denominarse de esta manera a los errores sistemáticos por el uso de herramientas estadísticas inadecuadas. La estadística del presente estudio ha sido simple y poco expuesta a este tipo de problemas. Se ha preferido el uso de pruebas no paramétricas por la distribución no-normal de la mayoría de variables numéricas y porque, también, es más conservadora o garantista, en el sentido de que tiene menor poder para mostrar diferencias *significativas* que la estadística paramétrica. En los modelos multivariantes, especialmente expuestos a este tipo de sesgos, se comprobó detenidamente el cumplimiento de los requerimientos de los modelos.

Limitaciones a la validez externa

Como se ha comentado más arriba, la población de estudio (personas que acuden al Servicio de Alergología procedentes de la Vía rápida) es altamente seleccionada pero se trata de una población similar a la que es alérgica a otros venenos de himenópteros en lo que a tipo de manifestaciones clínicas o resultados esperables de sensibilización se refiere. Los resultados se podrían, por tanto, generalizar a pacienets de otras localizaciones con unas características de exposición y clínica similares a los incluidos en el estudio.

Una limitación externa es la no disponibilidad comercial de los componentes moleculares estudiados pero ya existe, y de hecho se ha utilizado en alguno de los estudios, sIgE comercial frente a *Vespa velutina*.

Fortalezas del estudio

La principal fortaleza del estudio es la homogeneidad en la recolección de la información y, en el caso del seguimiento de la inmunoterapia específica, su carácter longitudinal, que permite observar el efecto del tratamiento sobre los parámetros inmunológicos estudiados en tiempos predefinidos. No se ha realizado prueba de repicadura en los pacientes, considerada patrón oro, al no disponer de estudios sobre la toxicidad del veneno de *Vespa velutina*. Sin embargo, la población que ha padecido repicaduras espontáneas esta bien controlada e identificada.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

En relación con los OBJETIVOS planteados en la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El veneno de *Vespa velutina* se ha convertido en la primera causa de anafilaxia por veneno de himenóptero en nuestra área sanitaria; sin embargo, no existen diferencias epidemiológicas con respecto a posibles factores de riesgo respecto a las picaduras ocasionadas por el veneno de otros himenópteros. El grado de gravedad de la reacción provocada por la picadura de *Vespa velutina* es similar a la provocada por la picadura de otros himenópteros.
2. El alérgeno del veneno de otras especies de himenópteros que con más frecuencia reconoce la IgE de los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* es *Vespula spp* y, más concretamente, el antígeno 5 o Ves v 5.
3. En la población estudiada, el veneno de *Vespula spp* actúa como sensibilizante primario o genuino como se demuestra por los estudios de inhibición.
4. Api m 5 es el alérgeno de *Apis mellifera* que reconocen con mayor frecuencia los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina*, posiblemente por su homología con Ves v 3.
5. Los niveles de sIgE frente a *Vespa velutina* son bajos pero se correlacionan bien con los niveles de sIgE frente a *Vespula spp*. De forma similar, existe una alta correlación entre los niveles de sIgE frente a los componentes moleculares de *Vespa velutina,* nVesp v 1 y nVesp v 5 con los componentes moleculares de *Vespula spp*, Ves v 1 y Ves v 5.
6. Existe una correlación significativa entre los niveles de nVesp v 1 y el MUXF3 como marcador de CCD.
7. El componente molecular del veneno de *Vespa velutina* que, con más frecuencia detectan los pacientes alérgicos al veneno de este himenóptero es nVesp v 5 que podría considerarse como un alérgeno mayor en esta población,
8. nVesp v 1 es un nuevo alérgeno identificado en el veneno de *Vespa velutina* cuya naturaleza glicosilada queda demostrada por estudios de inhibición con glicanos y por la tinción específica que reconoce la presencia de proteínas glicosiladas.
9. El veneno completo de *Vespa velutina* es un buen marcador de la actividad biológica medida por pruebas de activación de basófilos y expresión de CD63, siendo suficiente una concentración de 1 µg/mL para inducir reactividad en los basófilos.
10. De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, los estudios de activación de los basófilos se pueden emplear en el seguimiento de la inmunoterapia específica con venenos de himenópteros si bien no existe acuerdo sobre las concentraciones de alérgeno o el momento más adecuado para realizar la determinación.
11. La inmunoterapia con veneno de *Vespula spp* administrada durante un año a los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* inducen cambios en los niveles de sIgE y sIgG4 específica que son más evidentes a los 12 meses de tratamiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Aguiar A, Deans A, Engel M, Forshage M, Huber JT, Huber JT, Jennings JT, Johnson NF, Lelej AS, Longino JT, Lohrmann V, Mikó I, Ohl M, Rasmussen C, Taeger A, Yu, DSK. Order Hymenoptera Linnaeus, 1758. Zootaxa 2013;3703.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. World Allergy Organ J 2015;8:17.

Alvarez-Twose I, González-de-Olano D, Sánchez-Muñoz L, Matito A, Jara-Acevedo M, Teodosio C, García-Montero A, Morgado JM, Orfao A, Escribano L. Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms. Int Arch Allergy Immunol 2012;157:275-80.

Antolín-Amérigo D, Ruiz-León B, Boni E, Alfaya-Arias T, Álvarez-Mon M, Barbarroja-Escudero J, González-de-Olano D, Moreno-Aguilar C, Rodríguez-Rodríguez M, Sánchez-González MJ, Sánchez-Morillas L, Vega-Castro A. Component-resolved diagnosis in Hymenoptera allergy. Allergol Immunopathol 2018;46:253-62.

Arca M, Mougel F, Guillemaud T, Dupas S, Rome Q, Perrard A, Muller F, Fossoud A, Capdevielle-Dulac C, Torres-Leguizamon M, Chen XX, Tan JL, Jung C, Villemant C, Arnold G, Silvain JF. Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, in Europe. Biol Invasions 2015;17:2357–71.

Archer ME. Vespine wasps of the world. Behaviour, ecology and taxonomy of the vespinae, monograph series (Vol. 4) 2012 ISBN: 9780956779571.

Bertolino S, Lioy S, Laurino D, Manino A, Porporato M. Spread of the invasive yellow-legged hornet *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae) in Italy. Appl Entomol Zool 2016;51:589–97.

Bidad K, Nawijn MC, van Oosterhout AJ, van der Heide S, Elberink JN. Basophil activation test in the diagnosis and monitoring of mastocytosis patients with wasp venom allergy. Cytometry B Clin Cytom 2014;86B:183–90.

Bilò MB, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN; EAACI Interest group on insect venom hypersensitivity. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. Allergy 2005;60:1339-49.

Bilò MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. Clin Exp Allergy 2009;39:1467-76.

Bilò MB, Martini M, Pravettoni V, Bignardi D, Bonadonna P, Cortellini G, Kosinska M, Macchia D, Mauro M, Meucci E, Nittner-Marszalska M, Patella V, Pio R, Quercia O, Reccardini F, Ridolo E, Rudenko M, Severino M. Large local reactions to Hymenoptera stings: outcome of re-stings in real life. Allergy 2019a;74:1969-76.

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 2019b;51:244-258.

Bilò MB, Pravettoni V, Bignardi D, Bonadonna P, Mauro M, Novembre E, Quercia O, Cilia M, Cortellini G, Costantino MT, Cremonte L, Lodi Rizzini F, Macchia L, Marengo F, Murzilli F, Patella V, Reccardini F, Ricciardi L, Ridolo E, Romano A, Savi E, Schiavino D, Severino M, Pastorello EA. Hymenoptera venom allergy: management of children and adults in clinical practice. J Investig Allergol Clin Immunol 2019c;29:180-205.

Blank S, Seismann H, Bockisch B, Braren I, Cifuentes L, McIntyre M, Rühl D, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW, Grunwald T, Spillner E. Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high molecular weight Hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3. J Immunol 2010;184:5403-13.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Blank S, Seismann H, McIntyre M, Ollert M, Wolf S, Bantleon FI, Spillner E. Vitellogenins are new high molecular weight components and allergens (Api m 12 and Ves v 6) of *Apis mellifera* and *Vespula vulgaris* venom. PLoS One 2013;8:e62009.

Blank S, Bilò MB, Ollert M. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: important steps towards precision medicine. Clin Exp Allergy 2018;48:354-64.

Blank S, Grosch J, Ollert M, Bilò MB, Basten A, Sabato V. Precision medicine in Hymenoptera venom allergy: diagnostics, biomarkers, and therapy of different endotypes and phenotypes. Frontiers in Immunology 2020;11:1.

Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, Caruso B, Colarossi S, Dal Fior D, Castellani L, Bonetto C, Frattini F, Dama A, Martinelli G, Chilosi M, Senna G, Pizzolo G, Zanotti R. Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. J Allergy Clin Immunol 2009;123:680-6.

Bonadonna P, Scaffidi L. Hymenoptera anaphylaxis as a clonal mast cell disorder. Immunol Allergy Clin North Am. 2018 Aug;38:455-68.

Bonifazi F, Jutel M, Biló BM, Birnbaum J, Muller U; EAACI interest group on insect venom hypersensitivity. Prevention and treatment of Hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. Allergy 2005;60:1459-70.

Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol 2004;114:371-6.

Brunet JL, Girodet B, Pham-Thi N. Le frelon oriental (*Vespa orientalis*) arrive en France. Revue Française d'Allergologie 2022;62:91–2.

Brusca R, Brusca G. Invertebrados (M. McGraw-Hill-Interamericana, Ed.; 2ª). 2005 ISBN 0-87893-097-3.

Budge GE, Hodgetts J, Jones EP, Ostojá-Starzewski JC, Hall J, Tomkies V, Semmence N, Brown M, Wakefield M, Stainton K. The invasion, provenance and diversity of *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae) in Great Britain. PLoS One 2017;12:e0185172.

Cappa F, Cini A, Pepiciello I, Petrocelli I, Inghilesi AF, Anfora G, Dani FR, Bortolotti L, Wen P, Cervo R. Female volatiles as sex attractants in the invasive population of *Vespa velutina nigrithorax*. J Insect Physiol 2019;119:103952.

Carballada FJ, González-Quintela A, Núñez-Orjales R, Vizcaino L, Boquete M. Double (honeybee and wasp) immunoglobulin E reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom: the role of cross-reactive carbohydrates and alcohol consumption. J Investig Allergol Clin Immunol 2010;20:484-9.

Carballada FJ, González-Quintela A, Núñez R, Vidal C, Boquete M. Low prevalence of IgE to cross-reactive carbohydrate determinants in beekeepers. J Allergy Clin Immunol 2011;128:1350-2.e2.

Carballo I, Carballada F, Nuñez-Orjales R, Martín-Lázaro J, Vidal C, Gonzalez-Quintela A. Total and honeybee venom-specific serum IgG4 and IgE in beekeepers. J Investig Allergol Clin Immunol 2017;27:146-8.

Carvalho J, Hipólito D, Santarém F, Martins R, Gomes A, Carmo P, Rodrigues R, Grosso-Silva J, Fonseca C. Patterns of *Vespa velutina* invasion in Portugal using crowdsourced data. Insect Conservation and Diversity 2020;13:501–7.

Castro L, Pagola-Carte S. *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae), recolectada en la Península Ibérica. Heteropterus Rev Entomo 2010;10:193–6.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Celikel S, Karakaya G, Yurtsever N, Sorkun K, Kalyoncu AF. Bee and bee products allergy in Turkish beekeepers: determination of risk factors for systemic reactions. Allergol Immunopathol 2006;34:180-4.

Cheng YN, Wen P, Dong SH, Tan K, Nieh JC. Poison and alarm: the Asian hornet *Vespa velutina* uses sting venom volatiles as an alarm pheromone. J Exp Biol 2017;220:645-51.

Choi MB, Martin SJ, Lee JW. Distribution, spread, and impact of the invasive hornet *Vespa velutina* in South Korea. J Asia-Pacific Entomol 2012;15:473–7.

Chugo S, Lizaso MT, Alvarez MJ, Arroabaren E, Lizarza S, Tabar AI. *Vespa velutina nigritorax*: a new causative agent in anaphylaxis. J Investig Allergol Clin Immunol 2015;25:231-2.

Cichocka-Jarosz E, Dorynska A, Pietrzyk JJ, Spiewak R. Laboratory markers of mast cell and basophil activation in monitoring rush immunotherapy in bee venom-allergic children. Immunotherapy 2011;3:1013-7.

Couto A, Monceau K, Bonnard O, Thiéry D, Sandoz JC. Olfactory attraction of the hornet *Vespa velutina* to honeybee colony odors and pheromones. PLoS One 2014;9:e115943.

D´Adamo P, Lozada M. Cognitive plasticity in foraging *Vespula germanica* wasps. J Insect Sci 2011;11:1–11.

Das RN, Mukherjee K. Asian wasp envenomation and acute renal failure: a report of two cases. Mcgill J Med 2008;11:25–8.

Dhami S, Zaman H, Varga EM, Sturm GJ, Muraro A, Akdis CA, Antolín-Amérigo D, Bilò MB, Bokanovic D, Calderon MA, Cichocka-Jarosz E, Oude Elberink JN, Gawlik R, Jakob T, Kosnik M, Lange J, Mingomataj E, Mitsias DI, Mosbech H, Ollert M, Pfaar O, Pitsios C, Pravettoni V, Roberts G, Ruëff F, Sin BA, Asaria M, Netuveli G, Sheikh A. Allergen immunotherapy for insect venom allergy: a systematic review and meta-analysis. Allergy 2017;72:342-65.

de Haro L, Labadie M, Chanseau P, Cabot C, Blanc-Brisset I, Penouil F. Medical consequences of the Asian black hornet (*Vespa velutina*) invasion in Southwestern France. Toxicon 2010;55:650–2.

de la Torre-Morin F, García-Robaina JC, Vázquez-Moncholí C, Fierro J, Bonnet-Moreno C. Epidemiology of allergic reactions in beekeepers: a lower prevalence in subjects with more than 5 years exposure. Allergol Immunopathol 1995;23:127-32.

Dribin TE, Sampson HA, Camargo CA Jr, Brousseau DC, Spergel JM, Neuman MI, Shaker M, Campbell RL, Michelson KA, Rudders SA, Assa'ad AH, Risma KA, Castells M, Schneider LC, Wang J, Lee J, Mistry RD, Vyles D, Vaughn LM, Schumacher DJ, Witry JK, Viswanathan S, Page EM, Schnadower D. Persistent, refractory, and biphasic anaphylaxis: a multidisciplinary Delphi study. J Allergy Clin Immunol 2020;146:1089-96.

Eberlein-König B, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. J Investig Allergol Clin Immunol 2004;14:10-6.

Eberlein-König B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. J Investig Allergol Clin Immunol 2006;16:5-10.

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;130:155-61.

Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. Allergy 2006;61:1028-39.

USC

Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. Cytometry B Clin Cytom 2007;72:196-203.

Ediger D, Terzioglu K, Ozturk RT. Venom allergy, risk factors for systemic reactions and the knowledge levels among Turkish beekeepers. Asia Pac Allergy 2018;8(e15).

Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. Allergy 2004;59:1102-9.

Eržen R, Košnik M, Silar M, Korošec P. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. Allergy 2012;67:822-30.

Estelle F, Simons FE, Ebisawa M, Sanchez-Borges M, Thong BY, Worm M, Tanno LK, Lockey RF, El-Gamal YM, Brown SG, Park HS, Sheikh A. 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. World Allergy Organ J 2015;8:32.

Feás Sánchez X, Charles RJ. Notes on the nest architecture and colony composition in winter of the yellow-legged Asian hornet, *Vespa velutina* Lepeletier 1836 (Hym.: Vespidae), in its introduced habitat in Galicia (NW Spain). Insects 2019;10:237.

Feás X. Human fatalities caused by hornet, wasp and bee stings in Spain: epidemiology at state and sub-State Level from 1999 to 2018. Biology 2021;10:73.

Feás X, Vidal C, Remesar S. What we know about sting-related deaths? Human fatalities caused by hornet, wasp and bee stings in Europe (1994–2016). Biology 2022;11:282.

Fedele E, Gervasini E, De Jesus Cardoso A, La Notte A, Vallecillo Rodriguez S, Tsiamis, K and Maes J, Invasive alien species impact on ecosystem services, EUR 29827 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2019, ISBN 978-92-76-09510-1.

Fernandez J, Soriano V, Mayorga L, Mayor M. Natural history of Hymenoptera venom allergy in Eastern Spain. Clin Exp Allergy 2005;35:179-85.

García-Robaina JC, de la Torre-Morín F, Vazquez-Moncholi C, Fierro J, Bonnet-Moreno C. The natural history of *Apis*-specific IgG and IgG4 in beekeepers. Clin Exp Allergy 1997;27:418-23.

Goldberg A, Shefler I, Panasoff J, Paitan Y, Confino-Cohen R. Immunotherapy with commercial venoms is efficacious for anaphylactic reactions to *Vespa orientalis* stings. Int Arch Allergy Immunol 2013;161:174-80.

Golden DB, Moffitt J, Nicklas RA, Freeman T, Graft DF, Reisman RE, Tracy JM, Bernstein D, Blessing-Moore J, Cox L, Khan DA, Lang DM, Oppenheimer J, Portnoy JM, Randolph C, Schuller DE, Spector SL, Tilles SA, Wallace D; Joint Task Force on practice parameters; American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI); American College of Allergy, Asthma & Immunology (ACAAI); Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update 2011. J Allergy Clin Immunol 2011;127:852-4.e1-23.

González de Olano D, de la Hoz Caballer B, Núñez López R, Sánchez Muñoz L, Cuevas Agustín M, Diéguez MC, Alvarez Twose I, Castells MC, Escribano Mora L. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). Clin Exp Allergy 2007;37:1547-55.

González-de-Olano D, Alvarez-Twose I, Morgado JM, Esteban López MI, Vega Castro A, Díaz de Durana MD, Sánchez-Muñoz L, Matito A, de la Hoz Caballer B, Sanz ML, Orfao A, Escribano L. Evaluation of basophil activation in mastocytosis with Hymenoptera venom anaphylaxis. Cytometry B Clin Cytom 2011;80:167-75.

USC DE SANTIAGO

González-Quintela A, Garrido M, Gude F, Campos J, Linneberg A, Lojo S, Vidal C. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants in relation to alcohol consumption. Clin Exp Allergy 2008;38:152-60.

González-Quintela A, Gómez-Rial J, Valcarcel C, Campos J, Sanz ML, Linneberg A, Gude F, Vidal C. Immunoglobulin-E reactivity to wine glycoproteins in heavy drinkers. Alcohol 2011;45:113-22.

Grabenhenrich LB, Dölle S, Moneret-Vautrin A, Köhli A, Lange L, Spindler T, Ruëff F, Nemat K, Maris I, Roumpedaki E, Scherer K, Ott H, Reese T, Mustakov T, Lang R, Fernández-Rivas M, Kowalski ML, Bilò MB, Hourihane JO, Papadopoulos NG, Beyer K, Muraro A, Worm M. Anaphylaxis in children and adolescents: The European anaphylaxis registry. J Allergy Clin Immunol 2016;137:1128-37.e1.

Grigoreas C, Galatas ID, Kiamouris C, Papaioannou D. Insect-venom allergy in greek adults. Allergy 1997;52:51-7.

Grosso-Silva JM, Maia M. *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Vespidae), new species for Portugal. Arquivos Entomoloxicos 2012;6:53-4.

Haxaire J, Bouguet JP, Tamisier JP. *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hymenoptera: Vespidae). Bull Soc Entomol Fr 2006; 111:94.

Hernández R, García-Gans F, Selfa J, Rueda J. Primera cita de la avispa oriental invasora *Vespa orientalis* Linnaeus 1771 (Hymenoptera: Vespidae) en la Península Ibérica. Boletín de La Sociedad Entomológica Aragonesa 2013;52:299–300.

Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, Rouzaire P, Ebo DG, Sabato V, Sanz ML, Pecaric-Petkovic T, Patil SU, Hausmann OV, Shreffler WG, Korosec P, Knol EF. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. Allergy 2015;70:1393-405.

Jennings A, Duggan E, Perry IJ, Hourihane JO. Epidemiology of allergic reactions to Hymenoptera stings in Irish school children. Pediatr Allergy Immunol 2010;21:1166-70.

Jones EP, Conyers C, Tomkies V, Semmence N, Fouracre D, Wakefield M, Stainton K. Managing incursions of *Vespa velutina nigrithorax* in the UK: an emerging threat to apiculture. Sci Rep 2020;10:19553.

Keeling MJ, Franklin DN, Datta S, Brown MA, Budge GE. Predicting the spread of the Asian hornet (*Vespa velutina*) following its incursion into Great Britain. Sci Rep 2017;7:6240.

Kennedy PJ, Ford SM, Poidatz J, Thiéry D, Osborne JL. Searching for nests of the invasive Asian hornet (*Vespa velutina*) using radio-telemetry. Communications Biology 2018;1:88.

Kim J, Choi M, Moon T. Occurrence of *Vespa velutina* Lepeletier from Korea, and a revised key for Korean Vespa species (Hymenoptera: Vespidae). Entomol Res 2006;36:112–15.

Kosnik M, Korosec P, Silar M, Music E, Erzen R. Wasp venom is appropriate for immunotherapy of patients with allergic reaction to the European hornet sting. Croat Med J 2002;43:25-7.

Korosec P, Erzen R, Silar M, Bajrovic N, Kopac P, Kosnik M. Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. Clin Exp Allergy 2009;39:1730-7.

Korosec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Silar M, Zidarn M, Košnik M. High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy. J Allergy Clin Immunol 2012;129:1406-8.

Lange J, Cichocka-Jarosz E, Marczak H, Krauze A, Tarczoń I, Świebocka E, Lis G, Brzyski P, Nowak-Węgrzyn A. Natural history of Hymenoptera venom allergy in children not treated with immunotherapy. Ann Allergy Asthma Immunol 2016;116:225-9.

USC DE SANTIAGO

Leza M, Herrera C, Colomar V. First detection of *Vespa velutina nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae) in the Balearic Islands (Western Mediterranean): a challenging study case. Biol Invasions 2018;20:1643–9.

Leza M, Herrera C, Picó G, Morro T, Colomar V. Six years of controlling the invasive species *Vespa velutina* in a Mediterranean island: The promising results of an eradication plan. Pest Management Science 2021;77: 2375–84.

Liu Z, Chen S, Zhou Y, Xie C, Zhu B, Zhu H, Liu S, Wang W, Chen H, Ji Y. Deciphering the venomic transcriptome of killer-wasp *Vespa velutina*. Sci Rep 2015;5:9454.

López S, Gonzales M, Goldarazena A. *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae): first records in Iberian Peninsula. Bull OEPP/EPPO Bull 2011;41:439–41.

Mikkelsen S, Bibby BM, Dolberg MK, Dahl R, Hoffmann HJ. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. Clin Mol Allergy 2010;8:2.

