

VALORACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS A VENENO DE *APIS MELLIFERA* EN LA SEGURIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA SUBCUTÁNEA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Programa de Doctorado: Biomedicina

Berta Ruiz León

**Memoria presentada para optar
al grado de doctor en Medicina**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Directores: Francisco Guerra Pasadas • Carmen Moreno Aguilar

TITULO: VALORACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN DE LOS
PACIENTES ALÉRGICOS A VENENO DE APIS MELLIFERA EN LA
SEGURIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON
INMUNOTERAPIA SUBCUTANEA

AUTOR: *María Berta Ruiz León*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina
Programa de Doctorado: Biomedicina

TESIS DOCTORAL

**VALORACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN DE LOS PACIENTES
ALÉRGICOS A VENENO DE *APIS MELLIFERA* EN LA SEGURIDAD Y
EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA SUBCUTÁNEA**

Berta Ruiz León
Córdoba 2015



TÍTULO DE LA TESIS: VALORACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS A VENENO DE *APIS MELLIFERA* EN LA SEGURIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA SUBCUTÁNEA.

DOCTORANDA: MARIA BERTA RUIZ LEON

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El estudio del fenotipado de la sensibilización a veneno de abeja se realiza en dos fases, una de identificación y otra de desarrollo clínico. Esto es consecuencia de un planteamiento traslacional desde el inicio y de unos hallazgos obtenidos en la primera fase (identificación de la IgE-Api m 4 como biomarcador) del estudio.

Conviene destacar el modelo colaborativo que ha soportado este trabajo (tareas clínicas en el Hospital Universitario Reina Sofía y trabajo de laboratorio en el Departamento de I+D de ALK Abelló).

Entre las consecuencias inmediatas de esta tesis cabe la realización de dos publicaciones, la primera publicada el pasado febrero (*Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015 Apr;114(4):350-2. doi: 10.1016/j.anaai.2015.01.010. Epub 2015 Feb 27) y la segunda, actualmente bajo revisión de referees.

En un orden práctico, los resultados de esta tesis ya han sido implantados en la práctica clínica de la unidad de alergia a himenópteros del HURS. El fenotipado en pacientes alérgicos al veneno de abeja es sistemáticamente realizado y el tratamiento elegido según fenotipo.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

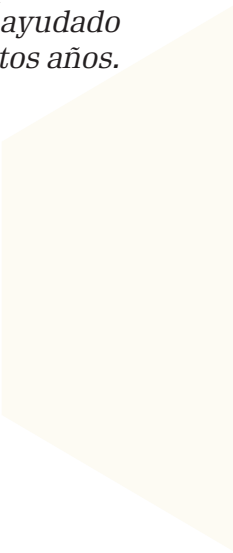
Córdoba, 21 de Septiembre de 2015

Firma de los directores

Fdo.: FRANCISCO GUERRA PASADAS.

Fdo.: CARMEN MORENO AGUILAR

*A todas aquellas personas
que me han ayudado
a lo largo de estos años.*



AGRADECIMIENTOS

A mi padre, porque siempre me hizo sentir el orgullo de su vida y ese sentimiento me acompaña en cada paso que doy.

A mi madre, por su coraje de vivir y ejemplo de superación diaria, que me ha permitido seguir avanzando y construyendo mi vida a mi manera. Apoyo incondicional en cada logro y tropiezo, siempre con un “hacia delante”.

A Juan, que ha sufrido y ha disfrutado todo este largo camino, por su comprensión y apoyo absoluto, sin duda esto es obra de ambos.

A Carmen Moreno, por transmitirme y enseñarme con pasión esta patología. Gracias por tu incansable dedicación y entusiasmo en este trabajo. A Francisco Guerra por permitir que comenzara con este apasionante proyecto y hacerme fácil el camino.

A Pilar Serrano, compañera y amiga que me ha guiado y me ha enseñado mucho en todos estos años, sin ella hubiera sido más difícil .

A mis compañeras en Córdoba, Vanessa, M. José, Lourdes, M. Del Mar y el resto del personal de este servicio por recibirme siempre con tanto cariño. A compañeras que siguen su camino pero que me prestaron su ayuda en los comienzos, Ana y Miriam. A mis compañeros en Alcázar, Estefanía, Ana, Rocío y Luis junto con el resto del equipo, por su gran apoyo.

Al laboratorio ALK-Abelló por su soporte técnico y humano (Agustín, Lucía y Rafa), en especial a Fernando de la Torre por su gran ayuda y su buena disposición, su experiencia unido a su carácter lo hacen único.

A todos aquellos amigos y familiares que han estado cerca de mí durante todos estos años, por su comprensión y apoyo.

Finalmente tengo que dar las gracias a todos los pacientes que han participado en este trabajo porque sin su colaboración no podríamos seguir investigando en esta patología.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	3
1.1. Abeja de la miel, <i>Apis mellifera</i> :	3
1.1.1. Entomología.	3
1.1.2. Características morfológicas de la abeja obrera.	3
1.1.3. Importancia biológica y socioeconómicas.	4
1.1.4. Mecanismo de un picadura de abeja.	5
1.2. Veneno de <i>Apis mellifera</i> .	6
1.2.1. Composición del veneno de <i>Apis mellifera</i> .	6
1.2.2. Alérgenos del veneno de <i>Apis mellifera</i> .	6
1.3. Enfermedad alérgica por veneno de <i>Apis mellifera</i> .	9
1.3.1. Presentación clínica.	10
1.3.1.1. Reacciones locales.	10
1.3.1.2. Reacciones sistémicas.	10
1.3.1.2.1. Factores de riesgo.	11
1.3.2. Diagnóstico.	12
1.3.2.1. Historia clínica.	12
1.3.2.2. Pruebas complementarias.	12
1.3.2.2.1. Pruebas <i>in vivo</i> .	12
1.3.2.2.1.1. Pruebas cutáneas.	12
1.3.2.2.1.2. Extractos alérgenos del veneno de <i>Apis mellifera</i> .	13
1.3.2.3. Pruebas <i>in vitro</i> .	13
1.3.2.3.1. Determinación de IgE específica a veneno completo de <i>Apis mellifera</i> . Método InmunoCAP FEIA®.	13
1.3.2.3.2. Determinación de IgE específica a alérgenos del veneno de <i>Apis mellifera</i> . Método ADVIA Centaur®.	13
1.3.2.3.3. Rentabilidad del diagnóstico por componentes.	14
1.3.2.4. Otras pruebas <i>in vitro</i> .	15
1.3.3. Tratamiento.	15
1.3.3.1. Medidas de prevención.	15
1.3.3.2. Tratamiento de urgencias.	16
1.3.3.3. Inmunoterapia.	16
1.4. Inmunoterapia con veneno de <i>Apis mellifera</i> .	16
1.4.1. Concepto.	16
1.4.2. Mecanismo de acción.	16
1.4.3. Indicaciones.	17
1.4.4. Extractos para la ITV.	17
1.4.5. Pautas de inicio de la ITV.	18
1.4.6. Seguridad de la ITV.	18
1.4.6.1. Factores de riesgo asociados a la seguridad de la ITV.	19
1.4.7. Eficacia de la ITV.	20
1.4.7.1. Factores que influyen en la eficacia de la ITV.	21
1.4.8. Monitorización de la ITV.	21
2. JUSTIFICACIÓN.	23
3. OBJETIVOS.	25
3.1. Objetivos de la Fase 1 del estudio.	25
3.2. Objetivos de la Fase 2 del estudio.	25

4. MATERIAL Y MÉTODOS.	27
4.1. Diseño del estudio.	27
4.1.1. Diseño de la Fase 1.	27
4.1.2. Diseño de la Fase 2.	27
4.2. Pacientes del estudio.	28
4.3. Métodos diagnósticos.	28
4.3.1. Intradermorreacción seriada.	28
4.3.2. Determinación de IgE específica frente a veneno completo de <i>Apis mellifera</i> .	28
4.3.3. Determinación de IgG4 frente a veneno completo de <i>Apis mellifera</i> y frente a Api m 1.	28
4.3.4. Determinación de IgE específica frente a alérgenos individuales del veneno de <i>Apis mellifera</i> .	29
4.3.5. Determinación de Triptasa basal.	29
4.4. Tratamiento.	29
4.4.1. Tratamiento usado en la Fase 1 del estudio.	29
4.4.2. Tratamiento usado en la Fase 2 del estudio.	30
4.5. Datos de seguridad.	31
4.5.1. En la Fase 1 del estudio.	31
4.5.2. En la Fase 2 del estudio.	31
4.6. Datos de eficacia.	31
4.6.1. En la Fase 2 del estudio.	31
4.7. Evolución de marcadores inmunológicos.	32
4.7.1. En la Fase 2 del estudio.	32
4.8. Variables recogidas.	32
4.8.1. En la Fase 1 del estudio.	32
4.8.2. En la Fase 2 del estudio.	33
4.9. Almacenamiento de datos.	33
4.10. Método estadístico.	33
5. RESULTADOS.	35
FASE 1 DEL ESTUDIO.	35
5.1. Características de la muestra.	35
5.1.1. Resultados demográficos, clínicos y diagnósticos.	35
5.1.2. Resultado de la sensibilización frente a los alérgenos del veneno de <i>Apis mellifera</i> .	35
5.1.2.1. Correlación entre los tres alérgenos estudiados.	37
5.2. Tolerancia a la inmunoterapia.	39
5.2.1. Seguridad de la inmunoterapia según perfiles de sensibilización.	39
5.2.1.1. Relación entre el perfil de sensibilización y la incidencia de RS.	39
5.2.1.2. Relación entre el perfil de sensibilización y la gravedad de las RS.	40
5.2.1.3. Relación entre el perfil de sensibilización y la recurrencia de las RS.	40
5.2.2. Relación de la seguridad de la ITVa con datos clínicos e IgE específica a <i>Apis mellifera</i> .	41
5.3. Estudio multivariante.	42
FASE 2 DEL ESTUDIO.	43
5.4. Característica de la muestra y perfil de sensibilización.	43
5.5. Resultados en el grupo fenotípico A.	45
5.5.1. Seguridad y eficacia de la ITVa.	45
5.5.1.1. Datos de seguridad.	45
5.5.1.2. Datos de eficacia.	45
5.5.2. Evolución de los datos inmunológicos.	45
5.6. Resultados en el grupo fenotípico B.	46
5.6.1. Seguridad y eficacia de la ITVa.	46
5.6.1.1. Datos de seguridad.	46
5.6.1.2. Datos de eficacia.	46
5.6.2. Evolución de los datos inmunológicos.	46

6. DISCUSIÓN.	47
FASE 1 DEL ESTUDIO.	47
6.1. Perfil de sensibilización detectado frente al veneno de abeja.	47
6.1.1. Prevalencia de sensibilización de los alérgenos del veneno de abeja.	47
6.1.2. Interdependencia de las sensibilizaciones.	48
6.2. Factores de riesgo asociado con mala tolerancia durante el inicio de la ITV _a :	48
6.2.1. Patrón de sensibilización frente al veneno de abeja asociado a un mayor riesgo de sufrir RS durante el inicio de la ITV _a .	49
6.2.2. Patrón de sensibilización frente al veneno de abeja asociado a la gravedad y recurrencia de las RS durante el inicio de la ITV _a .	49
6.2.3. Otras variables asociadas a un mayor riesgo de sufrir RS durante el inicio de la ITV _a .	50
6.3. Perfil de sensibilización en apicultores y su relación con la seguridad de la ITV _a .	50
FASE 2 DEL ESTUDIO.	51
6.4. Dos perfiles diferentes de pacientes alérgicos al veneno de abeja basado en la sensibilización a Api m 4, en tratamiento con ITV _a .	51
6.4.1. Perfil de Sensibilización en ambos fenotipos.	51
6.4.2. Perfil de pacientes alérgicos al veneno de abeja con el valor de IgE específica a Api m 4 ≥ 0.98 kU/L, como único criterio discriminativo.	51
6.4.3. Análisis de la seguridad, protección frente a picadura y evolución de marcadores inmunológicos tras dos años de ITV _a .	52
6.4.3.1. Menor tolerancia y falta de protección asociado a un perfil de pacientes alérgicos al veneno de abeja.	53
6.4.3.2. Cambios inmunológicos acorde a su perfil de sensibilización y tratamiento con ITV _a .	53
6.5. Diagnóstico molecular en la alergia a veneno de abeja y su impacto sobre la práctica clínica.	54
6.6. Limitaciones del estudio y sugerencias para futuras investigaciones.	54
7. CONCLUSIONES.	57
8. BIBLIOGRAFIA.	59
9. ANEXOS.	67
ANEXO I.	68
ANEXO II.	69
ANEXO III.	70
ANEXO IV.	72
ANEXO V.	74
ANEXO VI.	79
ANEXO VII.	86
10. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.	90



GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AH	Antihistamínicos.
CPA	Células presentadoras de antígeno.
Cols	Colaboradores.
COAG	Coordinadora de Organizaciones de Agricultores y Ganaderos.
DT	Desviación típica.
CCD	Determinante carbohidratado del componente.
CRD	Diagnóstico por componentes.
ELISA	Enzimoimmunoensayo.
E. coli	<i>Escherichia coli</i> .
EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology..
HURS	Hospital Universitario Reina Sofía.
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina.
IgE	Inmunoglobulina E.
IgG4	Inmunoglobulina G4.
ITV	Inmunoterapia con veneno.
ITVa	Inmunoterapia con veneno de abeja.
IL	Interleuquinas o citoquinas.
ID	Intradermorreacción.
kU/L	Kilo Unidades por litro.
kDa	Kilodaltons.
Kg	Kilogramo.
Km	kilómetro.
µg	Microgramo.
µg/ml	Microgramo por mililitro.
mg	Miligramo.
min	Minuto.
OR	Odd Ratio.
IQR	Rango intercuartílico.
RLE	Reacción Local Extensa.
RS	Reacción Sistémica.
rpm	Revolución por minuto.



1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Abeja de la miel, *Apis mellifera*.

1.1.1. Entomología:

Los himenópteros son uno de los mayores órdenes de insectos, caracterizados por poseer dos pares de alas membranosas (literalmente, el nombre *Hymenoptera* procede del griego Hymen = membrana, pteros = ala).

El orden *Hymenoptera* consta de unas 200.000 especies que incluye a las abejas, abejorros, avispas y hormigas entre otros.

Dentro del orden *Hymenoptera*, la familia *Apidae* se encuadra en el suborden *Apocrita*, infraorden *Aculeata* y superfamilia *Apoidea*.

Apidae constituye una familia homogénea formada por insectos muy evolucionados, de sumo interés biológico y económico. En esta familia se estableció el género *Apis* que cuenta con diferentes especies y entre ellas la abeja de la miel, *Apis mellifera*.

Apis mellifera es una especie de distribución mundial, originaria de Europa, África y parte de Asia, que posee numerosas subespecies o raza similares morfológicamente en lo que respecta a sus venenos, pero que difieren en su capacidad de invernarse y en su agresividad. *Apis mellifera iberiensis* Engel, 1999 es una subespecie endémica de la Península Ibérica, eslabón entre las abejas norteafricanas y las

europas (1). Es sin duda la subespecie que causa con más frecuencia reacciones alérgicas en nuestro país (2).

Las abejas melíferas son insectos sociales que viven en comunidad formando colonias permanentes denominadas colmenas (construidas por el hombre) o enjambres, activas durante todo el año.

La organización social de las abejas, dentro de una colonia, da lugar a tres tipos de castas (3,4):

- **La reina**, única en la colonia, tiene como principal tarea poner huevos, para mantener el nivel de individuos.
- **Las obreras** son las trabajadoras de la colonia con diferentes funciones, y entre ellas, las pecoreadoras que son aquellas que salen y pueden volar hasta una distancia de unos 3 km para recoger néctar y polen de las flores. Son las más importantes desde el punto de vista alérgico.
- **Los zánganos** nacen de huevos sin fecundar, son de mayores dimensiones que las obreras y no pican porque no poseen aguijón. Su principal función es fecundar a las futuras reinas.

1.1.2. Características morfológicas de la abeja obrera.

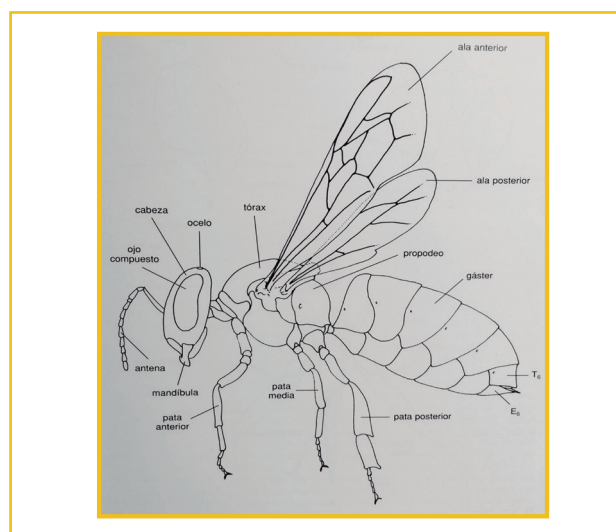
Desde el punto de vista morfológico en las obreras se pueden diferenciar tres partes (3,4) (Imagen 1):

- La cabeza consta de 6 segmentos de los cuales tres se han fusionado. Posee dos ojos compuestos (cuyas unidades se llaman ommatidios), tres ojos simples (ocelos), un par de antenas y la boca. La boca está rodeada de dos mandíbulas con una trompa adaptada a la recolección de néctar.
- El tórax se compone de 3 segmentos soldados, cada uno de los cuales lleva un par de patas, que además de ser un medio de locomoción les sirve para la recolección y

transporte de polen en los pelos rígidos que la recorren. El segundo y tercer segmento poseen un par de alas membranosas ensambladas.

- El abdomen se compone de 6 segmentos. En el último segmento se localiza un aguijón venenoso que surge cuando la obrera se defiende. Este aguijón posee unas barbas laterales en forma de arpón para quedar clavado en la piel, impulsando veneno por contracciones peristálticas. El veneno está producido por dos glándulas, una productora de veneno ácido y otra alcalino, y contiene acetato de isoamil, como sustancia de alarma que excita a las abejas y las incita a picar.

Imagen 1. Morfología general de Apoidea (1)



1.1.3. Importancia biológica y socioeconómicas.

Las diferentes razas de *Apis mellifera* son criadas por el hombre en todo el mundo para la polinización de especies vegetales y la producción de miel.

La polinización es uno de los procesos ecológicos fundamentales para mantener la viabilidad y diversidad de las especies vegetales en general y de las especies entomófilas (polinizadas por insectos) en particular. La mayoría de los cultivos, 87 de los 115 más importantes del mundo requieren de la polinización para su desarrollo (5). En este sentido, la abeja es el insecto polinizador más importante, capaz de transportar el polen desde la antera hasta el estigma de una flor, para su reproducción.

El valor económico de la polinización entomófila en la producción agraria española ronda los 3.300 millones de euros. De esta cantidad, 2.900 millones de euros se deben a la labor polinizadora de las abejas (6).

En cuanto a la producción de miel que se obtiene de la colmena, España es el primer productor europeo con más de 30.614 toneladas en el año 2013. Las buenas condiciones climáticas y orográficas de España junto a una abundante y variada flora han favorecido el desarrollo de

la apicultura. La apicultura moderna está en aumento y los nuevos apicultores transforman sus explotaciones tradicionales de tipo artesanal en modernas explotaciones que industrializan la producción. Este hecho ha supuesto que en España el censo de colmenas haya experimentado un crecimiento del 220 % en los últimos 25 años, con un total de 2.5 millones de colmenas en 2013, lo que supone aproximadamente el 26% del censo reconocido de la Unión Europea. Todo lo anterior junto con la aplicación de nuevos reglamentos que establecen medidas destinadas a mejorar la producción y la comercialización de la miel ha generado un incremento de la profesionalización del sector (por definición las explotaciones profesionales deben superar las 150 colmenas). Actualmente España posee la tasa de profesionalización más alta de la Unión Europea, 5.361 apicultores profesionales, lo que significa que la apicultura representa para estas familias la más importante o única fuente de ingresos (7).

Las comunidades autónomas más productivas en España son la Comunidad Valenciana, Extremadura y Andalucía, siendo esta última la comunidad con mayor número de colmenas (604.235 colmenas en un total de 4.400 explotaciones distribuidas por toda su geografía) (Gráfico 1 y 2) (7).

Gráfico 1.

Distribución por comunidades autónomas de la producción de miel 2013.

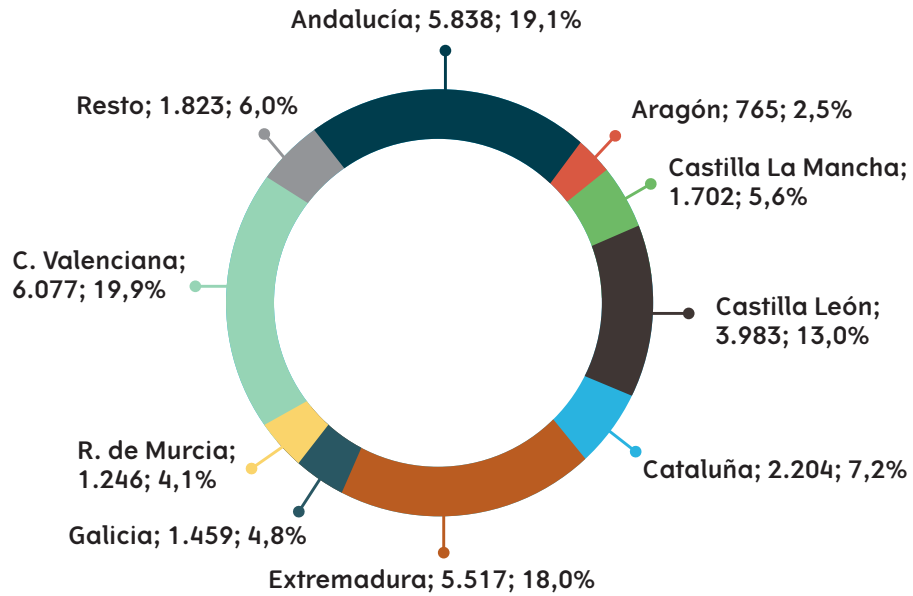
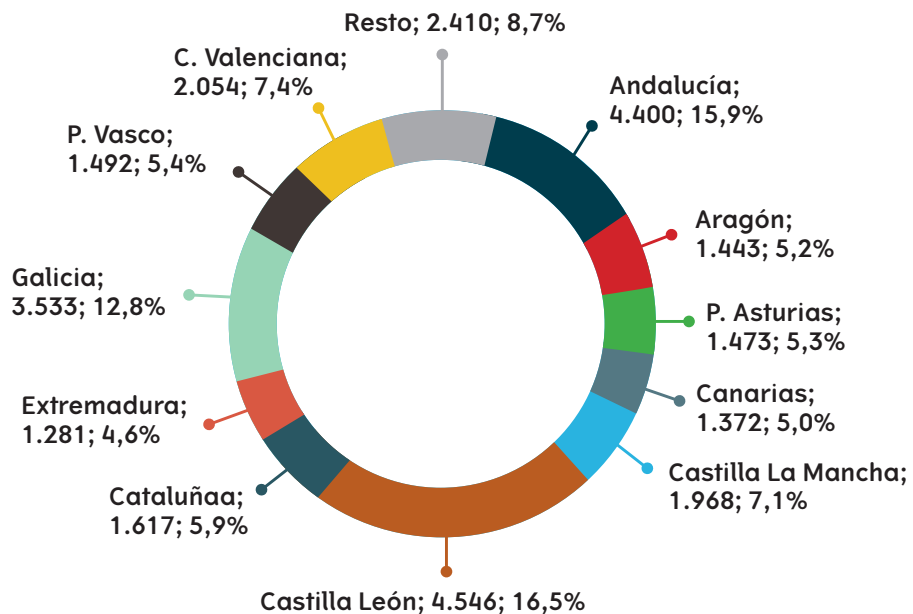
**Gráfico 2.**

Gráfico de explotaciones Apícolas por Comunidades Autónomas 2015.

**1.1.4. Mecanismo de una picadura de abeja.**

La capacidad de picar e inyectar veneno por parte de las abejas es una importante arma de defensa de las colonias. Las abejas pican cuando se les provoca o como respuesta a estímulos físicos (movimientos bruscos, colores, olores y sonidos).

Suelen picar una única vez porque su aguijón posee unas barbas laterales en forma de arpón

que quedan ancladas a la piel, desprendiéndose su aparato digestivo junto con el resto de vísceras del abdomen al levantar el vuelo (4).

La picadura de una abeja libera entre 50-140 µg de veneno (variabilidad entre individuos y colmena) (8), pudiendo inyectar el 90% del veneno en los primeros 20 segundos, completando el proceso en aproximadamente 30 segundos (9).

1.2. Veneno de *Apis mellifera*.

El veneno de abeja se obtiene por electroestimulación desde 1963. En este proceso las abejas son estimuladas a liberar veneno por descargas eléctricas tras colocar un malla (cobre, acero o nylon) electrificada en la

entrada de la colmena, depositándose el veneno en una membrana, el cual una vez desecado se recoge. Es necesario una media de 10-20 colmenas o alrededor de 10.000 - 20.000 insectos para obtener 1g de veneno de abeja (4).

1.2.1. Composición del veneno de *Apis mellifera*.

El veneno de abeja es una mezcla compleja de proteínas alergénicas, con función enzimática, junto con otras moléculas farmacológicamente activas como las aminas biógenas y péptidos básicos.

la fosfolipasa A2, y sobre todo la melitina los componentes más abundantes, constituyendo del 50-70% del peso seco del veneno.

Entre las proteínas alergénicas del veneno de abeja se encuentran enzimas como la fosfolipasa A2, hialuronidasa, fosfatasa ácida, entre otras, que permiten la penetración del veneno en los tejidos, así como péptidos simple como la melitina. De todos ellos son

Las aminas biógenas y otros péptidos como la histamina, dopamina, noradrenalina, aminoácidos libres, apamina, péptido degranulador de mastocitos, tertiapina, secapina, así como otros componentes de bajo peso molecular, no suelen ser alergénicos pero son responsables del dolor, la inflamación y también de la toxicidad del veneno (10).

1.2.2. Alérgenos del veneno de *Apis mellifera*.

La secuenciación completa del genoma de la abeja ha permitido el estudio de la composición de su veneno, convirtiéndola en un modelo para el estudio de estos insectos. El análisis proteómico más reciente del veneno de abeja revela que pueden existir más de 100 componentes diferentes en su veneno (11).

unen los anticuerpos IgE e inducen múltiples pruebas positivas de significado incierto), responsable de la reactividad cruzada (fenómeno por el que la misma molécula de IgE es reactiva contra diferentes moléculas alergénicas presentes en fuentes alergénicas distintas) entre los venenos de abejas y avispa (11,13).

Actualmente se han identificado 12 alérgenos en el veneno de abeja (12) (Tabla 1).

Esto hace plantearse la necesidad de expresar estas proteínas de forma recombinante, sin determinantes carbohidratados, con el fin de valorar la sensibilización genuina y evitar la reactividad cruzada con otros venenos para conseguir un diagnóstico preciso.

La purificación de estas proteínas alergénicas puede hacerse por aislamiento a partir del veneno, obteniendo una mezcla completa con las isoformas de las proteínas nativas alergénicas presentes en la fuente natural. Sin embargo, la mayoría de los alérgenos del veneno de abeja son glicoproteínas, por lo que el uso de alérgenos nativos purificados presenta el inconveniente de la presencia de determinantes carbohidratados (cadenas laterales de oligosacáridos presentes en glicoproteínas de múltiples orígenes, donde se

El alérgeno recombinante es toda aquella molécula que se ha obtenido a través de técnica de recombinación de ácidos nucleicos *in vitro* (14).

En los últimos años se han clonado, secuenciado y producido de forma recombinante la

mayoría de los alérgenos del veneno de abeja. Estos han sido expresados usando sistemas procarióticos, como la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*), y sistema eucariótico, en células

infectadas con baculovirus o Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), demostrando su capacidad de reacción con IgE con una especificidad a veces mayor que el veneno completo (15).

Tabla 1. Alérgenos del veneno de abeja (11,16).

Alérgeno	Nombre Bioquímico	Peso Mol (kDa)	Peso Veneno (%)	IgE positiva (%)	Glicosilado
Api m 1	Fosfolipasa A2	16	7-15	95	SI
Api m 2	Hialuronidasa	43	1-3	50	SI
Api m 3	Fosfatasa ácida	45	1	37	SI
Api m 4	Melitina	2.8	35-50	29	NO
Api m 5	Dipeptidilpeptidasa IV	102	1	60	SI
Api m 6	Inhibidor de proteasa	8	1-2	42	NO
Api m 7	Proteasa	39	<1	80	SI
Api m 8	Carboxilesterasa	70	<1	?	SI
Api m 9	Carboxipeptidasa	60	?	?	SI
Api m 10	Icarapina	50-55	?	50	SI
Api m 11	Proteína mayor de la jalea real	50-60	?	15/34	SI
Api m 12	Vitelogenina	200	?	40	SI

De todos los alérgenos descritos hasta el momento, hoy por hoy son Api m 1, Api m 2 y Api m 4, los mejor conocidos y los que están disponibles comercialmente hasta la fecha.

