

# Diagnostyka alergii na jad pszczoły miodnej

## Diagnosis of allergy to honey bee venom

WOJCIECH KOWALCZYK<sup>1</sup>, KINGA LIS<sup>1,2</sup>, ZBIGNIEW BARTUZI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Klinika Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych SU nr 2 im. Dr Jana Bizuela w Bydgoszczy

<sup>2</sup> Katedra Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych CM w Bydgoszczy UMK w Toruniu

### Streszczenie

Pszczoły są powszechnie hodowane przez ludzi w celu pozyskiwania miodu, wosku oraz mleczka pszczelego. Owady te uczestniczą także w zapylaniu roślin dziko rosnących oraz uprawnych. Koegzystencja ludzi i pszczół, wiąże się z ryzykiem użądlenia, co u osób predysponowanych może prowadzić do anafilaksji.

Zwykle w miejscu użądlenia pojawia się miejscowy rumień, któremu towarzyszy ból oraz obrzęk do 10 cm, utrzymujący się do 24 godzin. Stanowi to fizjologiczną odpowiedź organizmu na jad.

Ciężkie reakcje ogólnoustrojowe dotyczą od 0,9% do 3,4% wszystkich przypadków użądleń przez owady błonkoskrzydłe u dorosłych. Są one przyczyną 48,2% wszystkich śmierci wywołanych anafilaksją w tej grupie wiekowej. U dzieci od 0,5% do 0,9% użądleń kończy się ciężkimi reakcjami ogólnoustrojowymi, które stanowią 20,2% wszystkich anafilaksji.

W jadzie pszczół zidentyfikowano ponad 103 substancje czynne, z czego dwanaście zostało zaklasyfikowanych jako alergeny. Pięć spośród nich odpowiada za 95% wszystkich reakcji alergicznych. Do tej grupy należą: fosfolipaza A2 (Api m 1), hialuronidaza (Api m 2), kwaśna fosfataza (Api m 3), dipeptydylowa peptydaza IV (Api m 5) oraz icarapina (Api m 10).

Obecnie dostępny jest szeroki panel metod diagnostycznych, które umożliwiają diagnozowanie oraz leczenie pacjentów z alergią na jad pszczoły. Można również przypuszczać, iż ciągłe poszukiwanie coraz lepszych narzędzi diagnostycznych w przyszłości zaowocuje jeszcze lepszymi testami.

**Słowa kluczowe:** pszczoła miodna, jad, anafilaksja, diagnostyka molekularna

### Summary

Bees are commonly bred by humans to obtain honey, wax and royal jelly. At the same time, it takes part in the pollination of wild and cultivated plants. On the other hand, the coexistence of humans and bees is associated with the risk of stings, and in people predisposed to anaphylaxis.

Usually, local redness appears at the site of the sting's injection, accompanied by pain, and swelling up to 10 cm, lasting up to 24 hours. This is the body's physiological response to the venom.

Severe systemic reactions account for 0.9% to 3.4% of all Hymenoptera stings in adults. It is the most common cause of death from anaphylaxis in this age group, accounting for 48.2% of all cases. In children, from 0.5% to 0.9% of all stings end in a severe systemic reaction, which accounts for 20.2% of all anaphylaxis episodes.

103 compounds were identified in bee venom, twelve of which were classified as allergens. Five of them are responsible for 95% of allergic reactions, they are: phospholipase A2 (Api m 1), hyaluronidase (Api m 2), acid phosphatase (Api m 3), dipeptidyl peptidase IV (Api m 5) and icarapine (Api m 10).

We currently have a wide panel of diagnostic methods that allow us to diagnose and treat patients with bee venom allergy, and the treatment of patients allergic to bee venom, and still developing science and research will likely result in even better tests in the future.

**Keywords:** honey bee, venom, anaphylaxis, molecular diagnostics

© Alergia Astma Immunologia 2022, 27 (1): 12-22

www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

mgr Wojciech Kowalczyk

Tel. 52 36 55 552

e-mail: immunologia.biziel@gmail.com

85-164 Bydgoszcz

Ul. K. Ujejskiego 75

Tel. 52 36 55 552

### Wstęp

Błonkoskrzydłe (*Hymenoptera*) stanowią liczny rząd owadów, obejmujący ponad 153000 aktualnie opisanych gatunków i wydaje się, że lista ta pozostaje otwarta. Zajmują szeroką niszę biologiczną, gdzie funkcjonują jako parazytoidy, drapieżniki oraz zapylacze. Odgrywają zasadniczą rolę w praktycznie wszystkich ekosystemach lądowych i mają duże znaczenie gospodarcze. Błonkoskrzydłe dzieli się na dwa podrzędy: rośliniarniki (*Symphyla*) oraz stylkowców (*Apocrita*). W podrzędzie *Apocrita* wyodrębnia się infrarząd żądłówek (*Aculeata*). Cechą charakterystycz-