Minoshima Y, Yamane S, Ueno T. An invasive alien hornet, *Vespa velutina nigrithorax* du Buysson (Hymenoptera, Vespidae), found in Kitakyushu, Kyushu Island: a first record of the species from mainland Japan. Jpn J Syst Entomol 2015;21:259–61.

Monceau K, Bonnard O, Thiéry D. Chasing the queens of the alien predator of honeybees: a water drop in the invasiveness ocean. Open Journal of Ecology 2012;2:183–91.

Monceau, K, Thiéry D. *Vespa velutina* nest distribution at a local scale: an 8-year survey of the invasive honeybee predator. Insect Science 2017;24:663–74.

Monsalve RI, Vega A, Marqués L, Miranda A, Fernández J, Soriano V, Cruz S, Domínguez-Noche C, Sánchez-Morillas L, Armisen-Gil M, Guspí R, Barber D. Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization. Allergy 2012;67:528-36.

Monsalve RI, Gutiérrez R, Hoof I, Lombardero M. Purification and molecular characterization of phospholipase, antigen 5 and hyaluronidases from the venom of the Asian hornet (*Vespa velutina*). PLoS One 2020;15:e0225672.

Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal Biochem 1981;117:307-10.

Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. J Asthma Res 1966;3:331-3.

Muller FJ, Rome Q, Perrard A, Villemant C. Potential influence of habitat type and seasonal variations on prey spectrum of the invasive alien species *Vespa velutina* var. *nigrothorax* Du Buysson, 1905 39 (Hym.:Vespidae), the Asian Hornet, in Europe. 41st Apimondia Congress Montpellier. 2009. 41st Apimondia Congress.

Müller U, Helbling A, Bischof M. Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honeybee venom. Allergy 1989;44:412-8.

Müller U, Helbling A, Berchtold E. Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. J Allergy Clin Immunol 1992;89:529-35.

Müller UR, Ring J. When can immunotherapy for insect sting allergy be stopped? J Allergy Clin Immunol Pract 2015;3:324-8;

USC DE SANTIAGO

Mullins RJ, Wainstein BK, Barnes EH, Liew WK, Campbell DE. Increases in anaphylaxis fatalities in Australia from 1997 to 2013. Clin Exp Allergy 2016;46:1099-110.

Münstedt K, Hellner M, Winter D, von Georgi, R. Bee venom allergy in beekeepers: allergy to bee 2008;18:100-5.

Muraro A, Roberts G, Worm M, Bilò MB, Brockow K, Fernández Rivas M, Santos AF, Zolkipli ZQ, Bellou A, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Cardona V, Clark AT, Demoly P, Dubois AE, DunnGalvin A, Eigenmann P, Halken S, Harada L, Lack G, Jutel M, Niggemann B, Ruëff F, Timmermans F, Vlieg-Boerstra BJ, Werfel T, Dhami S, Panesar S, Akdis CA, Sheikh A; EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines group. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Allergy 2014;69:1026-45.

Navarro LA, Peláez A, de la Torre F, Tenias Burillo JM, Megías J, Martínez I. Epidemiological factors on Hymenoptera venom allergy in a Spanish adult population. J Investig Allergol Clin Immunol 2004;14:134-41.

Nittner-Marszalska M, Liebhart J, Liebhart E, Dor A, Dobek R, Obojski A, Medrala W. Prevalence of Hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland. Med Sci Monit 2004;10:CR324-9.

Ortíz J. Mapa de distribución de véspidos. J Investig Allergol Clin Immunol 2013;23:47–9.

Perrard A, Arca M, Rome Q, Muller F, Tan J, Bista S, Nugroho H, Baudoin R, Baylac M, Silvain JF, Carpenter JM, Villemant C. Geographic variation of melanisation patterns in a hornet species: genetic differences, climatic pressures or aposematic constraints? PLoS One 2014;9:e94162.

Peternelj A, Silar M, Bajrovic N, Adamic K, Music E, Kosnik M, Korosec P. Diagnostic value of the basophil activation test in evaluating Hymenoptera venom sensitization. Wien Klin Wochenschr. 2009;121:344-8
Pravettoni V, Piantanida M, Primavesi L, Forti S, Pastorello EA. Determinants of venom-specific IgE antibody concentration during long-term wasp venom immunotherapy. Clin Mol Allergy 2015;13:29.

Pucci S, Antonicelli L, Bilò MB, Garritani MS, Bonifazi F. Shortness of interval between two stings as risk factor for developing Hymenoptera venom allergy. Allergy 1994;49:894-6.

Pucci S, D'Alò S, De Pasquale T, Illuminati I, Makri E, Incorvaia C. Risk of anaphylaxis in patients with large local reactions to Hymenoptera stings: a retrospective and prospective study. Clin Mol Allergy 2015;13:21

Rodríguez Trabado A, Cámara Hijón C, Ramos Cantariño A, Romero-Chala S, García-Trujillo JA, Fernández Pereira LM. Short-, intermediate-, and long-term changes in basophil reactivity induced by venom immunotherapy. Allergy Asthma Immunol Res 2016;8:412-20.

Rome Q, Perrard A, Muller F, Villemant C. Monitoring and control modalities of a honeybee predator, the yellow legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae). Aliens 2011;31:7–15.

Rome Q, Muller F, Villemant C. Expansion en 2011 de *Vespa velutina* en Europe (Hym., Vespidae). Bulletin de la Société Entomologique de France 2012;117:114.

Rome Q, Dambrine L, Onate C, Muller F, Villemant C, García-Pérez AL, Maia M, Carvalho-Esteves P, Bruneau E. Spread of the invasive hornet *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, in Europe in 2012 (Hym., Vespidae). Bulletin de La Société Entomologique de France 2013;118:21–2.

Ruëff F, Przybilla B, Müller U, Mosbech H. The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the subcommittee on insect venom allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy 1996;51:216-25.

Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, Birnbaum J, Bodzenta-Lukaszyk A, Bonifazi F, Bucher C, Campi P, Darsow U, Egger C, Haeberli G, Hawranek T, Körner M, Kucharewicz I, Küchenhoff H, Lang R, Quercia O, Reider N, Severino M, Sticherling M, Sturm GJ, Wüthrich B. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline

USC DE SANTIAGO

serum tryptase. A study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology interest group on insect venom hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol 2009;124:1047-54.

Sabogal-Cuadro P, Zakzuk J. Prueba de activación de basófilos: aspectos técnicos, metodológicos, y su utilidad clínica. Rev Fac Med 2018;66:447-57

Sahiner UM, Durham SR. Hymenoptera venom allergy: how does venom immunotherapy prevent anaphylaxis from bee and wasp stings? Front Immunol 2019;10:1959.

Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. Clin Exp Allergy 2000;30:1166-71.

Sainte-Laudy J, Touraine F, Cluzan D, Belle Moudourou F. Follow-up of venom immunotherapy on flow cytometry and definition of a protective index. Int Arch Allergy Immunol 2016;170:243-50.

Sauvard D, Imbault V, Darrouzet É. Flight capacities of yellow-legged hornet (*Vespa velutina nigrithorax*, Hymenoptera: Vespidae) workers from an invasive population in Europe. PLoS One 2018;13:e0198597.

Schäfer T, Przybilla B. IgE antibodies to Hymenoptera venoms in the serum are common in the general population and are related to indications of atopy. Allergy 1996;51:372-7.

Schwartz HJ, Squillace DL, Sher TH, Teigland JD, Yunginger JW. Studies in stinging insect hypersensitivity: postmortem demonstration of antivenom IgE antibody in possible sting-related sudden death. Am J Clin Pathol 1986;85:607-10.

Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. J Allergy Clin Immunol 2017;140:1485-98.

Smit J, Noordijk J, Zeegers T. Will the Asian hornet (*Vespa velutina*) settle in the Netherlands? Entomol Ber 2018;78:2–6.

Sturm GJ, Kranzelbinder B, Schuster C, Sturm EM, Bokanovic D, Vollmann J, Crailsheim K, Hemmer W, Aberer W. Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare. J Allergy Clin Immunol 2014;133:1635-43.e1.

Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, Antolín-Amérigo D, Cichocka-Jarosz E, Gawlik R, Jakob T, Kosnik M, Lange J, Mingomataj E, Mitsias DI, Ollert M, Oude Elberink JNG, Pfaar O, Pitsios C, Pravettoni V, Ruëff F, Sin BA, Agache I, Angier E, Arasi S, Calderón MA, Fernandez-Rivas M, Halken S, Jutel M, Lau S, Pajno GB, van Ree R, Ryan D, Spranger O, van Wijk RG, Dhami S, Zaman H, Sheikh A, Muraro A. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. Allergy 2018;73:744-64.

Tan K, Hu Z, Chen W, Wang Z, Wang Y, Nieh JC. Fearful foragers: honeybees tune colony and individual foraging to multi-predator presence and food quality. PLoS One 2013;8:e75841

Tripolt P, Arzt-Gradwohl L, Čerpes U, Laipold K, Binder B, Sturm GJ. Large local reactions and systemic reactions to insect stings: similarities and differences. PLoS One 2020;15:e0231747.

Urra JM, Cabrera CM, Alfaya T, Feo-Brito F. Agreement of skin test with IL-4 production and CD40L expression by T cells upon immunotherapy of subjects with systemic reactions to Hymenoptera stings. Mol Immunol 2016;70:134-9.

Valcárcel MA, Vidal C, Armisén M, Rodríguez V, Gonzalez-Quintela A. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants in 2 patients with Hymenoptera venom allergy and alcoholic cardiomyopathy. J Allergy Clin Immunol 2012;130:1001-3.

USC DE SANTIAGO

van der Brempt, X. Les anaphylaxies aux piqûres de frelons asiatiques (*Vespa velutina*) : cas déclarés au Réseau d'Allergo-Vigilance® (RAV) de 2011 à 2021 et conduite à tenir. Revue Française d'Allergologie 2022;62:166-70.

Van der Vecht J. Notes on Oriental Vespinae, including some species from China and Japan (Hymenoptera, Vespidae). Zool Mededel 1959;13:205-32.

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;28:193-4.

Vidal C. The Asian wasp *Vespa velutina nigrithorax*: Entomological and allergological characteristics. Clin Exp Allergy 2022;52:489-98.

Villemant C, Haxaire J, Streito JC. Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). Bull Soc Entomol Fr 2006;111:535–8.

Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, Muller F, Olivier G, Figuet F, Rome Q. Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. Biol Cons 2011;144:2142–50.

Witt, R. Esrtfund eines Nestes der Asiatischen Hornisse *Vespa velutina* Lepeletier, 1838 in Deutschland und Details zumm Nestbau (Hymenosptera, Vespinae). Ampulex 2015;7:42–53.

Worm M, Moneret-Vautrin A, Scherer K, Lang R, Fernandez-Rivas M, Cardona V, Kowalski ML, Jutel M, Poziomkowska-Gesicka I, Papadopoulos NG, Beyer K, Mustakov T, Christoff G, Bilò MB, Muraro A, Hourihane JO, Grabenhenrich LB. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). Allergy 2014;69:1397-404.

Xie C, Xu S, Ding F, Xie M, Lv J, Yao J, Pan D, Sun Q, Liu C, Chen T, Li S, Wang W. Clinical features of severe wasp sting patients with dominantly toxic reaction: analysis of 1091 cases. PLoS One 2013: 8:e83164.

Xu YS, Kastner M, Harada L, Xu A, Salter J, Waserman S. Anaphylaxis-related deaths in Ontario: a retrospective review of cases from 1986 to 2011. Allergy Asthma Clin Immunol 2014;10:38.

Žitnik SE, Vesel T, Avčin T, Šilar M, Košnik M, Korošec P. Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. Pediatr Allergy Immunol 2012;23:166-72.

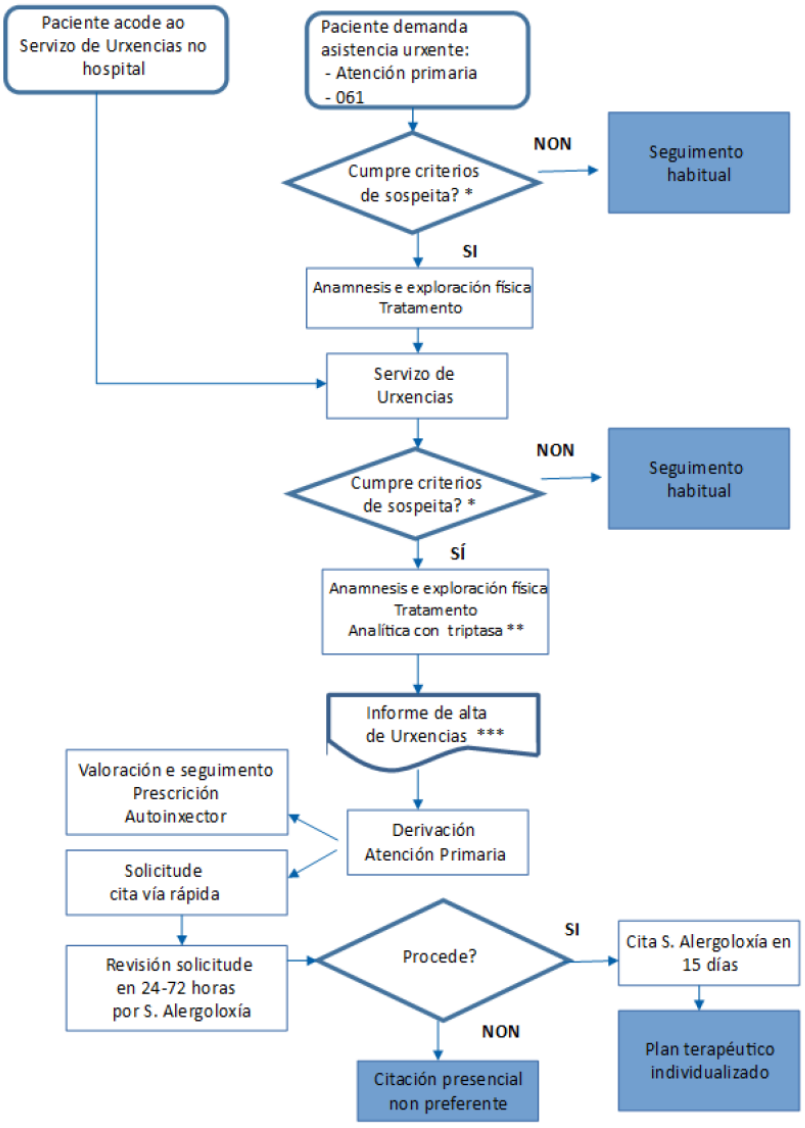
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexo I

Vía rápida para anafilaxia por veneno de himenóptero

CIRCUÍTO ASISTENCIAL RÁPIDO



*Reacción de inicio agudo (minutos a 2 horas) na que se observa afectación cutánea (urticaria, anxioedema ou eritema) acompañada de, polo menos, un dos seguintes: dificultade respiratoria, hipotensión arterial (TAS<90 mmHg ou descenso en 30 mmHg da habitual), síntomas gastrointestinais (dor abdominal, diarrea ou vómitos).

**Indicando tempo transcorrido desde a picadura e a extracción. Conveniente realizar extracción entre 2-3 horas tras picadura.

*** O autoinxector de adrenalina poderase prescribir nos Servizos de Urxencias segundo o criterio do clínico.

avaliacion.asistencial.garantias@sergas.es
www.sergas.es
Tel. 881 542866 - Fax 881 542897
Edificio Administrativo San Lázaro
c.p. 15703 - Santiago de Compostela - A Coruña

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexo II

Hojas de Consentimiento Informado

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A

TÍTULO DEL ESTUDIO: Anafilaxia por *Vespa velutina.* Estudio del perfil molecular frente a alérgenos de *Vespula spp, Polistes dominula y Apis mellifera* que reconocen los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* en el área sanitaria de Santiago de Compostela

CVP-Vespv-2018-01

Este documento tiene por objeto ofrecerle información sobre un **estudio de investigación** en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Galicia.

Si decide participar en el mismo, debe recibir información personalizada del investigador, **leer antes este documento** y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo. Si así lo desea puede llevar el documento, consultarlo con otras personas y tomarse el tiempo necesario para decidir si participa o no.

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Ud. puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a la relación con los profesionales sanitarios que le atienden ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

¿Cuál es la finalidad del estudio?

La finalidad de este estudio consiste en conocer el perfil de sensibilización a *Vespa velutina* (avispa asiática) en los pacientes que han padecido una anafilaxia (reacción alérgica grave) tras su picadura. Es decir, se pretende investigar con qué proteínas del veneno de la *Vespa velutina* reacciona el sistema inmunológico del paciente produciendo alergia. Se intentará aclarar si estas proteínas son similares o no a las que producen la alergia en el caso de la *Vespula vulgaris* (avispa común) o de la *Apis mellifera* (abeja). También se investigará la importancia de otros factores como por ejemplo la edad o la presencia de otras enfemedades, que puedan condicionar la aparición y gravedad de estas reacciones alérgicas. De esta forma, se busca **profundizar en el conocimiento de la alergia causada por la Vespa velutina con la intención de llegar a un mejor diagnóstico y tratamiento**.

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Ud. es invitado a participar porque ha sufrido la picadura de un himenóptero y ha presentado una reacción sistémica (anafilaxia).

¿En qué consiste mi participación?

Su participación en el estudio consiste, por una parte, en **facilitarnos la información** / **permitir el acceso a su historia clínica** para recoger los datos necesarios para el estudio y, por otra parte, en **permitir la utilización de sus muestras de sangre y de suero de la sangre guardadas** en el laboratorio para realizar análisis moleculares más completos sobre la alergia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Su participación no implicará la realización de ninguna otra prueba diagnóstica, tratamiento, consulta ni ningún otro procedimiento distinto a los necesarios para su correcta atención médica.

¿Qué molestias o inconvenientes tiene mi participación?

Su participación no implica molestias adicionales a las de la práctica asistencial habitual.

¿**Obtendré algún beneficio por participar?**

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la alergia a la *Vespa velutina*. Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que permita la identificación de los participantes.

Información referente a sus datos:

La obtención, tratamiento, conservación, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos (Reglamento UE 2016-679 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016) y la normativa española sobre protección de datos de carácter personal vigente.

La institución en la que se desarrolla esta investigación es la responsable del tratamiento de sus datos, pudiendo contactar con el Delegado/a de Protección de Datos a través de los siguientes medios: correo electrónico: Delegado.Proteccion.Datos@sergas.es / Tfn: 8815436631

Los datos necesarios para llevar a cabo este estudio serán recogidos y conservados de modo s**eudonimizado (codificado).** La seudonimización es el tratamiento de datos personales de manera tal que no pueden atribuirse a un/a interesado/a sin que se use información adicional. En este estudio sólamente el equipo investigador conocerá el código que permitirá saber su identidad.

La normativa que regula el tratamiento de datos de personas le otorga el derecho a acceder a sus datos, oponerse, corregirlos, cancelarlos, limitar su tratamiento, restringir o solicitar la supresión de los mismos. También puede solicitar una copia de éstos o que ésta sea remitida a un tercero (derecho de portabilidad).

Para ejercer estos derechos puede Ud. dirigirse al Delegado/a de Protección de Datos del centro a través de los medios de contacto antes indicados o al equipo investigador en el teléfono 981951750.

Únicamente el equipo investigador y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se podrá transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información se transmita a otros países, se realizará con un nivel de protección de datos equivalente, como mínimo, al establecido por la normativa española y europea.

Al finalizar el estudio, o el plazo legal establecido, los datos recogidos serán eliminados o guardados de forma anónima para su uso en futuras investigaciones según lo que Ud. escoja en la hoja de firma del consentimiento.

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Esta investigación es promovida por el Servicio de Alergología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela con fondos propios.

Los investigadores no recibirán ninguna retribución específica por la dedicación al estudio.

Ud. no será retribuidos por participar. En el hipotético caso de que de los resultados del estudio se deriven productos comerciales o patentes Ud. no participará de los beneficios económicos originados.

¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?

Ud. puede contactar con el equipo investigador a través del teléfono 981951750 y/o el correo electrónico que consta en su informe clínico.

Muchas gracias por su colaboración

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO DEL ESTUDIO: Anafilaxia por *Vespa velutina.* Estudio del perfil molecular frente a alérgenos de *Vespula spp, Polistes dominula y Apis mellifera* que reconocen los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* en el área sanitaria de Santiago de Compostela

Yo, _____

- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio.
- Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
- Accedo a que se utilicen mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.

¿Accedo a que mis muestras de sangre y de suero de la sangre sean almacenadas en una colección de muestras biológicas creada expresamente para este estudio?

□ Sí

□ No

Al terminar este estudio acepto que mis datos sean:

□ Eliminados

□ Conservados anonimizados para usos futuros en otras investigaciones

Fdo: El/la participante,	Fdo: El/la investigador/a que solicita el consentimiento
Nombre y apellidos:	Nombre y apellidos:
Fecha:	Fecha:

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Anexo III

Cuaderno de Recogida de Datos (CRD)

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anafilaxia por *Vespa velutina*

Estudio del perfil molecular frente a alérgenos de *Vespula spp, Polistes dominula y Apis mellifera* que reconocen los pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina* en el área sanitaria de Santiago de Compostela

CVP-Vespv-2018-01

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Código Sujeto:	Fecha:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Código del sujeto

***Nota de codificación:**

Codificación **CHUS - (Vespv) - (número de sujeto)**

Descripción **CHUS**: Complexo Hospitalario Universitario de Santiago
Vespvel 01, 02, 03…

Variables epidemiológicas (señalar lo que corresponda)

1. Sociodemográficas

1.1. Mes y Año de Nacimiento: _____ / _____

1.2. Edad: _____ años en el momento de la primera consulta

1.3. Sexo: 0. Mujer 1. Varón

1.4. Ingesta de alcohol en g/semana (cada unidad de bebida equivalente a 10 g de alcohol): _____ g/semana

2. Grado de exposición

2.1. Vivienda habitual: 0. Rural

1. Urbano

***Se consideran urbanos los que viven en la ciudad de Santiago de Compostela y rurales el resto.

2.2. Exposición laboral (en función del trabajo*)

0. No

1. Si

* Se considera exposición por medio laboral cualquier trabajo que se realice al aire libre en medio rural (apicultor, labores de campo, agricultor, ganadero, construcción en el exterior en medio rural,..)