Fosfolipasa A2 (Api m 1):

Esta considerado el alérgeno más importante y potente del veneno de abeja desde 1976 (17). Es la enzima más abundante y mejor conocida del veneno de abeja.

Su caracterización revela una glicoproteína de 16 kDa, que contiene 134 aminoácidos, capaz de sensibilizar a la gran mayoría de los pacientes alérgicos al veneno de abeja (18,19) .

Su actividad enzimática es causante de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana que produce un aumento significativo del ácido araquidónico y de leucotrienos, responsables éstos de la broncoconstricción, la producción

de moco y la permeabilidad vascular (4). Actúa sinérgicamente con la melitina, que al aumentar la permeabilidad de las membranas, permite la exposición del lugar catalítico de Api m 1 en los fosfolípidos (20).

La fosfolipasa A2 fue clonada en 1989 (21) y posteriormente, fue expresada en forma recombinante a través de un sistema procariótico utilizando la bacteria *E. coli* en 1992, siendo su actividad enzimática similar a la forma natural purificada (22), así como su reactividad cutánea (23).

Hialuronidasa (Api m 2):

Es un enzima glicosilada de 43 kDa, compuesta por 349 aminoácidos, capaz de sensibilizar aproximadamente al 50% de los pacientes alérgicos al veneno de abeja, por lo tanto es considerado un alérgeno mayor del veneno de abeja (19,24).

La hialuronidasa de abeja comparte un 55% de identidad de secuencia con la hialuronidasa de los vespídidos (25), pudiendo explicar la reactividad cruzada entre los mismos, aunque recientemente se postula la implicación de los determinantes carbohidratados como responsable de la doble sensibilización (26).

Es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico en el tejido diana, favoreciendo la penetración de los demás componentes del veneno (4).

La hialuronidasa es aislada en 1984 (27) y clonada en 1993 (28), se produce en forma recombinante en sistema procariota (*E.Coli*) y eucariota (Baculovirus), siendo este último sistema el que posee una actividad enzimática y una capacidad de unión a IgE similar a la del alérgeno natural purificado (24).

Melitina (Api m 4):

Consiste en el péptido más abundante del veneno de abeja, constituido por 26 aminoácidos con un peso molecular muy bajo (2.84 kDa). Está considerado una excepción como fuente alergénica del veneno de himenópteros al no ser un alérgeno proteico (25).

Schröder y cols. alcanzaron su síntesis en 1971 (29) y en estos años se confirmó que la melitina era un alérgeno en preparaciones altamente purificadas, con la detección de anticuerpo IgE específicos a través de test de radioalergoabsorción (RAST) (30). Está considerado un alérgeno minoritario (sensibiliza a < 50% de los pacientes alérgicos al veneno de abeja) con un prevalencia de sensibilización que varía en torno al 22.9%-29% (19,30).

La melitina es el principal componente tóxico del veneno de abeja porque posee un potente efecto citolítico y hemolítico, desencadenando la lisis de células como mastocitos y basófilos con la consecuente liberación de sus mediadores. Es, además, un potente activador de la fosfolipasa A2, siendo la lisis celular mayor cuando ambas actúan de forma sinérgica (31). Se ha descrito

también un efecto antimicrobiano y antivírico. La melitina almacenada en el saco del veneno, en solución acuosa, forma agregados en tetrámeros que pueden disociarse en monómeros según diferentes condiciones del medio (32). Müller encuentra en su forma de tetrámero una posible explicación para la inducción de anticuerpos IgE específicos (10).

En la actualidad está disponible de forma sintética.

Otras proteínas del veneno de abeja han sido descritas como alérgenos capaces de sensibilizar a los pacientes alérgicos al veneno de abeja:

Fosfatasa ácida (Api m 3): enzima glicosilada con un peso molecular de 43 kDa. Este alérgeno es considerado por algún autor como el tercer alérgeno mayor del veneno de abeja (15). Su prevalencia de sensibilización al alérgeno purificado nativo es del 60% en sueros de los pacientes alérgicos al veneno de abeja, el cual disminuye hasta el 37% cuando se usa la proteína recombinante (33). Sin embargo, en una reciente publicación, la sensibilización a la proteína recombinante se detecta en el 50% de los pacientes estudiados (19).

Dipeptidilpeptidasa IV (Api m 5): es una de las proteínas de mayor peso molecular (102 kDa) del veneno de abeja (19). Enzima glicosilada, con una prevalencia de sensibilización descrita a la molécula recombinante del 58.3% y responsable de la reactividad cruzada entre abejas y avispa (34).

Inhibidor de Proteasa (Api m 6): Es uno de los pocos alérgenos no glicosilados del veneno de abeja, posee un bajo peso molecular (8 kDa) y es considerado como un alérgeno minoritario. La frecuencia de reconocimiento en su forma purificada natural fue del 40%, usando el método Inmunoblot (35), sin embargo, solo mostraron reactividad IgE específica frente a la proteína recombinante un 26% de los pacientes alérgicos (36).

Proteasa (Api m 7): Proteína glicosilada de 39 kDa, cuya actividad enzimática se desconoce. Posee un dominio de proteína morfogenética ósea (CUB) añadido al dominio tirosin, que la diferencia de la proteasa del veneno de avispa y abejorro. En estudios de Inmunoblot se detecta la unión de IgE específica del 80% del suero estudiado (37).

Carboxilesterasa (Api m 8) y Carboxipeptidasa (Api m 9): Alérgenos de 70 y 60 kDa, respectivamente. Existen pocos datos de estos dos alérgenos. En relación al porcentaje de sensibilidad, solo encontramos descrito para Api m 8, que en 28 pacientes alérgicos al veneno de abeja se detecta IgE específica a la proteína recombinante en el 46% de los sueros, por método ELISA (38).

Icarapina (Api m 10): Proteína rica en carbohidratos con función aún desconocida. Ha demostrado ser un alérgeno genuino del veneno de abeja con una potencia de sensibilización en torno al 50-61.8% independientemente de la reactividad por carbohidratos. Se ha detectado una infrarrepresentación de este alérgeno en los extractos terapéuticos de veneno de abeja (19,39).

Proteína mayor de la jalea real (MRJP) (Api m11): Son proteínas glicosiladas genuinas del veneno de abeja que constituyen parte de la jalea real, alimento de aquellas larvas destinadas a convertirse en abeja reina. Esta molécula se presenta con dos isoalérgenos MRJP 8 y MRJP 9. La prevalencia de sensibilización en su forma natural es del 50% para MRJP8 y del 60% para MRJP 9 y parece que la contribución de los carbohidratos está presente, ya que en su forma recombinante se muestran una potencia de sensibilización mucho menor, del 15% y 34% respectivamente (40).

Vitelogenina (Api m 12): Es la proteína con mayor peso molecular (200 kDa) del veneno de abeja hasta donde se conoce. Está involucrada en el almacenamiento de la grasa y se encuentra en todos los animales ovíparos. Puede estar implicada en la reactividad cruzada con vespídos ya que es un alérgeno también presente en este veneno (Ves v 6). Las de himenópteros son las primeras vitelogeninas identificadas como componentes de venenos. Recientemente se ha demostrado que aproximadamente el 40% de los pacientes alérgicos al veneno de abeja presentaban IgE específica a la proteína recombinante (41).

1.3. Enfermedad alérgica por veneno de *Apis mellifera*.

La alergia a veneno de himenópteros es una reacción de hipersensibilidad mediada por anticuerpos de tipo IgE. Este tipo de reacción alérgica conlleva un proceso de dos etapas que consiste en una fase de sensibilización y otra de reacción.

Después de que una abeja ha inyectado el veneno en la piel, las células presentadoras de antígenos (CPA) captan los alérgenos de veneno y los procesan.

En los nódulos linfáticos se produce la interacción de las CPA con los linfocitos T helper precusores (Th0), que en presencia de ciertas citocinas transforman los Th0 en linfocitos T helper tipo 2 (Th2). Estas células

Th2, por mediación de la IL-4 y IL-13, actúan sobre los linfocitos B y promueven la síntesis de anticuerpos IgE específicos al alérgeno.

Si se produce un segundo contacto con el alérgeno, se iniciaría la segunda fase de la reacción alérgica, en la cual, el alérgeno se uniría a dos moléculas de IgE, fijadas en la superficie de basófilos y mastocitos, y como consecuencia de esta unión se inicia la liberación de los llamados mediadores preformados (histamina y factores quimiotácticos) y la síntesis de otras formadas de novo (prostaglandinas y leucotrienos), que ejercen su acción sobre diversos órganos (42).

Se estima que entre un 56.6%-94.5% de la población adulta recuerda haber recibido

al menos una picadura de himenóptero, dependiendo del clima donde residan, y un tercio de ellas han sido por abeja (43).

La frecuencia de reacciones locales por picadura de himenópteros se mueve entre el 2.4 y 26.4%, mientras que la de reacciones sistémicas lo hace entre 0.5 y el 3.3%

1.3.1. Presentación clínica.

Las manifestaciones clínicas por una picadura de abeja abarcan desde una reacción local normal o extensa hasta una reacción sistémica

1.3.1.1. Reacciones Locales:

Las reacciones locales normales son las más frecuentes y consisten en inflamación, enrojecimiento, dolor y picor en la zona de la picadura, que ceden de forma espontánea en horas. Aquellas reacciones locales con un diámetro mayor de 10 cm, que pueden abarcar dos articulaciones contiguas, y que duran

1.3.1.2. Reacciones Sistémicas:

Las reacciones sistémicas (RS) o generalizadas comprenden los síntomas clásicos de la anafilaxia con menor o mayor gravedad. Las reacciones anafilácticas pueden afectar a la piel, aparato respiratorio, gastrointestinal y/o cardiovascular.

Se han utilizado diferentes clasificaciones para valorar la gravedad de la anafilaxia, una de ellas es la propuesta por Müller, que clasifica en 4 grados de intensidad creciente (4) (Anexo I).

La instauración de las reacciones sistémicas graves son rápidas, por lo general dentro de los primeros 10 minutos tras una picadura (46).

En general los niños presentan síntomas cutáneos aislados con más frecuencia que los adultos y menos afectación cardiovascular.

(44). En un estudio epidemiológico a nivel nacional, en 2005 con 4.991 pacientes, fueron diagnosticados de alergia a himenópteros el 1.54% (77 pacientes), siendo la abeja responsable del 45.5% de las reacciones y el 18.7% de los casos fueron apicultores o familiares (2).

generalizada, que puede ser potencialmente mortal.

más de 24 horas, se definen como reacciones locales extensas (RLE). Estas reacciones no suponen un riesgo para la salud salvo en el caso excepcional de picaduras dentro de la cavidad oral que pueden producir compromiso respiratorio por obstrucción de la vía aérea superior (45).

En aquellos pacientes que presentan síntomas cardiovasculares sin afectación cutánea hay que pensar en la posibilidad de que presenten mastocitosis sistémica indolente (47).

Se pueden desencadenar reacciones inusuales o atípicas (rabdomiólisis, hemólisis, trombocitopenia, insuficiencia renal aguda, hepatitis), generalmente de inicio tardío, así como reacciones tóxicas por múltiples picaduras (16). Se ha publicado recientemente un caso de síndrome nefrótico en un niño que sufrió más de 200 picaduras de abeja (48), y también se han publicado casos de síndrome de Kounis (vasoespasma coronario en el contexto de una reacción anafiláctica, causado por la acción directa de los mediadores mastocitarios sobre las arterias coronarias) en relación con anafilaxia por picadura de abeja (49,50).

1.3.1.2.1. Factores de riesgo

No se dispone de ningún parámetro para predecir el tipo de reacción que sufriría un paciente sensibilizado a veneno de himenóptero en caso de ser picado de nuevo (51). En aquellas personas sensibilizadas, sin reacción previa, se ha estimado que el 17% pueden desarrollar reacciones generalizadas ante nuevas picaduras (52).

Una serie de características han sido descritas como factores de riesgo que pueden influir en la severidad de la reacción ante una nueva picadura.

Estos factores son :

- **La gravedad de la reacción previa:** tras una reacción local extensa, se estima que el 5%-10% de ellos sufrirán una reacción generalizada en la próxima picadura, que puede aumentar hasta el 79% de probabilidad si la reacción previa fue generalizada grave (53).
- **La edad adulta y el sexo masculino:** debido a un diferente grado de exposición, los hombres adultos son picados con mayor frecuencia que las mujeres.
- **Enfermedades concomitantes:** el riesgo es mayor cuando el paciente padece enfermedades cardiovasculares o asma y cuando sigue tratamiento con fármacos Beta-bloqueantes o inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina (IECA) (54,55).
- **Niveles elevados de la concentración basal de triptasa:** un aumento de su valor de 4.25 mg/L a 20 mg/L aumentará el riesgo de una reacción sistémica severa por picadura en aproximadamente 3.8 veces (55).
- **La Mastocitosis o síndrome de activación mastocitaria clonal** (56).
- **El tipo de insecto:** la alergia a veneno de abeja se ha considerado un factor de riesgo para el desarrollo de RS en futuras picaduras, confirmado en un estudio que realizó test de repicadura (57). Sin embargo, un estudio multicéntrico reciente, con casi 1.000 pacientes, observa mayor riesgo de sufrir RS tras picaduras espontáneas en los pacientes alérgicos a vespídos (55).
- **En relación al grado de exposición y el número de picaduras de abeja,** los apicultores y sus familias representa una población única, con un riesgo elevado de sufrir alergia al veneno de abeja (58); hasta el 31% refieren RLE y del 14% al 38 % sufren RS tras picadura de abeja (59). Müller y cols. analizan los factores de riesgo en apicultores y sus familias encontrado una mayor prevalencia de RS en el primer año de actividad normalmente en los meses de invierno, en aquellos con <10 picaduras al año y con antecedentes de atopía o asma durante el trabajo en las colmenas. Se correlaciona con protección sufrir más de 200 picaduras anuales y no parece haber diferencias de la severidad de la reacción entre pacientes apicultores y no apicultores (59). En un estudio británico reciente, realizado a través de cuestionarios, se sugiere que el sexo femenino, los antecedentes familiares de alergia a veneno de abeja, el uso de premedicación con AH antes de trabajar en las colmenas, así como, más de dos años de actividad antes de la RS, pueden ser factores de riesgo para el desarrollo de RS entre apicultores (60).

1.3.2. Diagnóstico.

El diagnóstico de la alergia a veneno de abeja está basado en una historia clínica sugerente de una reacción alérgica tras una picadura y

la demostración de anticuerpos IgE específicos frente al veneno de abeja.

1.3.2.1. Historia Clínica.

Es fundamental realiza una buena historia clínica. En ésta se deben recoger las características y la intensidad de los síntomas presentados, el tiempo de latencia entre la picadura y el inicio del cuadro, el tratamiento urgente que ha necesitado el paciente y la existencia de otras enfermedades, así como el tratamiento habitual, ya que puede incrementar la gravedad de la reacción.

para ello se debe indagar acerca del número de picaduras sufridas, la tolerancia a picaduras posteriores a la reacción, si practica actividades al aire libre, su profesión, y en el caso de la apicultura saber si se dedica de forma profesional, a tiempo parcial o es familiar de apicultor.

También es importante explorar el grado de exposición al que está sometido el paciente,

La presencia de aguijón en la lesión orienta a favor de una picadura de abeja, pero no es un dato patognomónico.

1.3.2.2. Pruebas Complementarias.

Una vez establecido que el paciente ha presentado una reacción generalizada tras la picadura de abeja y ante el riesgo de que ésta se repita, es imprescindible demostrar que se encuentra sensibilizado a este veneno.

Para demostrarlo se pueden realizar métodos *in vivo* o *in vitro*.

1.3.2.2.1. Pruebas *in vivo*

Las pruebas cutáneas como método diagnóstico comenzaron a emplearse en el siglo XIX y, sin grandes modificaciones, se han continuado aplicando hasta nuestros días. Tanto las pruebas

intraepidérmicas como las intradérmicas están orientadas al estudio de reacciones inmediatas de tipo I.

1.3.2.2.1.1. Pruebas Cutáneas

La prueba diagnóstica recomendada para confirmar la sensibilización al veneno de abeja es la prueba intradérmica (ID), puesto que la intraepidérmica tiene una baja sensibilidad (53).

realizar ID a las diferentes concentraciones de forma simultánea (61).

Es una prueba rápida, sencilla y barata. Se realiza en el antebrazo usando concentraciones seriadas desde de 0.001µg/ml hasta 1µg/ml, aunque cuando la reacción es grave se puede iniciar a concentración más baja de 0.0001 µg/ml (53). Recientemente se ha confirmado la seguridad de

La sensibilidad de la ID, con historia clínica compatible, es superior al 95%, sin embargo la especificidad, puede ser considerablemente inferior (70-75%) probablemente debido a la gran cantidad de sustancias irritantes en el veneno de abeja. Aproximadamente hasta un tercio de las personas alérgicas al veneno pueden presentar pruebas cutáneas negativas (16).

1.3.2.2.1.2. Extractos alergénicos del veneno de *Apis mellifera*

El extracto de veneno de abeja es el principio activo que permite llevar a cabo el diagnóstico correcto para identificar el insecto *Apis mellifera* como el causante de la alergia y poder aplicar el tratamiento adecuado.

El extracto del veneno de abeja se fabrica

en base a veneno purificado, estandarizado según la actividad enzimática de los alérgenos mayoritarios (fosfolipasa A2 e hialuronidasa) y la cuantificación de la proteína total como la medida del principio activo para su dosificación; sin consideración del contenido alergénico individual (62).

1.3.2.3. Pruebas *in vitro*

Las pruebas cutáneas y serológicas deben usarse de forma complementaria para poder diagnosticar al máximo número de pacientes.

Actualmente hay disponibles distintos métodos para la determinación de IgE específica frente a extracto completo del veneno de abeja y sus moléculas alergénicas (Figura 1).

1.3.2.3.1. Determinación de IgE específica a veneno completo de *Apis mellifera*. Método InmunoCAP FEIA®.

La determinación de sIgE frente a veneno completo de abejas se realiza mediante InmunoCAP FEIA® (enzimo-fluoro inmunoensayo, de tipo sándwich). El extracto alergénico o alérgeno de interés (veneno de abeja) está unido químicamente a una matriz de celulosa (fase sólida) confinada en el interior de una cápsula de plástico (CAP). Este diseño en cápsula aumenta la eficacia en los procesos de unión de la IgE del suero al alérgeno y la eliminación por lavado de las uniones inespecíficas de componentes no

IgE del suero. Posteriormente, un anticuerpo anti-IgE marcado enzimáticamente (Beta-galactosidasa) es añadido a la muestra. La unión IgE (suero)-anti-IgE marcada es revelada por reacción enzimática sobre la Beta-galactosidasa, provocando una señal fluorescente, proporcional a la cantidad de IgE específica presente en el suero. Esta concentración es cuantificada (en kU/L) por interpolación del valor en curva patrón de sueros con concentraciones de IgE conocidos (rango 0-100 kU/L) (63).

1.3.2.3.2. Determinación de IgE específica a alérgenos del veneno de *Apis mellifera*. Método ADVIA Centaur®.

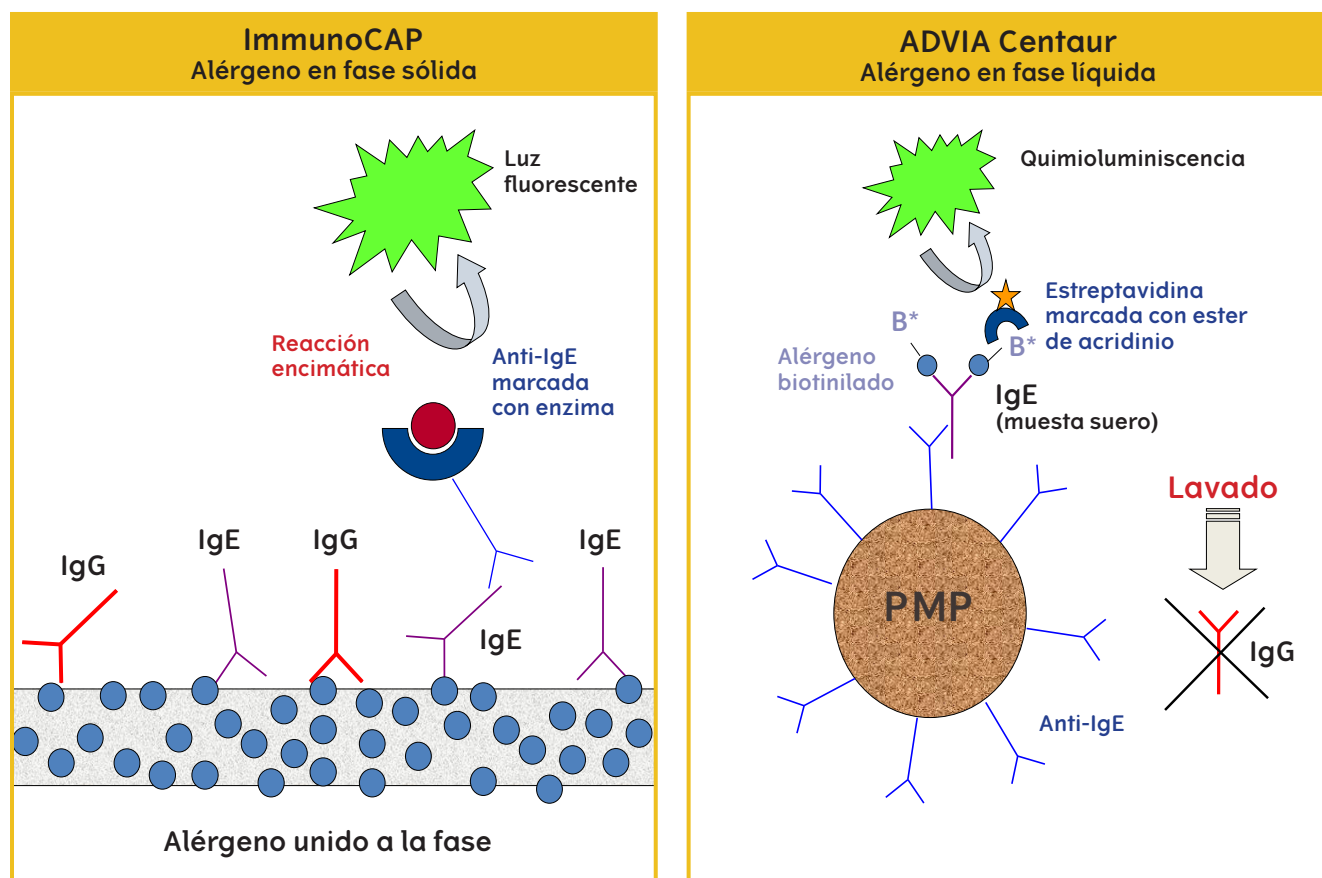
La determinación de la IgE en plataforma ADVIA Centaur® (Siemens, Tarrytown, NY, EE.UU.) se realiza mediante inmunoensayo automatizado, de tipo sándwich en fase inversa, que utiliza tecnología de quimioluminiscencia.

La fase sólida está constituida por partículas paramagnéticas acopladas covalentemente con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana. La IgE del suero es capturada en la fase sólida y el componente no IgE del suero es eliminado por sucesivos lavados. El alérgeno marcado con biotina reacciona con la IgE capturada en la fase sólida. La unión del alérgeno marcado con la IgE capturada en la fase sólida

se detecta indirectamente mediante reacción quimioluminiscente (unión éster de acridinio-estreptoavidina-biotina). La señal de la reacción (en unidades relativas de luz) es proporcional a la concentración de IgE específica frente al alérgeno marcado.

Este método es muy útil en la determinación de IgE específica a moléculas alergénicas del veneno, debido a la ausencia de interferencias de otras inmunoglobulinas, su amplio rango lineal y la baja cantidad de alérgeno (25uL por alérgeno) necesaria por ensayo (64).

Figura 1. Arquitecturas de los ensayos de determinación de IgE ImmunoCAP® y ADVIA Centaur®.



1.3.2.3.3. Rentabilidad del diagnóstico por componentes.

El concepto de utilizar alérgenos aislados para determinar el perfil de sensibilización de los pacientes se denominó "diagnóstico por componentes", y se conoce popularmente por sus siglas anglosajonas (CRD).

Éste permite realizar un diagnóstico mucho más sensible y específico, solucionando en gran parte el problema de la polisensibilización, al discriminar entre alérgenos genuinos y marcadores de reactividad cruzada.

Entre el veneno de abeja y avispa, si se utiliza el extracto completo, puede existir doble positividad en el 25%-40% de los casos, aunque la historia clínica sea compatible para un solo veneno (53). Este fenómeno, atribuible a reactividad cruzada puede ser debido a la homología de las proteínas (sobre

todo por hialuronidasa, dipeptilpetidasa o vitelogeninas) o al reconocimiento por la IgE de su fracción glicosilada, con escasa o nula relevancia clínica (20).

El uso de proteínas recombinantes, libres de carbohidratos, ayuda a diferenciar la reactividad cruzada de la verdadera sensibilización en el caso de alérgenos glicoproteicos (18). En el caso de reactividad cruzada debida a homología de la fracción proteica, el CRD también permite identificar sensibilización específica a estas proteínas, que son origen de falsos positivos cuando se emplea el veneno completo.

En el CRD del veneno de abeja se ha observado que el uso del alérgeno de Api m 1, presenta diferente sensibilidad según la técnica y fuente utilizadas (65-68). A favor del uso de

la proteína nativa, Korošec y cols. describen mayor sensibilidad que con el alérgeno recombinante en pacientes con reacciones más graves (69).

Las discrepancias diagnósticas descritas podrían ser parcialmente resueltas

1.3.2.4. Otras pruebas *in vitro*.

Estas pruebas ayudan indirectamente al diagnóstico o lo complementan en casos especiales. No siempre están disponibles para uso asistencial de rutina.

- **Western Blot:** de utilidad para identificar alérgenos no conocidos.
- **ELISA de inhibición/Blotting de inhibición:** ayudan a resolver problemas generados por la reactividad cruzada.

1.3.3. Tratamiento.

El tratamiento de las reacciones alérgicas por picaduras de himenópteros combina el tratamiento sintomático (farmacológico) y el tratamiento etiológico. De éste último

1.3.3.1. Medidas de Prevención.

Las abejas en comparación con otros himenópteros son relativamente dóciles, su agresividad depende de determinados factores (temperatura y humedad del aire, hora del día, olores, colores, ruidos, especies) y aumenta cuando se sienten amenazadas, por lo que debe de evitarse circunstancias que puedan hacer que se sientan en peligro (4).

Los pacientes alérgicos deben extremar las precauciones para evitar picaduras y estar advertidos sobre los riesgos a los que están expuestos. Deben estar provistos de la medicación de emergencia, como los autoinyectores de adrenalina, y estar

incorporando al panel diagnóstico nuevos alérgenos específicos recombinantes del veneno de abeja (rApi m 2, rApi m3, Api m 4, rApi m5, rApi m10) (19), así como determinantes carbohidratados aislados bromelina, MUXF3, peroxidasa y oxidasa del ac. Ascórbico) (70,71).

- **Activación de basófilos:** complementa la información de lo que ocurre en la fase celular de la cascada inflamatoria.
- **Test de liberación de histamina:** poco empleado por su baja especificidad.
- **Triptasa basal:** determinación habitual en la asistencia alergológica hospitalaria, forma parte de la valoración elemental del paciente con riesgo de anafilaxia.

forman parte las medidas de prevención, para evitar futuras picaduras y el tratamiento potencialmente curativo como es la inmunoterapia específica.

adiestrados en su empleo. Normalmente se aconseja desprender el aguijón de la piel sin apretar para no presionar el saco del veneno, pero lo importante es retirarlo rápidamente, siendo el método irrelevante (45,72).

A los apicultores y familiares que han presentado RS tras picadura de abejas se les aconseja abandonar la apicultura, pero en la mayoría de los casos permanecen en su actividad, no sólo porque representa su fuente de ingresos sino también por la afición y afecto a las abejas (73). Se les aconseja el uso de ropa protectora que cubra todo su cuerpo y no ir solos a las colmenas.

1.3.3.2. Tratamiento de Urgencias.

El tratamiento de urgencias ante una reacción sistémica por picadura de abeja se aborda siguiendo el protocolo específico ante una anafilaxia (74). La adrenalina es el fármaco de elección, por su rápido efecto y potencia. La

dosis inicial suele ser de 0.3-0.5 mg en adultos y de 0.01 mg/kg de peso en niños. También se usan corticoides, antihistamínicos y si es preciso, según la gravedad, broncodilatadores, coloides y drogas vasoactivas (75).

1.3.3.3. Inmunoterapia.

La inmunoterapia es el pilar fundamental en el tratamiento etiológico de las reacciones alérgicas por picaduras de himenópteros, capaz de modificar el curso natural de la enfermedad.