3. Antecedente de picaduras previas (Se pueden marcar varias casillas)

3.1. Avispas (1=SI; 0= NO)

3.2. Vespa velutina (1=SI; 0=NO)

3.3. Abejas (1=SI; 0=NO)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Antecedente de reacción sistémica previa

4.1. Avispas (1=SI; 0= NO)

4.2. Vespa velutina (1=SI; 0=NO)

4.3. Abejas (1=SI; 0=NO)

Episodio de anafilaxia motivo de la consulta

5. Himenóptero implicado en la reacción

Avispas (1)

Vespa velutina (2)

Abejas (3)

6. Número de insectos implicados en la reacción: _____

7. Período de latencia

En los primeros 15 minutos (1)

Entre 15 y 30 minutos (2)

Más de 30 minutos (3)

8. Grado de anafilaxia

(1) Grado I. Leve (Afectación cutánea en forma de eritema, urticaria y/o angioedema con malestar general sin datos objetivos de afectación de otros órganos)

(2) Grado II. Moderada (Afectación respiratoria (disnea, estridor, sibilancias), cardiovascular (mareo, sudoración, opresión torácica) y/o gastrointestinal (vómitos, diarrea, dolor abdominal)

(3) Grado III. Grave (Presencia de cianosis, saturación de O2 por debajo del 92%, hipotensión, confusión, hipotonía y/o pérdida de conocimiento)

9. ¿Se administró adrenalina?

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

0. No

1. Sí

Variables serológicas

(a) Valor de la IgE total: _____ (UI/mL)

(b) Valor de la IgE específica (kU_A/L) frente a:

1. i1: Abeja "Apis mellifera" _____
2. i2: Avispón "Dolichovespula maculata" _____
3. i3: Avispa "Vespula spp." _____
4. i5: Avispón "Dolichovespula arenaria" _____
5. i75: Abejorro *"Vespa crabro"* _____
6. i77: Avispa "Polistes dominula" _____
7. i208: rApi m1 (fosfolipasa A2) _____
8. i209: rVes v 5 _____
9. i210: rPol d 5 _____
10. i211: rVes v 1 (fosfolipasa A1) _____
11. i214: rApi m 2 (hialuronidasa) _____
12. i215: rApi m 3 (fosfatasa ácida) _____
13. i216: rApi m 5 (dipeptidil peptidasa)_____
14. i217: rApi m 10 (icarapina)_____
15. o214: CCD (MUFX3 de bromelina)_____

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo IV

Autorización del Comité Ético de Investigación de Galicia

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Cristina Márquez Riveras, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 19/12/18 el estudio:

Título: Estudio de sensibilización a Vespa velutina en pacientes con anafilaxia por veneno de himenópteros en el área sanitaria de Santiago de Compostela
Versión:
Promotor/a:Carmen Vidal Pan
Investigador/a: Carmen Vidal Pan
Código de Registro:2018/622

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

Documento firmado digitalmente por:
Márquez Riveras, Cristina: 19/12/2018 18:10
SAOC-H4G4-BOAH-OFHR-RC15-4523-9414-843

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexo V

Listado de verificación STROBE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Sí/No/NA		página
Título y resumen		
Si	Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio	XIII-XIV
Si	Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado.	XIII-XIV
Introducción		
Si	Indique el fundamento científico de la Investigación que se comunica	3-23
Objetivos		
Si	Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis preespecificada	31
Material y métodos		
Diseño del estudio		
Si	Presente los elementos clave del diseño del estudio	35,38,41-43
Contexto		
Si	Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluidos los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos.	35-36,38, 41-42
Participantes		
Si	Para estudios de cohortes: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento	42,43
NA	Estudios de casos y controles: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el proceso diagnóstico de los casos y el de selección de los controles. Proporcione las razones para la elección de casos y controles.	NA
Si	Estudios transversales: proporcione los criterios de elegibilidad y las fuentes y métodos de selección de los participantes	35,38,41
NA	Estudios de cohortes apareados. Proporcione los criterios para la formación de parejas y el número de participantes con y sin exposición	NA
NA	Estudios de casos y controles apareados. Proporcione los criterios para la formación de las parejas y el número de controles por cada caso	NA
Variables		
Si	Defina claramente todas las variables: de respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificacoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos	35-36,38, 41-42
Fuentes de datos/medidas		
Si	Para cada variable de interés, proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida).	36-39, 41-43
Si	Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad de los procesos de medida	43
Sesgos		
Si	Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de sesgo	74
Tamaño muestral		
Si	Explique cómo se determinó el tamaño muestral	35
Variables cuantitativas		
Si	Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique cómo se categorizaron y por qué	37-39,42
Métodos estadísticos		
Si	Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión	43,44
Si	Especifique todos los métodos utilizados para analizar subgrupos e interacciones	43,44
Si	Explique el tratamiento de los datos ausentes (missing data)	43
NA	Estudio de cohortes: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento	NA

USC

NA	Estudios de casos y controles: si procede, explique cómo se aparearon casos y controles	NA
NA	Estudios transversales: si procede, especifique cómo se tiene en cuenta en el análisis la estrategia de muestreo	NA
NA	Describa los análisis de sensibilidad	NA
Resultados		
Participantes		
Si	Número de participantes en cada fase del estudio; por ejemplo: cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el estudio, los que tuvieron un seguimiento completo y los analizados	48-49, 52, 59, 64
NA	Razones de la pérdida de participantes en cada fase	NA
NA	Considere el uso de un diagrama de flujo	NA
Datos descriptivos		
Si	Características de los participantes en el estudio (p. ej., demográficas, clínicas, sociales) e información sobre exposiciones y posibles factores de confusión	47-48, 59, 64
Si	Número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés	48,49
Si	Estudios de cohortes: resuma el período de seguimiento (p. ej., promedio y total)	44
Datos de las variables de resultado		
Si	Estudios de cohortes: describa el número de eventos del efecto, o bien proporcione medidas resumen a lo largo del tiempo	64
NA	Estudios de casos y controles: describa el número de participantes en cada categoría de exposición, o bien proporcione medidas resumen de exposición	NA
Si	Estudios transversales: describa el número de eventos del efecto, o bien proporcione medidas resumen	48-51, 52-55. 59-62
Resultados principales		
Si	Proporcione estimaciones crudas (no ajustadas) y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión (p. ej., intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y las razones para incluirlos	48-53, 59-62, 64
NA	Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un período de tiempo relevante	NA
Otros análisis		
NA	Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad)	NA
Discusión		
Resultados clave		
Si	Resuma los resultados principales de los objetivos del estudio	79
Limitaciones		
Si	Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo	74,75
Interpretación		
Si	Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes	67-73
Generabilidad		
Si	Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa)	75
Financiación		
Si	Especifique la financiación y el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que se basa el presente trabajo	44

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PUBLICACIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

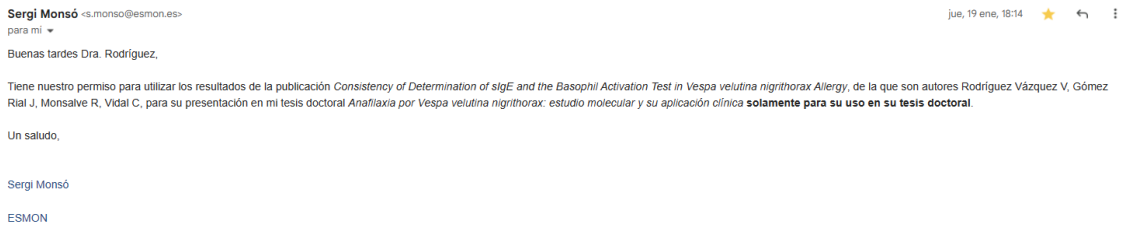
Artículo 1

Anaphylaxis to Vespa velutina nigrithorax: pattern of sensitization for an emerging problem in Western countries. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 2021; 31:228-35. https:// doi.org/10.18176/jiaci.0474

Contribución del doctorando en la publicación: Conceptualización y metodología. Recogida y análisis de datos. Redacción del manuscrito original.

Índices de calidad: La revista donde fue publicado presenta actualmente un índice de impacto de 8.185 (2021 Journal Citation Reports), ocupando la posición 5/28 y, por tanto, Q1 en "Alergia".

Autorización de la revista: La revista Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, pertenece a la editorial ESMON y permite la utilización del artículo por parte de la autora como parte de su tesis.



Sergi Monsó <s.monso@esmon.es> jue, 19 ene, 18:14

para mí

Buenas tardes Dra. Rodríguez,

Tiene nuestro permiso para utilizar los resultados de la publicación *Consistency of Determination of sIgE and the Basophil Activation Test in Vespa velutina nigrithorax Allergy*, de la que son autores Rodríguez Vázquez V, Gómez Rial J, Monsalve R, Vidal C, para su presentación en mi tesis doctoral *Anafilaxia por Vespa velutina nigrithorax: estudio molecular y su aplicación clínica* **solamente para su uso en su tesis doctoral**.

Un saludo,

Sergi Monsó

ESMON

Artículo 2

La prueba de activación de basófilos en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros: una revisión de la evidencia actual. Revista Alergia México 2022;69:102-12.

Contribución del doctorando en la publicación: Conceptualización y metodología. Recogida y análisis de datos. Redacción del manuscrito original.

Índices de calidad: La revista donde fue publicado presenta actualmente un índice de impacto de 0.210 (2021 Journal Citation Reports), Q4 en "Alergia".

Autorización de la revista: La revista Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, se adhiere a Creative Commons NC 4.0 Internatcional con acceso libre para el uso de la información.

Artículo 3

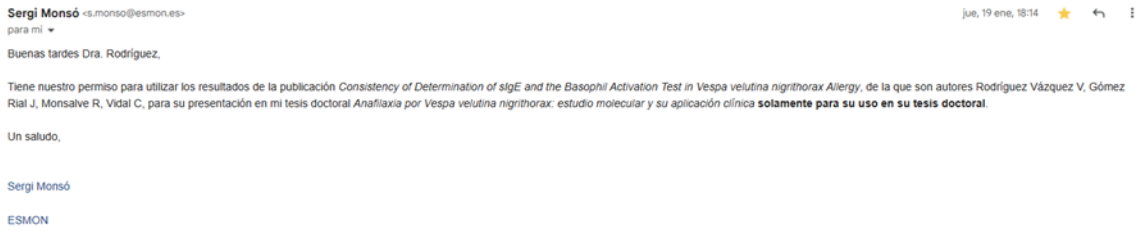
Consistency of determination of sIgE and the basophil activation test in Vespa velutina nigrithorax allergy. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology 2022;32:143-5

Contribución del doctorando en la publicación: Conceptualización y metodología. Recogida y análisis de datos. Redacción del manuscrito original

Índices de calidad: La revista donde fue publicado presenta actualmente un índice de impacto de 8.185 (2021 Journal Citation Reports), ocupando la posición 5/28 y, por tanto, Q1 en "Alergia".

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Autorización de la revista: La revista Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, pertenece a la editorial ESMON y permite la utilización del artículo por parte de la autora como parte de su tesis.



Sergi Monsó <s.monso@esmon.es> jue, 19 ene, 18:14

para mí

Buenas tardes Dra. Rodríguez,

Tiene nuestro permiso para utilizar los resultados de la publicación *Consistency of Determination of sIgE and the Basophil Activation Test in Vespa velutina nigrithorax Allergy*, de la que son autores Rodríguez Vázquez V, Gómez Rial J, Monsalve R, Vidal C, para su presentación en mi tesis doctoral *Anafilaxia por Vespa velutina nigrithorax: estudio molecular y su aplicación clínica* **solamente para su uso en su tesis doctoral**.

Un saludo,

Sergi Monsó

ESMON

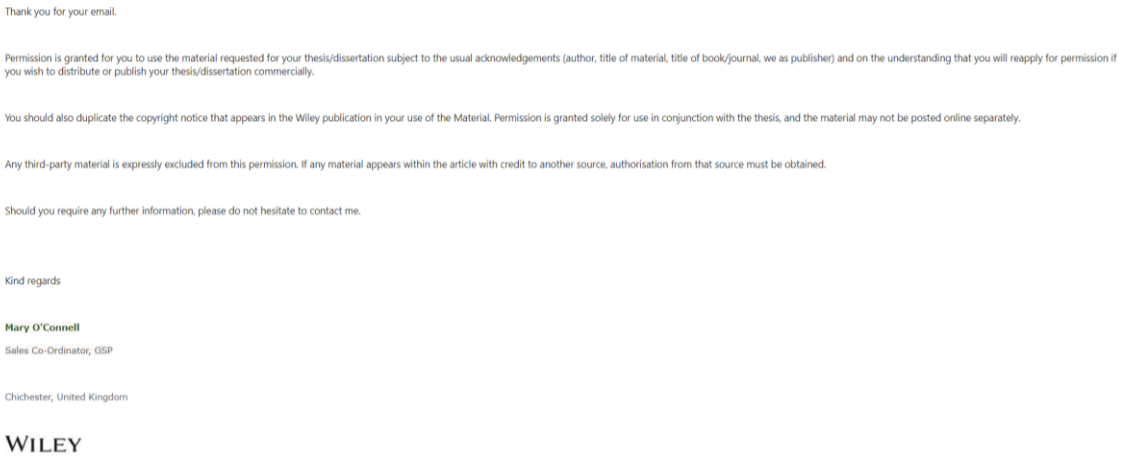
Artículo 4

Immunotherapy with Vespula venom for Vespa velutina nigrithorax anaphylaxis: Preliminary clinical and immunological results. Clinical and experimental Allergy 2022;52:345-7

Contribución del doctorando en la publicación: Conceptualización y metodología. Recogida y análisis de datos. Redacción del manuscrito original.

Índices de calidad: La revista donde fue publicado presenta actualmente un índice de impacto de 5.401 (según Journal Citation Reports 2021), ocupando la posición 13/28 en “Allergy” y, por tanto, siendo Q2.

Autorización de la revista: La revista Clinical and experimental Allergy, pertenece a la editorial Wiley y permite la utilización del artículo por parte de la autora como parte de su tesis.



Thank you for your email.

Permission is granted for you to use the material requested for your thesis/dissertation subject to the usual acknowledgements (author, title of material, title of book/journal, we as publisher) and on the understanding that you will reapply for permission if you wish to distribute or publish your thesis/dissertation commercially.

You should also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Material. Permission is granted solely for use in conjunction with the thesis, and the material may not be posted online separately.

Any third-party material is expressly excluded from this permission. If any material appears within the article with credit to another source, authorisation from that source must be obtained.

Should you require any further information, please do not hesitate to contact me.

Kind regards

Mary O'Connell

Sales Co-Ordinator, GSP

Chichester, United Kingdom

WILEY

ORIGINAL ARTICLE

Anaphylaxis to *Vespa velutina nigrithorax*: Pattern of Sensitization for an Emerging Problem in Western Countries

Vidal C[1,2], Armisén M[1], Monsalve R[3], González-Vidal T[1], Lojo S[4], López-Freire S[1], Méndez P[1], Rodríguez V[1], Romero L[1], Galán A[3], González-Quintela A[2,5]

[1]Allergy Department, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, School of Medicine, University of Santiago de Compostela, Spain
[2]Spanish Network for Addictive Disorders (Red de Trastornos Adictivos, RD16/0017/0018), Spain
[3]CMC R&D (Chemistry, Manufacturing and Control Research and Development), ALK-Abelló, Madrid, Spain
[4]Department of Biochemistry, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain
[5]Department of Medicine, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, Spain

J Investig Allergol Clin Immunol 2021; Vol. 31(3): 228-235
doi: 10.18176/jiaci.0474

Abstract

Objective: To define the sensitization pattern of patients with anaphylaxis to *Vespa velutina nigrithorax* (VVN).
Methods: We studied 100 consecutive Spanish patients with anaphylaxis to Hymenoptera venom and systematically determined specific IgE (sIgE) to whole venoms (*Vespula* species, *Polistes dominula*, *Apis mellifera*, *Vespa crabro*, and *Dolichovespula maculata*) and their molecular components (rApi m 1, rApi m 5, rApi m 10, rVes v 1, rVes v 5, rPol d 5, and cross-reactive carbohydrates). Specific IgE to VVN venom and its antigen 5 (nVesp v 5) were measured in a subsample.
Results: Seventy-seven patients had anaphylaxis to VVN. Of these, only 16 (20.8%) reported previous VVN stings, but were stung by other Hymenoptera. Positive sIgE (>0.35 kU_A/L) to each of the whole venoms was detected in >70% of patients (*Vespula* species in 100%). The components showing >50% positivity were rApi m 5 (51.4%), rPol d 5 (80.0%), and rVes v 5 (98.7%). This pattern was similar to that of *Vespula* species anaphylaxis (n=11) but different from that of *A mellifera* anaphylaxis (n=10). Specific IgE to nVesp v 5 was positive in all patients (n=15) with VVN anaphylaxis and was correlated with sIgE to both rVes v 5 (R=0.931) and rPol d 5 (R=0.887).
Conclusions: VVN has become the commonest cause of Hymenoptera anaphylaxis in our area. Most cases report no previous VVN stings. Their sensitization pattern is similar to that of patients with anaphylaxis to other *Vespidae*. Specific IgE to antigen-5 from VVN, *Vespula* species, and *P dominula* are strongly correlated in patients with VVN anaphylaxis.

Key words: *Vespa velutina nigrithorax*. Anaphylaxis. Ves v 5. Pol d 5. Vesp v 5. Allergy. Hymenoptera.

Resumen

Objetivo: Definir el patrón de sensibilización alérgica de pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina nigrithorax* (VVN), un problema emergente en países occidentales.
Métodos: Se estudió una población de 100 pacientes adultos con anafilaxia por veneno de himenóptero en España. Se determinó IgE específica frente a los venenos completos de *Vespula* spp, *Polistes dominula*, *Apis mellífera*, *Vespa crabro*, *Dolichovespula maculata*, y algunos de sus componentes moleculares (rApi m 1, rApi m 5, rApi m 10, rVes v 1, rVes v 5, rPol d 5, carbohidratos [MUXF]). En una muestra de 15 pacientes con anafilaxia por VVN se determinó la IgE específica frente a este veneno completo y al antígeno 5 de VVN (denominado nVesp v 5).
Resultados: Setenta y siete pacientes (77,0%) padecieron anafilaxia por VVN. De ellos, tan solo 16 (20,8%) habían padecido picaduras previas por VVN si bien reconocían picaduras previas por otros himenópteros. Más del 70% de los pacientes con anafilaxia por VVN presentaron IgE específica positiva (>0,35 kU_A/L) frente a cada uno de los venenos completos estudiados (el 100% en el caso de *Vespula* spp). Los componentes moleculares reconocidos por la IgE de más del 50% de los pacientes fueron rApi m 5 (51,4%), rPol d 5 (80,0%), y rVes v 5 (98,7%). Este patrón de sensibilización fue similar al de los pacientes con anafilaxia por *Vespula* spp (n=11) y diferente al de los pacientes con anafilaxia por *Apis mellifera* (n=10). La IgE específica frente a nVesp v 5 fue positiva en el 100% de los pacientes con anafilaxia por VVN analizados (15/15). La correlación entre la IgE específica frente a nVesp v 5 y la IgE específica frente a rVes v 5 (R=0,931) y rPol d 5 (R=0,887) fue muy significativa.
Conclusiones: VVN es la principal especie de himenóptero responsable de anafilaxia en la actualidad en nuestra área. El perfil de sensibilización es similar al de los pacientes con anafilaxia por otros Véspidos. La IgE específica frente al antígeno 5 de VVN, *Vespula* spp, y *Polistes dominula* se correlaciona estrechamente en los pacientes con anafilaxia por VVN.

Palabras clave: *Vespa velutina nigrithorax*. Anafilaxia. Ves v 5. Pol d 5. Vesp v 5. Alergia. Hymenoptera.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

© 2021 Esmon Publicidad

Introduction

Alien species causing biological invasions are recognized as a significant problem nowadays, primarily because of the impact on biodiversity, but also because they cause new health problems. *Vespa velutina nigrithorax* (VVN), commonly known in Spain as Asian wasp, is one of the 12 color variants of *Vespa velutina Lepeletier* 1836, which is naturally distributed in Asia from Afghanistan to eastern China, Indochina, and Indonesia [1]. The first record of the presence of VVN in Europe was in 2005 in Lot-et-Garonne, France, where it was thought to have arrived in 2004 [2]. This unexpected invasion seems to have been due to an accidental transport of at least 1 hibernating founder queen in pottery or other horticultural commercial products from China (bonsai tree) [3,4]. From that moment onwards, VVN has spread rapidly across France [5-7] and the Basque Country in the North of Spain [8]. In 2011, Villemant et al [7] published an interesting model predicting the future invasion of VVN. The model predicted that many countries in western Europe had a high probability of being invaded, with the highest risk being along the Atlantic and northern Mediterranean coasts. Coastal areas of the Balkan Peninsula, Turkey, and Near East also appeared suitable and could potentially be colonized later [7]. Other parts of the world with high climatic suitability for this species could also be threatened by VVN, since the species could enter again through international trade [7]. This prediction is now a reality, since VVN has spread into Spain (particularly in the north and northwestern areas (information available at http://webs-gis.cesga.es/velutina/), Portugal, Italy, and the UK [4,9,10]. In Galicia, a region in the northwest of Spain, more than 47 394 nests were identified and 24 196 retrieved and destroyed in 2018 (compared to 769 in 2014) (Consellería de Medio Rural, Xunta de Galicia).

Vespa velutina is one of the most aggressive and feared Hymenoptera species in China, where it is known as killer wasp, because it causes a number of deaths every year [11]. Most affected persons die after multiple stings because of multiple organ dysfunction induced by toxins in the venom [11,12]. Apart from these toxic effects, *V velutina* can provoke allergic reactions similar to those caused by other Hymenoptera species. In fact, up to 6 deaths after VVN stings, presumably due to fatal allergic reactions, were reported by the media in Spain in 2017 and 2018 (5 in the northwest). For that reason, the population of the north and northwest of Spain has been alerted to the presence of VVN, and specific political campaigns have been activated to fight against the invasion. The first well-identified case of anaphylaxis due to VVN in Spain was reported in 2014 [13]. The first patient with anaphylaxis to VVN in our area was detected in June 2015. Two additional cases were seen in 2016 and 9 in 2017. This increase in the frequency of anaphylaxis to VVN and the lack of commercially available assays for identifying specific IgE (sIgE) against VVN or its components led us to initiate the present study. Our objective was to identify the sensitization profile of patients with anaphylaxis to VVN and to compare it with that of patients who experience anaphylaxis caused by other Hymenoptera. We used commercially available sIgE determinations against both the whole venom and molecular components of *Vespula* species, *Polistes dominula*, *Apis mellifera*, *Vespa crabro*, and *Dolichovespula maculata*. We also aimed to investigate the usefulness of a customized test to detect VVN-sIgE based on binding biotin to the whole venom extract and to its purified components, phospholipase and antigen 5 (namely Vesp v 1 and Vesp v 5).