En el siguiente capítulo se recogen los aspectos más relevantes de la inmunoterapia con veneno de abeja (ITVa).

1.4. Inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera*.

1.4.1. Concepto.

Consiste en la administración de cantidades gradualmente crecientes de un extracto de veneno de *Apis mellifera*, hasta alcanzar la dosis que se considera óptima (aquella que induce un efecto clínicamente relevante en la mayoría de los pacientes sin dar lugar a efectos adversos inaceptables) (76).

El objetivo de este tratamiento es proteger de una nueva reacción sistémica, potencialmente mortal, tras una picadura de abeja y mejorar de forma significativa la calidad de vida del paciente (77).

1.4.2. Mecanismo de Acción.

La inmunoterapia es capaz de modular la respuesta inmune, produciendo cambios celulares y moleculares que pueden clasificarse en 4 grupos (78):

- Descenso en la actividad de mastocitos y basófilos desde estadios precoces.
- Generación de células Treg y Breg alérgeno específicos (que producen IL-10, TGF- β , CTLA-4 y PD-1) y supresión de células T efectoras alérgeno específicas (Th1 y Th2) con desviación hacia la respuesta Th1.
- Cambio en el perfil de anticuerpos, con un descenso de los niveles de IgE específica y aumento de la IgG4.

- Descenso en el recuento de mastocitos tisulares y eosinófilos de forma más tardía.

El aumento de la citoquina IL-10 y el anticuerpo bloqueante IgG4, también se ha demostrado en apicultores expuesto a altas dosis de veneno de abeja por múltiples picaduras que han desarrollado tolerancia natural (79,80).

Una cuestión no resuelta en los pacientes en tratamiento con inmunoterapia es la identificación y validación de biomarcadores predictivos de la respuesta clínica. Hasta ahora, los estudios que encuentran diferencias individuales en la seguridad y la eficacia de la ITV no han tenido en cuenta la asignación de pacientes a subgrupos definidos por un fenotipo de sensibilización distinta (78).

1.4.3. Indicaciones.

La inmunoterapia frente al veneno de himenópteros (ITV) es el modelo de toda inmunoterapia específica frente a alérgenos, dada su eficacia.

si se considera que el riesgo de reacción sistémica grave es elevado, siempre que se demuestre un mecanismo IgE mediado.

Existe una indicación absoluta de inmunoterapia

En la Tabla 2 se resumen las indicaciones que recogen las guías actuales.

Tabla 2. Indicaciones de la ITV (54).

Tipo de reacción	Pruebas Diagnósticas (P. Cutáneas e IgE)	Decisión de iniciar IT
Anafilaxia	Positivas	SI
	Negativas	NO
Urticaria si hay factores de riesgo ^a o afectación de la calidad de vida	Positivas	SI
	Negativas	NO
Local Extensa ^b	Positivas	SI NO
	Negativas	NO

^aFactores de riesgo: exposición elevada, como en el caso de los apicultores, y sufrir otras patologías concomitantes (cardiovascular o mastocitosis).

^bEn las reacciones locales extensas con compromiso vital y/o afectación de la calidad de vida + alta exposición + estudio alergológico positivo podría considerarse la posibilidad de ITV. En este caso, algunos autores defienden la utilidad de indicar ITV cuando el paciente presenta un alto riesgo de repicadura (81,82).

1.4.4. Extractos para la ITVa.

Los primeros tratamientos con inmunoterapia estaban constituidos por extractos de cuerpo entero de abeja. A finales de los años 70, se comenzaron a utilizar extractos de su veneno, que demostraron superioridad en eficacia con respecto a placebo y los extractos de cuerpo entero. Al mismo tiempo se comenzó a controlar el proceso de fabricación y actualmente el extracto del veneno de abeja está estandarizado en base a la cuantificación de proteína total y la actividad enzimática de los alérgenos mayoritarios, sin consideración del contenido alérgico individual (62).

acuoso. Sin embargo, no hay que olvidar la posibilidad de los extractos depot de producir reacciones tardías, así como la ventaja de los extractos acuosos de poder ser administrados en pautas rápidas (83,84).

En la actualidad, podemos utilizar dos tipos de extractos para este tipo de inmunoterapia: extractos acuosos, los más frecuentemente utilizados, y extractos depot, adsorbidos en hidróxido de aluminio. Ambos presentan un perfil similar de eficacia, con una mejor tolerancia del extracto depot sobre el

En Europa, con una eficacia comparable, se pueden utilizar dos tipos de extractos acuosos (purificados o no purificados-nativos) cuando la fase de inicio tiene un rápido incremento de dosis (ultra-rush, rush o cluster). Los extractos purificados son productos procedentes del veneno nativo, al que se ha desprovisto de la fracción de menor peso molecular (punto de corte: 10000 Da). En el proceso de purificación se eliminan aminas vasoactivas como dopamina, histamina y serotonina y pequeños péptidos, como apamina, cininas y péptidos de degranulación de mastocitos (85).

1.4.5. Pautas de inicio de la ITV.

Existen muchos protocolos para el inicio de la ITV, pero clásicamente se describen 4 tipos en función de la rapidez con la que se alcanza la dosis óptima de mantenimiento (86):

- Convencional: consiste en la administración una dosis por visita, con un intervalo semanal entre cada una de ellas, hasta alcanzar la dosis de mantenimiento. En general, el número de dosis es elevado entre las 7-9 semanas hasta las 14-20 semanas.
- Agrupadas (Cluster): se administran varias dosis en una misma visita, con un intervalo de 30-45 minutos entre cada dos dosis y

con un intervalo semanal entre cada visita, alcanzando las dosis de mantenimiento en 2-6 semanas.

- Rápidas (Rush): Consiste en la inyección diaria de varias dosis, administrando cada grupo de dosis en días consecutivos. Se alcanza la dosis de mantenimiento en 4-7 días.
- Ultra-rápidas (Ultra-rush): administración sucesiva de varias dosis en un mismo día hasta alcanzar la dosis máxima en 12 a 48 horas. Se usan exclusivamente en pacientes de muy alto riesgo o en ensayos clínicos.

1.4.6. Seguridad de la ITVa.

Durante la inmunoterapia con veneno, pueden ocurrir reacciones locales extensas en el lugar de la inyección y reacciones sistémicas, incluso severas, que requieran tratamiento urgente e interrupción del tratamiento. Actualmente no existe ninguna prueba fiable capaz de predecirlas.

Sabemos que la ITVa se tolera peor que la ITV de vespídos, aunque la causa aún permanece desconocida. La tasa global de efectos adversos que una revisión sistemática reciente le asigna a la ITVa con extractos acuosos es del 25% (87) y del 14,2 % según otra revisión que considera extractos acuosos y depot agrupados (88).

Existen pocos estudios de tolerancia para pacientes alérgicos al veneno de abeja

y es difícil su comparación porque usan diferentes pautas de inicio, extractos y clasificaciones para las RS. En el caso de los apicultores, el único estudio que compara la tolerancia de la ITVa con respecto a pacientes con exposición no profesional y a familiares de apicultores (exposición intermedia), describe una tasa de efectos adversos significativamente menor en los apicultores (59). Sin embargo, en la práctica clínica habitual algunos apicultores suponen un gran desafío para alcanzar la tolerancia a ITVa.

En la tabla 3 se recogen las tasas de RS con ITVa en estudios destacados de seguridad, aunque ninguno de estos trabajos tuvo en cuenta el perfil de sensibilización de los pacientes.

Tabla 3. Porcentaje de RS con ITV_a en estudios de seguridad destacados.

Autor	Año	Pacientes	Tipo de estudio	Pacientes Abeja	Pauta de Inicio	RS (%) ITV _a
Biló (85)	2012	80	Prospectivo	80	Rush	15
Patella (89)	2012	24	Prospectivo	8	Convencional	4
		25		9	Rush	8
		27		9	Ultrarush	0
Kohli-Wiesner (90)	2012	94	Retrospectivo	65	Ultrarush	20
Goldberg (91)	2011	179	Retrospectivo	93	Rush	31
Rüeff (92)	2010	680	Prospectivo	207	Conv/clus/rush	16
Sánchez-Machín (93)	2010	54	Retrospectivo	54	Cluster	1.2
Quercia (94)	2006	70	Retrospectivo	19	Rush	37
				49	Cluster	4
Sánchez-Morillas (95)	2005	44	Retrospectivo	12	Rush	8.3
Schiavino (96)	2004	57	Prospectivo	9	Ultrarush	11
Birnbaum (97)	2003	258	Retrospectivo	90	Ultrarush	30
Mosbech (98)	2000	840	Prospectivo	212	Conv/clus/rush	24
Moreno (99)	1999	70	Retrospectivo	26	Cluster	25

1.4.6.1. Factores de riesgo asociados a la seguridad de la ITV.

El factor más importante asociado significativamente con las RS durante el inicio de la inmunoterapia es la alergia al veneno de abeja (59).

Sin embargo, existen otros factores de riesgo asociado a la inmunoterapia con venenos que también pueden estar presentes en pacientes alérgicos al veneno de abeja y deben conocerse y tenerse en cuenta ante la decisión de iniciar la inmunoterapia.

- **Fase de Inicio:** Los efectos adversos ocurren con más frecuencia en la fase de inicio de la ITV que en la fase de mantenimiento (98). El rápido incremento de dosis durante esta fase se ha relacionado con un aumento de reacciones (92). Contrasta con los resultados de estudios retrospectivos más pequeños que indican que las pautas rush y ultrarush son toleradas igual o mejor que las pautas lentas; sin embargo, existen evidencias respecto a la tolerancia de los diferentes
- **Género femenino:** en un estudio que consideró todas las RS, las mujeres tienen más riesgo de RS (98), sin embargo, en un estudio multicéntrico reciente, cuando se han considerado las RS severas no se ha observado un aumento del riesgo de reacción (92).
- **La concentración basal de triptasa >11.4 µg/l** se correlaciona significativamente con la frecuencia de efectos adversos durante la fase de inicio, sin embargo su poder predictivo es notablemente mayor en pacientes que reciben ITV con vespídos que con abeja (92).
- **Síndrome de activación mastocitaria clonal:** los pacientes con mastocitosis sufren con

protocolos entre abeja y vespídos, siendo los protocolos ultrarush menos ventajosos para el tratamiento con veneno de abeja (100).

más frecuencia RS con ITV (101), sin embargo se ha observado con más frecuencia en los pacientes alérgicos a *Vespula* (47).

- **Medicación antihipertensiva:** en un estudio multicéntrico estaba asociada con un riesgo mayor de RS, sin embargo esta observación no se pudo atribuir a un medicamento específico (92). El tratamiento con IECA se ha relacionado con reacciones graves tras picadura y también con una mayor tasa de fracaso de la ITV (55,102), pero no se ha demostrado su papel en la incidencias de RS (103). Los beta-bloqueantes no parecen incrementar el riesgo de RS, pero pueden agravar y dificultar el tratamiento en el caso de reacción (104). Es cuestionable la interrupción de dichos fármacos en patología cardiaca grave, pero de forma individualizada cuando la patología lo permitiese se recomienda la retirada de ambos fármacos (105).
- **Otros factores** que se han asociado al riesgo de sufrir RS con la ITV son la edad avanzada, la presencia de niveles elevados de IgE específica a veneno en el suero, un periodo corto de tiempo entre la picadura y el inicio de la ITV, la existencia previa de rinitis alérgica y una reacción severa (grado Müller III-IV) con la picadura previa al diagnóstico (56,92,97,98).

1.4.7. Eficacia de la ITVa.

La eficacia de la ITV ha sido confirmada, a través de la tolerancia de picaduras espontáneas y picaduras realizadas en medio hospitalario, en dos metaanálisis y un estudio multicéntrico reciente (88,113,114).

La ITVa ofrece una protección frente a futuras picaduras en torno al 75-84% (45,86), comparable con los diferentes extractos (acuosos, depot) e incluso una semana después de alcanzar la dosis de mantenimiento (91). Sin embargo, la tasa de protección es mayor con la ITV de véspidos (115). Esta diferencia

Aparte de definir los factores de riesgo asociados a las RS con la ITV, se han propuesto otras estrategias para reducir los efectos adversos durante la inmunoterapia:

- **Premedicación:** el uso previo de un antihistamínico H1 ha demostrado que reduce el número y la gravedad de RLE, así como las RS leves como urticaria y angioedema. (106–108). Montelukast ha sido capaz de disminuir la incidencia de reacciones locales (109), y Omalizumab ha permitido la tolerancia en algunos pacientes, aunque son necesarios más estudios (110,111).
- **Uso de diferentes extractos:** se ha demostrado que los extractos purificados depot son mejor tolerados que los acuosos (83,94). Respecto al uso de extractos acuosos purificados y no purificados, Biló y cols. evidencian menor tasa de RS en el extracto purificado (85).
- Se están estudiando **otras estrategias** como las diferentes vía de administración sublingual e intralinfática y el uso de alérgenos modificado con la finalidad de incrementar la seguridad de este tratamiento (112).

de protección entre abeja y avispa (*Vespula*) es conocida desde hace décadas y se ha sugerido que puede estar relacionado por las diferencias en las cantidades y calidades de los venenos que se inyectan durante la picadura (116).

Recientemente un estudio multicéntrico prospectivo y otro estudio con gran número de pacientes encuentran diferentes factores de riesgo asociados a mayores tasas de fracaso con la ITV de abeja y véspidos (102,114).

1.4.7.1. Factores que influyen en la eficacia de la ITV_a.

- **La dosis de mantenimiento:** es recomendable, tanto en adultos como en niños, utilizar 100 µg de veneno, que puede equivaler a una o dos picaduras de abeja. Se recomienda utilizar una dosis mayor (200 µg o superior) ante la falta de protección con la dosis habitual y en poblaciones altamente expuestas como los apicultores (117,118).
- **El intervalo de administración:** se considera que 4-6 semanas es un intervalo adecuado para un tratamiento eficaz (76), no obstante se ha demostrado eficacia en estudios realizados en pacientes alérgicos a abejas y avispa cuando ésta se administra a intervalos de 3-4 meses (119,120).
- **La duración del tratamiento:** está aceptado comúnmente que debe ser de 3 a 5 años pero debe ser ajustada valorando el perfil de riesgo individual de cada paciente. En el caso de los apicultores la duración mínima debe ser 5 años y en aquellos pacientes con alta exposición o que hayan presentado RS durante el curso de la ITV, debe considerarse continuar con la ITV_a mientras ejerzan la apicultura (117).
- **La presencia de RS** durante el tratamiento con ITV se ha relacionado con el fracaso terapéutico (102), sin embargo esto no ha sido confirmado por otros estudios (91,114).
- **La concentración basal de triptasa** no se ha podido relacionar con el fracaso terapéutico, sin embargo puede depender del método de evaluación de la eficacia (114). No obstante, otro estudio consideró la concentración de triptasa >20 µg/l o sospecha de mastocitosis cutánea como un factor predictivo débil del fracaso de ITV (102).
- Recientemente, y con el avance del conocimiento de la composición molecular de los venenos, se ha propuesto la **ausencia o infrarrepresentación de algunos alérgenos** importantes (Api m 3 y Api m 10) en los extractos comerciales utilizados en la inmunoterapia como causa de fracaso terapéutico (19,39).

1.4.8. Monitorización de la ITV.

Para evaluar la respuesta a la ITV e identificar a los pacientes que no están protegidos, utilizamos herramientas de seguimiento *in vitro* e *in vivo*. Las más accesibles asistencialmente se citan a continuación:

- Cambios en la IgE e IgG4 específicas:

Traducen el cambio en la producción de inmunoglobulinas inducido por la inmunoterapia. Aunque no se encuentra una correlación con la tolerancia a nivel individual, la IgE específica incrementa en el inicio de la ITV, para luego ir disminuyendo a lo largo del tratamiento, así como el crecimiento de la IgG4 refleja la puesta en marcha de una respuesta fisiológica a la exposición alérgica (83). Un trabajo reciente ha demostrado que la producción de IgG4 frente a fosfolipasa A2 en

apicultores está confinada a la subpoblación de células B reguladoras, CD25+CD70+CD73-productoras de IL10 con actividad inmunorreguladora antiinflamatoria (121).

- Cambios en el tamaño de la pápula de la ID:

Fenómeno íntimamente ligado a los cambios en los niveles de IgE específica. Se ha objetivado una disminución e incluso negativización (en el 20% de casos) de las mismas tras completar 5 años de ITV (122).

- Test de repicadura controlada con insecto vivo:

Constituye el “gold standard” en la monitorización de la eficacia de la inmunoterapia con veneno de himenópteros,

ya que los métodos anteriores no nos permiten predecir la protección ante una picadura. Aunque algunos trabajos proponen la picadura espontánea como equivalente, se aceptan como sus debilidades la incertidumbre sobre la cantidad de veneno inyectado y la errónea identificación del insecto implicado. La repicadura controlada presenta además las fortalezas de ser programable, de dar la oportunidad de monitorizar la respuesta y controlar los posibles efectos adversos. Una vez suspendida la vacuna sirve para monitorizar

el grado de protección a lo largo del tiempo que permite identificar a aquellos pacientes que han perdido la protección y que deberían reiniciar el tratamiento (123).

Recientemente se ha diseñado una prueba de repicadura controlada que en vez del insecto vivo utiliza una microjeringa que inyecta 0.5 μ L de veneno puro a 2 mm de profundidad y cuyos resultados preliminares se corresponden a los de una picadura espontánea (124).

2. JUSTIFICACIÓN.

La sensibilización al veneno de himenópteros supone un importante problema de salud, no tanto por su prevalencia como por el riesgo de desencadenar una reacción anafiláctica cuando un paciente es picado por uno de estos insectos. El abordaje terapéutico de estos pacientes exige, además del tratamiento sintomático y urgente de la reacción experimentada por la picadura, el tratamiento etiológico mediante inmunoterapia específica con veneno de himenópteros.

La ITV de himenópteros es un tratamiento eficaz y seguro en la mayoría de los pacientes, aunque es conocido que el uso de ITV_a se asocia a mayor riesgo de aparición de RS al mismo tiempo que a una menor protección frente a las picaduras, cuando se compara con la inmunoterapia a vespídos. La causa de este hecho aún permanece desconocida (102).

Los extractos alergénicos disponibles en la actualidad para ITV_a se estandarizan en base a su actividad enzimática y a la cantidad total de proteínas, pero no consideran el contenido de los componentes alergénicos individuales del veneno. Por diferente proceso de fabricación existen en el mercado dos productos terapéuticos, un extracto acuoso nativo completo (no purificado) y otro purificado (sin componentes de bajo peso molecular como la melitina) (62).

El veneno de abeja es una mezcla compleja de proteínas alergénicas con función enzimática, junto con otras moléculas farmacológicamente activas responsables del dolor y la inflamación.

Hasta la actualidad se han identificado 12 alérgenos diferentes en el veneno de abeja (12). El más prevalente de ellos es la fosfolipasa A2 (Api m 1), con independencia del método utilizado en la detección de IgE (18,19,69). La hialuronidasa (Api m 2) es

un marcador de reactividad cruzada (24), que sensibiliza al 50% de los pacientes alérgicos al veneno de abeja (65). La melitina (Api m 4) es un péptido de 2,84 kDa (25) muy abundante en el veneno, al que se atribuye una baja alergenicidad (19).

Estos tres componentes alergénicos, que constituyen la mayoría del peso seco del veneno, son los mejor conocidos hasta el momento y los disponibles actualmente para uso clínico. Sin embargo, aún no ha sido determinada su relevancia real, ni la influencia sobre la seguridad y la eficacia de la ITV_a.

Mediante las técnicas habituales de diagnóstico, como la determinación de IgE frente a extracto completo resulta difícil explicar la mala tolerancia a la ITV_a en algunos pacientes, indistinguibles clínicamente de los demás, lo que supone no poder protegerlos frente a una futura nueva picadura. La posibilidad de identificar fenotipos de sensibilización a veneno de abeja proporcionada por el diagnóstico molecular, abre una vía para explorar el problema aún no resuelto de la mala tolerancia-escasa eficacia de la ITV_a.

En nuestra experiencia al analizar clínicamente los primeros pacientes a los que se les realizó diagnóstico molecular basado en IgE específica frente a Api m 1, Api m 2 y Api m 4, tuvimos la impresión clínica de que la sensibilización a Api m 4 podría jugar un papel importante en pacientes complicados como factor relacionado con la seguridad y tolerancia a la ITV_a. Este hecho sienta las bases de nuestro estudio.

Poder avanzar en este terreno nos permitiría ofrecer una mayor calidad asistencial a nuestros pacientes.



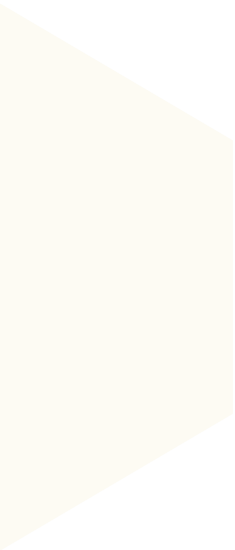
3. OBJETIVOS.

→ **Objetivos de la Fase 1 del estudio:**

- **1.-** Describir el perfil de sensibilización frente al veneno de *Apis mellifera* basado en los componentes alergénicos Api m 1, Api m 2 y Api m 4.
- **2.-** Conocer la importancia epidemiológica de las sensibilizaciones encontradas.
- **3.-** Comprobar si la IgE frente a Api m 4 es un biomarcador de mala tolerancia a la ITV_a.
- **4.-** Saber si la IgE frente a Api m 1 y Api m 2 son biomarcadores de utilidad clínica.

→ **Objetivos de la Fase 2 del estudio:**

- **1.-** Valorar si la IgE frente a Api m 4 es un marcador fenotípico crítico en la enfermedad alérgica a veneno de *Apis mellifera* (fenotipo A y fenotipo B).
- **2.-** Describir la seguridad, eficacia y cambios inmunológicos en ambos fenotipos.
- **3.-** Valorar la adecuación de uso de dos extractos alergénicos acuosos de veneno de abeja según los fenotipos de sensibilización.



4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Diseño del estudio.

Se realizó un estudio observacional y abierto con pacientes que acudieron al Servicio de Alergia por haber sufrido una reacción anafiláctica tras picadura de abeja (*Apis mellifera*) y presentaban indicación de recibir tratamiento con inmunoterapia específica con veneno de abeja.

El ámbito del estudio fue el habitual del Servicio

4.1.1. Diseño de la Fase 1.

Entre los años 2009 a 2011, se realizó un estudio observacional retrospectivo no intervencionista, en el que se revisaron historias clínicas de la Unidad de Inmunoterapia del Servicio de Alergología del HURS para localizar una cohorte de pacientes que cumplieran los siguientes criterios:

- a) Diagnóstico de anafilaxia por veneno de abeja.
- b) Haber completado la fase de inicio con Pharmalgen® 100% *Apis mellifera*.
- c) Disponer en la seroteca de la Unidad de

4.1.2. Diseño de la Fase 2.

Entre los años 2011 a 2014 se realizó un estudio prospectivo y de grupos paralelos, en el que una población se dividiría en dos cohortes en función de un solo factor diferenciador entre ellos, la sensibilización frente a Api m 4. El valor crítico discriminatorio de la IgE específica frente a Api m 4 se estableció en 0.98 kU/L, que correspondía al valor de la mediana de una muestra piloto (datos previamente obtenidos que motivan la hipótesis) de 25 pacientes con Api m 4 detectable.

de Alergología del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS). Así mismo, todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito al protocolo aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HURS (Anexo II).

Para poder alcanzar los objetivos anteriormente expuestos, fue necesario dividir el estudio en dos fases:

una alícuota de suero extraído antes de iniciar inmunoterapia y congelado a -20°C.

En la cohorte de pacientes seleccionada se llevó a cabo el diagnóstico frente a los componentes alergénicos del veneno de abeja Api m 1, Api m 2 y Api m 4. Se estudió el perfil de sensibilización y su relación con la seguridad durante la fase de inicio de la inmunoterapia, para constatar si la sensibilización Api m 4 suponía un factor de riesgo para el desarrollo de RS. Secundariamente se valoró la asociación de la seguridad con otras variables: demográficas, clínicas y diagnósticas de los pacientes.

Los pacientes se distribuyeron en dos grupos (Fenotipo A: Api m 4 < 0.98 kU/L y Fenotipo B: Api m 4 ≥ 0.98 kU/L), y se decidió la opción terapéutica con ITV_a más conveniente en función de su perfil (extracto purificado o nativo).

Se analizaron la seguridad, eficacia y evolución de marcadores inmunológicos a los dos años, con una primera evaluación de la respuesta al año de iniciar la inmunoterapia.

4.2. Pacientes del estudio.

Se incluyeron en el estudio pacientes que acudieron al Servicio de Alergia por haber sufrido una reacción anafiláctica tras picadura de abeja (*Apis mellifera*) y se confirmó su sensibilización frente a este veneno con las pruebas diagnósticas habituales (pruebas cutáneas y determinación de IgE específica frente a extracto completo).

Según la práctica clínica habitual, todos los pacientes deberían tener indicación de recibir tratamiento con inmunoterapia frente a veneno de abeja. Las contraindicaciones absolutas y relativas de la inmunoterapia subcutánea están establecidas por la EAACI (125).

En nuestro estudio se excluyeron:

- Enfermedades inmunopatológicas e inmunodeficiencias severas.
- Enfermedades malignas.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes que habían recibido tratamiento con inmunoterapia con veneno de *Apis mellifera* previamente.

4.3. Métodos diagnósticos.

El diagnóstico se estableció de acuerdo a la historia clínica de cada paciente, y la demostración de sensibilización al veneno de *Apis mellifera*.

Para demostrar la sensibilización se utilizaron varios métodos diagnósticos:

4.3.1. Intradermorreacción seriada:

Es la prueba diagnóstica recomendada para confirmar la sensibilización al veneno de abeja. Se realizó de acuerdo a las normas del Comité Europeo (53) mediante inyección intradérmica en la cara volar del antebrazo, de 0.02 ml de solución a concentraciones crecientes desde 0.0001 a 1 µg/ml de extracto de veneno de abeja (Pharmalgen®, ALK-Abelló, S.A., Madrid. España), considerando

positiva la concentración mínima que desarrolló una pápula de 5 mm de diámetro medio, evaluándose a los 20 minutos de iniciar la prueba. Como control positivo se utilizó histamina 10 mg/ml y como control negativo el disolvente específico de este extracto (0.3 mg de albúmina humana, 9 mg de cloruro sódico, 4 mg de fenol y 1ml de agua para inyección c.s.p de laboratorios ALK-Abelló, S.A.).

4.3.2. Determinación de IgE específica frente a veneno completo de *Apis mellifera*:

Se efectuó siguiendo el método ImmunoCAP® (ThermoFisher, Uppsala, Suecia) realizándose la valoración de acuerdo a las instrucciones del fabricante (valor mínimo detectado 0.1 y

valor máximo 100 kU/L). Esta determinación fue llevada a cabo por el laboratorio de Inmunología del HURS según su procedimiento habitual.

4.3.3. Determinación de IgG4 frente a veneno completo de *Apis mellifera* y frente a Api m1:

Se realizó igualmente siguiendo el método ImmunoCAP® (ThermoFisher, Uppsala, Suecia) similar al procedimiento anterior. La IgG4 frente a *Apis mellifera* se realizó en el

laboratorio de Inmunología del HURS y la IgG4 frente a Api m 1 se determinó en el laboratorio de investigación de ALK-Abelló (Madrid).

4.3.4. Determinación de IgE específica frente a alérgenos individuales del veneno de *Apis mellifera*:

Se determinó la IgE frente a tres alérgenos del veneno de abeja: nApi m 1 (Fosfolipasa A2 nativa) (Sigma-Aldrich Madrid, España), rApi m 2 (Hialuronidasa recombinante), expresada en células purificadas e infectadas en baculovirus siguiendo la técnica publicada (24) y Api m 4 (melitina), un péptido sintético (Schafer-N, Dinamarca).

Los alérgenos purificados se marcaron con biotina y el nivel de IgE específica frente a ellos se determinó con la plataforma ADVIA Centaur® (Bayer Health Care Diagnostics Division, Tarrytown, NY, EE.UU.), expresado en kU/L, siguiendo las instrucciones (126) y cuyo método ha sido explicado en el apartado de introducción.

Se estudiaron diferentes puntos de corte para cada uno de los alérgenos 0.1, 0.35, 10, 20 y 50 kU/L.

En este caso, las determinaciones analíticas fueron realizadas en el laboratorio de investigación de ALK-Abelló (Madrid). Para ello, a todos los pacientes se les extrajo un muestra de sangre venosa, (de forma basal antes de iniciar ITVa, al año y a los dos años del inicio del tratamiento) que fue manipulada según las recomendaciones para el manejo de cualquier muestra de suero o sangre en humanos potencialmente infecciosos, según el departamento de salud y servicios humanos americano (127). Cada tubo se rotuló, con tinta indeleble, con las iniciales del paciente, su número de historia clínica y el número correlativo de inclusión. Se dejó coagular la sangre durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos y tras ello se conservaron a -20° C para su posterior análisis. Las muestras fueron enviadas al laboratorio sin romper la cadena de frío.