Patients and Methods

Study Population and Design

We performed a cross-sectional study in which we prospectively enrolled all adult individuals with anaphylaxis due to Hymenoptera venom who attended our Allergy Department for the first time between December 2017 and June 2019. Our institution is a reference teaching hospital in northwest Spain. Patients were submitted from either primary care or the emergency department after experiencing an anaphylactic reaction to Hymenoptera sting. Patients with large local reactions were not included in the study. The hospital covers an area of approximately 500 000 people, of whom nearly 90 000 live in the city of Santiago de Compostela and the remainder in primarily rural areas. All eligible patients (n=100) agreed to participate. The median age was 63 years (range, 20-90 years), and 87 (87.0%) were males. Most patients (97 [97%]) lived in a rural environment, and 57 (57%) worked outdoors, thus leading them to be considered at high risk of exposure.

A physician-administered structured questionnaire was completed for every patient to obtain a series of data: (*a*) identification of the Hymenoptera species involved in the reaction (bees, common wasps, and VVN); (*b*) recall of previous Hymenoptera stings (bees, common wasps, and VVN); (*c*) a history of previous systemic reactions after Hymenoptera stings; (*d*) time elapsed between exposure to Hymenoptera venom and when symptoms and appearance of the first signs; (*e*) signs and symptoms reported by the patient; (*f*) signs and symptoms reported by doctors who treated the patients after the reaction; and (*g*) history of Hymenoptera stings after the reported reaction and before entering the study. The severity of the systemic reaction was classified based on the information recorded and divided into 3 categories: mild (skin and subcutaneous lesions plus nonspecific general symptoms), moderate (features suggesting respiratory, cardiovascular, or gastrointestinal involvement), and severe (hypoxia, hypotension, or neurologic compromise) (adapted from [14]), as accepted for systemic reactions to Hymenoptera venom [15]. Information was recorded between 15 and 30 days after the reaction and all laboratory determinations were performed in serum samples obtained under baseline conditions 1-2 months after the reaction. Finally, and following the recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis, we recorded the Spanish Mastocytosis Network (REMA) score [16] to calculate the risk of a clonal mast cell disorder that could increase the severity of the reaction.

Laboratory Determinations

Commercially available specific IgE

Allergen sIgE was measured using the ImmunoCAP-250 system (Thermo Fisher Scientific) and included sIgE against *Vespula* species, *P dominula*, *A mellifera*, *V crabro*, *D maculata*, rApi m 1, rApi m 5, rApi m 10, rVes v 1, rVes v 5, rPol d 5, and MUXF (o214) as a marker of cross-reactive carbohydrate

© 2021 Esmon Publicidad

determinant (CCD). Following the manufacturer's instructions, sIgE levels ≥0.1 kU_A/L were deemed positive, although analyses were performed with the classic 0.35-kU_A/L threshold level for positivity.

Customized specific IgE

We measured sIgE to VVN whole venom extract and to VVN phospholipase and antigen 5 (nVesp v 1 and nVesp v 5, respectively) in a subsample of 15 patients with anaphylaxis to VVN. The nVesp v 1 and 5 components were purified from an extract of VVN venom (ALK-Source Materials) by successive chromatographic steps [17] in a procedure similar to that used for purifying the allergenic components of *Vespula* species and *P dominula* [18]. VVN whole venom extract and nVesp v 1 and nVesp v 5 proteins were biotinylated [19], bound to high-streptavidin-coated high-capacity plates (o212, Thermo Fisher Scientific, Inc.), and subsequently used as specific reagents in the ImmunoCAP-250 platform.

Serum total IgE

Total IgE was measured in serum samples using a chemiluminescence immunoassay in a Centaur XP System analyzer (Siemens).

Serum tryptase

Serum tryptase was determined using the ImmunoCAP 250 tryptase assay (Thermo Fisher Scientific).

Statistical Analyses

The chi-square test (with continuity correction and analysis of trend, when needed) was used to compare proportions. The Mann-Whitney test was used to compare numerical variables between groups. The Jonckheere-Terpstra test was used to analyze the trend of numerical variables in relation to ordinal categories. The Pearson test was used to assess correlation. Linear regression was used to predict the value of a dependent variable (VVN-sIgE) based upon the values of independent variables (commercially available sIgE to related allergens).

Ethics

The study was approved by the Institutional Ethics Committee and complied with the recommendations of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

Table 1. Clinical Data of Study Patients Stratified by Culprit Insect

	Culprit Insect			*P* Value[a]	
	Vespula species (n=11)	*Vespa velutina nigrithorax* (n=77)	*Apis mellifera* (n=10)	VVN vs VV	VVN vs AM
Age, y[b]	58 (56-65)	63 (54-69)	54 (41-68)	.618	.348
Male sex	11 (100)	66 (85.7)	9 (90.0)	.394	.712
History of previous stings					
Vespula species	11 (100)	75 (97.4)	8 (80.0)	.999	.095
Vespa velutina nigrithorax	2 (18.2)	16 (20.8)	0 (0.0)	.999	.245
Apis mellifera	6 (54.5)	41 (53.2)	10 (100)	.936	.013
Previous systemic reactions					
Vespula species	1 (9.1)	13 (16.9)	0 (0.0)	.826	.349
Vespa velutina nigrithorax	0 (0.0)	5 (6.5)	0 (0.0)	.862	.914
Apis mellifera	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (30.0)	.999	<.001
Habitat (rural)	11 (100)	75 (97.4)	9 (90.0)	.999	.775
Occupational exposure (outdoors)	8 (72.7)	43 (55.8)	5 (50.0)	.463	.991
Grade of anaphylaxis					
Grade I	3 (27.3)	12 (15.6)	2 (20.0)	.628	.419
Grade II	4 (36.4)	33 (42.9)	6 (60.0)		
Grade III	4 (36.4)	32 (41.6)	2 (20.0)		
Time to reaction					
Less than 15 min	7 (63.6)	61 (79.2)	7 (70.0)	.514	.431
15-30 min	3 (27.3)	12 (15.6)	3 (30.0)		
More than 30 min	1 (9.1)	4 (5.2)	0 (0.0)		
Use of adrenaline	5 (45.5)	37 (48.1)	5 (50.0)	.872	.908

[a]VVN vs VV, comparison of *Vespa velutina nigrithorax* with *Vespula* species.
VVN vs AM, comparison of *Vespa velutina nigrithorax* with *Apis mellifera*.
[b]Age data are median and interquartile range (in parenthesis). The remainder are absolute numbers and percentages (in parenthesis).

© 2021 Esmon Publicidad

Results

Clinical Data

Seventy-seven patients (77.0%) identified VVN as the insect responsible for the reaction. Only 11 (11.0%) and 10 (10.0%) patients identified the common wasp (*Vespula* species) and honeybee (*A mellifera*) as the culprit insect, respectively. Two patients (2%) did not recognize the insect involved in the reaction.

All patients with anaphylaxis to *Vespula* species and *A mellifera* reported previous stings by the culprit insect. In contrast, only 20.8% (16/77) of patients with anaphylaxis to VVN reported a previous sting by this species. However, all patients with anaphylaxis to VVN reported previous stings by either *Vespula* species (75/77, 97.4%) or *A mellifera* (41/77, 53.2%). Twenty-three patients reported past episodes of anaphylaxis before the present attack, even though they had not been sent for evaluation (14 episodes related to *Vespula* species, 5 to VVN, and 4 to *A mellifera*). No additional stings were recorded after the last systemic reaction and before inclusion in the study. No differences were found regarding the culprit insect with respect to age, sex, environment (rural or urban), or occupation (outdoors or indoors) (Table 1).

Most reactions happened in the first 15 minutes after the sting, with no differences regarding the culprit insect (Table 1). The anaphylactic reaction was mild in 17 cases (17%), moderate in 45 (45%), and severe in 38 (38%) cases. Severity of anaphylaxis to VVN was similar to that of anaphylaxis to *Vespula* species or *A mellifera* (Table 1). Adrenaline was used in 48 patients (48%): the more severe the reaction, the more frequent the use of adrenaline (17.6% in mild reactions, 44.4% in moderate reactions, and 65.8% in severe reactions; $P<.001$, trend test). Baseline serum tryptase levels (available for all patients) tended to increase with the severity of the anaphylactic reaction. Median tryptase was 3.9 ng/mL (3.6-5.4 ng/mL), 4.5 ng/mL (3.5-5.9 ng/mL), and 5.4 ng/mL (4.3-6.7 ng/mL), in patients with mild, moderate, and severe reactions, respectively ($P=0.015$, trend test). However, serum tryptase levels were similar in patients with anaphylaxis to VVN, *Vespula* species, and *A mellifera* (Table 2). The REMA score was <2 in 98 patients. Only 2 patients, both of whom belonged to the VVN group, had a REMA score higher than 2, although the hematological study performed enabled us to rule out the presence of a clonal mast cell disorder.

Sensitization Profile

Commercially available specific IgE determinations

Specific IgE against *Vespula* species was available in 76/77 patients with anaphylaxis to VVN, and results were positive (>0.35 kU_A/L) for all of them. Most patients with anaphylaxis to VVN (70%) also had positive sIgE to the whole venom extract of *D maculata*, *P dominula*, *V crabro*, and *A mellifera*, in that order (Figure 1). Regarding molecular components, patients with anaphylaxis to VVN had positive sIgE to *Vespula* species rVes v 5 more frequently than to rVes v 1. Specific IgE to *P dominula* rPol d 5 was present in most patients with anaphylaxis to VVN. The only molecular component from *A mellifera* with a positive sIgE rate >50% in patients with anaphylaxis to VVN was rApi m 5 (Figure 1).

Patients with anaphylaxis due to VVN had similar levels of sIgE against *Vespula* species, *P dominula*, rVes v1, rVes v 5, rPol d 5, *D maculata*, and *V crabro* than patients with anaphylaxis due to *Vespula* species. In contrast, patients

Table 2. Laboratory Data for Study Patients Stratified by Culprit Insect

	Culprit Insect						*P* Value[a]	
	Vespula species		*Vespa velutina nigrithorax*		*Apis mellifera*			
	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	VVN vs VV	VVN vs AM
Serum specific IgE, kU_A/L								
MUXF	11	0.20 (0.00-0.92)	77	0.05 (0.00-0.34)	10	0.09 (0.00-1.55)	.362	.562
Apis mellifera	11	1.12 (0.31-3.79)	76	0.91 (0.22-3.67)	10	7.48 (2.88-27.4)	.655	<.001
rApi m 1	10	0.07 (0.00-0.35)	76	0.01 (0.00-0.12)	10	2.45 (1.50-7.79)	.332	<.001
rApi m 5	10	1.17 (0.11-10.2)	72	0.50 (0.00-3.93)	9	1.15 (0.02-15.4)	.432	.710
rApi m 10	10	0.04 (0.01-0.07)	75	0.03 (0.00-0.86)	10	0.31 (0.04-2.25)	.802	.053
Vespula species	11	14.0 (8.51-57.3)	76	5.38 (2.03-14.2)	9	0.08 (0.00-7.23)	.019	.007
rVes v 1	11	0.07 (0.03-5.98)	77	0.15 (0.03-1.44)	9	0.00 (0.00-1.29)	.870	.820
rVes v 5	11	12.4 (0.52-65.0)	76	4.45 (1.48-12.3)	9	0.00 (0.00-0.75)	.322	<.001
Polistes dominula	11	4.22 (2.95-36.1)	77	1.54 (0.41-6.72)	9	0.06 (0.00-2.43)	.060	.024
rPol d 5	11	6.89 (0.85-15.7)	75	1.65 (0.50-8.31)	9	0.01 (0.00-0.57)	.151	.001
Dolichovespula m	7	4.78 (1.10-13.5)	76	1.34 (0.42-4.05)	8	0.15 (0.00-8.85)	.046	.185
Vespa crabro	7	2.98 (0.98-3.79)	75	0.93 (0.34-3.34)	9	0.02 (0.00-8.48)	.137	.073
Serum total IgE, kU/L	11	189 (126-264)	76	78.5 (33.0-198)	10	45.0 (16.2-182)	.017	.247
Serum tryptase, ng/mL	11	4.3 (3.5-5.2)	77	5.1 (3.9-6.4)	10	4.5 (4.1-6.3)	.304	.868

Abbreviations: MUXF (o214), marker of cross-reactive carbohydrate determinant; *Dolichovespula m*, *Dolichovespula maculata*.
aVVN vs VV, comparison of *Vespa velutina nigrithorax* with *Vespula* species.
VVN vs AM, comparison of *Vespa velutina nigrithorax* with *Apis mellifera*.

© 2021 Esmon Publicidad

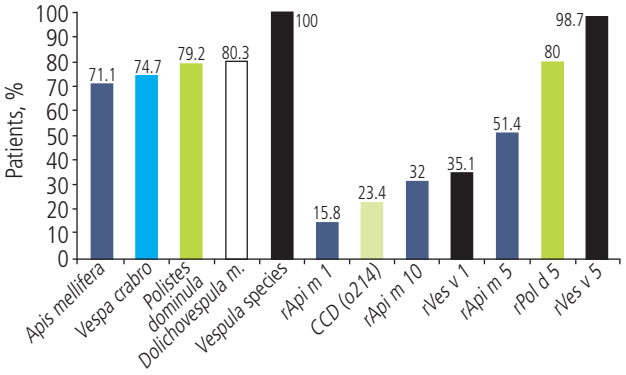


Figure 1. Percentage of patients with anaphylaxis due to *Vespa velutina nigrithorax* and positive sIgE (>0.35 kUA/L) to whole Hymenoptera venoms (*Vespula* species [n=76], *Polistes dominula* [n=77], *Apis mellifera* [n=76], *Vespa crabro* [n=75], and *Dolichovespula maculata* [n=76], left side) and their molecular components (rApi m 1 [n=76], rApi m 5 [n=72], rApi m 10 [n=75], rVes v 1 [n=77], rVes v 5 [n=76], rPol d 5 [n=75], and o214 [MUXF, as a CCD marker, n=77], right side). Each venom and its molecular components are represented with the same color to facilitate identification.

with anaphylaxis to VVN had lower levels of sIgE against *A mellifera* and its main allergen, rApi m 1, than patients with anaphylaxis to *A mellifera*. Of note, sIgE levels to rApi m 5, rApi m 10, rVes v 1, and the CCD marker (MUXF, o214) were similar in all patients, irrespective of the culprit insect (Table 2).

Patients with anaphylaxis to *Vespula* species presented higher levels of total IgE than patients with anaphylaxis to VVN or *A mellifera* (Table 2). A similar profile was observed when concentrations of venom-specific IgE were considered in relation to total IgE, ie, patients with anaphylaxis to VVN displayed a pattern of sIgE sensitization similar to that of patients with anaphylaxis to *Vespula* species and different from that of patients with anaphylaxis to *A mellifera* (Table 3).

Customized specific IgE determinations

In a subsample of 15 patients with anaphylaxis to VVN, 13 (86.6%) had positive sIgE (>0.35 kU_A/L) to a whole

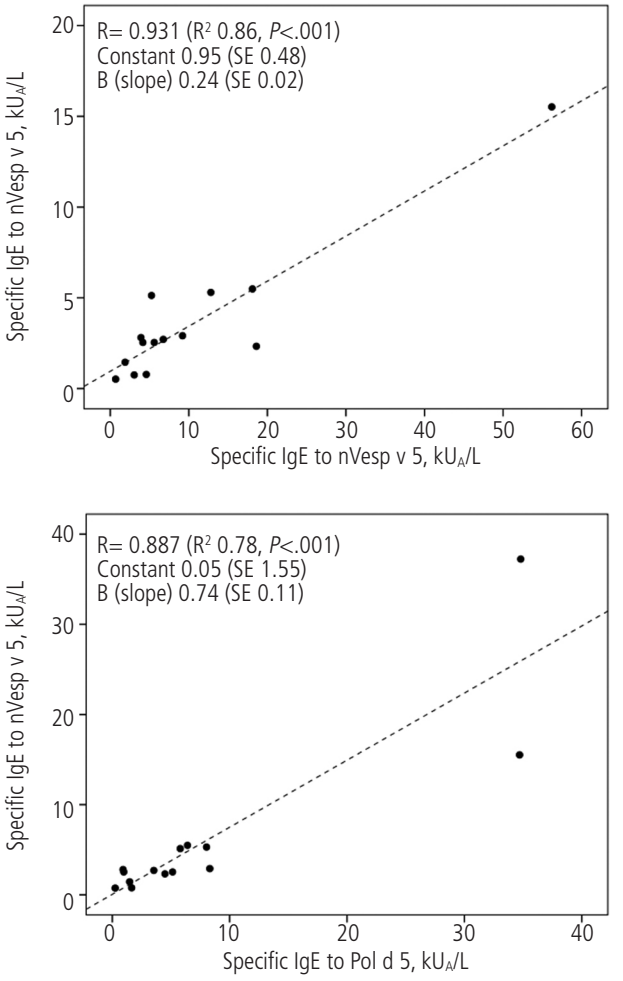


Figure 2. Scatterplots representing the relationship between serum specific IgE to rVes v 5 and rPol d 5 and specific IgE to *Vespa velutina nigrithorax* antigen 5 (nVesp v 5). Linear regression models were constructed to predict nVesp v 5 concentrations as a function of rVes v 5 and rPol d 5 concentrations, thus explaining 86% and 78% of the variability of nVesp v 5, respectively.

Table 3. Ratio of Serum Specific IgE to Serum Total IgE for Study Patients Stratified by Culprit Insect

	Culprit Insect						*P* Value[a]	
	Vespula species		*Vespa velutina nigrithorax*		*Apis mellifera*			
Ratio of serum specific IgE, kU_A/L to total IgE, kU/L (×100)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	VVN vs VV	VVN vs AM
Apis mellifera	11	0.51 (0.34-1.43)	76	1.07 (0.31-2.92)	10	16.7 (12.3-38.3)	.358	<.001
Vespula species	11	8.45 (5.93-21.0)	75	5.54 (3.12-15.7)	9	0.22 (0.0-1.64)	.419	<.001
Polistes dominula	11	3.27 (1.01-13.8)	76	2.02 (0.84-5.63)	9	0.18 (0.0-4.16)	.319	.040
Vespa crabro	7	1.12 (0.58-3.46)	74	1.91 (0.59-3.35)	9	0.11 (0.0-1.81)	.814	.043
Dolichovespula maculata	7	1.83 (1.25-7.11)	75	1.97 (0.85-3.35)	8	0.83 (0.0-2.52)	.578	.112

[a]VVN vs VV, comparison of *Vespa velutina nigrithorax* with *Vespula* species.
VVN vs AM, comparison of *Vespa velutina nigrithorax* with *Apis mellifera*.

© 2021 Esmon Publicidad

venom extract of VVN. Levels of sIgE to VVN were low (median [IQR], 1.1 kU_A/L [0.12-20.5 kU_A/L]). Using the same methodology, 100% of these patients presented positive sIgE to nVesp v 5, while only 28.8% presented positive sIgE levels to nVesp v 1. Median (IQR) levels of sIgE to nVesp v 5 (2.71 [0.52-37.2 kU_A/L], n=15) tended to be higher than those of sIgE to nVesp v 1 (0.17 kU_A/L, [0.99-27.1 kU_A/L], n=14) and tended to be higher than those of sIgE to whole venom extract of VVN (2.71 [0.52-37.2 kU_A/L], n=15). A significant correlation was found between sIgE to VVN and sIgE to *Vespula* species (R=0.669, *P*=.009), *P dominula* (R=0.620, *P*=.014), *D maculata* (R=0.973, *P*<.001), and *V crabro* (R=0.968, *P*<.001). There was also a strong correlation between sIgE to nVesp v 5 and sIgE to rVes v 5 (R=0.931, *P*<.001) and between sIgE to nVesp v 5 and rPol d 5 (R=0.887, *P*<.001). Figure 2 shows a scatterplot of nVesp v5 in relation to rVes v5 and rPol d 5 and linear regression parameters to predict the level of sIgE to nVesp v5, given the values of rVes v 5 and rPol d 5. Finally, no significant correlation was found between sIgE to nVesp v 1 and sIgE to rVes v 5 and rVes v 1 (R=0.429, *P*=.143, R=–0.002, *P*=.993).

Discussion

The present study enables us to conclude the following: (*a*) Anaphylaxis to VVN has increased rapidly in frequency recent years in our area, where it represents the most common form of Hymenoptera anaphylaxis today; (*b*) Most patients with anaphylaxis to VVN do not report previous stings by VVN, although they do report previous stings to other Hymenoptera, especially common wasps (*Vespula* species); (*c*) The IgE sensitization profile of patients with anaphylaxis to VVN is similar to that of patients with anaphylaxis to other Vespidae; and (*d*) Most patients with VVN anaphylaxis show sIgE to antigen 5 from *Vespula* species (rVes v 5) and antigen 5 from *P dominula* (rPol d 5), which is strongly correlated with sIgE to antigen 5 from VVN (n Vesp v 5) in the same patients. Taken together, these findings suggest a degree of cross-reactivity between VVN and other Vespidae, which may be important for sensitization and relevant for diagnostic and therapeutic purposes.

Our data confirm anaphylaxis to VVN to be a significant emerging problem. The number of patients reporting anaphylaxis to VVN has increased exponentially from the first case in 2015 in our area. The number of incident cases of anaphylaxis caused by other Hymenoptera remained stable in those years, although more than three-quarters of incoming patients reporting Hymenoptera anaphylaxis today identify VVN as the culprit insect. As an example, and considering the number of patients receiving venom immunotherapy, while 60.3% of 126 patients were being treated with *A mellifera* venom in 2015, 68.2% of 245 were being treated with *Vespula* species venom in June 2019 (most after experiencing anaphylaxis to VVN). To the best of our knowledge, this is the largest series of VVN anaphylaxis that has been reported in the English-language literature. The paucity of previous reports is noteworthy. We found no scientific reports of anaphylaxis to VVN or anaphylaxis to *V velutina* variants from the countries of origin in Asia. In the case of European countries where VVN has expanded, we found only 1 case of VVN anaphylaxis in the literature, corresponding to the first case described in 2014 in Spain [13]. While cases of VVN anaphylaxis are commonly reported by the mass media in Spain, underreporting of epidemiological, clinical, and immunological characteristics of VVN anaphylaxis prompted us to report this series in an attempt to fill the knowledge gap for this emerging, relevant clinical problem.

Importantly, most of the patients who experienced anaphylaxis to VVN did not recall previous stings from the insect. This fact, together with the results of sIgE determinations, supports the idea that, in our study, allergic reactions to VVN may develop after stings by other Hymenoptera, mainly *Vespula* species. It could also explain why patients reported here more frequently reacted against *Vespula* species than against *V crabro*, which is nearer to VVN than *Vespula* species. Likewise, cases of anaphylaxis to *Vespa orientalis* (a different member of the Vespidae family) without previous stings by this insect were reported in American soldiers deployed in Afghanistan [20]. The existence of cross-reactivity among allergens from different Vespidae could explain these reactions [18,21-23]. The specific reasons for potentially increased susceptibility to VVN anaphylaxis after sensitization via different Hymenoptera species are not known.

Most of the anaphylactic reactions to VVN were moderate to severe. The proportion of cases with moderate-to-severe reactions was similar to that of reactions to *Vespula* species and *A mellifera* in the present series. Our data cannot answer the question of potentially more frequent anaphylaxis after VVN sting than after sting by other Hymenoptera species. Taking into account the size of VVN, a more severe reaction could be expected, as occurs with *V crabro* sting, which is known to induce 3 times more life-threatening reactions than *Vespula* species or *A mellifera* stings [22]. Of note, 5 deaths after a VVN sting were reported during 2017 and 2018 in the Galicia region of Spain, which is home to some 2.7 million people. Thus, the number of deaths attributable to VVN was higher than expected for the general population according to a UK national database that sets the risk of death from Hymenoptera stings at 0.09 cases per million inhabitants per year (95%CI, 0.07-0.10) [24]. These observations further support the clinical importance of emerging VVN anaphylaxis.

The lack of specific tools to diagnose and treat patients who are allergic to VVN is challenging for physicians, who must choose the best therapeutic option. In the population studied, all patients with anaphylaxis to VVN presented sIgE to *Vespula* species, and almost all of them presented sIgE to rVes v 5 and to rPol d 5. We also confirmed the presence of sIgE to antigen 5 from VVN by using the novel allergen nVesp v 5 in all cases from a subsample of patients with anaphylaxis to VVN. Of note, sIgE to antigen 5 from *Vespula* species, *P dominula*, and VVN was closely correlated in patients with VVN anaphylaxis. Hence, antigen 5 from VVN appears to be a good candidate as a major allergen. In contrast, a poorer diagnostic value was recorded for nVesp v 1. In addition, sIgE to rApi m 5 (dipeptidyl peptidase IV, which is homologous to Ves v 3 from *Vespula* species) [25] was detected in more than 50% of patients with anaphylaxis to VVN; consequently, it could also be considered a major allergen. The fact that more than 70% of patients with

© 2021 Esmon Publicidad

anaphylaxis to VVN reacted against all the venoms used in the study suggests a high level of cross-reactivity that cannot be explained though sensitization to CCD. Therefore, further studies are needed to identify other relevant allergens in VVN venom that would likely react to other venoms as well.

Analogies in the sensitization profile of patients who experience anaphylaxis to VVN and *Vespula* species led us to systematically use a commercially available immunotherapy regimen based on *Vespula* species (data not shown). To date, only 5 patients with anaphylaxis to VVN and treated with *Vespula* species venom were stung by VVN after initiating immunotherapy, and none presented systemic reactions (data not shown). Likewise, immunotherapy with *Vespula* species in patients with anaphylaxis to *V orientalis* has proven to be efficacious [23], and immunotherapy with *Vespula* species was efficacious in patients with anaphylaxis to *V crabro* [26]. Further studies are needed to develop specific immunotherapy for VVN, and a longer follow-up is needed to support the efficacy of immunotherapy initiated in the patients we treat. Meanwhile, commercially available Vespula-based immunotherapy seems to be a wise option in patients with VVN anaphylaxis.

Our study is subject to a series of limitations. First, the cause of anaphylaxis was classified according to the identification of the culprit insect provided by the patients, because samples of the insects were not available. Classification is always problematic when dealing with anaphylaxis due to Hymenoptera species. However, the fact that almost all patients live or work in a rural environment, where Hymenoptera are easily recognized, decreases the risk of misidentification. Besides, given that VVN has become very well-known in our region as a result of its proliferation, photographs of insects and their nests are frequently displayed in local newspapers and on television. The reason 2 patients were unable to identify the culprit insect was that they had not seen it. Second, determinations of sIgE to VVN venom and nVesp v 5 were available for a small subsample of patients; therefore, findings should be confirmed in larger studies. Finally, as already mentioned, further molecular and follow-up studies are needed to add information to the profile and outcome of patients that cannot be provided from this preliminary, cross-sectional study.

In conclusion, anaphylaxis to VVN is a relevant, emerging problem and has quickly become the most common type of Hymenoptera anaphylaxis in our area. Similarities in sensitization profile between VVN and other Vespidae (particularly *Vespula* species) could help in the diagnosis and treatment of VVN anaphylaxis when specific determinations and immunotherapy are not readily available.

Acknowledgments

The authors thank Emilia Martínez Lourido for helping with the collection and storage of serum samples

Funding

The study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health, PI16/1401 and PI19/01023) and Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Immunología Clínica (SEAIC).

Conflicts of Interest

Carmen Vidal reports grants from Fundación SEAIC and grants from Instituto Carlos III during the conduct of the study.

Rafael Monsalve is an employee of ALK-Abelló.

Agustín Galán is an employee of ALK-Abelló.

The remaining authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Perrard A, Arca M, Rome Q, Muller F, Tan J, Bista S, et al. Geographic variation of melanisation patterns in a hornet species: genetic differences, climatic pressures or aposematic constraints? PLoS ONE. 2014;9:e94162.
2. Haxaire J, Bouguet JP, Tamisier JP. Vespa velutina Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hymenoptera: Vespidae). Bull Soc Entomol Fr. 2006;111:194.
3. Monceau K, Bonnard O, Thiéry D. Vespa velutina: a new invasive predator of honeybees in Europe. Journal of Pest Science. 2014:87;1-16.
4. Arca M, Mougel F, Guillemaud T, Dupas S, Rome Q, Perrard A, et al. Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, Vespa velutina, in Europe. Biological Invasions. 2015:17;2357-71.
5. Villemant C, Haxaire J, Streito JC. Premier bilan de l'invasion de Vespa velutina Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). Bull Soc Entomol Fr. 2006;111:535-8.
6. Rome Q, Muller F, Gargominy O, Villemant C. Bilan 2008 de l'invasion de Vespa velutina Lepeletier en France (Hymenoptera: Vespidae). Bull Soc Entomol Fr. 2009;114:297-302.
7. Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, Muller F, Gargominy O, Jiguet F, et al. Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking yellow-legged hornet Vespa velutina nigrithorax across Europe and other continents with niche models. Biological Conservation. 2011;144:2142-50.
8. Castro L, Pagola-Carte S. Vespa velutina Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae), recolectada en la Península Ibérica. Heteropterus Rev Entomol. 2010;10:193-6.
9. Monceau K, Thiery D. Vespa velutina nest distribution at a local scale: an 8-year survey of the invasive honeybee predator. Insect Science. 2016;00:1-12.
10. Budge GE, Hodgetts J, Jones EP, Ostoja-Starzewski JC, Hall J, Tomkies V, et al. The invasion, provenance and diversity of Vespa velutina Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae) in Great Britain. PLoS ONE. 2017;12:e0185172.
11. Liu Z, Chen S, Zhou Y, Xie C, Zhu B, Zhu H, et al. Deciphering the venomic transcriptome of killer-wasp Vespa velutina. Sci Rep. 2015;5:9454.
12. Xie C, Xu S, Ding F, Xie M, Lv J, Yao J, et al. Clinical features of severe wasp sting patients with dominantly toxic reaction: analysis of 1091 cases. PLoS One. 2013;8:e83164.
13. Chugo S, Lizaso MT, Alvarez MJ, Arroabaren E, Lizarza S, Tabar AI. Vespa velutina nigritorax: a new causative agent in anaphylaxis. J Investig Allergol Clin Immunol. 2015;25:231-2.

© 2021 Esmon Publicidad

14. Brown SGA. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2004;114:371-6.
15. 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 Invest Allergol Clin Immunol. 2019;29:180-250.
16. 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 Invest Allergol Clin Immunol. 2018;28:193-4.
17. Monsalve RI, Gutiérrez R, Hoof I, Lombardero M. Purification and molecular characterization of phospholipase, antigen 5 and hyaluronidases from the venom of the Asian hornet (Vespa velutina). PLoS One. 2020;15(1):e0225672
18. 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;67:528-36.
19. Erwin EA, Custis NJ, Satinover SM, Perzanowski MS, Woodfolk JA, Crane J, et al. Quantitative measurement of IgE antibodies to purified allergens using streptavidin linked to a high-capacity solid phase. J Allergy Clin Immunol. 2005;115:1029-35.
20. Turbyville JC, Dunford JC, Nelson MR. Hymenoptera of Afghanistan and the central command area of operations: assessing the threat to deployed U.S. service members with insect venom hypersensitivity. Allergy Asthma Proc. 2013:34:179-84.
21. Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnosis. Curr Allergy Asthma Rep. 2015;15:26.
22. Antonicelli L, Bilo M, Napoli G, Farabollini B, Bonifazi F. European hornet (Vespa crabro) sting: a new risk factor for life-threatening reaction in hymenoptera allergic patients? Allerg Immunol (Paris). 2003;35:199-203.
23. Goldberg A, Shefler I, Panasoff J, Paitan Y, Confino-Cohen R. Immunotherapy with commercial venoms is efficacious for anaphylactic reactions to Vespa orientalis stings. Int Arch Allergy Immunol. 2013;161:174-80.
24. Turner PJ, Gowland MH, Sharma V, Lerodiakonou D, Harper N, Garcez T, et al. Increase in anaphylaxis-related hospitalizations but no increase in fatalities: an analysis of United Kingdom national anaphylaxis data. 1992-2012. J Allergy Clin Immunol. 2015;135:956-63.
25. 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;184:5403-13.
26. Košnik M, Korošec P, Šilar M, Mušiè E, Eren R. Wasp venom is appropriate for immunotherapy of patients with allergic reaction to the European hornet sting. Croat Med J. 2002;43:25-7.

Manuscript received September 6, 2019; accepted for publication December 16, 2019.

Carmen Vidal

Allergy Department
Complejo Hospitalario Universitario de Santiago
Faculty of Medicine, University of Santiago
Rúa Ramón Baltar, s/n
15706 Santiago de Compostela, Spain
E-mail: carmen.vidal.pan@sergas.es

© 2021 Esmon Publicidad

Colegio Mexicano de Inmunología Clínica y Alergia, A. C. CMICA
Revista Alergia México raM

Basophil activation test to follow-up of patients treated with hymenoptera venom immunotherapy: a review of current evidence

Prueba de activación de basófilos en el seguimiento de pacientes que reciben inmunoterapia con veneno de himenópteros: revisión de la evidencia actual

Virginia Rodríguez-Vázquez,[1] Sara López-Freire,[1] Paula Méndez-Brea,[1] María Teresa González-Fernández,[1] Cristian Hernández-Pérez,[2] Carmen Vidal,[1,2]

Abstract

Hymenoptera venom immunotherapy (HVI) is a long-term effective treatment to avoid new systemic reactions in patients with Hymenoptera allergy. The sting challenge test is considered the gold standard to confirm the tolerance. However, the use of this technique is not generalized in clinical practice, being the basophil activation test (BAT), which functionally explores allergen response, an alternative that does not entail any of the provocation risks associated with the sting challenge test. This study reviews the publications that used the BAT to follow up and evaluate the success of the HVI. Studies assessing the changes between a baseline BAT before the start and BATs performed between the starting and maintenance phases of the HVI were selected. Ten articles were found, comprising information from 167 patients, of which 29% used the sting challenge test. The studies concluded the importance of evaluating the responses with submaximal allergen concentrations, which reflect basophil sensitivity, to monitor the HVI using the BAT. It was also observed that changes in the maximum response (reactivity) could not reflect the clinical status of tolerance, particularly in the initial phases of HVI.

Key words: Hymenoptera venom; Immunotherapy; Basophil activation test; Immune tolerance

Resumen

La inmunoterapia con veneno de himenópteros (IVH) es, a largo plazo, un tratamiento eficaz para evitar nuevas reacciones sistémicas en pacientes con alergia a este tipo de insectos. La prueba de repicadura controlada es el estudio de referencia para confirmar la tolerancia del individuo. Sin embargo, no se ha generalizado su indicación clínica, por lo que la prueba de activación de basófilos (TAB) resulta una buena alternativa, pues valora de manera funcional la respuesta al alérgeno y está exenta de los riesgos asociados con la provocación. En esta revisión se explora la utilidad de la TAB en el seguimiento y valoración del éxito de la IVH. Se seleccionaron estudios que evalúan los cambios entre una TAB basal y en otro momento de la fase de inicio o mantenimiento de la IVH. Se incluyeron 10 estudios con datos de 167 pacientes, de los que el 29% había tenido prueba de repicadura controlada. Para vigilar la eficacia de la IVH debe explorarse la respuesta del basófilo, con la determinación de las concentraciones submáximas del alérgeno, que reflejan la sensibilidad del basófilo. Los cambios en la respuesta máxima (reactividad) no pueden aportar información del estado de tolerancia, especialmente en las fases iniciales de la IVH.

Palabras clave: Veneno de himenópteros; Inmunoterapia; Prueba de activación de basófilos; Tolerancia inmunológica

[1] Servicio de Alergología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, España.
[2] Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Correspondencia:
Virginia Rodríguez Vázquez
virginia.rodriguez.vazquez@sergas.es

Recibido: 13-06-2022
Aceptado: 24-09-2022
DOI: 10.29262/ram.v69i2.1135

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CC BY NC

Introducción

Se estima que entre 0.3 y 7.5% de la población adulta, incluso el 3.4% de la infantil, ha padecido alguna reacción sistémica después de la picadura de un himenóptero, debido a la alergia a su veneno.[1] La mortalidad asociada varía del 0.03 al 0.48 por cada millón de habitantes al año.[1] La inmunoterapia con veneno de himenópteros (IVH) es el tratamiento de elección para evitar nuevas reacciones sistémicas, moderadas-graves, luego del contacto con el insecto.[2,3] Entre el 75 y 85% de los pacientes con alergia al veneno de las abejas (*Apis mellifera*) y entre el 90 y 95% de los alérgicos al veneno de los véspidos (*Vespula spp* o *Polistes spp*) consiguen protección después de realizar un ciclo de tratamiento, cuya duración recomendada varía de 3 a 5 años.[4,5] Se consideran factores de buen pronóstico para la suspensión de la inmunoterapia con veneno de himenópteros: pérdida de sensibilización, evidenciada de resultado negativo en la determinación de IgE específica, ausencia de reacciones sistémicas durante la administración de las dosis de la vacuna, y buena tolerancia a las picaduras espontáneas o controladas en el medio hospitalario (denominada prueba de repicadura).[6] La prueba de repicadura controlada, si bien no es recomendable realizarla con fines diagnósticos en pacientes sin tratamiento debido al riesgo alto de anafilaxia,[7] se considera el estudio de referencia para el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros.[3,7] Aun así, no posee una especificidad del 100%, y su indicación en la práctica clínica no se ha generalizado, principalmente por motivos éticos y debido a su complejidad técnica y de accesibilidad al insecto. La determinación de IgE específica al veneno de himenópteros es una prueba comúnmente empleada en la práctica clínica para detectar la sensibilización a himenópteros. Sin embargo, la evolución de los valores de IgE específica después la inmunoterapia no se correlaciona con el estado de tolerancia, pues el 50% de los casos no llega a negativizarse, aun cuando el paciente es capaz de tolerar la exposición.[8] En este contexto, se han buscado métodos alternativos que estén exentos de riesgo y permitan predecir el éxito del tratamiento, y de esta forma diferenciar a los pacientes tolerantes de los que requieren tratamiento más prolongado o con mayores concentraciones. Entre las técnicas *in vitro* propuestas se encuentra la prueba de activación de basófilos (TAB), que valora de manera funcional la respuesta de activación del basófilo luego de la exposición con el alérgeno, lo que se considera una provocación *ex vivo*.[9]

La prueba de activación de basófilos cuantifica los cambios en la expresión de los marcadores de activación del basófilo después de la estimulación específica con el alérgeno. En la mayor parte de los protocolos se mide el marcador CD63, situado en la membrana de los gránulos intracitoplasmáticos en reposo y solo es accesible a su detección en la superficie celular después de la activación por la unión con la membrana celular. El CD63 no es un marcador exclusivo de basófilos, por lo que en esta prueba se utilizan otros marcadores específicos de reconocimiento de basófilos para diferenciarlos de otras células sanguíneas.[10] La respuesta de activación del basófilo es heterogénea, varía entre los individuos dependiendo del alérgeno empleado. Entre las ventajas de la prueba de activación de basófilos destaca su alta especificidad de respuesta al alérgeno, y el hecho de haberse utilizado frente a inhalantes, alimentos, venenos de himenópteros, látex o medicamentos.[9] Como prueba diagnóstica es especialmente útil en pacientes con discordancia entre las manifestaciones clínicas y resultados ambiguos de otras técnicas, cuando no existe una fuente alergénica adecuada para efectuar pruebas cutáneas o de provocación, o en situaciones en las que una nueva exposición pueda suponer un riesgo.[9] Sin embargo, es una prueba de compleja facturación, que requiere medios técnicos específicos, como la disponibilidad de un citómetro de flujo, que no siempre se encuentra al alcance de todos los centros asistenciales.

Por último, y aun disponiendo de un citómetro, la prueba de activación de basófilos es un estudio de difícil interpretación. Sus resultados se expresan, principalmente, en dos medidas de actividad del basófilo: *1)* reactividad y *2)* sensibilidad.[9] La reactividad se refiere a la cantidad de basófilos que responden (CD63+) al estímulo del alérgeno, correspondiendo a la máxima respuesta alcanzada después de llegar a un *plateau*, en una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones. La principal utilidad de la medida de reactividad del basófilo es el diagnóstico de la patología alérgica, que alcanza una sensibilidad del 85-100% y especificidad del 83-100% para el veneno de himenópteros, cuando se utiliza CD63 como marcador de activación.[11,12,13] En pacientes con anamnesis de reacciones sistémicas después de la picadura de algún himenóptero, en quienes el resultado de IgE específica es negativo, la prueba de activación de basófilos ofrece como ventaja diagnóstica una mayor sensibilidad, que no se afecta por el tiempo transcurrido entre la reacción y la prueba,[14] especialmente en pacientes con valores bajos de IgE total.[15] También supone un método preciso y seguro para el diagnóstico de alergia a himenópteros en pacientes con mastocitosis.[15] Además, es especialmente útil para identificar el himenóptero responsable en caso de doble sensibilización y falta de reconocimiento por parte del paciente, evitando así una doble inmunoterapia.[16,17]

La sensibilidad, por su parte, hace referencia al umbral de concentración del alérgeno que produce una respuesta positiva. Puede expresarse de diferentes maneras: *1)* EC50, que corresponde a la concentración que produce una respuesta en el 50% de los basófilos reactivos en una curva dosis-respuesta, *2)* CD-sens, índice que resulta de la inversión del EC50 y al multiplicar por 100, o *3)* LC50, que equivale al log10 de la concentración que produce un 50% de la activación de los basófilos. Otra aproximación a la sensibilidad es la ratio 0.1/1, medida que se ha relacionado con la aparición de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

efectos secundarios en la fase de incremento de la dosis de inmunoterapia con veneno de himenópteros.[18,19] Así entendida, la sensibilidad es más útil que la reactividad para vigilar el efecto de la inmunoterapia, pues es capaz de detectar cambios en el umbral de respuestas, de modo que un descenso en la sensibilidad del basófilo se relaciona con tolerancia a largo plazo luego de finalizar la inmunoterapia con veneno de himenópteros.[20]

No existe consenso de indicación de la prueba de activación de basófilos como biomarcador en la vigilancia de la respuesta a la inmunoterapia con veneno de himenópteros, ni en la valoración del éxito del tratamiento. La escasez de estudios y la cantidad reducida de pacientes, además de la heterogénea interpretación de los resultados realizada por los autores, añaden complejidad sobre la utilidad real del método en la práctica clínica.

El objetivo del presente estudio fue revisar las publicaciones que utilizan la prueba de activación de basófilos para vigilar la eficacia de la inmunoterapia con veneno de himenópteros, con la finalidad de extraer conclusiones relacionadas para su indicación.

Métodos

Se realizó una revisión de la literatura mediante la búsqueda electrónica en las bases de datos y metabuscadores Medline, Cochrane y clinicaltrials.gov, con límite temporal desde 1990, año en que se desarrolló la técnica, hasta el 8 de enero de 2021. Las palabras clave fueron: "*basophil activation test*" *OR "basophil reactivity" AND "hymenoptera venom immunotherapy*". No se limitó la búsqueda por veneno de himenóptero específico, para evitar la exclusión de artículos en los que se hubiesen empleado varios venenos de diferentes especies que no fueran claramente especificadas en el título, resumen o palabras clave. Tampoco se limitó la búsqueda por tipo de artículo ni idioma, pero se descartaron los que no estuviesen en idioma inglés o español. Se investigaron las referencias adicionales en los propios artículos de la búsqueda. Se examinaron todos los artículos seleccionados por título y resumen, y se evaluaron de forma minuciosa los estudios que incluyeron datos de la prueba de activación de basófilos, con independencia del momento en que se había realizado la técnica y la duración de la inmunoterapia.[21-51] Se excluyeron del análisis final los artículos que no incluyeron datos relacionados con el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. El diagrama de flujo de la búsqueda se representa en la **Figura 1**. De los artículos se analizaron: *a)* cantidad de pacientes incluidos en el estudio y edad (expresada en media, rango, o mediana, según se detalle en los estudios); *b)* punto de corte seleccionado para definir un resultado positivo en la prueba de activación de basófilos; *c)* dosis y alérgeno (veneno de *Apis mellifera, Vespula spp*, *Polistes spp*) utilizado en la prueba de activación de basófilos; *d)* tiempo de vigilancia de la inmunoterapia respecto al basal (antes de iniciar el tratamiento); *e)* desenlaces clínicos obtenidos; *f)* ejecución o no de la prueba de repicadura; y *g)* tolerancia a picaduras espontáneas (estudios que proporcionaron este dato).

Resultados

Se incluyeron 10 estudios[52-61] con datos de 182 pacientes que tuvieron reacciones sistémicas por alergia a la picadura de este tipo de himenópteros y recibieron inmunoterapia con veneno de este tipo de insectos. Para el análisis se consideraron sólo los pacientes que realizaron todo el seguimiento planteado en el estudio, y que contaran con los resultados de la prueba de activación de basófilos basal (TAB), previo al inicio de la inmunoterapia, positivo al veneno y al menos otra TAB en diferentes momentos de la fase de inicio o mantenimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Esta selección dio un total de 167 pacientes, de los que 137 fueron adultos y 30 menores de 18 años al iniciar los estudios. Respecto al himenóptero responsable de la reacción sistémica, 46 pacientes fueron alérgicos a *Apis mellifera* y 121 a véspidos: 102 a *Vespula spp*, 15 a *Polistes spp (Polistes dominulus),* 3 *a Vespa crabro*[52] y 1 paciente tenía doble sensibilización a *Vespula spp* y *Polistes spp.*[53] En la muestra se incluyeron 11 pacientes con mastocitosis sistémica que procedían de un único estudio.[54] Los datos demográficos de los pacientes se muestran en el **Cuadro 1**.