4.3.5. Determinación de Triptasa basal:

Se determinaron los niveles de Triptasa basal medida a través de InmunoCAP Tryptase®, según las indicaciones del fabricante, en el

laboratorio de Inmunología del HURS según su procedimiento habitual.

4.4. Tratamiento.

La inmunoterapia se administró de forma subcutánea, en la fase de inicio y la de mantenimiento, de manera controlada en una unidad especializada de inmunoterapia, por

el mismo personal de enfermería, entrenado y experimentado en reconocer y tratar las reacciones anafilácticas, siempre bajo la supervisión directa de un alergólogo.

4.4.1. Tratamiento usado en la Fase 1 del estudio.

Todos los pacientes recibieron el mismo extracto acuoso nativo Pharmalgen® *Apis mellifera* 100% (ALK-ABELLÓ, S.A.),

estandarizado, liofilizado y reconstituido con diluyente de solución salina que contiene albúmina.

4.4.2. Tratamiento usado en la Fase 2 del estudio.

Los pacientes recibieron distintos extractos de inmunoterapia en función de su perfil de sensibilización frente a Api m 4.

- Los pacientes con Api m 4 \geq 0.98 kU/L (Fenotipo B) fueron tratados con extracto acuoso nativo de veneno completo Pharmalgen® *Apis mellifera* 100% (ALK-ABELLÓ, S.A.).
- Los pacientes con Api m 4 $<$ 0.98 kU/L (Fenotipo A) fueron tratados con extracto acuoso purificado Aquagen SQ® *Apis mellifera* 100% (ALK-ABELLÓ, S.A.). La purificación del producto se obtiene principalmente a través de un proceso de filtración Sephadex-gel, que permite la separación de las fracciones de proteína por su peso molecular, con ausencia de componentes de bajo peso molecular presentes en el veneno nativo (punto de corte:10000 Da). Por lo tanto este extracto no contienen aminas vasoactivas como la dopamina, histamina y serotonina. Además, el proceso de filtración reduce la presencia de péptidos pequeños como

apamina, cininas, péptido degranulador de mastocitos, así como también debería reducir su contenido en melitina (Api m 4). Su principal diferencia con Pharmalgen® es la ausencia de aminas vasoactivas y péptidos de bajo peso molecular.

De forma habitual, ambos tratamientos son adquiridos por el Servicio de Alergia del HURS a través del Servicio de Farmacia del HURS. Este mismo sistema fue el seguido para los pacientes que se incluyeron en nuestro estudio.

La fase de inicio se realizó mediante un protocolo agrupado que permite alcanzar la dosis terapéutica entre 2 y 3 semanas. Aquellos pacientes con alto riesgo de exposición a picaduras recibieron una dosis de 200 μ g (fase de inicio en 3 semanas) y el resto recibieron 100 μ g (fase de inicio en 2 semanas). La dosis de mantenimiento se administró siempre con un intervalo mensual a lo largo de los dos años de estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Pauta de inicio agrupada de extracto acuoso.

Día	Dosis (μ g de veneno)	Observación (Minutos)
1	5	30
	10	30
	20	30
	20	60
8	50	30
	50	60
15	100	30
	100	60

4.5. Datos de seguridad.

Se estudió la seguridad de la inmunoterapia y su relación con el perfil de sensibilización

frente al veneno de abeja, tanto en la Fase 1 como en la Fase 2 del estudio.

4.5.1. En la Fase 1 del estudio.

Para valorar la seguridad de la inmunoterapia se recogieron, durante la fase de inicio de la inmunoterapia, la incidencia de RS, así como el número y la gravedad de las mismas (Clasificación de Müller).

Todos los pacientes iniciaron la inmunoterapia sin premedicación. En caso de ocurrir una RS se protocolizó en las siguientes visitas

premedicación (30 min antes de forma intravenosa) con Dexclorfeniramina (5 mg) y Metilprednisolona (1mg/Kg), hasta finalizar la fase de inducción. Se introdujo una modificación en el esquema previsto en la siguiente visita consistente en repetir la última dosis administrada y continuar hasta alcanzar el mantenimiento, con el fin de evitar, en lo posible, la aparición de nuevas RS.

4.5.2. En la Fase 2 del estudio.

Se procedió igual que en los pacientes de la fase 1.

4.6. Datos de eficacia

Se estudió la eficacia de la inmunoterapia y su relación con el perfil de sensibilización frente al

veneno de abeja.

En la Fase 1 del estudio: no aplicable.

4.6.1. En la Fase 2 del estudio.

Según práctica habitual, para evaluar la eficacia de la inmunoterapia se realizó el test de repicadura intrahospitalaria con abeja viva a todos los pacientes que alcanzaron la dosis de mantenimiento y que no presentaban RS. La prueba se llevó en dos ocasiones, al año y los dos años del inicio de la inmunoterapia. Antes de someterse a esta prueba los pacientes dieron su consentimiento por escrito.

El test de repicadura se realizó en el hospital de día de Alergología del HURS, cercano a la unidad de reanimación, por un alergólogo y personal de enfermería entrenado y experimentado en reconocer y tratar las reacciones anafilácticas. Para la realización de este test la abejas fueron capturadas, identificadas (obreras maduras) y suministradas por el departamento de entomología (sección del departamento de Zoología) de la Universidad de Córdoba (Córdoba, España). Las abejas fueron

transportadas en recipientes bien ventilados hasta el hospital donde, tras la aplicación de CO₂, fueron adormecidas 40 o 50 segundos para poder manipularlas y cortar sus alas. Cuando las abejas se despertaron y volvieron a su estado agresivo, se colocaron en el antebrazo del paciente y se mantuvieron con pinzas hasta que picaron quedándose ancladas durante 15 segundos, posteriormente se dependieron del brazo dejando el aparato vulnerador (aguijón con el saco contráctil de veneno) contrayéndose durante 15 segundos más, con ello se aseguró que se inyectó una cantidad de veneno adecuada. A continuación el aguijón se retiró.

La respuesta del paciente se clasificó según los grados de Müller (4). Los pacientes permanecieron en observación controlando sus constantes (tensión arterial, frecuencia cardiaca y saturación de oxígeno) durante 2 horas después de la picadura.

4.7. Evolución de marcadores inmunológicos.

Conjuntamente a la seguridad y a la eficacia de la inmunoterapia se estudió la evolución de diversos marcadores inmunológicos:

4.7.1. En la Fase 2 del estudio.

Tras completar el primer año y segundo año de la inmunoterapia se determinaron las siguientes pruebas diagnósticas, siguiendo la misma metodología a lo descrito anteriormente:

- Intradermorreacción seriada: para su análisis se agruparon según la concentración en tres categorías 0.0001-0.01 µg/ml , 0.1 µg/ml y ≥1 µg/ml. Se expresó como "ID mejora", la reducción de la concentración necesaria para provocar una prueba positiva.
- Determinación de IgE específica frente a

En la Fase 1: no aplicable.

veneno completo de *Apis mellifera*.

- Determinación de IgG4 frente a veneno completo de *Apis mellifera* y frente a Api m 1.
- Determinación de IgE específica frente a nApi m 1, rApi m 2 y Api m 4.

Para evaluar la respuesta a la inmunoterapia los resultados obtenidos se compararon con los datos basales. Todos los datos inmunológicos se analizaron en los dos grupos fenotípicos por separados (A y B).

4.8. Variables recogidas.

4.8.1. En la Fase 1 del estudio.

- **Principales:**

- Reacciones Sistémicas durante la iniciación de la inmunoterapia (si/no).
- IgE específica frente a nApi m 1, rApi m 2, Api m 4. Además del valor continuo de estas variables fueron establecidos diferentes puntos de corte: 0.1, 0.35, 10, 20 y 50 kU/L.

- **Secundarias:**

- Datos demográficos y factores de riesgo: sexo, edad, riesgo cardiovascular (enfermedad coronaria y/o Hipertensión, y/o tratamiento con Beta-bloqueantes y/o IECA) y relación con la apicultura dividida en tres categorías (Apicultor profesional

con más de 50 picaduras al año, apicultor aficionado con más 10 picaduras al año y no apicultor con menos de 5 picaduras al año).

- Datos clínicos: grado de la RS tras la picadura (según Müller).
- Datos diagnósticos: intradermorreacción (concentración), IgE específica frente a extracto completo de *Apis mellifera* y triptasa basal.
- Datos de la inmunoterapia: dosis máxima alcanzada (100/200 µg).
- Datos de seguridad de la inmunoterapia: severidad de la RS (según Clasificación de Müller) y número de RS con la ITVa.

4.8.2. En la Fase 2 del estudio.

- **Datos de eficacia de la inmunoterapia:**
 - Test de repicadura.
- **Evolución de los marcadores inmunológicos:**
 - Intradermorreacción seriada.
 - Determinación de IgG4 a veneno completo de *Apis mellifera* y frente a Api m 1.
 - Determinación de IgE específica frente a nApi m 1, rApi m 2 y Api m 4.

4.9. Almacenamiento de datos.

Todos los datos recogidos en el cuestionario de cada uno de los pacientes fueron almacenados

en una hoja de cálculo Microsoft Excel® para su posterior análisis estadístico.

4.10. Método estadístico.

La descripción de los valores cuantitativos se realizó mediante los estadísticos de la media, la desviación típica y el intervalo de confianza para la media. Dada la falta de normalidad en los datos descritos y el tamaño muestral, se han indicado también otros estadísticos robustos como la mediana, y el rango intercuartílico, así como los valores máximo y mínimo.

En variables cuantitativas, para comprobar la significación estadística en las diferencias entre grupos, se aplicaron los test de la t de Student no pareada, y cuando no se cumplían los supuestos de normalidad, se aplicó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis, dependiendo del número de grupos a comparar. Para comprobar la relación entre las variables se utilizó la correlación de Spearman.

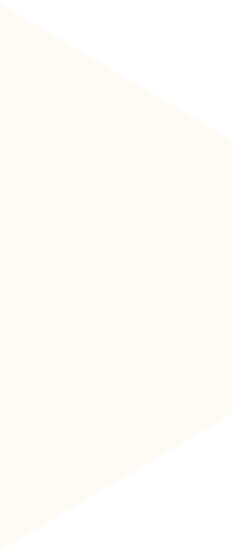
Las variables categóricas se han descrito por medio de frecuencias absolutas y porcentuales

de la distribución, indicándose en estos casos, la medida del efecto de la variable explicativa sobre la variable objetivo por medio del Odds Ratio.

Se comprobó la independencia entre variables cualitativas por medio de la aplicación del test de Chi Cuadrado o su correspondiente no paramétrico test Exacto de Fisher. Otros tests empleados en el subanálisis estadístico han sido el test de Tendencia de Cochran-Armitage, el test del rango con signo de Wilcoxon y el test de simetría.

La presencia de reacciones sistémicas, se modelizó por medio de modelos explicativos de regresión logística multivariantes, aplicándose como forma de selección de variables el método Stepwise.

Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS Versión 9.3.



5. RESULTADOS. FASE I DEL ESTUDIO.

5.1. Características de la muestra.

5.1.1. Resultados demográficos, clínicos y diagnósticos:

Se incluyeron un total de 69 pacientes (74% varones y 26% mujeres) con un rango de edad entre 11 y 68 años (media: 39 años, DT 15.05). El 61% de ellos tenían relación con la apicultura (28 pacientes de forma profesional y 14 pacientes aficionados). Ocho pacientes (11,6%) presentaban riesgo cardiovascular (Hipertensión arterial o enfermedad coronaria, que recibían tratamiento con IECA/Beta-bloqueantes).

Todos los pacientes habían presentado al menos una RS tras la picadura de abeja: 8 pacientes (11.6%) grado Müller I, 18 pacientes (26%) grado Müller II, 33 pacientes (47.8%) grado Müller III y 10 pacientes (14.5%) grado Müller IV.

Los resultados de la intradermorreacción con veneno de *Apis mellifera* fueron los siguientes: 16 pacientes (23.2%) positivo a 0.0001 µg/ml, 19 pacientes (27.5%) positivo a 0.001 µg/ml, 11 pacientes (15.9%) positivo a 0.01 µg/ml, 17 pacientes (24.6%) positivo a 0.1 µg/ml y 6 pacientes (8.7%) con resultado negativo (≥ 1 µg/ml).

El valor de la mediana de la IgE específica frente a veneno completo de *Apis mellifera* fue 13.20 kU/L (IQR 38.90).

La mediana de la Triptasemia basal fue 4.37 µg/l (IQR 3.18).

5.1.2. Resultado de la sensibilización frente a los alérgenos del veneno de *Apis mellifera*.

En la tabla 5 se recogen todos los datos estadísticos de los valores cuantitativos de los tres alérgenos testados.

Tabla 5. Descripción de la IgE frente a los principales alérgenos del veneno de *Apis mellifera*.

	n	Media	DT.	Min.	Max.	Mediana	IQR	I.C. 95%
IgE nApi m 1 (kU/L)	69	31.53	67.78	0.22	493.0	5.69	23.45	15.2-47.8
IgE rApi m 2 (kU/L)	69	19.42	42.42	0.00	193.5	2.01	10.28	9.2-29.6
IgE Api m 4 (kU/L)	69	1.43	2.68	0.00	13.58	0.42	1.49	0.8-2.0

DT: desviación típica; Min: mínimo; Max: máximo; IQR: índice intercuartílico; I.C.: intervalo de confianza.

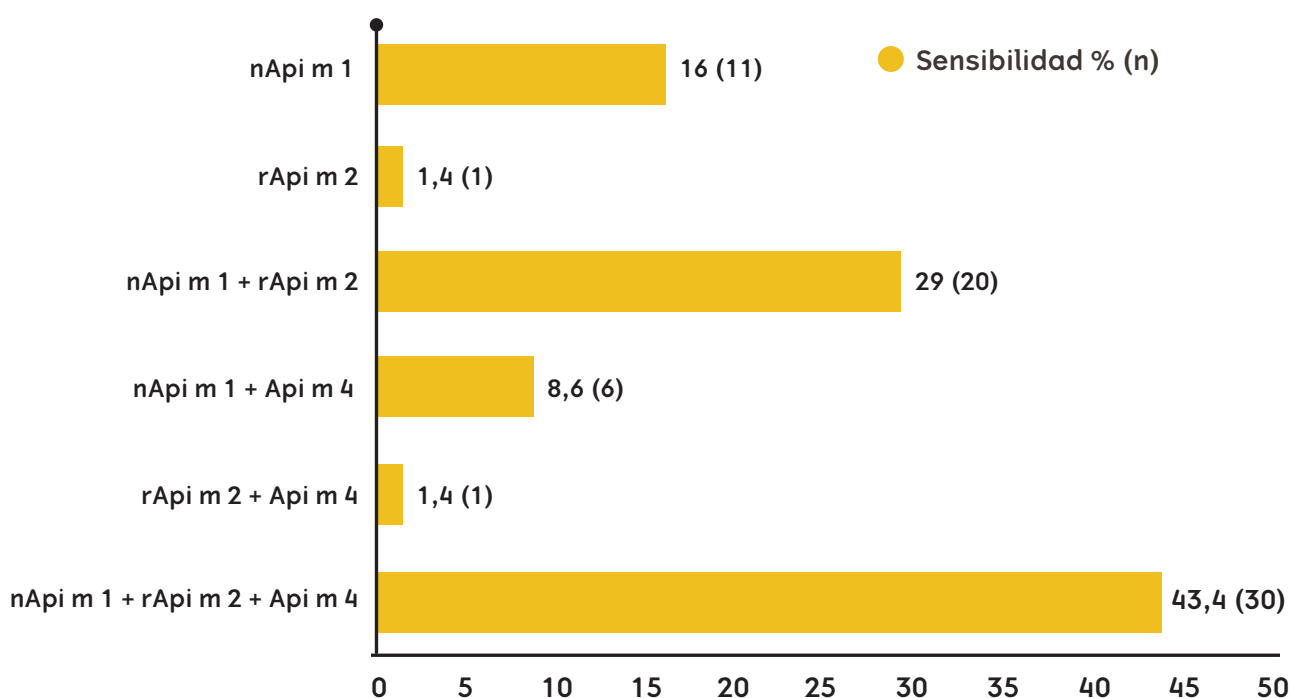
En la tabla 6 se puede encontrar la prevalencia de sensibilización de nuestros pacientes frente a los alérgenos nApi m 1, rApi m 2 y Api m 4, en los distintos puntos de corte estudiados.

Tabla 6. Prevalencia de sensibilización.

IgE (kU/L)	>0.1	>0.2	>0.35	>0.5
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
nApi m 1	69 (100)	69 (100)	66 (95.6)	63 (91.3)
rApi m 2	55 (79.7)	54 (78.2)	52 (75.4)	51(73.9)
Api m 4	46 (66.7)	45 (65.2)	37 (53.6)	33 (47.8)

El gráfico 3 refleja la distribución de los pacientes en función de sus perfiles de sensibilización.

Gráfico 3. Sensibilidad de IgE específica a diferentes perfiles de alérgenos del veneno de abeja (punto de corte 0.35 kU/L).



Tras estudiar el perfil molecular de los pacientes clasificados en función de su relación o no con la apicultura (profesional, aficionado o no apicultor), se observó que los apicultores profesionales presentaban niveles estadísticamente superiores de IgE frente a nApi m 1 y a rApi m 2, no mostrando significación para Api m 4 (Tabla 7).

Se realizó la comparación de las tres categorías (apicultor profesional, aficionado o no apicultor) mediante análisis bivalente y se observó que únicamente hay diferencias estadísticamente significativas entre las puntuaciones de los apicultores profesionales y aquellos que no tienen ninguna relación con la apicultura (Tabla 7).

Tabla 7. Estudio entre los alérgenos del veneno de abeja y el grado de exposición de los pacientes en relación con la apicultura.

Alérgenos (kU/L)	A. Prof. n=28	A. Afic. n=14	No Ap. n=27	p value ^a	Análisis bivalente p value ^b		
					No Ap. - A. Afic.	No Ap. - A. Prof.	A. Afic. - A. Prof.
IgE nApi m 1, Mediana (IQR)	14.28 (79)	6.92 (40.5)	4 (12.3)	0.035	0.351	0.039	1.000
IgE rApi m 2, Mediana (IQR)	7.89 (37.6)	1.93 (18.2)	1.52 (3.3)	0.016	1.000	0.012	0.471
IgE Api m 4, Mediana (IQR)	0.75 (1.4)	0.28 (1.4)	0.27 (0.7)	0.127	0.981	0.134	1.000

IRQ: Rango Intercuartílico; A. Prof: apicultor profesional; A. Afic: apicultor aficionado; No Ap: no apicultor. ^aTest de kruskal-Wallis. ^bComparación por pares - Test de la U de Mann-Whitney (Con corrección de Bonferroni).

5.1.2.1. Correlación entre los tres alérgenos estudiados.

Analizamos la interdependencia entre los tres alérgenos. Al aplicar el coeficiente de correlación de Spearman se observa que la relación mayor

se encuentra entre la IgE nApi m 1 y Api m 4 (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de la relación entre los valores de IgE específica a los tres alérgenos.

Correlación de Spearman, n=69			
	IgE nApi m 1	IgE rApi m 2	IgE Api m 4
IgE nApi m 1, (p valor)	1.000	0.469 <.0001	0.560 <.0001
IgE rApi m 2, (p valor)	0.469 <.0001	1.000	0.339 0.004
IgE Api m 4, (p valor)	0.560 <.0001	0.339 0.004	1.000

^aEl valor 1 implica relación positiva perfecta, el valor 0 implica que no hay correlación y -1 implica correlación completa negativa.

Tomando diferentes puntos de corte, comparamos los niveles de IgE específica frente a nApi m 1 (> 0.1, 0.35, 10, 20, 50 kU/L) con los niveles de IgE específica frente a rApi m 2 y Api m 4 a 0.1 y 0.35 kU/L, observando que a partir de IgE específica

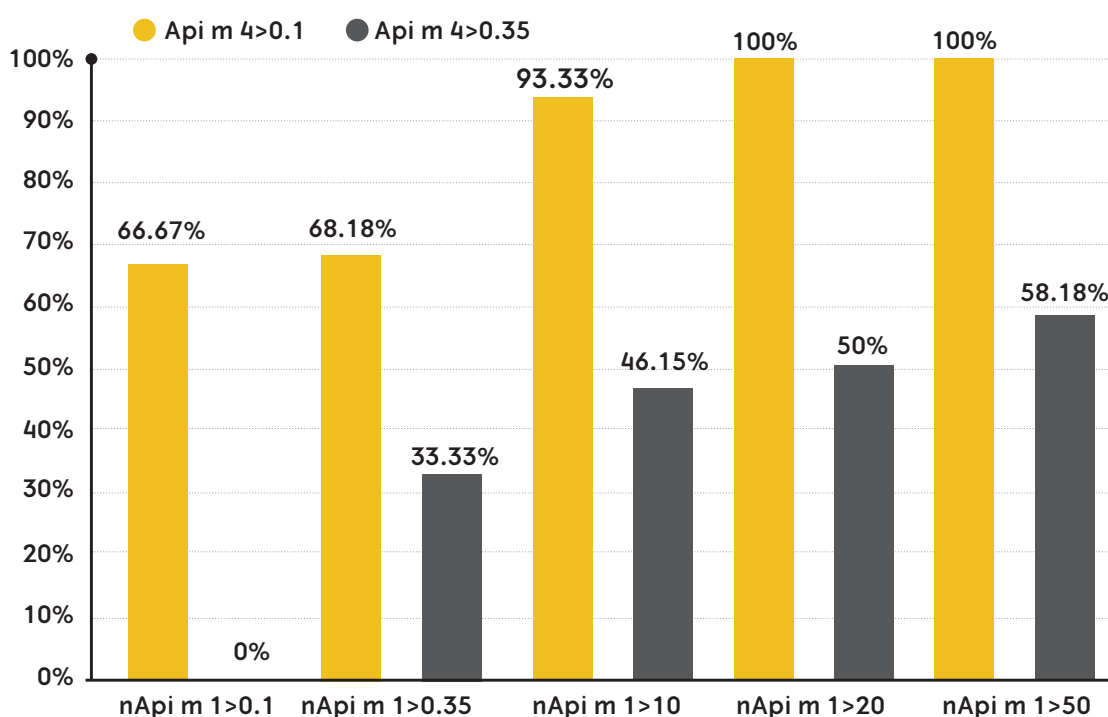
frente a Api m 1 > 10 kU/L empieza a detectarse Api m 4 tanto en el nivel de 0.1 kU/L como en el nivel de 0.35 kU/L de manera significativa (Tabla 9 y gráfico 4). En el caso de Api m 2 no se observa esta relación.

Tabla 9. Comparación de la sensibilización frente a nApi m 1 en los puntos de corte de 10, 20 y 50 kU/L con la sensibilización a rApi m 2 y a Api m 4.

IgE kU/L	nApi m 1 > 10		p valor ^a	nApi m 1 > 20		p valor ^a	nApi m 1 > 50		p valor ^a
	SI	NO		SI	NO		SI	NO	
	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	
rApi m 2 > 0.1	25 (45.5)	30 (54.5)	0.561	20 (36.4)	35 (63.6)	0.356	12 (21.8)	43 (78.2)	0.718
rApi m 2 > 0.35	25 (48.1)	27 (51.9)	0.260	20 (38.5)	32 (61.5)	0.145	12 (23)	40 (77)	0.490
Api m 4 > 0.1	28 (60.9)	18 (30.1)	<.0001	23 (50)	23 (50)	<.0001	14 (30.5)	32 (69.5)	<.002
Api m 4 > 0.35	25 (67.6)	12 (32.4)	<.0001	20 (54)	17 (46)	<.0001	13 (35.1)	24 (64.9)	<.0008

^aTest exacto de Fisher.

Gráfico 4. Porcentaje de sensibilidad frente a Api m 4 según el nivel de sensibilidad a Api m 1 (kU/L).



5.2. Tolerancia a la inmunoterapia.

De los 69 pacientes de la muestra, el 27% de ellos (19 pacientes) presentaron un total de 57 RS durante la fase de inicio de la inmunoterapia. Se clasificaron en: 45 reacciones grado Müller I (79%) y 12 reacciones grado Müller III (21%). Ningún paciente presentó una reacción grado Müller IV.

Si distribuimos las RS por cluster administrado durante la fase de inicio, observamos que en el primer cluster se producen 33 RS (57.9%), en el segundo cluster aparecen 19 RS (33.3%) y en el tercer cluster 5 RS (8.8%).

De los 19 pacientes que sufrieron RS, 15 de ellos presentaron más de una reacción, tres pacientes presentaron 7, 8 y 9 reacciones respectivamente, a pesar de realizar premedicación tras la primera RS. Cuatro pacientes presentaron solamente una reacción.

Todos los pacientes alcanzaron la dosis de mantenimiento establecida: 39 pacientes recibieron 100 µg de veneno y 30 pacientes 200 µg.

5.2.1. Seguridad de la inmunoterapia según perfiles de sensibilización.

5.2.1.1. Relación entre el perfil de sensibilización y la incidencia de RS.

Si analizamos la presencia de RS y los valores cuantitativos de la IgE frente a los componentes alergénicos individuales, se observa que los pacientes que sufrieron RS mostraron

niveles de IgE específica frente a Api m 4 significativamente más altos que frente al resto de alérgenos (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de IgE específica (kU/L) según la presencia de reacciones sistémicas.

Alérgenos	RS	n	IgE (kU/L)				
			media	DT	mediana	IQR	p valor ^a
nApi m 1	SI	19	60.26	112.6	21.96	82.4	0.214
	NO	50	20.61	35.7	5.20	19.3	
rApi m 2	SI	19	18.24	41.1	4.47	9.5	0.435
	NO	50	19.87	43.3	1.81	16.1	
Api m 4	SI	19	3.48	4	1.78	4.9	0.0002
	NO	50	0.65	1.3	0.29	0.8	

RS: reacción sistémica; DT: desviación típica; IQR: rango intercuartílico. ^a Test U de Mann-Whitney.

Considerando la sensibilización a alérgenos como variable cualitativa, cuando se compararon los puntos de corte (0.1, 0.35, 10, 20 y 50 kU/L) frente a nApi m 1, rApi m 2 y Api m 4 respectivamente en relación con la incidencia de RS se observó que el riesgo de tener una RS era 6 veces mayor en los pacientes

que presentaron IgE específica frente a Api m 4 >0.1 kU/L (OR, 6.15; 95% IC, 1.28 - 29.55; $p=0.01$) y 3 veces mayor en los pacientes que presentaron IgE específica a nApi m 1 >20 kU/L (OR, 3.16; 95% IC, 1.05-9.5; $p=0.04$). Esta relación no se encontró para rApi m 2.

5.2.1.2. Relación entre el perfil de sensibilización y la gravedad de las RS.

El análisis de la gravedad de las 57 RS como variables independientes en relación con los niveles de IgE específica frente a nApi m 1, rApi m 2 y Api m 4, reveló que aquellos pacientes con RS más severas (Grado Müller III) presentaron niveles significativamente más elevados de IgE específica frente a los tres alérgenos (Tabla 11).

Considerando la sensibilización a alérgenos como variable cualitativa, cuando se compararon los puntos de corte (0.1, 0.35, 10, 20 y

50 kU/L) frente a nApi m 1, rApi m 2 y Api m 4 respectivamente, en relación con la gravedad de las RS, se demostró que el riesgo de tener una RS grado Müller III era 7.52 veces mayor en los pacientes que presentaron IgE frente a nApi m 1 >50 kU/L (OR, 7.52; 95% IC 0.02-0.68; $p=0.009$) y 8 veces mayor en los pacientes que tuvieron IgE frente a rApi m 2 >10 kU/L (OR, 8; 95% IC, 0.03-0.51; $p=0.003$). No se mostró aumento del riesgo en ningún punto de corte para los valores de IgE frente a Api m 4.

Tabla 11. Valores de IgE específica según la severidad de reacciones sistémicas durante el inicio de la ITV_a.

Alérgenos	Gravedad	N°RS	IgE (kU/L)				p valor ^a
			media	DT	mediana	IQR	
nApi m 1	Grado I	45	49.2	77.9	21.9	79.6	0.002
	Grado III	12	91	43.5	116.4	34.2	
rApi m 2	Grado I	45	12.6	28.6	2.2	5.2	0.008
	Grado III	12	105.2	88.8	177	171.7	
Api m 4	Grado I	45	2.5	2.9	0.9	3.2	0.0003
	Grado III	12	7.3	3.2	9.7	5.2	

N°RS: número de reacciones sistémicas; DT: desviación típica; IQR: rango intercuartílico. ^a Test U de Mann-Whitney.

5.2.1.3. Relación entre el perfil de sensibilización y la recurrencia de las RS.

Al analizar exclusivamente a los 19 pacientes que presentaron RS, se observó que los 15 pacientes que habían sufrido más de un episodio, tenía un nivel de IgE específica frente a rApi m 2 significativamente más elevado que

los 4 pacientes que habían sufrido una única reacción. Por el contrario los niveles de IgE específica frente a Api m 4 en los 15 pacientes con recidivas eran significativamente más bajos (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de IgE específica en función de la recidiva de la reacción.

Alérgenos	N°RS	n	IgE (kU/L)				p valor ^a
			media	DT	mediana	IQR	
nApi m 1	1	4	143.6	235.9	40.47	285.8	0.920
	>1	15	30.04	43.10	21.96	80.5	
rApi m 2	1	4	0.32	0.55	0.07	0.6	0.005
	>1	15	23.01	45.37	6.99	22.5	
Api m 4	1	4	8.31	4.73	8.15	7.8	0.016
	>1	15	2.19	2.78	0.81	3.4	

N°RS: número de reacciones sistémicas; DT: desviación típica; IQR: rango intercuartílico. ^a Test U de Mann-Whitney.

5.2.2. Relación de la seguridad de la ITV_a con datos clínicos e IgE específica a *Apis mellifera*.

En la tabla 13 se pueden observar las características demográficas, clínicas y diagnósticas de los pacientes que presentaron RS durante el inicio de la ITV_a y de aquellos que no las sufrieron. Se observó que las RS fueron significativamente más frecuentes en apicultores profesionales, en aquellos pacientes que habían sufrido una reacción de mayor gravedad con la picadura y en aquellos

que mostraron una mayor sensibilidad en la ID.

Los valores más elevados de IgE específica frente a *Apis mellifera* se asociaron a una mayor incidencia de RS, pero no a una mayor gravedad de éstas, ni tampoco a su recidiva.

El resto de variables analizadas no obtuvieron significación estadística (Tabla 13).

Tabla 13. Seguridad de la ITV_a en función de datos demográficos, clínicos y diagnósticos.

Características	Reacción sistémica		p valor
	No	Si	
Pacientes, n (%)	50 (72.5)	19 (27.5)	
Sexo varón, n (%)	38 (76)	13 (68.4)	0.549 ^a
Edad en años, media (DT)	39.5 (14.5)	36.6 (16.5)	0.482 ^b
Apicultores profesionales, n (%)	16 (32)	12 (63)	0.031^a
Riesgo Cardiovascular, n (%)	7 (14)	1 (5.3)	0.429 ^a
Reacción con la picadura (Müller), n (%)			
I	7 (14)	1 (5.3)	0.017^c
II	17 (34)	1 (5.3)	
III	20 (40)	13 (68.4)	
IV	6 (12)	4 (21)	
IgE <i>Apis mellifera</i> (kU/L), mediana (IQR)	8.2 (19.4)	50.9 (80.1)	0.0007^d
Intradermorreacción, n. (%)			
0.0001 µg/ml	6 (12)	10 (52.6)	0.0007^c
0.001 µg/ml	14 (28)	5 (26.3)	
0.01 µg/ml	9 (18)	2 (10.5)	
0.1 µg/ml	16 (32)	1 (5.2)	
≥1 µg/ml	5 (10)	1 (5.2)	
Triptasa Basal (µg/l), mediana (IQR)	4.9 (3.7)	3.8 (2.1)	0.185 ^d

DT: desviación típica; IQR: rango intercuartílico. ^aTest exacto de Fisher; ^bTest T de Student; ^cTest de tendencia de Cochran-Armitage; ^dTest U de Mann-Whitney.

5.3. Estudio multivariante.

Tras el estudio estadístico inicial se realizó un modelo de análisis por regresión logística para la presencia de RS. Se evaluaron la gravedad de la reacción frente a la picadura, la sensibilidad mostrada en la intradermorreacción y la IgE frente a nApi m 1 y Api m 4 como covariables, por haber demostrado asociación a la variable principal. Finalmente la IgE frente a Api m 4 no permaneció en el modelo por la fuerte dependencia mostrada entre los dos parámetros "*in vitro*", ya expuesta

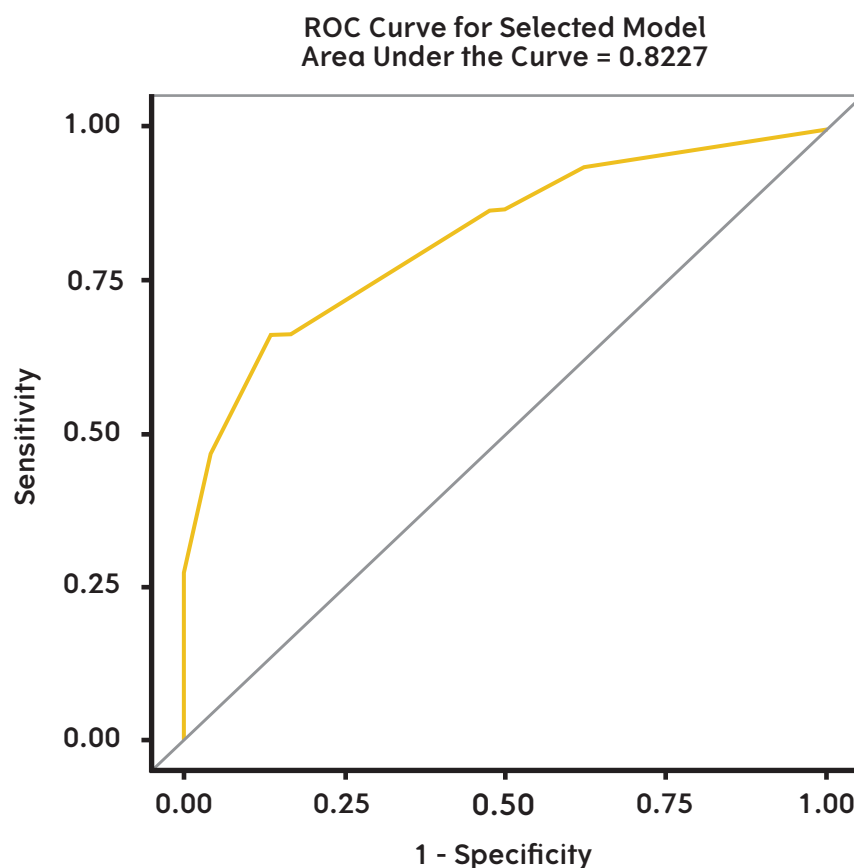
anteriormente ($r^2=0.56055$, $p<0,0001$). La dedicación a la apicultura de forma profesional había mostrado una relación significativa con niveles elevados de IgE específica frente a nApi m 1 ($p=0.0359$). Por este motivo, esta variable tampoco fue considerada por el modelo.

Los resultados de este análisis estadístico se muestran en la Tabla 14 y en el gráfico 5 se representa la curva ROC.

Tabla 14. Resultado del modelo de regresión logística para predecir el riesgo de sufrir RS en el inicio de la ITVa.

Variable	Odd Ratio	95% Intervalo de Confianza	Significación estadística
Grado III-IV Müller	6.65	1.16 - 38.05	$p=0.033$
IgE nApi m 1 >20 kU/L	3.97	0.92 - 16.97	$p=0.062$
ID ≥ 0.0001 $\mu\text{g/ml}$	6.1	0.03 - 0.80	$p=0.025$

Gráfico 5. Curva ROC para el modelo de regresión logística que predice el riesgo de presentar reacciones sistémicas con ITVa.



RESULTADOS.

FASE II DEL ESTUDIO.

5.4. Características de la muestra y perfil de sensibilización.

Se incluyeron un total de 31 pacientes, cuyas características demográficas, clínicas y diagnósticas están recogidas en la Tabla 15.

De acuerdo al punto de corte establecido en 0.98 kU/L para la IgE específica frente a Api m 4, 19 pacientes fueron asignados al

grupo A y 12 pacientes al grupo B, configurándose dos fenotipos que incluyeron diferencias significativas en la gravedad de la reacción frente a la picadura, la intensidad de la intradermorreacción y los niveles basales de IgE frente a *Apis mellifera*, nApi m 1 y frente a la IgG4 a Apis (Tabla 15).

Tabla 15. Características de ambos grupos de población de pacientes alérgicos al veneno de *Apis mellifera*.

Características	Fenotipo A	Fenotipo B	p valor
Pacientes, n (%)	19 (61.3)	12 (38.7)	
Sexo varón, n (%)	15 (79)	11 (91.6)	0.633 ^a
Edad en años, media (DT)	38 (16.4)	36.4 (19)	0.787 ^b
Apicultores (Prof.+ Afic.), n. (%)	10 (52.6)	8 (66.6)	0.484 ^a
Presencia de riesgo cardiovascular, n. (%)	3 (15.7)	2 (16.6)	1.000 ^a
Grado reacción con picadura , n. (%)			
I	3 (15.7)	2 (16.6)	0.049 ^c
II	8 (42)	0	
III	7 (36.8)	6 (50)	
IV	1 (5.2)	4 (33.3)	
IgE <i>Apis mellifera</i> , mediana (IQR), kU/L	4.3 (11.5)	35 (52.6)	0.0004 ^d
Intradermorreacción, n. (%)			
0.0001 µg/ml	0	3 (25)	0.011 ^c
0.001 µg/ml	6 (31.5)	5 (41.6)	
0.01 µg/ml	1 (5.2)	2 (16.6)	
0.1 µg/ml	7 (37)	1 (8.3)	
≥1 µg/ml	5 (26.3)	1 (8.3)	
Triptasa Basal, mediana (IQR), µg/L	5.48 (4.4)	5.27 (3)	0.584 ^d
IgE nApi m 1, mediana (IQR), kU/L	5.12 (12)	55.2 (77)	0.0004 ^d
IgE rApi m 2, mediana (IQR), kU/L	1.52 (7)	5.5 (127.5)	0.221 ^d
IgE Api m 4, mediana (IQR), kU/L	0.3 (0.5)	2.7 (8.2)	0.0001 ^d
IgG4 <i>Apis mellifera</i> , mediana (IQR), µg/mL	698 (1525)	2235 (6590)	0.027 ^d
IgG4 Api m 1, mediana (IQR), µg/mL	1.2 (1.9)	3.3 (3.5)	0.096 ^d

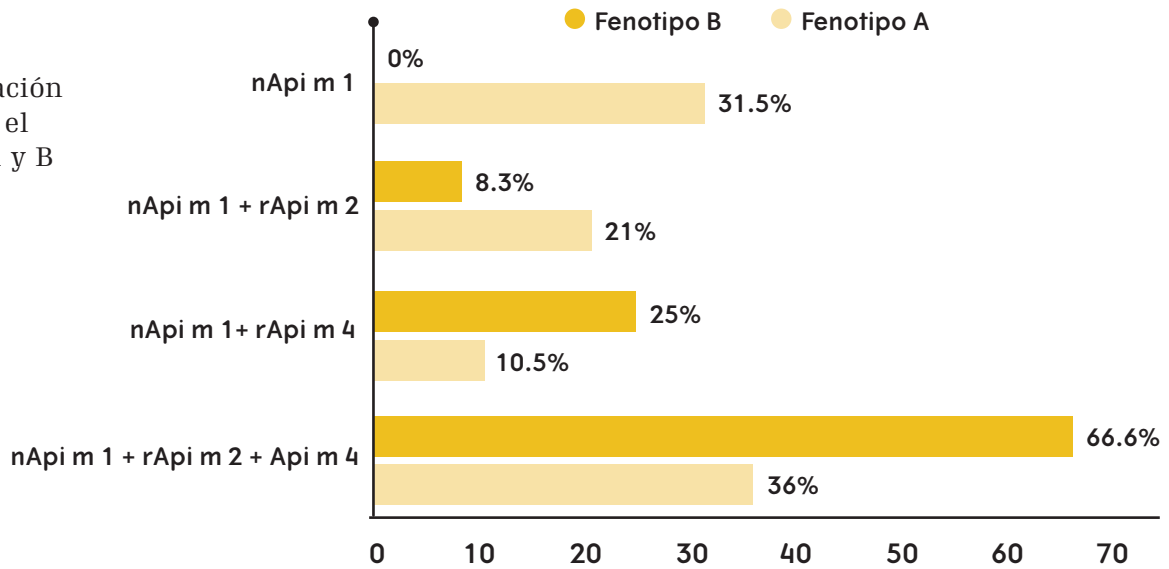
DT: desviación típica; IQR: rango intercuartilico. ^aTest exacto de Fisher; ^bTest T de Student; ^cTest de tendencia de Cochran-Armitage; ^dTest U de Mann-Whitney.

La prevalencia de sensibilización, considerando el punto de corte clásico de 0.35 kU/L, fue para nApi m 1 del 100% en ambos fenotipos. La sensibilización frente a rApi m 2 fue 52.6% en el fenotipo A y 75% en el fenotipo B y frente a

Api m 4 se detectó una prevalencia del 47% en fenotipo A y del 100% en el fenotipo B.

Los perfiles de sensibilización de ambos grupos (fenotipo A y B) quedan reflejados en el gráfico 6.

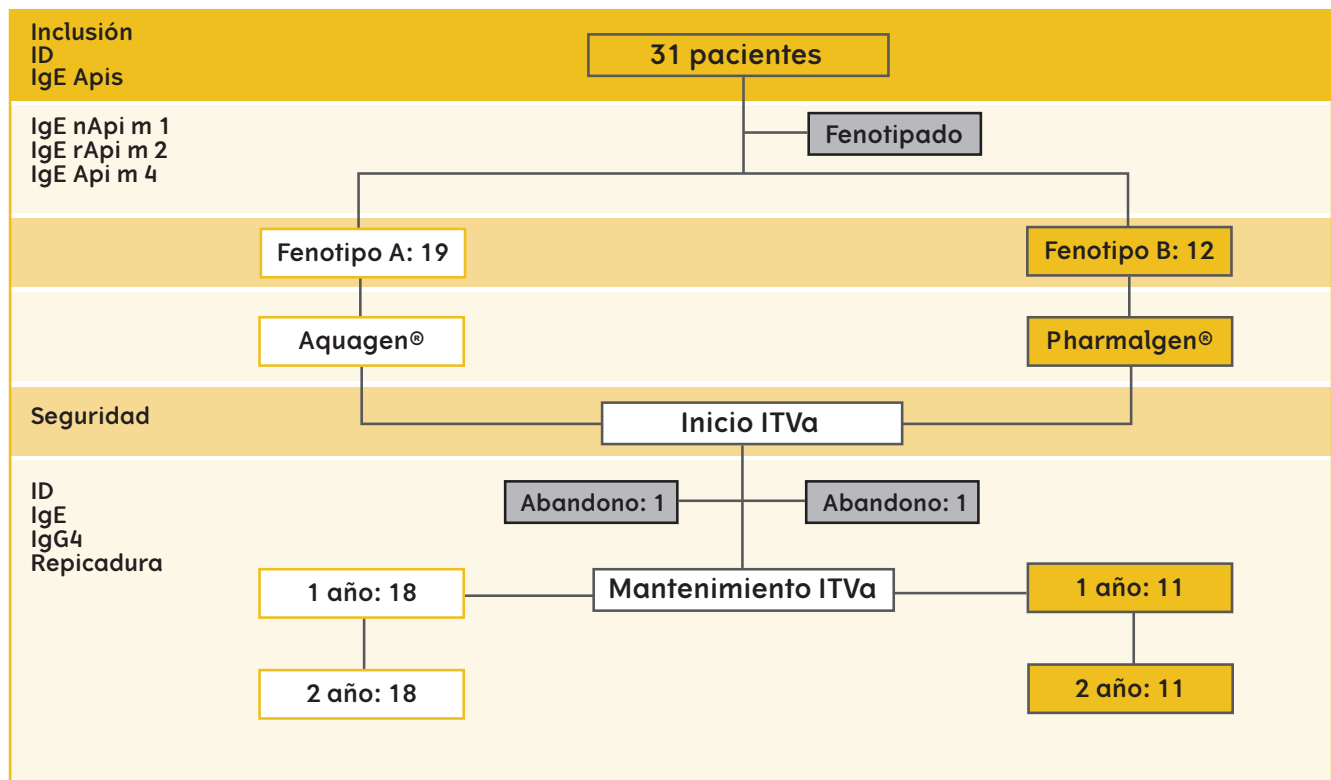
Gráfico 6.
Perfil de sensibilización en % para el fenotipo A y B



La figura 2 muestra el flujo de los pacientes de esta fase desde la inclusión hasta su tratamiento,

junto con las diferentes pruebas realizadas en cada uno de estos periodos.

Figura 2. Distribución de los pacientes durante la Fase 2.



5.5. Resultados en el grupo fenotípico A.

5.5.1. Seguridad y eficacia de la ITVa.

5.5.1.1. Datos de seguridad.

Los 19 pacientes del fenotipo A fueron tratados con extracto acuoso purificado (Aquagen®) de veneno de abeja.

Trece pacientes alcanzaron la dosis de mantenimiento establecida de 100 µg de

veneno y seis la de 200 µg. Durante la fase de inicio de la ITVa, 3 pacientes (15.7%) sufrieron 2 RS grado Müller I cada uno de ellos (total 6 RS). La segunda RS de cada paciente se produjo a pesar de utilizar premedicación.

5.5.1.2. Datos de eficacia.

Los 18 pacientes que continúan con ITVa tras el inicio, toleraron el test de repicadura intrahospitalaria realizado al año y a los dos

años del inicio de la ITVa. Por lo tanto la eficacia en este fenotipo de pacientes fue del 100%.

5.5.2. Evolución de los datos inmunológicos.

La tabla 16 recoge la evolución de los valores de IgE, IgG4 y respuesta cutánea para este fenotipo de pacientes, comparando las

determinaciones realizadas al final del primer y segundo año del tratamiento con los valores basales.

Tabla 16. Evolución de los datos inmunológicos en los pacientes del fenotipo A.

Parámetros	Fenotipo A (n=18)				
	Basal	Año 1º	p valor ^a	Año 2º	p valor ^a
IgE <i>Apis mellifera</i> , mediana (IQR), kU/L	4(11.5)	2(5.6)	0.038	2(4.8)	0.02
ID, mejora, n.	-	9	0.029^b	9	NS ^b
IgE nApi m 1, mediana (IQR), kU/L	5.2(12)	3(6.2)	0.026	2.3(5.3)	0.012
IgE rApi m 2, mediana (IQR), kU/L	1.5(7)	5.3(10.3)	NS	3.9(10.5)	NS
IgE Api m 4, mediana (IQR), kU/L	0.3(0.5)	0.3(0.4)	NS	0.25(0.3)	NS
IgG4 <i>Apis</i> , mediana (IQR), µg/mL	688(1519)	5130(6210)	0.001	4378(5721)	0.001
IgG4 Api m 1, mediana (IQR), µg/mL	1.3(2.4)	4.1(6)	<.0001	5.4(6)	0.0001

IQR: rango intercuartílico; ID: intradermorreacción; NS: no significativo. ^aTest del signo de rangos de Wilcoxon. ^bTest de simetría.

5.6. Resultados en el grupo fenotípico B.

5.6.1. Seguridad y eficacia de la ITVa.

5.6.1.1. Datos de seguridad.

Los 12 pacientes del fenotipo B fueron tratados con extracto acuoso nativo completo (Pharmalgen®) frente al veneno de abeja.

Cuatro pacientes alcanzaron la dosis de mantenimiento establecida de 100 µg de veneno y 8 pacientes la de 200 µg.

Durante la fase de inicio de la ITVa, 5 pacientes (41%) presentaron 20 RS. Tres pacientes presentaron una sola RS, dos de ellas de gravedad Müller I y otra de gravedad Müller III. Otros 2 pacientes acumularon 17 episodios, seis de ellos grado Müller I y 11 de grado Müller III. Un paciente continuó presentando RS durante la fase de mantenimiento de la ITVa.

5.6.1.2. Datos de eficacia .

De los 11 pacientes que continuaron con la ITVa tras alcanzar la fase de mantenimiento, se les realizó el test de repicadura intrahospitalaria a 10 pacientes. Un paciente de este grupo, no fue sometido a este test porque mantuvo RS durante el mantenimiento, contabilizándose

como fracaso terapéutico (intención de tratar). Un mismo paciente presentó una RS grado Müller III tras repicadura, tanto en el primer año como en el segundo. Por lo tanto, la eficacia en este fenotipo de pacientes fue del 82%.

5.6.2. Evolución de los datos inmunológicos.

La tabla 17 recoge la evolución de los valores de IgE, IgG4 y respuesta cutánea para este fenotipo de pacientes, comparando las

determinaciones realizadas al final del primer y segundo año del tratamiento con los valores basales.

Tabla 17. Evolución de los datos inmunológicos en los pacientes del fenotipo B.

Parámetros	Fenotipo B (n=11)				
	Basal	Año 1°	p valor ^a	Año 2°	p valor ^a
IgE <i>Apis mellifera</i> , mediana (IQR), kU/L	42(63.5)	15(30.6)	0.001	13.4(14.2)	0.001
ID, mejora, n.	-	4	NS ^b	4	NS ^b
IgE nApi m 1, mediana (IQR), kU/L	63.3(92.8)	20.6(32.5)	0.013	23(39.7)	0.002
IgE rApi m 2, mediana (IQR), kU/L	9(162.6)	3.5(44)	NS	4.33(33)	NS
IgE Api m 4, mediana (IQR), kU/L	3.7(8.7)	1.2(3.1)	0.004	0.75(1.4)	0.002
IgG4 <i>Apis</i> , mediana (IQR), µg/mL	2213(6582)	10522(9734)	0.001	12436(15049)	0.002
IgG4 Api m 1, mediana (IQR), µg/mL	3.1(3.4)	8.5(7)	0.001	7.7(6.7)	0.001

IQR: rango intercuartílico; ID: intradermorreacción; NS: no significativo. ^aTest del signo de rangos de Wilcoxon. ^bTest de simetría.

6. DISCUSIÓN. FASE I DEL ESTUDIO.

6.1. Perfil de sensibilización detectado frente al veneno de abeja.

6.1.1. Prevalencia de sensibilización de los alérgenos del veneno de abeja.

En el presente trabajo hemos analizamos el perfil de reactividad individual al antígeno nativo Api m 1, Api m 2 recombinante y Api m 4 sintético en una población con reacción sistémica tras picadura de abeja e IgE específica positiva a veneno completo de *Apis mellifera*, con un test cutáneo positivo a concentración igual o inferior a 0.1 µg/ml en el 91% de los pacientes.

Las tres moléculas estudiadas se han comportado como alérgenos mayoritarios en nuestra población, si se tiene en cuenta el punto de corte convencional de 0.35 kU/L.

La sensibilización frente a Api m1 ha sido la más frecuente, como ya ha sido descrito por otros autores (19,128).

La elevada prevalencia de sensibilización para el antígeno nativo Api m1 encontrada en nuestro estudio (95.6%) es comparable a la encontrada por Korošec (69) empleando nApi m 1 con otra metodología diagnóstica y a la encontrada por Müller (18) empleando Api m 1 recombinante (rApi m 1) con la misma técnica que nosotros. Sin embargo, un estudio reciente (19) encuentra un 72.2% de prevalencia para rApi m 1 empleando la misma técnica de Korošec. Al margen de las diferencias metodológicas, parece lógico pensar que la presencia de carbohidratos en la proteína nativa nApi m 1, debería aumentar la sensibilidad del test, pero este extremo ha sido rechazado por Förster (129) y cuando menos es objeto de controversia (65–68).

La prevalencia de sensibilización frente a rApi m 2 en nuestra población (75.4%) es sorprendentemente mayor que la descrita por otros autores (47.9% (19) y 52.2% (65), reflejando diferencias propias de la población estudiada.

Todos los pacientes sensibilizados a Api m 2 (IgE > 0.35 kU/L) también lo estaban frente a nApi m 1 con una única excepción, lo que sugiere que Api m 1 es el sensibilizante primario del veneno de abeja en esta población. Al considerar la respuesta IgE frente a rApi m 2 hay que tener en cuenta su homología con la hialuronidasa de vespídos, lo que equivale a contemplar fuentes de sensibilización diferentes al veneno de abeja y sinérgicas con éste (70).

El tercer alérgeno estudiado, la proteína sintética Api m 4, también se ha comportado como un sensibilizante mayoritario en nuestra población, algo que no ha sido descrito hasta el momento en otras poblaciones (19,65). Aunque los perfiles de sensibilización de nuestros pacientes hacen pensar que Api m 4 no es un sensibilizante primario, es importante destacar el perfil de un paciente individual con niveles de IgE de 0.35 kU/L frente a nApi m 1, 12 kU/L frente a Api m 4 e indetectable para rApi m 2, descubriendo un fenotipo diferente en el que Api m 4 posiblemente se comporta como el sensibilizante primario. Este fenómeno infrecuente, que también ha sido descrito por Köhler (19), destaca la importancia de los perfiles individuales de sensibilización, e introduce algunas incertidumbres en la respuesta a la inmunoterapia, particularmente en el caso de la utilización de extractos deplecionados de su fracción de peso molecular más bajo, por lo tanto pobres en Api m 4.

Considerando el punto de corte de 0.35 kU/L de IgE, la capacidad para diagnosticar alergia al veneno de abeja es superior al 95% en el caso de nApi m 1, llegando al 100% al añadir rApi m 2 y Api m 4 al panel diagnóstico, y poniendo de manifiesto perfiles de sensibilización diferentes a lo sospechado a priori. En un estudio previo, la incorporación de

rApi m 2 y Api m 4 aumentó en un 15% la capacidad diagnóstica demostrada por rApi m 1 en pacientes alérgicos al veneno de abeja (65).

En nuestra población, la alta sensibilidad de la técnica ADVIA Centaur® ha sido capaz de identificar al 100% de los pacientes alérgicos a veneno de abeja con nApi m 1 en el nivel de detección de 0.1 kU/L. El mismo nivel ha detectado al 80% de los pacientes sensibilizados a rApi m 2 y al 67% de pacientes sensibilizados a Api m 4,

6.1.2. Interdependencia de las sensibilizaciones.

El estudio de relación entre los niveles de IgE específica a las tres proteínas alergénicas muestra que los pacientes con niveles más elevados de IgE frente a nApi m 1 están sensibilizados a rApi m 2 y Api m 4.

Las correlaciones encontradas tienen unos niveles de significación variables y se consideran relevantes desde un punto de vista clínico-biológico.

Todos nuestros pacientes sensibilizados frente a Api m 4, también lo están frente a nApi m 1

sugiriendo un itinerario natural de la sensibilización Api m 1-Api m 2-Api m 4. Este razonamiento es coherente con la frecuencia de los distintos perfiles de sensibilización que se pueden ver en el gráfico 6.

Finalmente, hay que tener en cuenta que las sensibilizaciones encontradas se ven afectadas por el tamaño de la población estudiada, por la técnica empleada y además pueden responder a un particular patrón regional como ya ha sido descrito anteriormente (65,68).

y algunos además frente a rApi m 2, lo que nos hace pensar que la IgE a Api m 4 podría comportarse como un marcador de “marcha alérgica avanzada”, representando una forma más compleja de la enfermedad o un patrón diferente de sensibilización.

La explicación para la no sensibilización frente a Api m 4 en algunos pacientes podría significar por el contrario en una enfermedad menos desarrollada por el tipo de exposición o simplemente un baja potencia alérgica de Api m 4.

6.2. Factores de riesgo asociados con mala tolerancia durante el inicio de la ITV_a.

Sabemos que las reacciones sistémicas con la ITV de himenópteros son más frecuentes en los pacientes tratados con veneno de abeja durante la fase de inicio (98,115) y que los pacientes que toleran mal la ITV repetidamente, tienden a mostrar una menor protección tras el tratamiento (102).

El 27% de los pacientes de la Fase 1 de este estudio presentó alguna RS durante el inicio de la ITV_a, acorde con lo descrito en una revisión reciente para extractos acuosos (87) y superior al 14.2% calculado en otra revisión para los extractos acuosos y depot agrupados (88). Sin embargo, nuestro porcentaje de RS es inferior al 38.7% descrito en un estudio reciente (130). Estas diferencias podrían estar afectadas por los criterios de cada autor entre otras influencias.

En la actualidad no existe una prueba fiable capaz de predecir la magnitud del riesgo de esta inmunoterapia. Existen publicaciones que aportan evidencia sobre el valor como marcador de gravedad de las proteínas transportadoras de lípidos en alergia a alimentos (131), y se ha sugerido una mejor respuesta a la inmunoterapia con gramíneas en pacientes con fenotipos sencillos de sensibilización (132). Además recientemente se ha demostrado que la sensibilización a diferentes proteínas de gramíneas (Phl p1+ Phl p5 o Phl p1+ Phl p5 + Phl p12) se asocia a mayor frecuencia de RS con la inmunoterapia específica (133). Los perfiles de sensibilización alérgica podrían también tener importancia en el caso de la respuesta a la inmunoterapia con venenos.

6.2.1. Patrón de sensibilización frente al veneno de abeja asociado a un mayor riesgo de sufrir RS durante el inicio de la ITV_a.

En nuestro estudio se evidencia que la sensibilización frente a Api m 4 se asocia a un aumento en la aparición de RS durante la fase de inicio de la ITV_a. Aunque el tamaño de la muestra condiciona un resultado explicativo y no predictivo, una interpretación biológica de este hallazgo atribuiría a la sensibilización a Api m 4 el valor de biomarcador de mala tolerancia a la ITV_a.