En todos los estudios se cuantificó CD63 por citometría de flujo, mientras que en 2 trabajos[54,55] se utilizó CD203c como marcador de activación complementario. No se analizó el método para la técnica de activación ni selección de la población de basófilos, pero los estudios revisados debieron disponer de datos de activación espontánea (control negativo) y de control positivo (con anti-IgE, anti receptor de alta afinidad de IgE [FcεRI], o N-formilmetionil-leucil-fenilalanina [fMLP]). Para la activación con el alérgeno se emplearon al menos dos concentraciones del veneno implicado, seleccionadas después de efectuar la curva dosis-respuesta. En varios estudios[54,56,59] se especificó que la prueba de activación de basófilos se llevó a cabo antes de la administración de la dosis de inmunoterapia con veneno de himenópteros, para evitar el efecto de desgranulación de los basófilos luego de aplicar la inyección por vía subcutánea del alérgeno.

El umbral de reactividad, o positividad, establecido por la mayoría de los autores fue >15% de células CD63+, salvo en el trabajo de Chichocka y colaboradores[56] que reportaron 10%, y en tres de ellos no se especificó el umbral de positividad.[54,55,57] El umbral de sensibilidad se expresó con LC50 en dos estudios.[54,55] Los ensayos emprendidos por Zitnik y su grupo[59] sugieren que la sensibilidad del basófilo, expresada en ratio 0.1/1, es útil para predecir los efectos secundarios durante la fase de incremento de la dosis de inmunoterapia con veneno de himenópteros. Sin embargo, en otros estudios no se confirma la utilidad de ratio para esta finalidad.[55]

En dos estudios[60,61] efectuaron la prueba de repicadura

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Resumen de los estudios de la revisión: características de la muestra, variables analizadas y resultados

Autor	n	Edad	Concentraciones	Tipo de veneno o	Umbral (positividad)	Tiempo de monitorización	Resultados	Repicadura
Cichocka-Jarosz E[56]	4 /5	9.5-18* 14.4**	1.15 pg/mL – 11.5 pg/mL 0.115 ng/mL – 1.15 ng/mL 11.5 ng/mL (0.0115 ug/mL)	*Apis mellifera*	10%	Basal (T0) – 15 días (T1) – 40 días (T2)	Sin cambios a la máxima concentración. Permanece positivo T1 y T2 **(R)**	No
Zitnik S[59]	26/31	4-18* 10.7**	0.1 µg/mL – 1 µg/mL	*Apis mellifera*	15%	Basal (T0) – 5 días (T1) – 6 meses (T2) – 2/4 años (T3)	Sin cambios T1 con 0.1 y 1 µg/mL. Disminución significativa T2 y T3 a 0.1 µg/mL **(S)**	No
Eržen R[60]	12 (a) 11 (b)	25-68* 46**	0.1 µg/mL 1 µg/mL	*Apis mellifera* *Vespula spp*	15%	Basal (T0) – 1 año (T1) – Fin de la ITE (T2) – Tras repicadura (T3)	Sin cambios en T1. T2 y T3 descenso respuesta X4 con 0.1 µg/mL **(S)** en tolerantes a repicadura. Sin cambios a 1 µg/mL	Sí
Rodríguez A[58]	2 (a) 3 (b) 5 (c)	14-76*	25 ng/mL - 100 ng/mL 500 ng/mL - 1 µg/mL	*Apis mellifera* *Vespula germanica* *Polistes dominula*	15%	Basal (T0) – 1 mes (T1) – 3 meses (T2) – 6 meses (T3) –12 meses (T4) – 18 meses (T5) – 24 meses (T6) – 60 meses (T7)	Descenso significativo T2 a 100 ng/mL **(S)** No mantenido entre T3-T5 y descenso T6 y T7	No
Sainte-Laudy J[52]	2 (a) 10 (b) 3 (d)	20-76*	9 ng/mL- 28 ng/mL 83 ng/mL - 0.25 µg/mL	*Apis mellifera* *Vespula spp* *Vespa spp*	15%	Basal (T0) – 21 semanas (T1) – 3-5 años (T2)	Descenso en reactividad T2 expresado como AUC‡ (S)	Sí
Urra JM[53]	2 (b) 10 (c) 1 (e) /14	47.2** ± 16.2 (DS)	0.1 µg/mL 1 µg/mL	*Vespula spp* *Polistes dominula* *Vespula / Polistes spp*	15%	Basal (T0) – 6 meses (T1)	Descenso significativo T1 en las dos concentraciones **(R)**	No
Erdmann SM[61]	25	18-58* 44**	0.1 µg/mL 1 µg/mL	*Vespula spp*	15%	Basal (T0) – 6 meses (T1)	No cambios en T1 con 0.1 µg/mL **(R)** Positivo en 23/25 Todos Repicadura negativa	Sí
Ebo DG[57]	22	17-73* 46.5**	0.01 µg/mL – 0.1 µg/mL 1 µg/mL 10 µg/mL	*Vespula spp*	No especifica	Basal (T0) – 5 días (T1) – 6 meses (T2)	Descenso significativo en T2 con la concentración 0.01 µg/mL **(S).** Sin cambios T1	No

Milkensen S[55]	18/ 20	54 (44-61) ***	10 pg/mL – 1 pg/mL – 0.01 µg/mL 0.1 µg/mL – 1 µg/mL – 10 µg/mL	*Vespula spp*	No especifica	Basal (T0) – 1 semana (T1) – 2 semanas (T2) – 3 semanas (T3) – 4 semanas (T4) - 7 semanas (T5) – 11 semanas (T6)	Aumenta LC50 en T3 respecto a T0 **(S)**	No
Bidad K[54]	11/17	39-67* 56 **	0.5 ng/ mL 5 ng / mL – 50 ng/mL – 500 ng/mL – 5 µg/mL	*Vespula spp*	No especifica	Basal (T0) – 6 semanas (T1) – 1 año (T2)	Descenso significativo en T1 a dosis submáximas. $LC50_1$ incrementa en T1. Sin diferencia significativa en T2	No

IVH: inmunoterapia con veneno de himenópteros; TAB: prueba de activación de basófilos; n: cantidad de pacientes con TAB positivo en T0 y que completaron el periodo seguimiento del estudio / población inicial de estudio, en el caso de que no coincidan.

En las referencias con diferentes himenópteros se identifican como:

(a) Cantidad de pacientes con IVH *Apis mellifera*
(b) Cantidad de pacientes con IVH *Vespula spp/ Vespula germanica*
(c) Cantidad de pacientes IVH *Polistes spp/ Polistes dominula*
(d) Cantidad de pacientes IVH *Vespa spp*
(e) Cantidad de pacientes con IVH *Vespula y Polistes spp*
Edad representada como * rango * *Edad media - desviación standard (DS) *** mediana - rango intercuartil (RIQ).
Tiempo monitorización T0: TAB realizada antes de iniciar la IVH; T1, T2, T3...: TABs realizadas durante la IVH. El momento de la realización se detalla en la tabla, en días, semanas, meses o años, según se refiere en los estudios.
R: reactividad; **S**: sensibilidad
$_1$ LC50 log10 de la concentración que produce un 50% de la activación de los basófilos
$_1$ AUC área bajo la curva

controlada en 48 pacientes, con resultado positivo en 1 caso. En tres investigaciones[57,58,59] reportaron concurrencia de picaduras espontáneas durante la inmunoterapia con veneno de himenópteros y todas fueron bien toleradas.

Los principales resultados de los 10 estudios revisados se enlistan en el **Cuadro 1**. A continuación se realiza el análisis específico para valorar las siguientes variables: *1)* concentración del veneno empleada, *2)* periodo de inmunoterapia con veneno de himenópteros en que se efectuó el estudio, *3)* edad de la población estudiada y *4)* prueba de repicadura.

Concentración de veneno de himenóptero empleada en la prueba de activación de basófilos

La mayor parte de los estudios reportó la curva dosis-respuesta frente a diferentes concentraciones del alérgeno hasta alcanzar el *plateau* de respuesta máxima, lo que permitió la validación de la técnica para los ensayos posteriores. En la fase de estudio longitudinal se utilizaron, al menos, dos concentraciones, incluida la respuesta máxima. Sin embargo, se ha observado que la concentración óptima del alérgeno depende del uso que se quiera proporcionar a la técnica y cuando se emplea la prueba de activación de basófilos como diagnóstico, la concentración utilizada debe ser capaz de discriminar entre pacientes y controles. De acuerdo con estos hallazgos, Ebo y sus colaboradores[57] encontraron que la concentración de 10 µg/mL de veneno muestra una sensibilidad del 83.8% y especificidad del 100%. En otros estudios, la concentración de himenóptero fue inferior, concretamente 1 µg/mL,[57,61] 0.1 µg/mL[55,53] y 0.5 µg/mL.[54] Con base en estos resultados, la selección de la concentración es un factor importante, pues con concentraciones altas la prueba de activación de basófilos es incapaz de marcar diferencias en distintos momentos de la evolución de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Por el contrario, el empleo de concentraciones submáximas: 0.1 µg/mL,[58,59,60] 0.05 µg/mL [54] y 0.01 µg/mL [57] puede discernir entre el estado basal y la situación después de trascurrido un tiempo de inmunoterapia. En conclusión, estas concentraciones (reflejo de la sensibilidad del basófilo) son las más apropiadas para vigilar los cambios en la respuesta del basófilo después de la inmunoterapia con veneno de himenópteros.

Momento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros en que se realiza la prueba de activación de basófilos

En la fase inicial de la inmunoterapia con veneno de himenópteros es imposible detectar cambios significativos y permanentes en las respuestas de activación alérgeno-específica del basófilo. El empleo de pautas rápidas de inicio, como en los estudios de Chichocka y su grupo,[56] y Ebo y colaboradores,[57] en donde se aplicó un protocolo *rush* que alcanzó la dosis de mantenimiento en 5 días, no permitió detectar la modificación de la respuesta al comparar la situación basal

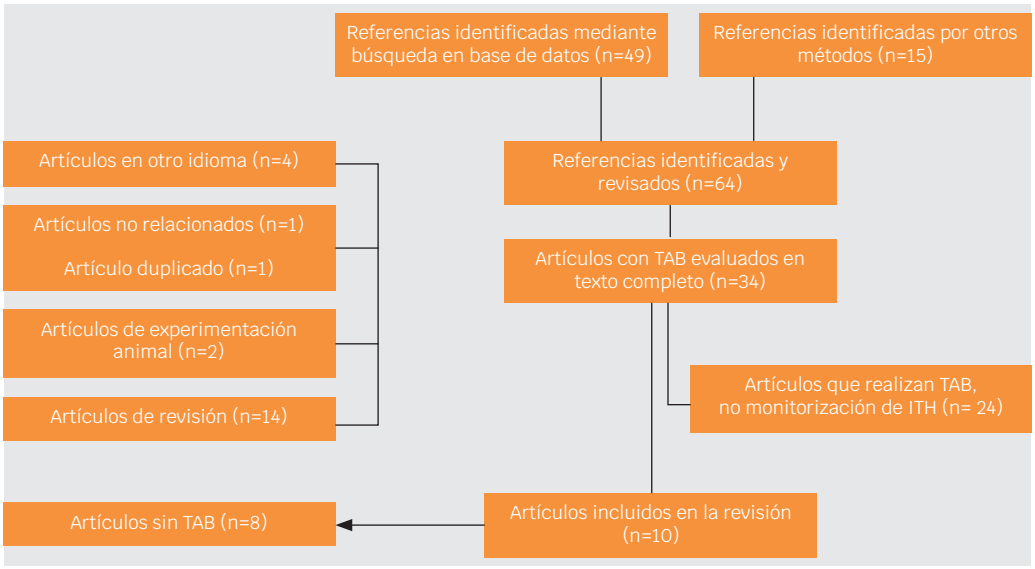


Figura 1. Diagrama de flujo de la búsqueda y selección de artículos de la revisión

con el momento en que se alcanza la dosis de mantenimiento. Estos autores comprobaron que, incluso, luego de aplicar una dosis adicional de mantenimiento, la respuesta del basófilo permanecía inalterada.[56] Por su parte, el ensayo de Mikkelsen y cols.[55] valoró la sensibilidad del basófilo expresada con LC50 después de emplear pautas lentas de incremento de la dosis de inmunoterapia con *Vespula spp*, es decir, un protocolo de 7 (11 dosis) o 16 semanas (1 dosis/semana). Los autores observaron un aumento transitorio en la sensibilidad del basófilo en la tercera dosis, para volver a los valores basales en las sucesivas dosis y que se mantuvieron hasta la primera dosis de mantenimiento de la inmunoterapia.

Los principales cambios en la activación de los basófilos de las poblaciones analizadas se concentraron en la fase de mantenimiento y, especialmente, en los últimos años de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Para Rodriguez-Trabado y su grupo,[58] la primera determinación, luego de 3 meses de iniciar la inmunoterapia con veneno de himenópteros, es capaz de detectar un descenso significativo en la activación de los basófilos (después de una pauta de incremento semanal en 6 semanas y primeras dosis de mantenimiento). Sin embargo, a los 6 y 18 meses los resultados indican mayor activación, que disminuye de forma definitiva a los 2 años de tratamiento y se mantiene constante hasta el final. Al analizar la respuesta frente a las diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1 µg/mL), se observó que la negativización de la prueba de activación de basófilos al comienzo de la inmunoterapia con veneno de himenópteros era más evidente a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones la negativización se obtuvo principalmente al final de la inmunoterapia. Por tanto, para detectar los cambios en la activación del basófilo inducida por la inmunoterapia es de particular interés de respuesta a las concentraciones submáximas, especialmente en las primeras fases del tratamiento. En este contexto, Ebo y sus colaboradores[57] evaluaron la expresión de CD63 a diferentes concentraciones antes de iniciar la inmunoterapia con veneno de *Vespula* y a los 6 meses de mantenimiento, y encontraron significación estadística solo entre la respuesta basal y a los 6 meses con la concentración submáxima (0.01 µg/mL), lo que representa un descenso de 10 veces en la sensibilidad de las células. Zitnik y su equipo de trabajo[59] reportaron resultados similares en la población infantil, con un descenso de 4 veces a concentración submáxima (0.1 µg/mL), que apareció desde los 6 meses y se mantuvo a largo plazo en más del 80% de los pacientes, mientras que con la concentración máxima de 1 µg/mL el descenso que apareció a los 6 meses regresó a los valores basales en la determinación final. La falta de valoración de la activación de basófilos a las concentraciones submáximas explica por qué en el estudio de Erdmann y cols[61] no se encontró supresión de la activación de basófilos a los 6 meses de tratamiento con *Vespula*, pues utilizó una concentración de 0.1 µg/mL, que producía una respuesta máxima de activación, según los datos aportados. Sin embargo, Urra y su grupo[53] constataron un descenso significativo en la activación a concentraciones máximas (1 µg/mL) en 12 de los 14 pacientes evaluados a los 6 meses de comenzar la inmunoterapia con veneno de himenópteros.

Todos los estudios que valoraron la respuesta del basófilo al final de la inmunoterapia con veneno de himenópteros[52,58,59,60] informaron cambios significativos respecto al basal en la prueba de activación de basófilos. En el trabajo de Erzen y sus colaboradores,[60] el porcentaje de basófilos CD63+ fue del 80% antes de comenzar la inmunoterapia, con una concentración de veneno de 1 µg/mL, y del 41% con una concentración de 0.1 µg/mL. Al final de la inmunotera-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pia con veneno de himenópteros la activación de basófilos disminuyó 4 veces con la concentración submáxima y estos cambios se mantuvieron, incluso, después de la suspensión y posterior prueba de repicadura controlada, que fue tolerada indicando, por tanto, una protección permanente. En esta misma línea, los resultados de Zitnik y su grupo[59] señalan un descenso de 4 veces en la activación desde los 6 meses que se mantuvo hasta el final del tratamiento.

Edad de la población de estudio

Esta revisión incluye dos artículos[56,59] que emplearon la prueba de activación de basófilos en el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros en la población infantil, con 30 pacientes que representaron el 18% del total de la muestra revisada. En ambos ensayos, los pacientes eran alérgicos al veneno de *Apis mellifera*. Cabe remarcar que no se encontraron cambios sustanciales en los resultados respecto a los encontrados en la población adulta. En el estudio de Chichocka y colaboradores[56] se realizó la prueba de activación de basófilos en una etapa inicial de la inmunoterapia con veneno de himenópteros y se observó que la TAB permanecía positiva durante todo el periodo. En el estudio de Zitnik y sus colaboradores,[59] llevado a cabo con 26 niños, se encontró un descenso significativo y mantenido en la sensibilidad del basófilo desde los 6 meses del inicio de la inmunoterapia con *Apis mellifera* y a largo plazo tras finalizar la inmunoterapia. Este descenso a concentraciones submáximas se observó en el 80% de los niños que participaron en el estudio, mientras que con concentraciones máximas el descenso fue transitorio a los 6 meses para volver a valores basales. Como se había descrito previamente,[18] la mayor sensibilidad del basófilo, medida en ratio 0.1/1, previo al inicio de la inmunoterapia, fue predictor de los efectos secundarios durante la fase de incremento de la dosis.[59]

En este grupo de edad solo efectuaron repicaduras espontáneas en el 45% de los pacientes del estudio de Zitnik y cols,[59] que fueron bien toleradas.

Prueba de activación de basófilos para predecir el éxito del tratamiento comparado con la prueba de repicadura

En un estudio prospectivo de 25 pacientes que recibieron inmunoterapia con veneno de *Vespula,* se practicó la repicadura controlada a los 6 meses de iniciar la inmunoterapia.[61] Puesto que solo el 8% de los pacientes tuvo resultados negativos con la prueba de activación de basófilos, a pesar de tolerar la exposición en la prueba de repicadura, los autores concluyen que la TAB no permite identificar a los pacientes tolerantes en ese momento de la inmunoterapia. Sin embargo, debe considerarse que la concentración que emplearon en el estudio (0.1 µg/mL) producía una respuesta de activación máxima en la TAB basal, por lo que no era idónea para valorar los cambios en la sensibilidad del basófilo.

En el estudio de Erzen y sus colaboradores[60] se valoró la relación entre los cambios en la prueba de activación de basófilos con la prueba de repicadura realizada al final de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Los autores observaron un descenso significativo en la respuesta del basófilo con una concentración submáxima (0.1 µg/mL), y no encontraron cambios con la concentración de 1 µg/mL. Más del 95% de la población estudiada toleró la prueba de repicadura, por lo que los autores concluyen que a una concentración submáxima, la prueba de activación de basófilos supone un buen predictor del éxito del tratamiento, y que la supresión de la respuesta específica del basófilo es permanente después de suspender la inmunoterapia con veneno de himenópteros.

El resto de los estudios no informa la prueba de repicadura, pero tres de ellos recogieron datos de las picaduras espontáneas,[57,58,59] y no produjeron reacciones sistémicas. No se dispone de información acerca de la relación entre los pacientes tolerantes a picaduras espontáneas y el resultado de la prueba de activación de basófilos.

La inmunoterapia con veneno de himenópteros modifica la respuesta inmunológica específica frente al alérgeno, y estimula el cambio de una respuesta alérgica a otra de tolerancia a largo plazo, que se consigue de 3 a 5 años de iniciar la inmunoterapia.[5] En la adquisición de este estado de tolerancia participan diferentes mecanismos celulares y humorales, incluida la desensibilización de células efectoras, modulación de la respuesta T y B con el cambio de isotipos, y aparición de células T reguladoras específicas. Estas células son secretoras de IL-10 y suprimen la respuesta proinflamatoria Th2, con reducción de la secreción de citocinas IL-3, IL-4, IL-5, e IL-13, así como de la migración y activación de las células efectoras, eosinófilos, mastocitos y basófilos, entre otras.[62,63]

Por lo que se refiere al efecto de la inmunoterapia en los basófilos, ésta produce una disminución de su activación.[63] En la etapa más temprana (fase de incremento de la dosis) se observa la desensibilización de mastocitos y basófilos, que no es específica del alérgeno,[64] y afecta su estado de activación y la capacidad de liberación de mediadores,[65] además de ser decisiva para evitar eventos de anafilaxia.[66,67] Este efecto protector se explica por la rápida regulación del receptor de Histamina 2 (H2R),[68] así como la expresión del receptor de alta afinidad de IgE FcεRI.[64] En esta misma línea, y en concreto con la inmunoterapia con veneno de *Vespula*, Nullens y sus colaboradores[69] midieron simultáneamente el contenido y la liberación de histamina, y la expresión de marcadores de activación de basófilos. Comprobaron que, previo al inicio de la inmunoterapia con veneno de himenópteros, los pacientes alérgicos a este veneno tenían mayor concentración de basófilos que quienes habían sido expuestos, pero no eran alérgicos. Además, sus basófilos contenían incluso 2.5 mayor cantidad de histamina que el grupo control.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se observó también que durante la fase de incremento de la dosis, con una pauta *semirush*, los basófilos circulantes disminuían considerablemente, pero mantenían su contenido de histamina. Curiosamente, luego de 6 meses de mantenimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros, si bien la concentración de basófilos circulantes recuperaba su valor basal, se evidenciaba una disminución significativa del contenido y de la liberación de histamina en respuesta al alérgeno.[69] Estos hallazgos coinciden con los resultados de Erdmann y su grupo,[61] quienes observaron que mientras la prueba de repicadura controlada, efectuada a los 6 meses de iniciar la inmunoterapia, fue bien tolerada, la mayoría de los pacientes mostraba positividad en la prueba de activación de basófilos, lo que parece reflejar que en esta fase se produce la señalización y fusión de los gránulos con la membrana externa, pero sin provocar la liberación de mediadores.

En resumen, el descenso de la activación de basófilos aparece entre los 18-24 meses de iniciar la inmunoterapia con veneno de himenópteros, principalmente a concentraciones submáximas, y se mantiene hasta completar el tratamiento,[52,58,59,60] incluso después de aplicar la repicadura.[60] Además, a medida que se avanza en la inmunoterapia con veneno de himenópteros, el número de TAB que está por debajo del umbral de positividad aumenta, siendo más evidente a las concentraciones submáximas al comienzo de la inmunoterapia, y en los últimos años con altas concentraciones.[58] Algunos estudios señalan que los pacientes que no toleraban la repicadura, después de un periodo prolongado de inmunoterapia, tenían valores más altos de basófilos CD63 por el estímulo específico que los no respondedores.[70,71] Otro estudio informó que la liberación de histamina fue mayor en pacientes que recibieron inmunoterapia con veneno de abeja, que reaccionaban con la prueba de repicadura realizada al finalizar la inmunoterapia, en comparación con los tolerantes.[72] Todos estos estudios apoyan la indicación de la prueba de activación de basófilos como biomarcador útil para vigilar la eficacia de la inmunoterapia con veneno de himenópteros[20] y sugiere que deben valorarse las concentraciones que produce una respuesta submáxima, puesto que los cambios en la respuesta máxima (reactividad) pueden no aportar información del estado clínico de tolerancia, especialmente en las fases iniciales del tratamiento.[73,74]

La inmunoterapia con veneno de himenópteros es el único tratamiento eficaz para evitar reacciones sistémicas en pacientes alérgicos al veneno de insectos;[75,76] sin embargo, no todos los sujetos alcanzan este efecto protector duradero.[2] En pacientes con alergia al veneno de himenópteros, la prueba de activación de basófilos puede emplearse como herramienta diagnóstica, debido a su alta sensibilidad y valor predictivo positivo similar o superior al de las pruebas cutáneas o la determinación de IgE específica,[70] incluso como alternativa para vigilar la eficacia de la inmunoterapia.[19]

Conclusiones

La selección de las concentraciones adecuadas para valorar la respuesta específica del basófilo debe efectuarse con base en la curva dosis-respuesta, que permita identificar la concentración máxima y submáxima, y conseguir la activación del 50% de los basófilos. La discriminación entre reactividad y sensibilidad es decisiva para utilizar la prueba de activación de basófilos en la vigilancia de la inmunoterapia con veneno de himenópteros. Los cambios en la sensibilidad del basófilo pueden observarse luego de un período prolongado de mantenimiento (entre 18-24 meses). La prueba de activación de basófilos puede implementarse durante el seguimiento de la inmunoterapia con veneno de himenópteros como marcador de eficacia del tratamiento, con resultados consistentes con los obtenidos en la prueba de repicadura. Es importante conocer los mecanismos de tolerancia inducida por la inmunoterapia y disponer de biomarcadores, y de esta forma vigilar la eficacia de la terapia y predecir el éxito del tratamiento.

Agradecimientos

Carla Granados (Trialance SCCL) prestó asistencia editorial, patrocinada por una beca de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEIAC) y financiada por Leti Pharma.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés respecto a este estudio.

Financiación

El estudio contó con la financiación por parte del Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad, PI19/01023 y la Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC).

Referencias

1. Biló MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. Clin Exp Allergy 2009;39:1467-1476 DOI: 10.1111/J.1365.2222.2009.03324. x.
2. Dhami S, Zaman H, Varga EM, *et al*. Allergen immunotherapy for insect venom allergy: a systematic review and meta-analysis. Allergy 2017;72:342-365. DOI: 10.1111/all.13077

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, *et al*. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. Allergy 2018;73:744-764. DOI: 10.1111/all.13262
4. Müller U, Helbling A, Berchtold E. Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. J Allergy Clin Immunol 1992;89:529-535. DOI: 10.1016/0091-6749(92)90319-w
5. Müller UR, Ring J. When can immunotherapy for insect sting allergy be stopped? J Allergy Clin Immunol Pract 2015;3:324-328. DOI: 10.1016/j.jaip.2014.11.018
6. Bilò MB, Pravettoni V, Bignardi D, *et al*. Hymenoptera venom allergy: management of children and adults in clinical practice. J Investig Allergol Clin Immunol 2019;29:180-205. DOI: 10.18176/jiaci.0310
7. Ruëff F, Przybilla B. Müller U, *et al*. The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on insect venom allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy 1996;51:216-225. DOI: 10.1111/j.1398-9995. 1996.tb04596. x.
8. Pravettoni V, Piantanida M, Primavesi L, *et al*. Determinants of venom - specific IgE antibody concentration during long-term wasp venom immunotherapy. Clin Mol Allergy 2015;13:29. DOI: 10.1186/s12948-015-0036-6.
9. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, *et al*. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. Allergy 2015;70:1393-1405. DOI: 10.1111/all.12698
10. Sabogal - Cuadro P, Zakzuk J. Prueba de activación de basófilos: aspectos técnicos, metodológicos y su utilidad clínica. Rev Fac Med 2018;66:447-57. DOI: 10.15446/revfacmed. v66n3.61820
11. Eberlein-König B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, *et al*. In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy. J Investig Allergol Clin Immunol 2006;16:5-11
12. Ebo DG, Sainte-Laudy CH, Bridts CH, *et al*. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. Allergy 2006;61:1028-1039. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006. 01039.x
13. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet, M *et al*. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4. Clin Exp Allergy 2000;30:1166-1171. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2000. 00863.x
14. Korošec P, Eržen R, Šilar M, *et al*. Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. Clin Exp Allergy 2009;39:1730-1737. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03347. x.
15. González-de-Olano D, Álvarez-Twose I, Morgado JM, *et al*. Evaluation of basophil activation in mastocytosis with Hymenoptera venom anaphylaxis. Cytometry B Clin Cytom 2011;80:167-75. DOI: 10.1002/cyto.b.20577
16. Eberlein-König B, Rakoski J, Behrendt H, *et al*. Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. J Investig Allergol Clin Immunol 2004;14:10-6
17. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, *et al*. 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;130:155-61. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.02.008
18. Košnik M, Šilar M, Bajrovic N, *et al*. High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. Allergy 2005;60:1401-1406. DOI:10.1111/j.1398-9995.2005.00894. x.
19. Korošec P, Žiberna M, Šilar M, *et al*. Immunological and clinical factors associated with adverse systemic reactions during the build-up phase of honeybee venom immunotherapy. Clin Exp Allergy 2015;45:1579-1589. DOI: 10.1111/cea.12582
20. Blank S, Grosch J, Ollert M, *et al*. Precision medicine in Hymenoptera venom allergy: diagnostics, biomarkers, and Therapy of different endotypes and phenotypes. Front Immunol 2020;11:579409. DOI: 10.3389/fimmu.2020.579409
21. Schiener M, Eberlein B, Moreno-Aguilar C, *et al*. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. Allergy 2017;72:98–108. DOI: 10.1111/all.13000
22. De Amici M, Barocci F, Caimmi S, *et al*. Clinical use of basophil activation test in drug, food and hymenoptera venom allergies. Minerva Pediatr 2019;71. DOI: 10.23736/S0026-4946.18.05144-7
23. Arzt L, Bokanovic D, Schrautzer C, *et al*. Immunological differences between insect venom-allergic patients with and without immunotherapy and asymptomatically sensitized subjects. Allergy 2018;73:1223–31. DOI: 10.1111/all.13368
24. Jakob T, Rafei-Shamsabadi D, Spillner E, *et al*. Diagnostics in hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. Allergo J Int 2017;26:93–105. DOI: 10.1007/s40629-017-0014-2
25. Nittner-Marszalska M, Cichocka-Jarosz E. Insect sting allergy in adults: key messages for clinicians. Pol Arch Med Wewn 2015;125:929–37. DOI: 10.20452/pamw.3216
26. Tankersley MS, Ledford DK. Stinging insect allergy: State of the Art 2015. J Allergy Clin Immunol Pract 2015;3:315–22. DOI: 10.1016/j.jaip.2015.03.012
27. Uyttebroek AP, Sabato V, Faber MA, *et al*. Basophil activation tests: time for a reconsideration. Expert Rev Clin Immunol 2014;10:1325–35. DOI: 10.1586/1744666X.2014.959498
28. Cabrera CM, Urra JM, Alfaya T, *et al*. Expression of Th1, Th2, lymphocyte trafficking and activation markers on CD4+ T-cells of Hymenoptera allergic subjects and after venom immunotherapy. Mol Immunol 2014;62:178–85. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.06.023
29. Antolín D, Moreno C, Vega A, *et al*. Venom immunotherapy: an updated review. Curr Allergy Asthma Rep 2014;14:449. DOI: 10.1007/s11882-014-0449-1
30. Ebo DG, van Vaerenbergh M, de Graaf DC, *et al*. *In vitro* diagnosis of hymenoptera venom allergy and further development of component resolved diagnostics. Expert Rev Clin Immunol 2014;10:375–84. DOI: 10.1586/1744666X.2014.881252
31. Korošec P, Šilar M, Eržen R, *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;161:363–8. DOI: 10.1159/000348500

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

32. Vinzón SE, Marino-Buslje C, Rivera E, *et al*. A naturally occurring hypoallergenic variant of vespid Antigen 5 from Polybia scutellaris venom as a candidate for allergen-specific immunotherapy. PLoS One 2012;7:e41351. DOI: 10.1371/journal.pone.0041351
33. Bonadonna P, Zanotti R, Melioli G, *et al*. The role of basophil activation test in special populations with mastocytosis and reactions to hymenoptera sting. Allergy 2012;67:962–5. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02849.x
34. Neis MM, Merk HF. Value of component-based diagnostics in IgE-mediated hymenoptera sting reactions. Cutan Ocul Toxicol 2012;31:117-23. DOI: 10.3109/15569527.2011.621080
35. Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, *et al*. Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. PLoS One 2011;6:e20842. DOI: 10.1371/journal.pone.0020842
36. Tracy JM, Lewis EJ, Demain JG. Insect anaphylaxis: addressing clinical challenges. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2011;11:332–6 DOI: 10.1097/ACI.0b013e32834877ab
37. Blank S, Seismann H, Michel Y, *et al*. Api m 10, a genuine A. mellifera venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. Allergy 2011;66:1322–9. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011. 02667.x
38. Demain JG, Minael AA, Tracy JM. Anaphylaxis and insect allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2010;10:318–22. DOI: 10.1097/ACI.0b013e32833a6c72
39. Verweij MM, De Knop KJ, Bridts CH, *et al*. P38 mitogen-activated protein kinase signal transduction in the diagnosis and follow up of immunotherapy of wasp venom. Cytometry B Clin Cytom 2010;78:302–7. DOI: 10.1002/cyto.b.20531
40. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, *et al*. Hymenoptera venom allergy: taking the sting out of difficult cases. J Investig Allergol Clin Immunol 2007;17:357–60.
41. Dubois AE, van der Heide S. Basophil-activation tests in Hymenoptera allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7:346–9. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3282638848
42. Machado DC, Horton D, Harrop R, *et al*. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen specific IgE. Eur J Immunol 1996;26:2972–80. DOI: 10.1002/eji.1830261224
43. Brown SG, Haas MA; Black JA, *et al*. In vitro testing to diagnose venom allergy and monitor immunotherapy: a placebo-controlled, crossover trial. Clin Exp Allergy 2004;34:792–800. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2004.01949.x
44. Korošec P, Šilar M, Kopač P *et al*. Distinct contributory factors determine basophil-allergen sensitivity in grass pollen rhinitis and in anaphylactic wasp venom allergy. Int Arch Allergy Immunol 2016;171:89-101. DOI: 10.1159/000452102
45. Bergmann-Hug K, Fricker M, Hausmann O, *et al*. Sensitization to Hymenoptera venom in pollen allergic patients: Frequency and involvement of cross-reacting carbohydrate. PLoS One 2020;15:e0238740. DOI: 10.1371/journal.pone.0238740
46. Ebo DG, Faber M, Sabato V, *et al*. Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy. Clin Exp Allergy 2012;43:255-261. DOI: 10.1111/cea.12057
47. Siegmund BA, Vogelsang H, Machnik A, *et al*. Surface membrane antigen alteration on blood basophils in patients with Hymenoptera venom allergy under immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 2000;106:1190–1195. DOI: 10.1067/mai.2000.110928
48. Alfaya T, Soriano V, Soto T, *et al*. Key issues in hymenoptera venom allergy: an update. J Investig Allergol Clin Immunol 2017;27:19-31. DOI: 10.18176/jiaci.0123
49. Čelesnik N, Vesel T, Rijavec M, *et al*. Short-term venom immunotherapy induces desensitization of FcεRI-mediated basophil response. Allergy 2012;67:1594–1600. DOI: 10.1111/all.12044
50. Kosnik M, Korošec P. Importance of basophil activation testing in insect venom allergy. Allergy Asthma Clin Immunol 2009;5:11. DOI: 10.1186/1710-1492-5-11
51. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, *et al*. The basophil activation test in the diagnosis and follow-up of hymenoptera venom allergy: an alternative point of view. J Investig Allergol Clin Immunol 2008;18:482–495. PMID: 19123451
52. Sainte-Laudy J, Touraine F, Cluzan D, *et al*. Follow-up of venom immunotherapy on Flow cytometry and definition of a protective index. Int Arch Allergy Immunol 2016;170:243–250. DOI: 10.1159/000449162
53. Urra JM, Cabrera CM, Alfaya T, *et al*. Agreement of skin test with IL-4 production and CD40L expression by cells upon immunotherapy of subjects with systemic reactions to Hymenoptera stings. Mol Immunol 2016;70:134–9. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.12.013
54. Bidad K, Nawijn MC, van Oosterhout AJ, *et al*. Basophil activation test in the diagnosis and monitoring of mastocytosis patients with wasp venom allergy on immunotherapy. Cytometry B Clin Cytom 2014;10:375–84. DOI: 10.1002/cytob.21148
55. Mikkelsen S, Bibby BM, Bogebjerg M, *et al*. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. Clinical and Molecular Allergy 2010;8:2. DOI: 10.1186/1476-7961-8-2
56. Chichocka-Jarosz E, Dorynska A, Pietrzyk JJ, *et al*. Laboratory markers of mast cell and basophil activation in monitoring rush immunotherapy in bee venom-allergic children. Immunotherapy 2011;3:1013–7. DOI: 10.2217/imt.11.91
57. Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, *et al*. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. Cytometry B Clin Cytom 2007;72:196–203. DOI: 10.1002/cyto.b.20142
58. Rodríguez A, Cámara C, Ramos A, *et al*. Short-, intermediate-, and long-term changes in basophil reactivity induced by venom immunotherapy. Allergy Asthma Immunol Res 2016;8:412–20. DOI: 10.4168/aair.2016.8.5.412
59. Žitnik SE, Vesel T, Avčin T, *et al*. Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. Pediatr Allergy Immunol 2012;23:166–72. DOI: 0.1111/j.1399-3038.2011. 01233.x
60. Eržen R, Košnik M, Šilar M, *et al*. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. Allergy 2012;67:962–5. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02817.x
61. Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, *et al*. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring speci-

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

fic immunotherapy. Allergy 2004;59:1102-1110. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2004. 00624.x
62. Schiener M, Graessel A, Ollert M, *et al*. Allergen-specific immunotherapy of Hymenoptera venom allergy - also a matter of diagnosis. Hum Vaccin Immunother 2017;13:2467-2481. DOI: 10.1080/21645515.2017.1334745
63. Akdis C, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. World Allergy Organ J 2015;8:17. DOI: 10.1186/s40413-015-0063-2
64. Čelesnik N, Šilar M, Eržen R, *et al*. Down-regulation of FcεRI-mediated CD63 basophil response during short-term VIT determined venom-nonspecific desensitization. PLoS One 2014;14:e94762. DOI: 10.1371/journal.pone.0094762.
65. 65. Plewako H, Wosinska K, Arvidsson M, *et al*. Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol 2006;141:346–53. DOI: 10.1159/000095461
66. Patil SU, Shreffler WG. Immunology in the clinic review series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. Clin Exp Immunol 2012;167:59-66. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011. 04503.x
67. Demšar Luzar A, Korošec P, Košnik M, *et al*. Hymenoptera venom immunotherapy: immune mechanisms of induced protection and tolerance. Cells 2021;10:1575. DOI: 10.3390/cells10071575
68. Novak M, Mete M, Bussmann C, *et al*. Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. J Allergy Clin Immunol 2012;130:1153-1158.e2. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.04.039
69. Nullens S, Sabato V, Faber M, *et al*. Basophilic histamine content and release during venom immunotherapy: Insights by flow cytometry. Clinical Cytometry 2013;84B:173-178. DOI: 10.1002/cyto.b.21084
70. Peternelj A, Silar M, Erzen R, *et al*. Basophil sensitivity in patients not responding to venom immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol 2008;146:248-54. DOI: 10.1159/000116361
71. Kucera P, Cvackova M, Hulikova K, *et al*. Basophil activation can predict clinical sensitivity in patients after venom immunotherapy. J Investig Allergol Clin Immunol 2010;20:110–16.
72. Eberlein-Konig B, Ullmann S, Thomas P, *et al*. Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization. Clin Exp Allergy 1995;25:704–12. DOI: 10.1111/j.1365-2222. 1995. tb00007.x
73. Eberlein B. Basophil activation as marker of clinically relevant allergy and therapy outcome. Frontiers in Immunology 2020;11:1815. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01815
74. Ansotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, *et al*. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. World Allergy Organ J 2020;13:100080. DOI: 10.1016/j.waojou.2019.100080
75. Bonifazi F, Jutel M, Bilò MB, and the EAACI interest group on insect venom hypersensitivity. Prevention and treatment of Hymenoptera venom allergy: Guidelines for clinical practice. Allergy 2005;60:1459-70. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005. 00960.x
76. Sahiner UM, Durham SR. Hymenoptera Venom Allergy: ¿How Does Venom Immunotherapy Prevent Anaphylaxis from Bee and Wasp Stings? Front Immunol 2019;10:1959. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01959
77. Diagnostic value of the basophil activation test in evaluating Hymenoptera venom sensitization. Wien Klin Wochenschr 2009;121:344-348. DOI: 10.1007/s00508-009-1174-y

ORCID

Virginia Rodríguez Vázquez: 0000-0001-7268-5094
Sara López Freire: 0000-0001-8458-6384
Paula Méndez Brea: 0000-0002-8281-2357
María Teresa González Fernández: 0000-0002-2099-2436
Cristian Hernández Pérez: 0000-0002-2844-2754

Consistency of Determination of sIgE and the Basophil Activation Test in *Vespa velutina nigrithorax* Allergy

Rodríguez-Vázquez V[1], Gómez-Rial J[2], Monsalve RI[3], Vidal C[1,4]
[1]*Allergy Department, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, School of Medicine, University of Santiago de Compostela, Spain*
[2]*Department of Immunology, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain*
[3]*CMC R&D (Chemistry, Manufacturing and Control Research and Development), ALK-Abelló, Madrid, Spain*
[4]*Spanish Network for Addictive Disorders (Red de Trastornos Adictivos, RD16/0017/0018), Spain*

J Investig Allergol Clin Immunol 2022; Vol. 32(2): 143-145
doi: 10.18176/jiaci.0716

Key words: *Vespa velutina nigrithorax*. nVesp v 1. nVesp v 5. Basophil activation test. sIgE.

Palabras clave: *Vespa velutina nigrithorax*. nVesp v 1. nVesp v 5. Test de activación de basófilos. IgE sérica.

Vespa velutina nigrithorax is an alien species originally from Southeast Asia, although it is widely found in other regions of the world [1,2] because of its capacity to develop populous colonies with an effective predator defence and thus produce numerous founders [2]. Cases of beekeepers, farmers, and people living in rural environments who have been wounded or died owing to *Vespa velutina nigrithorax* stings are reported every year in Asia and Europe [3-5]. Most of these persons die because of the toxic effects of the venom, although *Vespa velutina nigrithorax* can also cause allergic reactions similar to those provoked by other hymenoptera species [6-8]. We previously reported extensive IgE cross-reactivity between *Vespa velutina nigrithorax* and other hymenoptera venoms, particularly *Vespula* species and *Polistes dominula* venoms [7,8]. Inhibition studies performed with *Vespula* species and *Vespa velutina* venoms suggested that *Vespula* species is likely the genuine or primary sensitizer [8]. Antigen 5 from *Vespa velutina nigrithorax* (Vesp v 5) and phospholipase A1 (Vesp v 1) are relevant and officially recognized allergens [7,8]. The present study measured the basophil response to *Vespa velutina nigrithorax* venom and its allergens (Vesp v 1 and Vesp v 5) in patients with confirmed IgE-induced anaphylaxis by using the basophil activation test (BAT) as an additional diagnostic method. If consistent results are obtained, this approach could be used for follow-up of venom immunotherapy.

We prospectively studied 10 consecutive patients with *Vespa velutina nigrithorax* venom anaphylaxis from December 2020 to February 2021. The median age was 57 years (range, 26-81 years), and all patients were men who lived in a rural environment. The anaphylactic event had developed less than 30 minutes after a median of 2 stings (range, 1-13).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

© 2022 Esmon Publicidad

We measured serum-specific IgE (sIgE) (ImmunoCAP-250) against a panel of commercially available hymenoptera venom allergens (including Vespa velutina venom [U1223]) (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and sIgE to nVesp v 1 and nVesp v 5 after biotinylation and binding to streptavadin-coated, high-capacity plates (o212, Thermo Fisher Scientific, Inc), as previously described [7,8].

BATs were performed 3-4 months after the anaphylactic reaction with the commercially available BASOTEST kit (Celonic), which detects translocation of CD63 from the secretory lysosomal granule to the basophil surface in heparinized whole blood samples. The test kit contains the chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) as a positive control, and the wash solution serves as a negative background control. The specific allergens tested in patients included *Vespa velutina nigrithorax* whole venom (10, 1, 0.1, and 0.01 µg/mL), nVesp v 1, and nVesp v 5 (10, 1, 0.1, and 0.01 ng/mL) purified as previously described [9]. Flow cytometry was performed within 3 hours using a FACScan device (Becton-Dickinson Immunocytometry System) and CellQuest software. Five healthy individuals (4 atopic and 1 nonatopic) with a negative history of venom allergy and absence of sIgE were recruited as controls. BAT experiments in control patients were performed with *Vespa velutina nigrithorax* whole venom. We defined basophil reactivity as the percentage of basophils that responded to the stimulus. The responses were considered positive when the percentage of activated basophils was greater than 15%, as recommended by the manufacturer and suggested by other authors [10,11]. All participants gave their written informed consent to participate in the study, which was approved by the institutional ethics committee (code 2018/622).

All patients presented a positive sIgE result (≥0.35 kU_A/L) to *Vespa velutina nigrithorax* and Vespula species venom, and 9/10 presented sIgE to *Vespa crabro* and *Polistes dominula* venom. Levels of sIgE to *Vespula* species were higher than levels of sIgE to *Vespa velutina nigrithorax* (see Supplementary Table 1 for more detail). As can be seen in the Figure and Supplementary Table 2, all but 1 patient (#3) presented a positive result in the BAT experiments with at least 1 of the allergens tested. The allergen components nVesp v 1 and nVesp v 5 activated the basophils in 5 and 7 patients, respectively (images from 3 representative patients can be seen in Supplementary Figure 1). When positive, the percentages of activated basophils with *Vespa velutina nigrithorax* whole venom, nVesp v 1, and nVesp v 5 were similar. The Spearman rank test revealed no correlations between the maximum percentage of activated basophils and the sIgE concentrations against any tested allergen (r=0.103, p=0.777 for *Vespa velutina nigrithorax* whole venom; r=0.055, p=0.881 for nVesp v 1; and r=0.067, p=0.885 for nVesp v 5) or the severity of the anaphylactic reaction (data not shown). The 5 healthy controls presented negative BAT results (Supplementary Table 3, and image from 1 control in Supplementary Figure 1).