Api m4 es el péptido responsable del dolor e inflamación en la zona de la picadura y cuantitativamente es el péptido más importante del veneno de abeja (10). Este alérgeno, considerado alérgeno minoritario, es para nuestra población un sensibilizante mayoritario. Ya en 1977, Paul B.R et al. afirmaron que la melitina podía ser un importante alérgeno para algunos pacientes y comportarse como un alérgeno mayoritario en poblaciones restringidas, al encontrar títulos altos de este alérgeno en un grupo de apicultores alérgicos (30).

Nos llama la atención como siendo el alérgeno más abundante es bastante menos sensibilizante en la mayoría de los pacientes, probablemente por

su baja potencia alergénica. No se ha comprobado este extremo, pero la forma tetramérica adoptada por la melitina cuando se encuentra a altas concentraciones y pH ácido, podría estar en relación con una mayor alergenicidad de la misma (32).

A través de la medida de la Odd Ratio hemos calculado el riesgo de presentar RS en relación a diferentes niveles de IgE específica y llamativamente la sensibilización frente a Api m 4 se comporta como un factor de riesgo desde niveles de IgE tan bajos como 0.1 kU/L a diferencia de lo que ocurre con nApi m 1, que induce RS por encima de 20 kU/L de IgE. Desde el punto de vista clínico, y para el manejo de la seguridad de los pacientes con inmunoterapia, este hallazgo se traduce en lo erróneo que sería tratar linealmente los resultados de las determinaciones de IgE frente a nApi m 1 y Api m 4. En pocas palabras, cantidades mínimas de IgE frente a Api m 4 suponen el doble de riesgo que cantidades elevadas de IgE frente a Api m 1 para sufrir una RS por la inmunoterapia a veneno de abeja.

6.2.2. Patrón de sensibilización frente al veneno de abeja asociado a la gravedad y recurrencia de las RS durante el inicio de la ITV_a.

Entre las RS encontradas se identifican claramente dos categorías atendiendo al modo de aparición: reacciones exclusivamente cutáneas (Müller I) y episodios que incluyen compromiso respiratorio objetivado (Müller III). La administración precoz de tratamiento (incluyendo adrenalina) en todos los casos pudo influir en la no progresión a grados más severos.

Cuando se considera la gravedad de las RS, la sensibilización frente a rApi m 2 adquiere una relevancia inesperada, resultando llamativo que un valor por encima de 10 kU/L de IgE suponga un riesgo 8 veces mayor para presentar inestabilidad ventilatoria (Müller III). El otro factor de riesgo elevado que se encontró, la sensibilización extrema frente a nApi m 1, podría

estar relacionado con el riesgo de presentar RS descrito anteriormente con una sensibilización de menor intensidad a este alérgeno.

La influencia que pudo tener la premedicación administrada estuvo presente en todos los pacientes que habían sufrido una primera RS, independientemente de su sensibilización.

Los pacientes con RS recidivantes mostraron niveles de IgE frente a rApi m 2 significativamente más elevados que los que presentaron una única RS. Un efecto inverso se observa para la IgE frente a Api m 4, que de esta manera se comporta paradójicamente como un factor de riesgo para sufrir reacciones sistémicas por ITV_a pero un factor protector para las recidivas de

éstas. El pequeño tamaño de la subpoblación de pacientes con RS no recidivantes (4 pacientes) constituye una limitación estadística a la hora de interpretar este resultado, y hay que contemplar

la influencia que pudo tener la premedicación con antihistamínicos y corticoides administrada únicamente a los pacientes que habían sufrido una primera RS.

6.2.3. Otras variables asociadas a un mayor riesgo de sufrir RS durante el inicio de la ITVa:

Los pacientes con RS en este trabajo habían sufrido reacciones con las picaduras previas a la ITVa de mayor gravedad, mostraban una sensibilidad cutánea más alta y unos niveles basales de IgE frente al veneno de *Apis mellifera* más elevados que los pacientes que toleraron la ITVa.

Resultados similares sobre la gravedad de la reacción previa se encontraron en un estudio unicéntrico con un amplio número de pacientes (97) y en otro sobre apicultores (134). No hemos confirmado otras asociaciones encontradas (sexo, edad, enfermedad cardiovascular previa y el nivel de triptasa basal) por Rüeff y cols. en un estudio multicéntrico con veneno de abeja y vespídidos (92).

Las fases de inicio rápidas también se han asociado al aumento de RS (92). Nuestro protocolo de inicio fue una pauta agrupada de dos visitas y cinco dosis que ha sido empleada con buenos resultados en el estudio de Sánchez-Machín (93). La tasa de RS de dicho estudio es inferior al nuestro, lo que podría estar justificado por un diferente perfil de pacientes: en el estudio de Sánchez-Machín, los pacientes tienen una mediana de IgE frente a *Apis* de 8.74 kU/L vs

a la de nuestros pacientes de 13.20 kU/L, al mismo tiempo que en nuestra serie utilizamos una dosis más elevada de ITVa (200 µg en 30/69 pacientes). Ambos factores, IgE más elevada y necesidad de una dosis mayor a la estándar de 100 µg, son sugerentes de un perfil clínico de mayor gravedad en los pacientes de nuestro trabajo, algo que cabe relacionar con una mayor incidencia de RS.

En el estudio multivariante realizado se incluyó la reacción de ID positiva a 0.0001 µg/ml o mayor, las reacciones grado III y IV de Müller en el diagnóstico y la IgE frente a nApi m 1 >20 kU/L por su relación con la aparición de RS con la ITVa. Finalmente únicamente las dos primeras variables fueron identificadas como predictoras de RS durante el inicio de ITVa, la sensibilización a Api m 1 casi alcanza la significación. En este modelo el perfil molecular no logra predecir el riesgo de sufrir RS, posiblemente debido a la limitación de nuestro tamaño muestral. La exclusión de la IgE frente a Api m 4 del modelo es probablemente debido a que el número de resultados positivos individuales de IgE específica a Api m 4 era muy pequeño y a su fuerte dependencia con nApi m 1.

6.3. Perfil de sensibilización en apicultores y su relación con la seguridad de la ITVa.

Dentro de la población alérgica al veneno de abeja nos encontramos con una población especial como son los apicultores y sus familias, debido a su alta exposición a picaduras de abeja y a la posibilidad de sensibilización a través de mucosas respiratorias que juega un papel importante en la patogénesis de su alergia al veneno de abeja (135).

Los niveles de IgE fueron significativamente más elevados en el subgrupo de apicultores profesionales frente a nApi m 1 y rApi m 2, presentando éstos una mayor frecuencia de RS que los no apicultores.

Los apicultores con RS tras ITVa no mostraron la alta prevalencia de sensibilización a Api m 4 del grupo general, algo que no se escapa a la atomización de la muestra cuando se valoran en conjunto distintas variables.

Este perfil de falta de tolerancia no ha sido identificado por Eich-Wanger cuando registró efectos adversos objetivos y subjetivos durante el inicio y el mantenimiento en un estudio con un diseño muy diferente al nuestro (134).

DISCUSIÓN. FASE II DEL ESTUDIO.

6.4. Dos perfiles diferentes de pacientes alérgicos al veneno de abeja basado en la sensibilización a Api m 4, en tratamiento con ITV_a.

La existencia de niveles de IgE marcadamente diferentes para las tres proteínas alergénicas, sugieren diferentes capacidades de respuesta de cada una de ellas. Por lo que ante el desconocimiento del verdadero potencial de respuesta de los niveles de IgE específica a Api m 4, establecemos el punto de corte en el

valor de 0.98 kU/L que es el resultante de la mediana de una población piloto representativa de nuestra área. La evolución del estudio demostró que este punto de corte tiene capacidad para discriminar entre dos maneras de ser alérgico al veneno de abeja, que hemos llamado fenotipos A y B.

6.4.1. Perfil de Sensibilización en ambos fenotipos.

En esta fase de nuestro estudio, el alérgeno nApi m 1 ha sido reconocido por el 100 % de los pacientes de ambos fenotipos en base al punto de corte estándar de 0.35 kU/L.

La prevalencia de sensibilización frente a rApi m 2 descrita por Köhler (47,9 %) (19) y por Sturm (52.2 %) (65) se corresponde con lo encontrado por nosotros en los pacientes del fenotipo A, mientras que en el fenotipo B la prevalencia es mucho más elevada sin que hayamos encontrado referencias equivalentes en la literatura. Este hecho podría justificarse con diferencias regionales o fuentes de sensibilización distintas al veneno de abeja, puesto que Api m 2 ha sido reconocido como

un marcador de reactividad cruzada entre los venenos de abejas y avispas (70).

De manera similar, la prevalencia de sensibilización frente a Api m 4 encontrada por Sturm (65) se corresponde con la de nuestro fenotipo A. En el fenotipo B es de esperar la máxima prevalencia por tratarse del criterio de selección específico.

Considerados globalmente, estos datos sugieren que los pacientes del fenotipo A tienen un perfil de sensibilización similar al descrito por otros autores (19,65), mientras que los pacientes del fenotipo B tienen una alta tasa de polisensibilización.

6.4.2. Perfil de pacientes alérgicos al veneno de abeja con el valor de IgE específica a Api m 4 \geq 0.98 kU/L, como único criterio discriminativo.

Encontramos en nuestra población, partiendo del nivel de IgE frente a Api m 4 (\geq 0.98 kU/L) como único criterio discriminativo, que los pacientes del fenotipo B habían sufrido RS más graves tras las picaduras, mostraban basalmente una mayor sensibilidad cutánea y unos niveles más elevados de IgE frente al veneno completo de Apis y frente a nApi m 1, así como unos niveles basales más elevados de IgG4 frente a Apis que sugieren la existencia

de un mayor número de picaduras previas atendiendo a lo descrito (136), a pesar de que la proporción de apicultores y la edad de los sujetos es similar en ambos fenotipos.

Todo ello conduce a interpretar de nuevo al fenotipo B como una forma más compleja o avanzada de la enfermedad, que puede ser sospechada a partir de un valor de IgE a Api m 4 \geq 0.98 kU/L.

6.4.3. Análisis de la seguridad, protección frente a picadura y evolución de marcadores inmunológicos tras dos años de ITV_a.

Una vez confirmado que hay diferentes maneras de ser alérgico al veneno de abeja en función del perfil de sensibilización, cabía preguntarse acerca de la posibilidad de una optimización terapéutica para cada grupo de pacientes, con los recursos disponibles en la actualidad.

En el mercado europeo disponemos de dos tipos de extractos de veneno de abeja, en relación con su contenido en componentes de bajo peso molecular, como el Api m 4. Parece

lógico tratar a los pacientes sensibilizados frente a Api m 4 con un extracto que lo contenga para dar una opción a la eficacia. Este es el motivo por el que los pacientes del fenotipo B fueron tratados con extracto acuoso nativo Pharmalgen®, y a los pacientes del fenotipo A se les asignó el extracto acuoso purificado Aquagen®, un extracto deplecionado de la fracción de más bajo peso molecular (incluyendo Api m 4), lo que, sin sacrificar eficacia (137), podía aportar una mejor tolerancia.

6.4.3.1. Menor tolerancia y falta de protección asociado a un perfil de pacientes alérgicos al veneno de abeja.

La alta tasa de RS encontrada en el fenotipo B (41%) podría explicarse en primer lugar por factores de predisposición individual del paciente (niveles más altos de IgE-Apis, IgE-nApi m 1 y IgE-Api m 4), reforzando el valor de Api m 4 como biomarcador de mala tolerancia a la ITV_a o en segundo lugar por factores asociados al extracto indicado (uso en el fenotipo A de un extracto conocidamente mejor tolerado) (85).

Factores como el valor de la triptasa sérica y la pauta de administración durante el inicio de la inmunoterapia, clásicamente reconocidos como influyentes sobre la tolerancia al tratamiento (92), eran idénticos en los fenotipos A y B por lo que puede excluirse su intervención en nuestro estudio.

Para comprobar la eficacia de la inmunoterapia hemos realizado el test de repicadura controlada, de conocida superioridad sobre la picadura espontánea ya que se trata de un test programable, protocolizado y cuyos resultados se pueden verificar y monitorizar (123).

En nuestro estudio los pacientes han recibido una picadura controlada al año y los dos años del inicio de la ITV_a, con el fin de asegurar

su protección, ya que se ha descrito en una población alérgica a veneno de avispa que una única repicadura tolerada no puede garantizar la máxima protección (138).

Los pacientes del fenotipo A alcanzaron la protección en el 100% de los casos en el primer año, manteniéndose en el segundo, lo que avala la efectividad del extracto purificado utilizado en las condiciones descritas. Estas condiciones, particularmente la selección fenotípica, parece haber sido crítica en la obtención del excelente resultado, si lo comparamos con el 85% de éxito obtenido por Rüeff utilizando el mismo extracto en una población de pacientes sin discriminar (83).

A pesar del contenido en melitina del extracto nativo empleado con el fenotipo B, la protección alcanzada fue del 82% en el primer año, sin que mejorara en el segundo. Uno de los dos pacientes que constituyeron el subgrupo de fracaso terapéutico no fue sometido al test de repicadura; a pesar de ello se contabilizó como "mal resultado" después de conocer que había sufrido picaduras espontáneas con resultado de RS, aunque fuesen más leves que las iniciales. El segundo paciente presentó tras la primera picadura controlada, un

episodio consistente en eritema cervico-facial inmediato y sibilancias, que respondieron adecuadamente al tratamiento con adrenalina y broncodilatadores. Como consecuencia de esto, se modificó la dosis de mantenimiento incrementando de 100 µg a 200 µg durante el segundo año, a pesar de lo cual volvió a presentar un resultado similar en el test de repicadura controlada el segundo año. Al finalizar el estudio se volvió a subir la dosis hasta 300 µg buscando un mejor resultado.

Ambos pacientes sufrieron repetidamente RS durante el inicio de ITV_a y el primero también durante el mantenimiento, confirmando el valor predictivo de fracaso terapéutico, que tiene la mala tolerancia a la ITV_a (102).

La protección del 93% de la población global, incluso superior a la obtenida en otras series (102), sugiere una adecuada elección de los extractos, y valida en cierta medida el criterio utilizado para la selección de los grupos.

6.4.3.2. Cambios inmunológicos acorde a su perfil de sensibilización y tratamiento con ITV_a.

Los cambios en las inmunoglobulinas (IgE e IgG4 frente a extracto completo de *Apis mellifera*) inducidos por la inmunoterapia, como se han descrito previamente (83,94), han sido confirmados tanto en el fenotipo A como en el B.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, solo hay dos trabajos que analizan la respuesta IgE e IgG4 de la inmunoterapia frente a Api m1 (19,122). Nuestros resultados coinciden con los de ambos, confirmando el ya conocido mecanismo de cambio de respuesta de las células B (139). Los cambios ocurridos para Api m 1 posiblemente trasladen lo medido frente al extracto completo.

Los valores de IgE frente a Api m 4 se han reducido significativamente en el fenotipo B desde el primer año de ITV_a, algo que no ocurre en el fenotipo A, explicable por los niveles mínimos al comienzo y por la ausencia de este principio activo en el extracto acuoso purificado y la consiguiente y esperada falta de respuesta específica.

Es necesario destacar que los niveles de IgE a Api m 4 no se han elevado en los pacientes del fenotipo A, excluyendo la sensibilización yatrógena que podría esperarse en caso de haber sido tratados con un extracto completo.

Lamentablemente no hemos dispuesto de la tecnología necesaria para determinar IgG4 frente a Api m 4, que habría sido de gran interés para confirmar la respuesta a la inmunoterapia a este nivel, algo ya comprobado por Köhler en un grupo de 20 pacientes, aunque sin especificar con qué tipo de extracto habían sido tratados (19). Esta herramienta puede satisfacer indirectamente el desconocimiento habitual sobre el contenido de las vacunas de venenos de himenópteros en componentes alérgicos habituales, debido a su especial modo de estandarización.

Uno de los rasgos característicos del grupo fenotípico B ha sido una alta sensibilidad cutánea al veneno de abeja medida por intradermorreacción y persistente a lo largo de todo el tiempo del estudio. Otros autores han confirmado esta cinética de respuesta (140) y se ha demostrado que el descenso puede ser tan tardío como a los 5 años (94,122). Cuando se trata de la menor sensibilidad cutánea de los pacientes con fenotipo A, la reducción se puso de manifiesto desde el primer año sugiriendo alguna diferencia que afecte a parámetros inflamatorios de los mastocitos cutáneos, que pudieran ser modificados por la inmunoterapia con independencia de los cambios en las inmunoglobulinas séricas.

6.5. Diagnóstico molecular en la alergia a veneno de abeja y su impacto sobre la práctica clínica.

La alergia al veneno de abeja supone una importante causa de enfermedad por el riesgo de sufrir una reacción anafiláctica amenazante para la vida al ser picado de nuevo. El tratamiento etiológico con inmunoterapia es eficaz pero las reacciones sistémicas ocurridas sobre todo durante el inicio de la ITV_a constituyen un motivo de preocupación por su posible gravedad y por su relación con una menor protección tras el tratamiento.

El estudio diagnóstico basado en componentes alergénicos del veneno de abeja permite identificar con precisión el alérgeno o alérgenos que producen la enfermedad en cada paciente y establecer perfiles de reactividad individual, al mismo tiempo que contribuye a una comprensión más detallada sobre el papel de cada componente del veneno en particular.

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

En el presente trabajo, tras estudiar la sensibilización frente a los alérgenos Api m 1, Api m 2, y Api m 4, destacamos que la sensibilización a Api m 4 se ha comportado como un alérgeno relevante en nuestra población, identificándose como un biomarcador asociado a la mala tolerancia de la ITV_a, desde niveles mínimos establecidos en 0.1 kU/L. La identificación de puntos de corte significativos cuenta con gran importancia clínica ya que ayuda a discriminar a los pacientes que pueden tener riesgo de sufrir RS de los que no.

Si determinamos sistemáticamente la IgE frente a Api m 4 en nuestros pacientes, podríamos identificar diferentes perfiles de alergia al veneno de abeja y utilizar estrategias terapéuticas adaptadas a los mismos que permitieran mejorar la seguridad y la eficacia de la ITV_a. Por ejemplo, los pacientes sensibles a melitina podrían beneficiarse de intervenciones específicas desde el comienzo como la premedicación durante la ITV_a, que ya ha sido propuesta para mejorar la tolerancia (106–108), o el uso de dosis más elevadas de veneno, ofreciendo mayor oportunidad a la eficacia.

6.6. Limitaciones del estudio y sugerencias para futuras investigaciones.

A pesar de las ventajas sugeridas, este estudio cuenta con algunas limitaciones necesarias de mencionar:

En primer lugar destaca el tamaño muestral limitado. La alergia al veneno de abeja es una enfermedad de baja prevalencia, y el número de pacientes incluido en este estudio puede considerarse elevado si se tiene en cuenta que se trata de un estudio unicéntrico. Sin embargo, sería necesario aumentar el tamaño muestral incluyendo amplias poblaciones para poder elevar la potencia estadística.

En segundo lugar señalamos el limitado

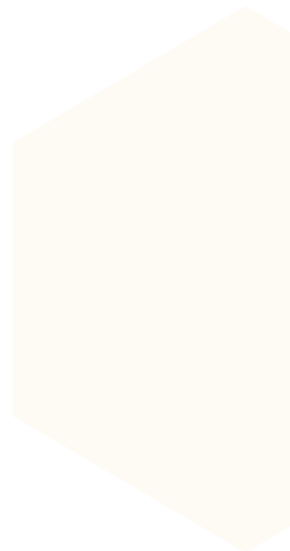
número de alérgenos estudiados. Actualmente existen 12 alérgenos identificados del veneno de abeja, aunque a la fecha del inicio de este estudio, solamente tuvimos disponibles para uso clínico tres: Api m 1, Api m 2 y Api m 4 para su determinación en plataforma ADVIA Centaur® en un entorno de investigación colaborativa. Ni siquiera a la finalización del estudio, se encuentran disponibles de forma rutinaria en los centros asistenciales. Además, recientes estudios demuestran que existen otras moléculas de gran interés, como Api m10 (Icarapina) (39), un alérgeno mayoritario con gran capacidad para producir IgE, o Api m6 (Inhibidor de proteasa) (36)

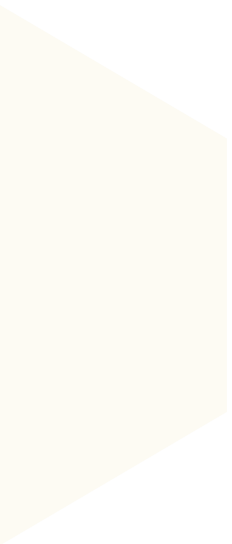
un alérgeno minoritario de relevancia clínica desconocida. La reciente obtención de prototipos recombinantes de Api m 3 y Api m 5 entre otras proteínas (19), abre un espectro de posibilidades de estudios que se muestra prometedor a medio plazo.

En tercer lugar, la actual estandarización de los extractos alérgicos para inmunoterapia con veneno de abeja. Como se reseñó brevemente al inicio en la justificación, las vacunas de veneno de abeja se estandarizan en base a la actividad enzimática de fosfolipasa A2 e hialuronidasa y a la cantidad total de proteínas, sin considerar el contenido en componentes alérgicos individuales. Una vez conocida la relevancia

clínica de los diferentes alérgenos del veneno de abeja, se hace incuestionable su necesidad para el diagnóstico habitual de los pacientes, y también parece obvio que su contenido en los extractos inyectados con fines terapéuticos debería ser conocido, cuantificado y controlado en todos los lotes.

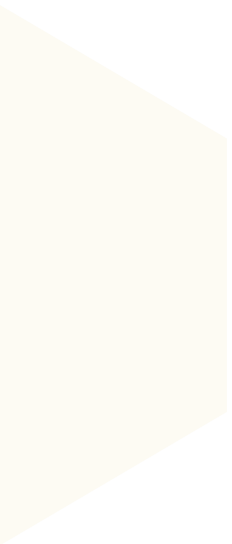
En un entorno realista, contando exclusivamente con las herramientas disponibles, nuestro estudio se optimizaría con un segundo estudio multicéntrico, prospectivo y aleatorizado de cuatro brazos, en el que los dos fenotipos encontrados recibieran cada uno de los dos tratamientos existentes.





7. CONCLUSIONES.

- 1.- Las sensibilizaciones frente a Api m 1, Api m 2 y Api m 4 existen en nuestra población. Los tres alérgenos se comportan como mayoritarios.
- 2.- La sensibilización frente a Api m 4 se ha comportado como biomarcador en pacientes con mala tolerancia durante el inicio de la ITVa, desde valores detectables.
- 3.- Durante el inicio de la ITVa, la sensibilización intensa frente a Api m 1 es un factor de riesgo para sufrir RS de mayor gravedad. La sensibilización media a Api m 2 es de utilidad clínica para predecir reacciones graves y recurrentes.
- 4.- La IgE frente a Api m 4 es un biomarcador fenotípico crítico en la sensibilización al veneno de abeja, capaz de demostrar diferentes maneras de ser alérgico.
- 5.- Los pacientes del fenotipo B (altos respondedores a Api m 4) se caracterizan, entre otras, por una mala tolerancia a la inmunoterapia y una peor tasa de éxito de la misma, pero no tienen una respuesta inmunológica a la ITVa diferente de lo esperable.
- 6.- Considerando los resultados globales de eficacia, la asignación de vacunas realizada en este estudio a cada fenotipo, ha sido acertada.



8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ornos C, Ortiz-Sánchez FJ. Hymenoptera, Apoidea I. In: Ramos MA, editor. Fauna Iberica Vol 23. CSIC. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales; 2004.
2. Marques L, Vega A, Munoz E, Moreno-Ancillo A. Epidemiologic observations on Hymenoptera allergy in Spain: the Alergologica-2005 study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 Suppl 2:51-5.
3. Jean-Prost P. Apicultura. 3a Edición. España: Mundi-Prensa; 1987.
4. Müller U. Insect Sting Allergy Clinical: Clinical picture, diagnosis and treatment. Gustav Fis. Stuttgart. New York; 1990.
5. Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci*. 2007 Feb 7;274:303-13.
6. Coordinadora de organizaciones de agricultores y ganaderos. COAG. Apicultura. Anuario Agrario 2014. [Internet]. Acceso en Julio 2015: <http://www.coag.org/index.php?s=1&n=2-5&np=2>.
7. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectordelamiel2014_tcm7-381460.pdf. Acceso en Julio 2015.
8. Hoffman DR, Jacobson RS. Allergens in hymenoptera venom XII: how much protein is in a sting? *Ann Allergy*. 1984 Apr;52:276-8.
9. Schumacher MJ, Tveten MS, Egen NB. Rate and quantity of delivery of venom from honeybee stings. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 May;93:831-5.
10. Muller UR. Hymenoptera venom proteins and peptides for diagnosis and treatment of venom allergic patients. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011;10:420-8.
11. Spillner E, Blank S, Jakob T. Hymenoptera allergens: from venom to "venome". *Front Immunol*. 2014 Jan;5:77.
12. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. [Internet]. Acceso en Julio 2015: <http://www.allergen.org/search.php?allergenname=&allergensource=Apis+mellifera&TaxSource=&TaxOrder=&foodallerg=all&bioname=>
13. De Graaf DC, Aerts M, Danneels E, Devreese B. Bee, wasp and ant venomomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J Proteomics*. 2009 Mar 6;72:145-54.
14. Fernández-Caldas E. Presente y futuro de la Inmunoterapia. *Alergol Inmunol Clin*. 2001;16(Extraordinario Núm 1):6-12.
15. Muller UR. Recombinant Hymenoptera venom allergens. *Allergy*. 2002;57:570-6.
16. Brown TC. Reactions to honeybee stings: an allergic prospective. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013 Aug;13:365-71.
17. Sobotka AK, Franklin RM, Adkinson NF, Valentine M, Baer H, Lichtenstein LM. Allergy to insect stings. II. Phospholipase A: the major allergen in honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1976 Jan;57:29-40.
18. Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy*. 2009;64:543-8.
19. Köhler J, Blank S, Müller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133:1383-9.

20. Marqués L, Alfaya T, Guspí R. Alergia al veneno de los himenópteros: aspectos básicos. Tratado de Alergología 2o Edición. ISBN:978-84-16270-36-1. Ergon. Madrid; 2015. En imprenta.
21. Kuchler K, Gmachl M, Sippl MJ, Kreil G. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur J Biochem.* 1989 Sep 1;184:249-54.
22. Dudler T, Chen WQ, Wang S, Schneider T, Annand RR, Dempcy RO, et al. High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Dec 2;1165:201-10.
23. Müller UR, Dudler T, Schneider T, Cramer R, Fischer H, Skrbic D, et al. Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A2 from honeybee venom is similar. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Sep;96:395-402.
24. Soldatova LN, Cramer R, Gmachl M, Kemeny DM, Schmidt M, Weber M, et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 May;101:691-8.
25. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;123:99-106.
26. Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:184-90 e1.
27. Kemeny DM, Dalton N, Lawrence AJ, Pearce FL, Vernon CA. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *Eur J Biochem.* 1984;139:217-23.
28. Gmachl M, Kreil G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90:3569-73.
29. Schröder E, Lübke K, Lehmann M, Beetz I. Haemolytic activity and action on the surface tension of aqueous solutions of synthetic melittins and their derivatives. *Experientia.* 1971 Jul;27:764-5.
30. Paull BR, Yunginger JW, Gleich GJ. Melittin: an allergen of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol.* 1977;59:334-8.
31. Du Y-R, Xiao Y, Lu Z-M, Ding J, Xie F, Fu H, et al. Melittin activates TRPV1 receptors in primary nociceptive sensory neurons via the phospholipase A2 cascade pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Apr 29;408:32-7.
32. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep.* 2007 Oct;27:189-223.
33. Grunwald T, Bockisch B, Spillner E, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW. Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Apr;117:848-54.
34. Blank S, Seismann H, Bockisch B, Braren I, Cifuentes L, McIntyre M, et al. Identification, Recombinant Expression, and Characterization of the 100 kDa High Molecular Weight Hymenoptera Venom Allergens Api m 5 and Ves v 3. *J Immunol.* 2010 Mar 26;184:5403-13.
35. Kettner A, Hughes GJ, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, et al. Api m 6: a new bee venom allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 May;107:914-20.
36. Michel Y, McIntyre M, Ginglinger H, Ollert M, Cifuentes L, Blank S, et al. The putative serine protease inhibitor Api m 6 from *Apis mellifera* venom: recombinant and structural evaluation. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22:476-84.
37. Winningham KM, Fitch CD, Schmidt M, Hoffman DR. Hymenoptera venom protease allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Oct;114:928-33.

38. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. [Internet]. Acceso en Julio 2015: <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=73>.
39. Blank S, Seismann H, Michel Y, McIntyre M, Cifuentes L, Braren I, et al. Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy*. 2011;66:1322–9.
40. Blank S, Bantleon FI, McIntyre M, Ollert M, Spillner E. The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:976–85.
41. Blank S, Seismann H, McIntyre M, Ollert M, Wolf S, Bantleon FI, et al. Vitellogenins are new high molecular weight components and allergens (Api m 12 and Ves v 6) of *Apis mellifera* and *Vespula vulgaris* venom. *PLoS One*. 2013;8:e62009.
42. Barber D, Escribese M., Sanz M. Aspectos básicos de la inmunología en relación con las enfermedades alérgicas. *Tratado de Alergología 2o Edición. Tomo I*. ISBN:978-84-16270-37-8. Ergon. Madrid; 2015. p. 47–58.
43. Bilò MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. *Clin Exp Allergy*. 2009 Oct;39:1467–76.
44. Bilò BM, Bonifazi F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;8:330–7.
45. Golden DB, Moffitt J, Nicklas RA, Freeman T, Graft DF, Reisman RE, et al. Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update 2011. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:823–52.
46. Annala I. Bee venom allergy. *Clin Exp Allergy*. 2000 Dec;30:1682–7.
47. Niedozytko M, de Monchy J, van Doormaal JJ, Jassem E, Oude Elberink JN. Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy*. 2009;64:1237–45.
48. Nag SS, Ghosh N, Singh AK, Nayek K, Mitra P. Nephritic syndrome following multiple bee stings: a late hypersensitivity reaction. *Paediatr Int Child Health*. 2015 May;35:157–9.
49. Karasu E, Minareci K. Myocardial infarction following a bee sting: an example of Type II Kounis syndrome. *Int J Cardiol*. 2011 May 5;148:382–4.
50. Taggar JS, Watson T, Musarrat K, Millane T. Kounis syndrome presenting as ST-segment elevation myocardial infarction following a hymenoptera (bee) sting. *Int J Cardiol*. 2009 Aug 14;136:e29–30.
51. Golden DB. Insect sting allergy and venom immunotherapy: a model and a mystery. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:439–47.
52. Bilò MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:1467–76.
53. Bilò BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005;60:1339–49.
54. Vega A, Antolín D, Ruiz B. Alergia al veneno de himenópteros: clínica, diagnóstico y tratamiento. *Tratado de Alergología 2o Edición*. ISBN:978-84-16270-36-1. Ergon. Madrid; 2015. En imprenta.
55. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Nov;124:1047–54.
56. Gonzalez-de-Olano D, Alvarez-Twose I, Vega A, Orfao A, Escribano L. Venom immunotherapy in patients with mastocytosis and hymenoptera venom anaphylaxis. *Immunotherapy*. 2011;3:637–51.

57. Van der Linden PW, Hack CE, Struyvenberg A, van der Zwan JK. Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Aug;94:151-9.
58. Von Moos S, Graf N, Johansen P, Müllner G, Kündig TM, Senti G. Risk assessment of Hymenoptera re-sting frequency: implications for decision-making in venom immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013 Jan;160:86-92.
59. Muller UR. Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5:343-7.
60. Richter AG, Nightingale P, Huissoon AP, Krishna MT. Risk factors for systemic reactions to bee venom in British beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106:159-63.
61. Strohmeier B, Aberer W, Bokanovic D, Komericki P, Sturm GJ. Simultaneous intradermal testing with hymenoptera venoms is safe and more efficient than sequential testing. *Allergy*. 2013 Apr;68:542-4.
62. Obispo T. Nuevos conceptos en la fabricación de extractos de veneno de himenópteros. *Allergol Immunol Clin*. 2002;17:215-20.
63. Ricci G, Capelli M, Miniero R, Menna G, Zannarini L, Dillon P, et al. A comparison of different allergometric tests, skin prick test, Pharmacia UniCAP and ADVIA Centaur, for diagnosis of allergic diseases in children. *Allergy*. 2003 Jan;58:38-45.
64. Petersen AB, Gudmann P, Milvang-Gronager P, Morkeberg R, Bogestrand S, Linneberg A, et al. Performance evaluation of a specific IgE assay developed for the ADVIA centaur immunoassay system. *Clin Biochem*. 2004;37:882-92.
65. Sturm GJ, Hemmer W, Hawranek T, Lang R, Ollert M, Spillner E, et al. Detection of IgE to recombinant Api m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; 2011 Jul;128:247-8.
66. Korošec P, Silar M, Zidarn M, Košnik M. Reply: To PMID 22277204. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Sep;130:818-9.
67. Jakob T, Köhler J, Blank S, Magnusson U, Huss-Marp J, Spillner E, et al. Comparable IgE reactivity to natural and recombinant Api m 1 in cross-reactive carbohydrate determinant-negative patients with bee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130:276-8; author reply 278-9.
68. Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S et al. Reply. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128:128:248.
69. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Eržen R, Zidarn M, et al. Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128:671-3.
70. Mittermann I, Zidarn M, Silar M, Markovic-Housley Z, Aberer W, Korosec P, et al. Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:1300-7 e3.
71. Mertens M, Brehler R. Suitability of different glycoproteins and test systems for detecting cross-reactive carbohydrate determinant-specific IgE in hymenoptera venom-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011 Jan;156:43-50.
72. Visscher PK, Vetter RS, Camazine S. Removing bee stings. *Lancet*. 1996;348:301-2.
73. Munstedt K, Wrobel D, Kalder M. Efficacy of venom immunotherapy in beekeepers. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20:58-62.
74. Cardona Dahl V. [Guideline for the management of anaphylaxis]. *Med Clin*. 2011;136:349-55.

75. Dhimi S, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Worm M, Bilo MB, et al. Management of anaphylaxis: a systematic review. *Allergy*. 2014;69:168–75.
76. Bonifazi F, Jutel M, Bilo BM, Birnbaum J, Muller U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy*. 2005;60:1459–70.
77. Oude Elberink JN, De Monchy JG, Van Der Heide S, Guyatt GH, Dubois AE. Venom immunotherapy improves health-related quality of life in patients allergic to yellow jacket venom. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:174–82.
78. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Mar;133:621–31.
79. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Rückert B, Akdis CA, Akdis M. *In vivo* switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med*. 2008 Nov 24;205:2887–98.
80. Varga E-M, Kausar F, Aberer W, Zach M, Eber E, Durham SR, et al. Tolerant beekeepers display venom-specific functional IgG4 antibodies in the absence of specific IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 May;131:1419–21.
81. Golden DB, Kelly D, Hamilton RG, Craig TJ. Venom immunotherapy reduces large local reactions to insect stings. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:1371–5.
82. Hamilton RG, Golden DB, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Case report of venom immunotherapy for a patient with large local reactions. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87:134–7.
83. Rueff F, Wolf H, Schnitker J, Ring J, Przybilla B. Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy*. 2004;59:589–95.
84. Müller UR. Venom immunotherapy: aqueous vs aluminium hydroxide adsorbed extracts. *Allergy*. 2004 Jun;59:577–8.
85. Bilo MB, Cinti B, Brianzoni MF, Braschi MC, Bonifazi M, Antonicelli L. Honeybee venom immunotherapy: a comparative study using purified and nonpurified aqueous extracts in patients with normal Basal serum tryptase concentrations. *J Allergy*. 2012;2012:869243.
86. Bonifazi F, Jutel M, Biló BM, Birnbaum J, Muller U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy*. 2005 Dec;60:1459–70.
87. Incorvaia C, Frati F, Dell’Albani I, Robino A, Cattaneo E, Mauro M, et al. Safety of hymenoptera venom immunotherapy: a systematic review. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;12:2527–32.
88. Boyle RJ, Elremeli M, Hockenhull J, Cherry MG, Bulsara MK, Daniels M, et al. Venom immunotherapy for preventing allergic reactions to insect stings. *Cochrane database Syst Rev*. 2012 Jan;10:CD008838.
89. Patella V, Florio G, Giuliano A, Oricchio C, Spadaro G, Marone G, et al. Hymenoptera Venom Immunotherapy: Tolerance and Efficacy of an Ultrarush Protocol versus a Rush and a Slow Conventional Protocol. *J Allergy*. 2012 Jan;2012:192.
90. Köhli-Wiesner A, Stahlberger L, Bieli C, Stricker T, Lauener R. Induction of specific immunotherapy with hymenoptera venoms using ultrarush regimen in children: safety and tolerance. *J Allergy*. 2012 Jan;2012:790–910.
91. Goldberg A, Yogev A, Confino-Cohen R. Three days rush venom immunotherapy in bee allergy: safe, inexpensive and instantaneously effective. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156:90–8.
92. Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of side effects during the buildup phase of venom immunotherapy for

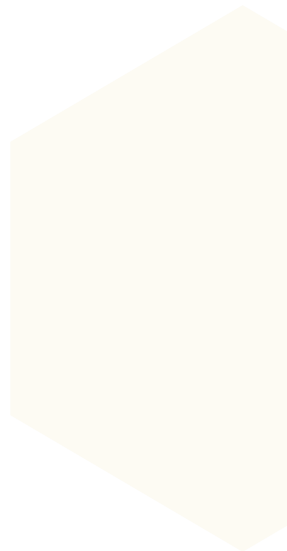
- Hymenoptera venom allergy: the importance of baseline serum tryptase. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:105–11 e5.
93. Sanchez-Machin I, Moreno C, Gonzalez R, Iglesias-Souto J, Perez E, Matheu V. Safety of a 2-visit cluster schedule of venom immunotherapy in outpatients at risk of life-threatening anaphylaxis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010;20:91–2.
94. Quercia O, Emiliani F, Pecora S, Burastero SE, Stefanini GF. Efficacy, safety, and modulation of immunologic markers by immunotherapy with honeybee venom: comparison of standardized quality depot versus aqueous extract. *Allergy Asthma Proc.* 2006;27:151–8.
95. Sanchez-Morillas L, Reano Martos M, Rodriguez Mosquera M, Iglesias Cadarso A, Dominguez Lazaro AR. [Safety of rush immunotherapy with Hymenoptera venom]. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2005;33:224–7.
96. Schiavino D, Nucera E, Pollastrini E, De Pasquale T, Buonomo A, Bartolozzi F, et al. Specific ultrarush desensitization in Hymenoptera venom-allergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004 Apr;92:409–13.
97. Birnbaum J, Ramadour M, Magnan A, Vervloet D. Hymenoptera ultra-rush venom immunotherapy (210 min): a safety study and risk factors. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:58–64.
98. Mosbech H, Muller U. Side-effects of insect venom immunotherapy: results from an EAACI multicenter study. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology.* *Allergy.* 2000;55:1005–10.
99. Moreno C, Guerra F. Inmunoterapia con veneno de himenópteros. Seguridad de una pauta agrupada. *Alergol Inmunol Clin.* 1999;14:315–21.
100. Rueff F, Przybilla B. Venom immunotherapy: adverse reactions and treatment failure. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4:307–11.
101. Gonzalez de Olano D, Alvarez-Twose I, Esteban-Lopez MI, Sanchez-Munoz L, de Durana MD, Vega A, et al. Safety and effectiveness of immunotherapy in patients with indolent systemic mastocytosis presenting with Hymenoptera venom anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:519–26.
102. Ruëff F, Vos B, Oude Elberink J, Bender A, Chatelain R, Dugas-Breit S, et al. Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2014 May;44:736–46.
103. Stoevesandt J, Hain J, Kerstan A, Trautmann A. Over- and underestimated parameters in severe Hymenoptera venom-induced anaphylaxis: cardiovascular medication and absence of urticaria/angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:698–704 e1.
104. Muller UR, Haeberli G. Use of beta-blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:606–10.
105. Pesek RD, Lockey RF. Treatment of Hymenoptera venom allergy: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2014 Aug;14:340–6.
106. Müller U, Hari Y, Berchtold E. Premedication with antihistamines may enhance efficacy of specific-allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jan;107:81–6.
107. Muller UR, Jutel M, Reimers A, Zumkehr J, Huber C, Kriegel C, et al. Clinical and immunologic effects of H1 antihistamine preventive medication during honeybee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:1001–7 e4.
108. Reimers A, Hari Y, Muller U. Reduction of side-effects from ultrarush immunotherapy with honeybee venom by pretreatment with fexofenadine: a double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy.* 2000;55(5):484–8.
109. Wohrl S, Gamper S, Hemmer W, Heinze G, Stingl G, Kinaciyan T. Premedication with

- montelukast reduces local reactions of allergen immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;144:137–42.
- 110.** Galera C, Soohun N, Zankar N, Caimmi S, Gallen C, Demoly P. Severe anaphylaxis to bee venom immunotherapy: efficacy of pretreatment and concurrent treatment with omalizumab. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19:225–9.
- 111.** Soriano Gomis V, Gonzalez Delgado P, Niveiro Hernandez E. Failure of omalizumab treatment after recurrent systemic reactions to bee-venom immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008 Jan;18:225–6.
- 112.** Biló MB, Antonicelli L, Bonifazi F. Honeybee venom immunotherapy: certainties and pitfalls. *Immunotherapy*. 2012;4:1153–66.
- 113.** Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of hymenoptera venom hypersensitivity: a meta-analysis. *Clin Ther*. 2000 Mar;22:351–8.
- 114.** Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Seitz MJ, et al. Clinical effectiveness of hymenoptera venom immunotherapy: a prospective observational multicenter study of the European academy of allergology and clinical immunology interest group on insect venom hypersensitivity. *PLoS One*. 2013 Jan;8:e63233.
- 115.** Muller 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.
- 116.** Biló MB. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. *Allergy*. 2011 Jul;66 Suppl 9:35–7.
- 117.** Antolín-Amérigo D, Moreno Aguilar C, Vega A, Alvarez-Mon M. Venom immunotherapy: an updated review. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014 Jul;14:449.
- 118.** Rueff F, Wenderoth A, Przybilla B. Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:1027–32.
- 119.** Cavallucci E, Ramondo S, Renzetti A, Turi MC, Di Claudio F, Braga M, et al. Maintenance venom immunotherapy administered at a 3-month interval preserves safety and efficacy and improves adherence. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010 Jan;20:63–8.
- 120.** Simioni L, Vianello A, Bonadonna P, Marcer G, Severino M, Pagani M, et al. Efficacy of venom immunotherapy given every 3 or 4 months: a prospective comparison with the conventional regimen. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;110:51–4.
- 121.** Van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Apr;131:1204–12.
- 122.** Carballada F, Boquete M, Nunez R, Lombardero M, de la Torre F. Follow-up of venom immunotherapy (VIT) based on conventional techniques and monitoring of immunoglobulin E to individual venom allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20:506–13.
- 123.** Moreno C. Pro-Sting Challenge is useful. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2015*. Barcelona, Spain; 2015.
- 124.** Cortellini G, Severino M, Francescato E, Turillazzi S, Spadolini I, Rogkakou A, et al. Evaluation and validation of a bee venom sting challenge performed by a micro-syringe. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012 Dec;109:438–41.
- 125.** Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling H-J, Valovirta E. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2006 Jan;61 Suppl 8:1–20.

126. Petersen AB, Gudmann P, Milvang-Grønager P, Mørkeberg R, Bøgestrand S, Linneberg A, et al. Performance evaluation of a specific IgE assay developed for the ADVIA centaur immunoassay system. *Clin Biochem.* 2004 Oct;37:882–92.
127. U. S. Dept. of Health and Human Services. Centers for Disease Control. Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to healthcare and public safety workers. 1989.
128. Müller U, Fricker M, Wymann D, Blaser K, Cramer R. Increased specificity of diagnostic tests with recombinant major bee venom allergen phospholipase A2. *Clin Exp Allergy.* 1997 Aug;27:915–20.
129. Förster E, Dudler T, Gmachl M, Aberer W, Urbanek R, Suter M. Natural and recombinant enzymatically active or inactive bee venom phospholipase A2 has the same potency to release histamine from basophils in patients with Hymenoptera allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Jun;95:1229–35.
130. Korošec P, Žiberna K, Šilar M, Dežman M, Čelesnik Smodiš N, Rijavec 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 Jun 5.
131. Pascal M, Munoz-Cano R, Reina Z, Palacin A, Vilella R, Picado C, et al. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy.* 2012;42:1529–39.
132. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007 Jan;17 Suppl 1:36–40.
133. Sastre J, Rodríguez F, Campo P, Laffond E, Marín A, Alonso MD. Adverse reactions to immunotherapy are associated with different patterns of sensitization to grass allergens. *Allergy.* 2015 May;70:598–600.
134. Eich-Wanger C, Müller UR. Bee sting allergy in beekeepers. *Clin Exp Allergy.* 1998 Oct;28:1292–8.
135. Annala IT, Karjalainen ES, Annala PA, Kuusisto PA. Bee and wasp sting reactions in current beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1996/11/01 ed. 1996;77:423–7.
136. Müller U, Johansson SG, Streit C. Hymenoptera sting hypersensitivity: IgE, IgG and haemagglutinating antibodies to bee venom constituents in relation to exposure and clinical reaction to bee stings. *Clin Allergy.* 1978 May;8:267–72.
137. Bilo MB, Antonicelli L, Bonifazi F. Purified vs. nonpurified venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10:330–6.
138. Franken HH, Dubois AE, Minkema HJ, van der Heide S, de Monchy JG. Lack of reproducibility of a single negative sting challenge response in the assessment of anaphylactic risk in patients with suspected yellow jacket hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1994 Feb;93:431–6.
139. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clin Exp Allergy.* 2011 Sep;41:1226–34.
140. Pasaoglu G, Sin BA, Misirligil Z. Rush hymenoptera venom immunotherapy is efficacious and safe. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2006 Jan;16:232–8.



9. ANEXOS.



ANEXO I. CLASIFICACIÓN DE MÜLLER DE LAS REACCIONES SISTÉMICAS POR PICADURAS DE HIMENÓPTEROS (4).

Grado I:	Urticaria generalizada, picor, malestar, ansiedad.
Grado II:	Cualquiera de los anteriores y dos o más de los siguientes: Angioedema (también se considera Grado II cuando aparece sin otro síntoma acompañante), opresión torácica, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, mareo.
Grado III:	Cualquiera de los anteriores y dos o más de los siguientes: Disnea, sibilancias, estridor (cualquiera de éstos tres se considera Grado III cuando aparece sin otro síntoma acompañante), disfagia, disartria, ronquera, debilidad, confusión, sensación de muerte inminente.
Grado IV:	Cualquiera de los anteriores y dos o más de los siguientes: hipotensión, colapso, pérdida de conocimiento, incontinencia de esfínteres, cianosis.

ANEXO II. ACEPTACIÓN DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HURS.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Hospital Universitario Reina Sofía

La Subcomisión de Investigación Sanitaria (Comisión de Ética e Investigación Sanitarias) del Hospital Universitario "Reina Sofía" de Córdoba, ha estudiado y evaluado el proyecto de investigación titulado: "Valoración del perfil molecular de los pacientes alérgicos a veneno de *Apis mellifera* en la eficacia del tratamiento con inmunoterapia subcutánea", del cual figura como Investigadora Principal la Dra. Berta Ruíz León (Servicio Alergia).

Esta Subcomisión considera que este proyecto respeta los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y a la biomedicina, demostrando los autores conocer suficientemente los antecedentes y el estado actual del tema que proponen investigar, estando bien definidos los objetivos del proyecto y siendo adecuada su metodología.

Por lo que hace constar la viabilidad del proyecto de investigación en todos sus términos y estima que los resultados pueden ser de gran interés.

Y para que conste, lo firmo en Córdoba a 28 de Enero de 2.009

EL PRESIDENTE
COMISION DE ETICA E
INVESTIGACION SANITARIAS
Subcomisión de Investigación
HOSPITAL UNIVERSITARIO "REINA SOFIA"
Fdo.: Manuel M. García Carasusan

ANEXO III. HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE.

Por favor, lea atentamente este documento en el cual le invitamos a participar en un estudio clínico que lleva por título: **VALORACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS A VENENO DE *APIS MELLIFERA* EN LA SEGURIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA SUBCUTÁNEA.**

Usted ha sido diagnosticado de enfermedad alérgica por sensibilización al veneno de abeja. Este es el motivo por el que usted ha sufrido una reacción tan grave tras ser picado por uno de estos insectos.

Debe saber que cada vez que usted sea picado por una abeja va a sufrir el mismo tipo de reacción. Incluso en un porcentaje de pacientes, la reacción a las sucesivas picaduras es más grave que la que acaba de sufrir. Por este motivo, no sólo es importante tratar su reacción alérgica sino que hay que tratar de evitar que ante posibles nuevas picaduras usted vuelva a sufrir una reacción como la que ha tenido. Para ello, el único tratamiento posible es la inmunoterapia con veneno de abeja. Se trata de un tratamiento que es utilizado frecuentemente en nuestro Servicio de Alergia para el tratamiento de la enfermedad que usted padece y que tiene una gran eficacia clínica.

El tratamiento se administra inyectándolo por vía subcutánea y consta de dos fases. Una primera, en la que la administración es semanal, y en la que se va incrementando la dosis de forma progresiva hasta alcanzar la dosis de mantenimiento. Una vez alcanzada la dosis anterior, se inicia la segunda fase del tratamiento, en la que la administración es de una dosis única mensual. La duración del estudio será de 2 años, decidiendo luego con su alergólogo si continuar o no con el tratamiento, en función de los resultados que se vayan observando durante este primer periodo de tratamiento. Durante el tratamiento usted puede sufrir algún tipo de reacción adversa. El tipo de reacción que sufre puede ser local (en el lugar de la inyección) o generalizada. Esta última puede ser semejante a la que sufrió cuando fue picado por última vez por una abeja. Todas las dosis le serán administradas en nuestra Unidad de Inmunoterapia, debiendo permanecer unos 45 minutos en observación una vez finalizado el tratamiento. Este es el procedimiento habitual que seguimos con todos los pacientes que tienen su mismo problema. En caso de que usted sufra una reacción durante este periodo de observación será tratado de forma inmediata. En caso de sufrirla fuera del hospital, más adelante le indicamos como actuar.

El **objetivo** del presente estudio es valorar la eficacia del tratamiento en las condiciones habituales, valorando la influencia de la inmunoterapia sobre ciertos anticuerpos. De esta manera podremos aumentar el conocimiento que actualmente tenemos de su enfermedad y poder mejorar nuestra actitud terapéutica, de lo que se beneficiarán, además de usted, otros pacientes que presenten su mismo problema. No se le va a someter a ninguna prueba diagnóstica especial, fuera de las habituales, y el tratamiento es el estándar para la enfermedad que usted padece.

Si durante el estudio le surge cualquier problema o incidencia en relación con el tratamiento administrado y su enfermedad alérgica, como por ejemplo aparición de una reacción adversa como las descritas anteriormente, o es picado nuevamente por una abeja, debe ponerse en contacto con la **Dra. Berta Ruiz** o la **Dra. Carmen Moreno**, llamando al **teléfono:**

Por favor, antes de decidir si desea participar o no en el estudio, lea detenidamente esta hoja. Realice cuantas preguntas quiera y solicite todas las aclaraciones que desee a su médico especialista antes de tomar su decisión. Debe saber que su participación es libre, y que si, en cualquier momento, decide abandonar el estudio, esto no le supondrá ningún deterioro en su relación con su médico especialista ni en seguir recibiendo el tratamiento más adecuado para el control de su enfermedad alérgica.

Todos los datos contenidos en el estudio serán tratados de forma confidencial, de acuerdo a la legislación vigente, y en ningún caso se hará uso de ellos fuera del ámbito científico del estudio.

ANEXO IV. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO.

Título: VALORACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS A VENENO DE *APIS MELLIFERA* EN LA SEGURIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA SUBCUTÁNEA.

Yo.....
(nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado
He podido hacer preguntas sobre el estudio
He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con:
(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria
Comprendo que puedo retirarme del estudio:
1º Cuando quiera
2º Sin tener que dar explicaciones
3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Fecha

Firma del participante

HOJA DE CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE

Título: VALORACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS A VENENO DE *APIS MELLIFERA* EN LA SEGURIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA SUBCUTÁNEA.

Yo.....
(nombre y apellidos)

en calidad de
(relación con el participante)

de.....
(nombre del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado
He podido hacer preguntas sobre el estudio
He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con:
(nombre del investigador)

Comprendo que la participación es voluntaria
Comprendo que puede retirarse del estudio:
1º Cuando quiera
2º Sin tener que dar explicaciones
3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos

En mi presencia se ha dado a.....
(nombre del participante)
toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento
y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que.
(nombre del participante)
participe en el estudio

Fecha

Firma del representante

ANEXO V. CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS.

**VALORACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN DE LOS PACIENTES
ALÉRGICOS A VENENO DE *APIS MELLIFERA* EN LA SEGURIDAD Y
EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA SUBCUTÁNEA.**

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

TESIS DOCTORAL: BERTA RUIZ
SERVICIO DE ALERGIA
HOSPITAL REINA SOFIA
CORDOBA

IDENTIFICACIÓN PACIENTE

Nº HISTORIA: INICIALES: ___|___|___

FECHAS REVISIÓN

T0: INICIO IT..... ___/___/___
T1: FIN AÑO 1 TRATAMIENTO..... ___/___/___
T2: FIN AÑO 2 TRATAMIENTO..... ___/___/___

DATOS GENERALES DEL PACIENTE

Fecha de nacimiento: ____/____/____

Edad:..... (años) Sexo: Mujer VarónRiesgo cardiovascular: Si NoRelación con apicultura: Profesional Aficionado No relación.Consentimiento informado: Si No Fecha: ____/____/____**DIAGNÓSTICO**Reacción a la picadura: Grado I Grado II Grado III Grado IV

ID: _____ µg/ml (señalar la concentración a la que ha dado positiva)

In Vitro

IgE	kU/L
Apis (CAP)	
nApi m 1	
rApi m 2	
Api m 4	

Identificación del tubo:

IgG4	µg/mL
Apis (CAP)	
Api m 1	

Tratamiento: Pharmalgen Aquagen

VALORACIÓN EFICACIA CLÍNICA Y PARÁMETROS *IN VITRO*.

T1: FIN PRIMER AÑO DE TRATAMIENTO

Identificación del tubo:

IgE	kU/L
Apis (CAP)	
nApi m 1	
rApi m 2	
Api m 4	

IgG4	µg/mL
Apis (CAP)	
Api m 1	

ID: _____µg/ml (señalar la concentración a la que ha dado positiva)

¿Se le ha hecho repicadura provocada? No Si ⇒ Fecha repicadura: ____/____/____

Reacción a la repicadura:

Grado I Grado II Grado III Grado IV

¿Ha sufrido el paciente alguna reacción adversa durante este periodo?

No Si ⇒ Ir a hojas de tolerancia

VALORACIÓN EFICACIA CLÍNICA Y PARÁMETROS *IN VITRO*.

T2: FIN 2º AÑO DE TRATAMIENTO

IgE	kU/L
Apis (CAP)	
nApi m 1	
rApi m 2	
Api m 4	

IgG4	µg/mL
Apis (CAP)	
Api m 1	

ID: _____ µg/ml (señalar la concentración a la que ha dado positiva)

¿Se le ha hecho repicadura provocada? No Si Fecha repicadura: ____/____/____

Reacción a la repicadura:

Grado I Grado II Grado III Grado IV

¿Ha sufrido el paciente alguna reacción adversa durante este periodo?

No Si ⇒ Ir a hojas de tolerancia

**VALORACIÓN TOLERANCIA.
REGISTRO DE REACCIONES SISTÉMICAS**

DOSIS: _____ (MCG)

Fecha: ___/___/___

SISTÉMICA

Clasificación

- Grado I:** urticaria generalizada, picor, malestar, ansiedad
- Grado II:** cualquiera de las anteriores más dos o más de las siguientes: angioedema, opresión torácica, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, mareo
- Grado III:** cualquiera de las anteriores más dos o más de las siguientes: disnea, sibilancias, estridor, disfagia, disartria, carraspeo, debilidad, confusión
- Grado IV:** cualquiera de las anteriores más dos o más de las siguientes: hipotensión, pérdida de conocimiento, incontinencia de esfínteres, cianosis

Tratamiento:

- NO SI ⇒ Describir:

Número de Reacciones:

Clasificación

- Grado I Grado II Grado III Grado IV



ANEXO VI.
RESULTADOS INDIVIDUALES DE LOS
PACIENTES A LO LARGO DEL SEGUIMIENTO.

Tabla.- CARACTERISTICAS BASALES DEL FENOTIPO A.