These results support the biological activity of *Vespa velutina nigrithorax* venom through an IgE-mediated mechanism. The allergen components nVesp v 1 and nVesp v 5 also induced strong positive responses, even at very low concentrations.

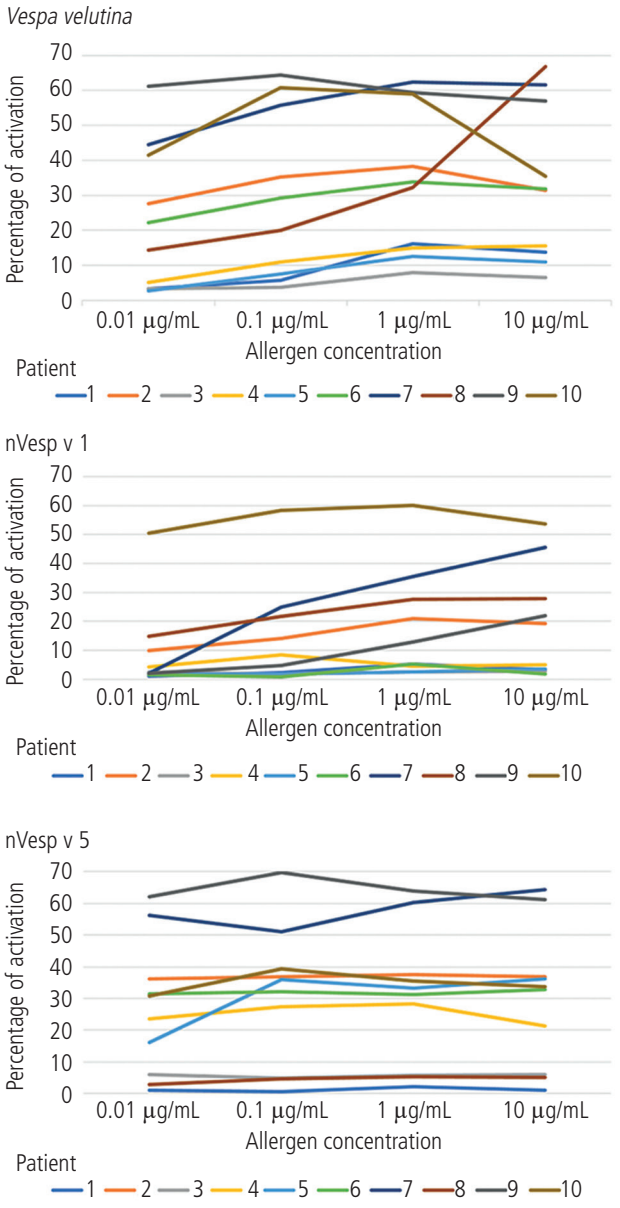


Figure. Representation of the percentage of CD63 expression on basophils after activation with different concentrations of *Vespa velutina nigrithorax* venom, nVesp v 1 (phospholipase A1), and n Vesp v 5 (antigen 5) molecules in each patient. Negative control, wash solution. Positive control, N-formyl-Met-Leu-Phe peptide. The result was considered positive when the percentage of activation was ≥15%.

The negative results from the controls ruled out nonspecific basophil activation. The results of this CD63-based BAT were consistent with the sIgE findings, since all but 1 patient (#3) with positive sIgE to *Vespa velutina nigrithorax* whole venom presented a significant percentage of basophil activation when exposed to *Vespa velutina nigrithorax* whole venom or its allergens (nVesp v 1 or nVesp v 5). Nevertheless, we could not find a good correlation between the degree of basophil activation and sIgE reactivity to *Vespa velutina nigrithorax*, as demonstrated elsewhere in wasp or bee venom allergens [10].

© 2022 Esmon Publicidad

Regarding the level of concordance between sIgE and dichotomous BAT results (positive vs negative), it seems that *Vespa velutina nigrithorax* whole venom and nVesp v 5 behave more favorably than nVesp v 1. Therefore, considering the commercial availability of *Vespa velutina nigrithorax* whole venom for determination of sIgE and its superior performance to that of the allergenic components tested, this whole venom seems to be a good marker for studying the biological activity of the venom in clinical settings. Moreover, given that BAT has been proposed as an ex vivo method for follow-up venom immunotherapy [8,10-15] and positive BAT responses were obtained in patients clinically diagnosed with anaphylaxis due to *Vespa velutina nigrithorax* venom allergy in our study, BAT could be performed after venom immunotherapy to investigate its potential efficacy in affected patients.

Funding

The study was supported by Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health, PI16/1401 and PI19/01023 "A way to make Europe") and Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Immunología Clínica (SEAIC).

Conflicts of Interest

Rafael Monsalve is an employee of ALK-Abelló. The remaining authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Arca M, Mougel F, Guillemaud T, Dupas S, Rome Q, Perrard A, et al. Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, Vespa velutina, in Europe. Biological Invasions. 2015:17;2357-71.
2. Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, Muller F, Gargominy O, Jiguet F, et al. Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking yellow-legged hornet Vespa velutina nigrithorax across Europe and other continents with niche models. Biological Conservation. 2011;144:2142-50.
3. Xie C, Xu S, Ding F, Xie M, Lv J, Yao J, et al. Clinical features of severe wasp sting patients with dominantly toxic reaction: analysis of 1091 cases. PLoS One. 2013;8:e83164.
4. Liu Z, Chen S, Zhou Y, Xie C, Zhu B, Zhu H, et al. Deciphering the venomic transcriptome of killer-wasp Vespa velutina. Sci Rep. 2015;5:9454.
5. Feás X. Human Fatalities Caused by Hornet, Wasp and Bee Stings in Spain: Epidemiology at State and Sub-State Level from 1999 to 2018. Biology (Basel). 2021;10:E73.
6. Chugo S, Lizaso MT, Alvarez MJ, Arroabaren E, Lizarza S, Tabar AI. Vespa velutina nigritorax: a new causative agent in anaphylaxis. J Investig Allergol Clin Immunol. 2015;25:231-2.
7. Vidal C, Armisén M, Monsalve R, González-Vidal T, Lojo S, López-Freire S, et al. Anaphylaxis to Vespa velutina nigrithorax: pattern of sensitization for an emerging problem in Western countries. J Investig Allergol Clin Immunol. 2021;31(3):228-35.
8. Vidal C, Armisén M, Monsalve R, Gómez-Rial J, González-Fernández T, Carballada F, et al. Vesp v 5 and glycosylated Vesp v 1 are relevant allergens in Vespa velutina nigrithorax anaphylaxis. Clin Exp Allergy. 2020;50:1424-7.
9. Monsalve RI, Gutiérrez R, Hoof I, Lombardero M. Purification and molecular characterization of phospholipase, antigen 5 and hyaluronidases from the venom of the Asian hornet (Vespa velutina). PLoS One. 2020;10;15:e0225672.
10. Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. Allergy. 2004;59:1102-9.
11. 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. 2015;70:1393-405.
12. Zitnik SEK, Vesel T, Avcin T, Silar M, Kosnik M, Korosec P. Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. Pediatr Allergy Immunol. 2012:23:166-72.
13. Cichocka-Jarosz E, Dorynska A, Pietrzyk JJ, Spiewak R. Laboratory markers of mast cell and basophil activation in monitoring rush immunotherapy in bee venom-allergic children. Immunotherapy. 2011;3:1013-7.
14. Erzen R, Kosnik M, Silar M, Korosec P. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: A long-term sting challenge study. Allergy Eur J Allergy Clin Immunol. 2012;67:822-30.
15. Rodríguez Trabado A, Cámara Hijón C, Ramos Cantariño A, Romero-Chala S, García-Trujillo JA, Fernández Pereira LM. Short-, intermediate-, and long-term changes in basophil reactivity induced by venom immunotherapy. Allergy Asthma Immunol Res. 2016;8:412-20.

Manuscript received April 27, 2021; accepted for publication June 3, 2021.

Carmen Vidal
Allergy Department
Complejo Hospitalario Universitario de Santiago
Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (IDIS)
Santiago de Compostela
Spain
E-mail: carmen.vidal.pan@sergas.es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Check for updates

Received: 17 August 2021 | Revised: 11 October 2021 | Accepted: 28 October 2021

DOI: 10.1111/cea.14039

RESEARCH LETTER

WILEY

Immunotherapy with *Vespula* venom for *Vespa velutina nigrithorax* anaphylaxis: Preliminary clinical and immunological results

To the Editor,

The Asian wasp, *Vespa velutina nigrithorax*, has become the most prevalent Hymenoptera species involved in anaphylactic reactions in NW Spain.[1,2] In previous studies, we have proven a strong correlation between serum-specific IgE (sIgE) to *Vespula* spp. venom and *Vespa velutina nigrithorax* venom.[2] Besides, inhibition experiments suggested that *Vespula* spp. venom is the genuine sensitizer in these cases, supporting the idea that sensitization could have occurred after *Vespula* spp stings.[2] These results were not surprising since cross-reactivity among allergens from different Vespidae is well known.[3]

Venom immunotherapy is the only effective treatment in patients with a history of anaphylaxis and has proven to be effective for up to 95% of patients with *Vespula* venom allergy.[4,5] During the course of venom immunotherapy, gradual decreases in sIgE and gradual increases in specific IgG4 (sIgG4) have been reported, even though these time course changes do not always correlate with clinical improvements.[4,6,7] Clinical tolerance to re-sting either spontaneous or after a controlled sting challenge is considered the gold standard for clinical efficacy in venom immunotherapy.[6,8]

Well-standardized commercial venom extracts are only available for *Vespula* spp, *Apis mellifera* and *Polistes dominula*. In cases of allergy to different Hymenoptera species, when the venom of the allergy-eliciting insect is not accessible for immunotherapy, the proper therapeutic selection should be based on the knowledge of the sIgE patient sensitization profile, trying to find which composition best represents shared allergens recognized by patients.[6,8] For example, *Vespula* spp extracts have proven to be efficacious in patients with anaphylaxis to *Vespa orientalis*[9] or *Vespa crabro*[10] to prevent from happening additional systemic reactions with the culprit insect.

In this scenario of increasing frequency of *Vespa velutina nigrithorax* anaphylaxis and lack of available specific venom for immunotherapy, we have used a *Vespula* spp venom extract (Pharmalgen, ALK Lab.,) to treat patients with anaphylaxis due to *Vespa velutina nigrithorax*. The present study was aimed to evaluate the usefulness of this *Vespula* spp venom in terms of clinical and immunological (sIgE and sIgG4) evolution in 46 of these patients during the first year of treatment. Patients had been studied at the Allergy Department of the University Hospital of Santiago de Compostela because of an

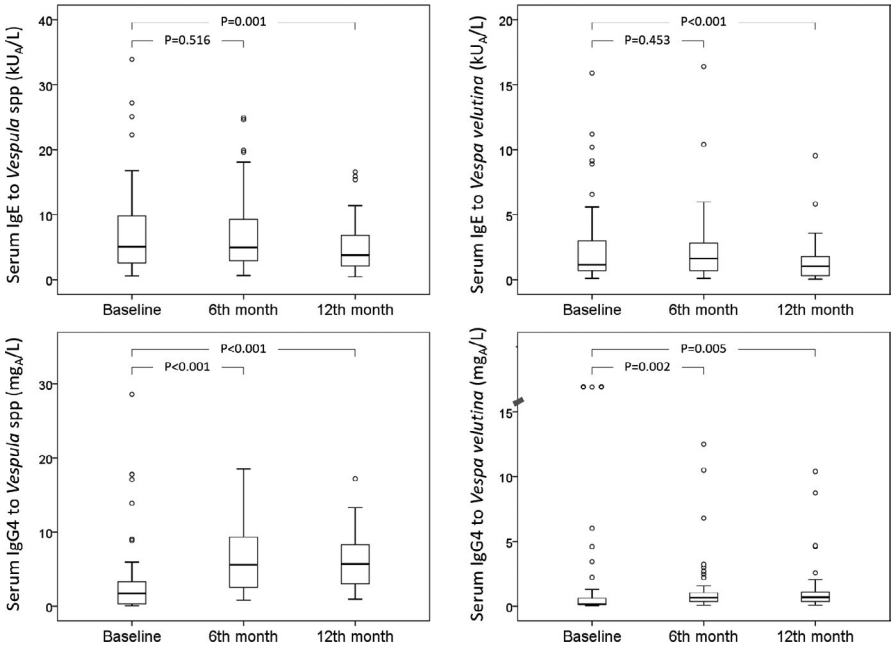


FIGURE 1 Boxplot of time-course changes of sIgE and sIgG4 against *Vespula* spp venom and *Vespa velutina* venom after immunotherapy with *Vespula* venom in *Vespa velutina nigrithorax* allergic patients ($n = 46$ in each case). Horizontal lines represent the median, boxes represent the interquartile (25–75th percentile), whiskers represent the extremes and dots represent the outliers (values outside 1.5 times the interquartile range above the upper quartile and below the lower quartile). *p*-values were obtained with the Wilcoxon test for paired data

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2021 The Authors. *Clinical & Experimental Allergy* published by John Wiley & Sons Ltd.

13652222, 2022, 2, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cea.14039 by Spanish Cochrane National Provision (Ministerio de Sanidad), Wiley Online Library on [01/12/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

anaphylactic reaction after being stung by *Vespa velutina nigrithorax*. The median age was 61 years (range, 20–78 years) and 39 (84.8%) were men. Most of the patients (93.5%) reported previous stings by *Vespula* spp and/or *Apis mellifera* (31, 67.4%) and only 10 (21.7%) reported previous stings by *Vespa velutina nigrithorax*. Patients who started allergen immunotherapy with *Vespula* spp venom from November 2019 to May 2020 were included. *Vespula* spp venom was administered in a 2 days, five-dose induction cluster schedule. On day 0, patients received subcutaneous injections (10 μg, 20 μg, and 30 μg) of the venom extract on alternate arms at 30 minutes intervals for the first two doses, and 60 minutes after the third dose. On day 7, each patient received two subcutaneous injections with 50 μg on alternate arms at 60 minutes intervals. This was followed by monthly administration of 100 μg of venom extract. All participants gave written informed consent for the study, which was approved by the Institutional Ethics Committee (code 2018/622). Specific IgE and sIgG4 against *Vespa velutina* (commercially available as 'research allergen U1223', Thermo Fisher Scientific™) and *Vespula* spp were measured by using the ImmunoCAP-250™ system (Thermo Fisher Scientific™) before starting allergen immunotherapy, and 6 and 12 months later. Figure 1 represents the changes in sIgE and sIgG4. A significant reduction in sIgE was seen against both *Vespa velutina* and *Vespula* spp (median reduction, 10.4% and 25.0% respectively) after 12 months. No significant changes were detected at 6 months. Regarding sIgG4 a significant increase was detected against both *Vespa velutina* and *Vespula* spp (median increase. 25.3% and 30.8% respectively) after 12 months. Contrary to what had happened with sIgE, changes in sIgG4 were significant at 6 months. The decrease in sIgE at 12 months was observed in 35 patients (76.1%) while the increase in sIgG4 was observed in 37 patients (80.4%). We could not find any baseline difference among patients who presented changes with respect to those who did not regarding age, severity of the reaction or baseline sIgE levels to *Vespa velutina* or *Vespula* spp (data not shown). We did not perform sting challenges with *Vespa velutina nigrithorax*, but 13 patients (28.2%) suffered in field stings with no systemic reactions after a median of 9 months (range, 4–12 months) after starting immunotherapy. Twelve of these patients presented either an increase in sIgG4 or a decrease in sIgE or both.

The development of venom extracts for immunotherapy is a complex process and ideally should require experimental randomized controlled trials with well-standardized venom extracts [11] that are not still available for *Vespa velutina nigrithorax*. Our results from a quasi-experimental study suggest a possible role of *Vespula* spp venom immunotherapy in patients with systemic reactions to *Vespa velutina nigrithorax*. Time-course changes in both sIgE and sIgG4 against *Vespa velutina* venom might support a positive immune modulation by using *Vespula* spp venom extract in these patients. The IgG4 induction *per se* is not a marker for therapeutic success, but the lack of IgG4 induction might be a marker for unresponsiveness. [6] For that purpose, we used the newly commercially available ImmunoCAP *Vespa velutina* instead of a customized CAP coupled to streptavidin (o212, Thermo Fisher Scientific) that we had used in previous experiments [1,2] so that studies could be easily reproducible. In a subsample of 36 patients, a significant correlation was found between sIgE to U1223 and sIgE to the customized *Vespa velutina* coupled to o212 (Spearman's Rho 0.832, $p < .001$). More importantly, our preliminary results suggest that immunotherapy with *Vespula* spp venom extract may be clinically useful in patients with *Vespa velutina nigrithorax* anaphylaxis. Sting challenges were not performed because of the previously reported toxicity of *Vespa velutina* venom [12], but real-life observations confirmed that no anaphylaxis episode developed after spontaneous stings by the culprit insect in more than a quarter of treated patients.

Taken together, both the prior evidence for *Vespula* venom as a genuine sensitizer [1,2] and the preliminary results suggesting clinical and immunological efficacy of immunotherapy with *Vespula* spp venom in patients with *Vespa velutina nigrithorax* anaphylaxis, we propose the use of *Vespula* spp venom products approved to treat this emerging problem until a specific extract has been standardized.

KEY MESSAGES

- *Vespula* venom immunotherapy induces changes in sIgE and sIgG4 against *Vespa velutina* in allergic patients.
- Spontaneous stings provoked no reaction in *Vespa velutina* allergic patients treated with *Vespula* venom immunotherapy.
- *Vespula* venom may be used to treat patients with *Vespa velutina* anaphylaxis.

KEYWORDS

basic mechanisms, IgE, immunologic tests, immunotherapy and tolerance induction, venom and insect allergy

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Prof. González-Quintela for his critical review and technical support.

The study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health, PI19/01023) (Co-funded by the European Regional Development Fund 'A way to make Europe'), and Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest regarding this manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTION

Carmen Vidal is the principal investigator of the study. I have received the grants and I have designed the study, collected data, analysed results, wrote the manuscript and created the Figure. Margarita Armisén and Virginia Rodríguez. They are coordinators of the study in Santiago where they have collected data and classified them. Besides, Virginia Rodriguez is working on her Doctoral Thesis on Vespa velutina allergy. Jose Gómez-Rial and Beatriz Lamas-Vázquez. They have performed specific IgE and IgG4 determinations.

13652222, 2022, 2, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cea.14039 by Spanish Cochrane National Provision (Ministerio de Sanidad), Wiley Online Library on [01/12/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

FUNDING INFORMATION

The study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health, PI19/01023) (Co-funded by the European Regional Development Fund 'A way to make Europe'), and Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

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

Virginia Rodríguez-Vázquez[1]
Margarita Armisén[1]
Jose Gómez-Rial[2]
Beatriz Lamas-Vázquez[2]
Carmen Vidal[1]

[1]*Allergy Department, Faculty of Medicine, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain*
[2]*Department of Immunology, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain*

Correspondence
Carmen Vidal, Allergy Department, Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (IDIS), Faculty of Medicine, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15706, Spain.
Email: carmen.vidal.pan@sergas.es

ORCID

Carmen Vidal https://orcid.org/0000-0002-2844-2754

REFERENCES

1. Vidal C, Armisén M, Monsalve R, et al. Anaphylaxis to Vespa velutina nigrithorax: pattern of sensitization for an emerging problem in Western countries. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021;31(3):228-235. https://doi.org/10.18176/jiaci.0474
2. Vidal C, Armisén M, Monsalve R, et al. Vesp v 5 and glycosylated Vesp v 1 are relevant allergens in Vespa velutina nigrithorax anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2020;50(12):1424-1427. https://doi.org/10.1111/cea.13738
3. Schiener M, Eberlein B, Moreno-Aguilar C, et al. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. *Allergy*. 2017;72(1):98-108. https://doi.org/10.1111/all.13000
4. Dhami S, Zaman H, Varga EM, et al. Allergen immunotherapy for insect venom allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2017;72(3):342-365. https://doi.org/10.1111/all.13077
5. Ruëff F, Vos B, Oude Elberink J, et al. Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(5):736-746. https://doi.org/10.1111/cea.12275
6. Blank S, Grosch J, Ollert M, Bilò MB. Precision medicine in hymenoptera venom allergy: diagnostics, biomarkers, and therapy of different endotypes and phenotypes. *Front Immunol*. 2020;11:579409. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.579409
7. Sahiner UM, Durham SR. Hymenoptera Venom allergy: how does venom immunotherapy prevent anaphylaxis from bee and wasp stings? *Front Immunol*. 2019;10:1959. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01959
8. Alfaya Arias T, Soriano Gómis V, Soto Mera T, et al. Key issues in Hymenoptera venom allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(1):19-31. https://doi.org/10.18176/jiaci.0123
9. Goldberg A, Shefler I, Panasoff J, Paitan Y, Confino-Cohen R. Immunotherapy with commercial venoms is efficacious for anaphylactic reactions to Vespa orientalis stings. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(2):174-180. https://doi.org/10.1159/000345139
10. Macchia D, Cortellini G, Mauro M, et al. *Vespa crabro* immunotherapy versus *Vespula*-venom immunotherapy in *Vespa crabro* allergy: a comparison study in field re-stings. *World Allergy Organ J*. 2018;11(1):3. https://doi.org/10.1186/s40413-018-0183-6
11. Bonertz A, Mahler V, Vieths S. New guidance on the regulation of allergen products: key aspects and outcomes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020;20(6):624-630. https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000687
12. Liu Z, Chen S, Zhou Y, et al. Deciphering the venomic transcriptome of killer-wasp Vespa velutina. *Sci Rep*. 2015;5:9454. https://doi.org/10.1038/srep09454

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

13652222, 2022, 2, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cea.14039 by Spanish Cochrane National Provision (Ministerio de Sanidad), Wiley Online Library on [01/12/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La Vespa velutina es una especie de himenóptero invasora procedente de Asia que está provocando problemas de salud en nuestra población en forma de reacciones alérgicas graves. En 4 sub-estudios se presentan los resultados del perfil molecular de reconocimiento de la IgE de los pacientes que sufrieron una anafilaxia tras la picadura de este himenóptero, demostrando que el veneno de otro véspido, Vespula spp, es el sensibilizante primario. Se han identificado los dos principales alérgenos responsables: Vesp v 1 y Vesp v 5 cuya actividad biológica se comprobó por medio de pruebas de activación de basófilos. La inmunoterapia con veneno de Vespula spp en estos pacientes induce cambios inmunológicos relevantes como el descenso de la IgE y el aumento de la IgG4 específicas frente al veneno de Vespa velutina.