Identificación	Factores de riesgo		Datos Diagnóstico				Datos Inmunoterapia			Datos Moleculares				
	Riesgo Cardiovascular	Apicultor	Grado Müller	IgE Apis (kU/L)	ID (µg/ml)	IgG Apis (µg/ml)	Triptasa	Extracto	Dosis Máxima (µg)	NºRS	IgE nApi m 1 (kU/L)	IgE rApi m 2 (kU/L)	IgE Api m 4 (kU/L)	IgG4 Api m 1 (µg/ml)
JGG232728P2	NO	AFICIONADO	II	4.37	0.001	294	3.02	AQUAGEN	100	-	3.16	18.25	0.26	1.50
JMJ445026P3	NO	PROFESIONAL	I	25.5	0.1	1725	11	AQUAGEN	200	-	17.50	1.40	0.80	3.21
CM558699P5	NO	AFICIONADO	III	0.63	0.1	6583	8.74	AQUAGEN	100	2	0.41	0.07	0.06	6.67
JRMJ19057P7	NO	PROFESIONAL	III	5.05	≥ 1	10512	8.87	AQUAGEN	200	-	5.95	18.11	0.53	3.21
AFG306547P8	NO	NO	III	3.2	0.1	869	4.27	AQUAGEN	100	-	1.63	1.97	0.51	1.01
VGC550101P9	NO	NO	II	0.91	≥ 1	1567	7.46	AQUAGEN	100	-	0.35	1.52	0.39	0.97
FJG415293P10	SI	PROFESIONAL	III	13.2	≥ 1	10409	5.48	AQUAGEN	200	-	10.06	43.98	0.47	1.23
CCC522199P12	NO	NO	II	88.5	0.01	248	3.02	AQUAGEN	100	-	21.68	0.04	0.42	0.15
IU566493P14	NO	PROFESIONAL	III	25.1	0.001	184	1.48	AQUAGEN	200	2	24.73	57.41	0.81	1.82
JAC577989P16	NO	NO	III	0.79	≥ 1	507	4.37	AQUAGEN	100	2	0.60	6.99	0.73	0.81
FBF585253P17	NO	AFICIONADO	II	1.72	0.1	146	5	AQUAGEN	200	-	2.98	0.00	0.01	0.20
ALC587177P19	NO	NO	II	2.74	0.001	363	4.17	AQUAGEN	100	-	5.12	0.26	0.35	1.56
JPL591048P22	NO	PROFESIONAL	IV	10.8	0.001	2002	6.62	AQUAGEN	100	-	11.06	1.57	0.01	2.67
ARA614891P26	SI	NO	II	5.23	0.1	15.6	8.93	AQUAGEN	100	-	5.27	2.60	0	0.09
JCG333420P27	SI	NO	II	2.54	0.1	1767	9.68	AQUAGEN	100	-	13.59	0	0	3.46
ARR158190P28	NO	NO	I	0.3	≥ 1	1.81	5.14	AQUAGEN	100	-	0.35	4.60	0.06	0.10
ACR609064P29	NO	NO	III	3.63	0.001	1081	5.54	AQUAGEN	100	-	2.04	0	0	0.95
JRR146639P30	NO	AFICIONADO	I	7.05	0.1	NR	6.98	AQUAGEN	100	-	4.77	0	0.35	NR
FJF239019P31	NO	PROFESIONAL	II	46.3	0.001	467	5.39	AQUAGEN	200	-	76.64	0	0.35	7.62

ID: intradermorreacción; N°RS: número de reacciones sistémicas; NR: No realizado.

Tabla.- CARACTERISTICAS BASALES DEL FENOTIPO B.

Identificación	Factores de riesgo		Datos Diagnóstico				Datos Inmunoterapia			Datos Moleculares				
	Riesgo Cardiovascular	Apicultor	Grado Müller	IgE Apis (kU/L)	ID (µg/ml)	IgG Apis (µg/ml)	Triptasa	Extracto	Dosis Máxima (µg)	N°RS	IgE nApi m 1 (kU/L)	IgE rApi m 2 (kU/L)	IgE Api m 4 (kU/L)	IgG4 Api m 1 (µg/ml)
JAP535667P1	NO	AFICIONADO	IV	50.9	0.001	862	5.4	PHARMALGEN	200	1	80.04	0	5.43	1.23
JPT423283P4	NO	NO	III	17.2	0.01	7444	3.26	PHARMALGEN	100	-	47.17	83.44	1.65	0.62
JRP47726P6	NO	AFICIONADO	IV	22.1	0.001	NR	7.71	PHARMALGEN	200	-	20.95	0.89	1.53	NR
FAM578079P15	NO	AFICIONADO	III	63.8	0.0001	3687	3.82	PHARMALGEN	200	9	83.61	2.01	3.70	4.68
CMIM588474P18	NO	AFICIONADO	III	100	0.001	451	3.51	PHARMALGEN	200	1	490	1.15	10.86	2.31
JNF514180P20	NO	AFICIONADO	I	18.8	≥1	2057	6.63	PHARMALGEN	200	-	43.46	9.08	1.10	3.07
AON554764P21	NO	NO	IV	27.8	0.001	3292	6.01	PHARMALGEN	100	-	63.29	10.31	0.99	4.55
RGA455673P23	NO	NO	III	100	0.0001	1274	4.61	PHARMALGEN	100	1	0.42	0.02	13.58	1.12
FAD588031P24	SI	PROFESIONAL	IV	42.1	0.0001	12291	8.99	PHARMALGEN	200	8	116.46	177.04	9.75	11.59
MOB608425P25	NO	PROFESIONAL	III	82.3	0.001	14891	3.48	PHARMALGEN	200	-	187.37	190	8.91	6.55
AML661311P32	NO	NO	I	22.8	0.01	781	5.14	PHARMALGEN	100	-	18.09	0	1.67	0.20
AJH583293P33	SI	PROFESIONAL	III	14	0.1	2213	6.74	PHARMALGEN	200	-	25.12	173.03	0.98	3.92

ID: intradermorreacción; N°RS: número de reacciones sistémicas. NR: No realizado.

Tabla.- CARACTERISTICAS EN EL PRIMER AÑO DE SEGUIMIENTO DEL FENOTIPO A.

Identificación	IgE Apis (kU/L)	IgE nApi m 1 (kU/L)	IgE rApi m 2 (kU/L)	IgE Api m 4 (kU/L)	ID (µg/ml)	IgG4 Apis (µg/ml)	IgG4 Api m 1 (µg/ml)	Repicadura
JGG232728P2	1.65	1.15	6.30	0.06	0.1	3213	4.12	NEG
JMJ445026P3	9.77	8.78	10.59	0.33	0.1	6972	8.95	NEG
CMM558699P5	0.56	0.99	0.19	0.02	0.1	6365	7.35	NEG
JRMJ190574P7	1.43	2.35	4.37	0.29	≥1	6417	4.13	NEG
AFG306547P8	2.1	2.72	3.39	1.15	≥1	1263	7.39	NEG
VGC550101P9	1.1	0.35	2.13	0.21	≥1	2814	0.62	NEG
FJG415293P10	7.15	3.67	24.46	0.29	≥1	11036	8.25	NEG
CCC522199P12	21.1	7.94	1.80	0.45	0.1	710	0.46	NEG
IU566493P14	7.15	12.50	29.50	0	0.1	1774	2.66	NEG
JAC577989P16	1.55	1.75	12.15	0.30	≥1	6222	4.12	NEG
FBF585253P17	3.36	3.11	17.57	0.4	0.1	11353	1.36	NEG
ALC587177P19	2.03	2.32	8.69	0.29	0.1	12614	11.21	NEG
JPL591048P22	1.81	1.76	0.39	0.03	≥1	1510	3.11	NEG
ARA614891P26	11.3	10.61	14.21	0.48	≥1	1219	1.77	NEG
JCG333420P27	0.99	3.59	0	0.06	≥1	7984	9.02	NEG
ARR158190P28	8.72	3.81	11.92	1.62	≥1	4038	1.91	NEG
ACR609064P29	1.92	1.40	0.48	0.14	0.1	3802	5.68	NEG
FJF239019P31	5.29	18.15	2.60	0.44	0.001	8404	7.80	NEG

ID: intradermorreacción; NEG: Negativo.

Tabla.- CARACTERISTICAS EN EL PRIMER AÑO DE SEGUIMIENTO DEL FENOTIPO B.

Identificación	IgE Apis (kU/L)	IgE nApi m 1 (kU/L)	IgE rApi m 2 (kU/L)	IgE Api m 4 (kU/L)	ID (µg/ml)	IgG4 Apis (µg/ml)	IgG4 Api m 1 (µg/ml)	Repicadura
JAP535667P1	44	101.97	3.22	5.86	0.1	10522	9.49	NEG
JPT423283P4	8.44	20.67	35.78	0.47	0.01	12288	10.88	NEG
FAM578079P15	24.1	37.20	2.19	0.97	0.01	6883	7.55	POSITIVA GRADO III
CMM588474P18	43.3	119.22	3.52	2.54	0.1	12170	2.78	NEG
JNF514180P20	7.48	9.25	27.58	0.4	≥1	16486	12	NEG
AON554764P21	3.68	11.27	0.83	0.30	0.1	4180	5.42	NEG
RGA455673P23	39.4	8.52	0.30	3.73	0.1	5348	4.06	NEG
FAD588031P24	15.1	41.80	57.32	3.59	0.01	15561	11.36	NR
MOB608425P25	18.4	34.46	44.84	1.71	0.01	15082	12.40	NEG
AML661311P32	12.2	3.04	0	1.18	≥1	1643	1.19	NEG
AJH583293P33	13.4	18.48	195.88	0.52	0.01	7150	9.40	NEG

ID: intradermorreacción; NEG: Negativo; NR: No realizado.

Tabla.- CARACTERISTICAS EN EL SEGUNDO AÑO DE SEGUIMIENTO DEL FENOTIPO A.

Identificación	IgE Apis (kU/L)	IgE nApi m 1 (kU/L)	IgE rApi m 2 (kU/L)	IgE Api m 4 (kU/L)	ID (µg/ml)	IgG4 Apis (µg/ml)	IgG4 Api m 1 (µg/ml)	Repicadura
JGG232728P2	0.62	0.6	1.9	0	≥1	2096	7.80	NEG
JMJ445026P3	8.18	10.98	30.48	0.98	0.1	16354	13.19	NEG
CM558699P5	0.39	1.99	0.01	0.11	≥1	13570	11.35	NEG
JRMJ190574P7	2.39	2.35	6.01	0.12	≥1	6938	4.56	NEG
AFG306547P8	2.78	1.56	0.71	0.41	≥1	9588	8.99	NEG
VGC550101P9	0.69	0.20	2.13	0.16	≥1	1424	2.53	NEG
FJG415293P10	1.89	2.32	14.99	0.14	≥1	11356	9.68	NEG
CCC522199P12	13	6.85	2.19	0.71	0.1	276	0.54	NEG
IU566493P14	1.59	7.77	12.94	0.21	0.1	4052	5.70	NEG
JAC577989P16	1.34	1.12	7.44	0.30	≥1	5722	4.21	NEG
FBF585253P17	2.69	2.36	13.01	0.31	0.1	7817	1.21	NEG
ALC587177P19	2.15	2.16	5.46	0.36	≥1	7715	8.68	NEG
JPL591048P22	1.56	1.49	0.27	0	≥1	1140	2.80	NEG
ARA614891P26	9.12	10.46	9.94	0.29	≥1	2021	2.64	NEG
JCG333420P27	0.72	3.74	0.02	0.03	0.01	4228	7.78	NEG
ARR158190P28	6.17	3.39	11.23	3.38	≥1	3431	1.94	NEG
ACR609064P29	1.32	0.94	0.04	0.03	0.1	4528	5.10	NEG
FJF239019P31	20.1	21.78	0.74	0.66	0.001	3976	6.25	NEG

ID: intradermorreacción; NEG: Negativo.

Tabla.- CARACTERISTICAS EN EL SEGUNDO AÑO DE SEGUIMIENTO DEL FENOTIPO B.

Identificación	IgE Apis (kU/L)	IgE nApi m 1 (kU/L)	IgE rApi m 2 (kU/L)	IgE Api m 4 (kU/L)	ID (µg/ml)	IgG4 Apis (µg/ml)	IgG4 Api m 1 (µg/ml)	Repicadura
JAP535667P1	21.7	34.7	0.7	2	0.01	13578	8.63	NEG
JPT423283P4	5.4	23.1	22.6	0.3	0.1	12436	9.61	NEG
FAM578079P15	16.9	24.72	0.93	0.50	0.01	7200	6.72	POSITIVA GRADO III
CMM588474P18	36.6	63.35	4.33	1.41	≥1	20572	3.98	NEG
JNF514180P20	5.08	9.01	33.86	0.75	≥1	23075	12.04	NEG
AON554764P21	1.99	7.56	0.26	0.16	0.1	2970	3.37	NEG
RGA455673P23	15.3	1.33	0.03	1.57	0.1	5527	4.27	NEG
FAD588031P24	19.4	89.23	46.03	8.49	0.01	51083	12.62	NR
MOB608425P25	13.4	47.27	28.06	1.85	0.01	17465	12.22	NEG
AML661311P32	5.2	1.37	0.78	0.73	≥1	2632	1.72	NEG
AJH583293P33	10.9	17.28	195.73	0.48	0.1	7445	9.69	NEG

ID: intradermorreacción; NEG: Negativo; NR: No realizado.

ANEXO VII.

ACTIVIDAD CIENTIFICA DERIVADA DE LA TESIS DOCTORAL.

(por orden cronológico)

Comunicación internacional Poster:

Verdú M, Ruiz B, Cano M, Serrano P, Fernández L, Moreno C, Guerra F. "Late systemic reaction in the initiation phase of Honeybee Immunotherapy". Allergy. Special Issue: XXXI Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2012. Vol 67, Issue Supplemet s96. Ginebra. Suiza.

Comunicación oral:

Ruiz León Berta. "Paciente con mala tolerancia a Inmunoterapia con Apis mellifera". Reunión de clausura de las XXII sesiones interhospitalarias de la sociedad Madrid-Castilla La Mancha de Alergología e Inmunología Clínica -SMCLM-. Albacete, 14 y 15 de Junio de 2013.

Ponencia Curso:

"Tolerancia al veneno y perfiles de sensibilización". Curso Manejo de Insectos Himenópteros en Alergia. Curso experto MIHA 10. Córdoba 26-27 de Marzo de 2014.

Comunicación oral:

Berta Ruiz León, Pilar Serrano Delgado, M. Del Mar Cano Mollinedo, Luis Alonso González Sánchez, Jesús Castellano Monedero, Carmen Moreno Aguilar. "Perfil molecular en apicultores sensibilizados a veneno de abeja". XLII Reunión Alergosur. 25 de Abril de 2014.

Capítulo de libro:

"Paciente con mala tolerancia a la Inmunoterapia con Apis mellifera". Berta Ruiz. Sesiones interhospitalarias. Sociedad Madrid- Castilla La Mancha de Alergología e Inmunología Clínica N°22. Curso 2012-2013. ISBN:978-84-7885-582-7. Madrid 2014.

Publicación en revista científica (tras este anexo se añade separata):

Ruiz B, Serrano P, Verdú M, Moreno C. "Sensitization to Api m 1, Api m 2, and Api m 4: association with safety of bee venom immunotherapy". Ann Allergy Asthma Immunol. 2015 Feb 27;114(4):350-2.

Ponencia curso:

"Fenotipo de sensibilización a Apis y tolerancia a la inmunoterapia". Curso Manejo de Insectos Himenópteros en Alergia. Curso experto MIHA 10. Córdoba 26-27 de Marzo de 2015.

Capítulo de Libro:

"Alergia al veneno de himenópteros: clínica, diagnóstico y tratamiento". Vega A, Antolín D, Ruiz B. Tratado de Alergología 2º Edición. ISBN: 978-84-16270-36-1. Ergon. Madrid 2015. En impresión.



ARTÍCULO.
“Sensitization to Api m 1, Api m 2, and Api m4:
association with safety of bee venom immunotherapy”

Sensitization to Api m 1, Api m 2, and Api m 4: association with safety of bee venom immunotherapy



Bee venom immunotherapy (bVIT) is associated with a higher risk of systemic reactions (SRs)¹; however, this issue and others remain unresolved.² Pharmacologic products for bVIT are manufactured based on purified venom and standardized on the basis of the enzymatic activity of proteins, with no consideration of individual allergenic content. To date, 12 different allergens have been identified in bee venom, but only a few of them are available for clinical use.^{3,4} Our objective was to identify useful biomarkers to predict the incidence of SRs during the build-up phase of bVIT using the currently best known bee venom allergens: phospholipase A2 (Api m 1), hyaluronidase (Api m 2), and melittin (Api m 4).

Sixty-nine patients diagnosed as having bee venom allergy were tested for specific IgE (sIgE) to natural Api m 1 (nApi m 1), recombinant Api m 2 (rApi m 2), and Api m 4 currently available in the ADVIA-Centaur platform. All patients were treated with Pharmedon *Apis mellifera* (ALK-Abelló, S.A., Madrid, Spain) using a clustered protocol⁵ to achieve the maintenance dose (100–200 µg). All our patients began bVIT without premedication to avoid a confounding influence of premedication on the absence of SRs. In the case of an initial SR occurrence, pretreatment with dexchlorpheniramine and methylprednisolone will be prescribed from the next appointment on.

The incidence of SRs was recorded during the build-up phase of bVIT. The SRs were classified according to the classification of Müller.⁶

Written informed consent was given by patients after approval by the Ethics Committee of Reina Sofía University Hospital (Córdoba, Spain).

Information on demographic characteristics, cardiovascular risk, severity of the field bee-sting reaction, sIgE to Apis (ImmunoCAP), serial intradermal test (IDT) results, and tryptase levels (UniCAP) was also collected. Bivariate and multivariate statistical models were applied.

Results of the initial study, classified according to the presence or absence of SRs after bVIT injections, are given in Table 1. The prevalence of sensitization to nApi m 1, rApi m 2, and Api m 4 (sIgE >0.35 kU/L) was 95.6%, 75.4%, and 53.6%, respectively. Twenty-seven percent of the patients who had a SR during induction of bVIT had significantly higher levels of sIgE to Api m 4 ($P < .001$). In addition, patients with levels of sIgE to Api m 4 greater than 0.1 kU/L (odds ratio [OR], 6.15; 95% confidence interval [CI], 1.28–29.55; $P = .01$) and Api m 1 greater than 20 kU/L (OR, 3.16; 95% CI, 1.05–9.5; $P = .04$) were related to a higher risk of SRs.

Of 57 SRs occurring in 19 patients, 45 were Müller grade I and 12 were Müller grade III. On analyzing only these 19 patients, 15 patients were found to have experienced more than one episode and to have significantly higher levels of sIgE to rApi m 2 ($P = .005$) compared with the 4 patients who had had only one episode; by contrast, the levels of sIgE to Api m 4 in these 15 patients were significantly lower ($P = .02$). Analysis of severity of the 57 SRs, as independent variables, revealed that the risk of Müller grade III SRs was 7.5 times higher in patients with an nApi m 1 level greater than 50 kU/L (OR, 7.52; 95% CI, 0.02–0.68; $P = .01$) and 8 times greater for patients with an rApi m 2 level greater than 10 kU/L (OR, 8; 95% CI, 0.03–0.51; $P = .004$).

Because of the strong link to the onset of SRs with bVIT, we included in the logistic regression model a positive IDT reaction to 0.0001 µg/mL or less (OR, 0.16; 95% CI, 0.03–0.80; $P = .02$), Müller grade III and IV reactions in the diagnosis (OR, 6.65; 95% CI, 1.16–38.05; $P = .03$), and levels of sIgE to nApi m 1 greater than 20 kU/L (OR, 3.97; 95% CI, 0.92–16.97; $P = .06$). sIgE to Api m 4 was excluded from the model.

The incidence of SRs in this study is consistent with the figure described in a recent review involving aqueous extracts,⁷ yet higher than the 14.2% calculated in another review involving aqueous and depot extracts together.⁸ We found an association of high levels of sIgE to Api m 4 and patients with SRs; furthermore, the value of positive Api m 4 was found as a biomarker of future SRs, even with low levels of sIgE, which could be interpreted from a clinical point of view as a marker of poor tolerance to bVIT. Although because of the limitation of the sample size, this result is explanatory rather than predictive.

As previously reported, bVIT SRs were significantly more frequent in those patients who had experienced a more severe reaction to the sting.⁹ Unclear references on the bVIT SR occurrence are found considering other findings from our study, like the influence of a high sensitivity to the IDT, the Apis sIgE values, and the beekeeper condition.^{9,10} We did not confirm other associations (sex, age, previous cardiovascular disease, and basal tryptase) found by Rüeff et al¹¹ in a multicenter study.

Our results for the association between the severe SR (Müller grade III) and allergenic molecules suggests that high levels of sIgE to nApi m 1 and rApi m 2 are predictors of severity, independently of sIgE to Api m 4. High levels of sIgE to rApi m 2 are also significantly related with relapsing of SRs without direct influence of premedication, which was given to every patient after a first SR occurred.

Letters / Ann Allergy Asthma Immunol 114 (2015) 341–356

351

Table 1

Characteristics of patients according to the presence or absence of SRs during the build-up phase of bee venom immunotherapy

Characteristic	No SRs	SRs	P value
Patients, No. (%)	50 (72.5)	19 (27.5)	
Male patients, No. (%)	38 (76)	13 (68.4)	.55 ^c
Age, mean (SD), y	39.5 (14.5)	36.6 (16.5)	.48 ^d
Beekeepers, No. (%)	16 (32)	12 (63)	.03 ^e
Cardiovascular risk, ^a No. (%)	7 (14)	1 (5.3)	.43 ^e
Bee-sting reaction grade, ^b No. (%)			
I	7 (14)	1 (5.3)	
II	17 (34)	1 (5.3)	
III	20 (40)	13 (68.4)	.02 ^e
IV	6 (12)	4 (21)	
sIgE <i>Apis mellifera</i> , median (IQR), kU/L	8.2 (19.4)	50.9 (80.1)	<.001 ^f
Intradermal reaction, No. (%)			
0.0001 µg/mL	6 (12)	10 (52.6)	
0.001 µg/mL	14 (28)	5 (26.3)	<.001 ^e
0.01 µg/mL	9 (18)	2 (10.5)	
0.1 µg/mL	16 (32)	1 (5.2)	
≥1 µg/mL	5 (10)	1 (5.2)	
Basal tryptase, median (IQR), µg/L	4.9 (3.7)	3.8 (2.1)	.18 ^f
sIgE nApi m 1, median (IQR), kU/L	5.2 (19.3)	21.9 (82.4)	.21 ^f
sIgE rApi m 2, median (IQR), kU/L	1.8 (16.1)	4.4 (9.5)	.44 ^f
sIgE Api m 4, median (IQR), kU/L	0.29 (0.8)	1.78 (4.9)	<.001 ^f

Abbreviations: SR, systemic reaction; IQR, interquartile range; sIgE, specific IgE.

^aCardiovascular risk was considered coronary disease, hypertension, and β-blockers or angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment.

^bThe field bee-sting reactions were classified according to the classification of Müller.

^cFisher exact test.

^dt test.

^eCochran-Armitage trend test.

^fMann-Whitney test.

Disclosures: Authors have nothing to disclose.

Funding: IgE determination was supported by the research department of ALK-Abelló S.A.

After applying a logistic regression model, 2 factors were identified as predictors of SRs during bVIT up dosing: a severe reaction after a field sting and a strongly positive IDT result; therefore, its ability to predict the SR was not improved by the sIgE profile, probably because the number of individual positive results of sIgE to Api m 4 was very small and strongly dependent of Api m 1 because all our patients sensitized to Api m 4 were also sensitized to nApi m 1.

Despite the fact that nApi m 1, rApi m 2, and Api m 4 behaved as major allergens in our population, their association with safety of bVIT should be considered with caution because of the limitation of the sample size and reduced allergenic panel. To our knowledge, this is the first time that component resolved diagnosis has been applied to safety of bVIT.

In conclusion, according to the 3 evaluated allergenic compounds, the incidence of SRs was associated with sensitization to Api m 4; although multicenter studies are needed to provide results with high statistical significance, there is a promising future with the emergence of new molecules, which opens the way to explore the still unresolved problem of poor tolerance to bVIT.

Acknowledgments

We are grateful to Fernando de la Torre, Lucía Jimeno, and Agustín Galan (ALK-Abello, S.A.) for their technical support and Juan Dorado for his support in the statistical analysis.

Berta Ruiz, MD*
 Pilar Serrano, MD, PhD[†]
 Miriam Verdú, MD[‡]
 Carmen Moreno, MD, PhD[†]
 *Department of Allergology
 Hospital General La Mancha Centro
 Alcázar de San Juan
 Ciudad Real, Spain
[†]Department of Allergology
 Hospital Universitario Reina Sofía
 Córdoba, Spain
[‡]Department of Allergology
 Hospital Universitario de Ceuta
 Ceuta, Spain
 rulebe@gmail.com

References

- [1] Ruëff F, Przybilla B, Bilo MB, et al. Predictors of side effects during the phase of venom immunotherapy for Hymenoptera venom allergy: the importance of baseline serum tryptase. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:1133-1138.
- [2] Golden DB. Advances in diagnosis and management of insect stings. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;111:84-89.
- [3] Köhler J, Blank S, Müller S, et al. Component resolution reveals major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:1383-1389.
- [4] WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. Allergen Nomenclature. <http://www.allergen.org/search.php?allergenname=&allergensource=mellifera&TaxSource=&TaxOrder=&foodallerg=all&bioName=>. August 31, 2014.
- [5] Sanchez-Machin I, Moreno C, Gonzalez R, Iglesias-Souto J, Perez E. Safety of a 2-visit cluster schedule of venom immunotherapy in outpatients at risk of life-threatening anaphylaxis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21:91-92.
- [6] Müller U. *Insect Sting Allergy Clinical: Clinical Picture, Diagnosis and Management*. New York, NY: Gustav Fischer; 1990.
- [7] Incorvaia C, Frati F, Dell'Albani I, et al. Safety of hymenoptera venom immunotherapy: a systematic review. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13:2527-2532.
- [8] Boyle RJ, Elremeli M, Hockenhull J, et al. Venom immunotherapy for preventing allergic reactions to insect stings. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;CD008838.
- [9] Birnbaum J, Ramadour M, Magnan A, Vervloet D. Hymenoptera venom immunotherapy (210 min): a safety study and risk factor analysis. *Allergy*. 2003;33:58-64.
- [10] Muller UR. Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5:343-347.

INDICE DE IMAGEN, FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS.

- Imagen 1.** Morfología general de Apoidea (1). **Pág. 4.**
- Figura 1.** Arquitecturas de los ensayos de determinación de IgE ImmunoCAP® y ADVIA Centaur®. **Pág. 14.**
- Figura 2.** Distribución de los pacientes durante la Fase 2. **Pág. 44.**
- Gráfico 1.** Distribución por comunidades autónoma de la producción de miel 2013. **Pág. 5.**
- Gráfico 2.** Gráfico de explotaciones Apícolas por Comunidades Autónomas 2015. **Pág. 5.**
- Gráfico 3.** Sensibilidad de IgE específica a diferentes perfiles de alérgenos del veneno de abeja (punto de corte 0.35 kU/L). **Pág. 36.**
- Gráfico 4.** Porcentaje de sensibilidad frente a Api m 4 según el nivel de sensibilidad a Api m 1. **Pág. 38.**
- Gráfico 5.** Curva ROC para el modelo de regresión logística que predice el riesgo de presentar reacciones sistémicas con ITV_a. **Pág. 42.**
- Gráfico 6.** Perfil de sensibilización en % para el fenotipo A y B. **Pág. 44.**
- Tabla 1.** Alérgenos del veneno de abeja (11,16). **Pág. 7.**
- Tabla 2.** Indicaciones de la ITV (54). **Pág. 17.**
- Tabla 3.** Porcentaje de RS con ITV_a en estudios de seguridad destacados. **Pág. 19.**
- Tabla 4.** Pauta de inicio agrupada de extracto acuoso. **Pág. 30.**
- Tabla 5.** Descripción de la IgE frente a los principales alérgenos del veneno de *Apis mellifera*. **Pág. 35.**
- Tabla 6.** Prevalencia de sensibilización. **Pág. 36.**
- Tabla 7.** Estudio entre los alérgenos del veneno de abeja y el grado de exposición de los pacientes en relación con la apicultura. **Pág. 37.**
- Tabla 8.** Análisis de la relación entre los valores de IgE específica a los tres alérgenos. **Pág. 37.**
- Tabla 9.** Comparación de la sensibilización frente a nApi m 1 en los puntos de corte de 10, 20 y 50 kU/L con la sensibilización a rApi m 2 y a Api m 4. **Pág. 38.**
- Tabla 10.** Valores de IgE específica (kU/L) según la presencia de reacciones sistémicas. **Pág. 39.**
- Tabla 11.** Valores de IgE específica según la severidad de las reacciones sistémicas durante el inicio de la ITV_a. **Pág. 40.**
- Tabla 12.** Valores de IgE específica en función de la recidiva de la reacción. **Pág. 40.**
- Tabla 13.** Seguridad de la ITV_a en función de datos demográficos, clínicos y diagnósticos. **Pág. 41.**
- Tabla 14.** Resultado del modelo de regresión logística para predecir el riesgo de sufrir reacciones sistémicas en el inicio de la ITV_a. **Pág. 42.**
- Tabla 15.** Características de ambos grupos de población de pacientes alérgicos al veneno de *Apis mellifera*. **Pág. 43.**
- Tabla 16.** Evolución de los datos inmunológicos en los pacientes del fenotipo A. **Pág. 45.**
- Tabla 17.** Evolución de los datos inmunológicos en los pacientes del fenotipo B. **Pág. 46.**