ną żądłówek jest przekształcenie pokładełka – żeńskiego narządu rozrodczego, służącego do składania jaj, w żądło połączone z gruczołami jadowymi. Jady owadów błonkoskrzydłych, stanowią niejednorodną mieszaninę wielu związków, do których można zaliczyć aminy biogenne, peptydy, toksyny, enzymy oraz białka o niskiej masie cząsteczkowej. Owady wykorzystują je do paraliżowania ofiar oraz samoobrony. W infrarzędzie *Aculeata* można wyróżnić rodziny *Apidae*, *Vespidae* oraz *Formicidae*. Przedstawicielami rodziny *Apidae* są pszczoły miodne oraz trzmiele. Zwykle nie są agresywne, żądła tylko gdy poczują się za-

grożone lub zostaną sprowokowane. Cechą szczególną pszczół jest obecność haczykowatych żądeł, które często pozostają w skórze po pojedynczym użądleniu. U trzmieli, żądło jest gładkie i nie pozostaje w skórze. W skład rodziny *Vespidae* wchodzi osy oraz szerszenie. Wykazują większą agresję niż przedstawiciele *Apidae*, w dodatku żądła osowatych pozbawione są haczyków. Rodzina *Formicidae* obejmuje wszystkie gatunki mrówek. Większość z nich gryzie żuchwami w kształcie szczypiec, niektóre jednak wykorzystują żądło obecne w odwłoku [1-4]. W tabeli I przedstawiono systematykę pszczoły miodnej (*Apis mellifera*).

Jady żądłówek charakteryzują się podobnymi właściwościami. Składniki o niskiej masie cząsteczkowej są odpowiedzialne za miejscowe reakcje zapalne, podczas gdy składniki o dużej masie cząsteczkowej najczęściej wywołują reakcje ogólnoustrojowe [3].

Do użądleń przez owady błonkoskrzydłe dochodzi w każdej grupie wiekowej, bez względu na płeć. Najczęściej w wyniku przypadkowego kontaktu z pojedynczym osobnikiem lub w pobliżu uszkodzonego gniazda [3].

W artykule zostały omówione poznane dotychczas komponenty alergenowe pszczoły miodnej (*A. mellifera*), objawy uczulenia oraz możliwości diagnostyczne alergii na jad pszczoły.

## Pszczola

Od lat pszczoły stanowiły dla ludzi źródło miodu, wosku oraz mleczka pszczelego. Znane są liczące ponad 7 tysięcy lat malowidła naskalne przedstawiające zbieranie miodu z gniazd pszczół. Źródła historyczne podają, że już Egipcjanie, w okresie rządów faraonów, posiadali swoje własne pasieki. Owady te odgrywają istotną rolę, w zapyłaniu roślin, zarówno dziko rosnących jak i uprawianych przez człowieka. Jednak bliskie sąsiedztwo z pszczołami, wiąże się z ryzykiem użądlenia, które może wywołać miejscowy rumień, obrzęk, duży miejscowy odczyn lub, u osób predysponowanych, może być przyczyną anafilaksji. Jad pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) jest mieszaniną licznych substancji aktywnych. Ostatnie badania wymieniają co

najmniej 103 obecne tam związki, spośród których 12 ma udowodnioną zdolność do wywoływania uczulenia u człowieka. Pięć z nich (fosfolipaza A2 (Api m 1), hialuronidaza (Api m 2), kwaśna fosfataza (Api m 3), dipeptydylowa peptydaza IV (Api m 5) oraz ikarapina (Api m 10)) odpowiada za blisko 95% wszystkich reakcji alergicznych [4,6,7]. Jad pszczeli jest klarowną cieczą o gorzkim smaku, ostrym zapachu, ciężarze właściwym 1,13 i pH 4,5-5,5. W kontakcie z powietrzem szybko krystalizuje, a wysuszony ma kolor jasnożółty [8].

Użądlenie przez pszczołę miodną zwykle powoduje miejscowy rumień, obrzęk <10 cm utrzymujący się do 24, któremu towarzyszy ból. Określane jest to jako fizjologiczna reakcja po użądleniu. U osób uczulonych na jad może wystąpić duży miejscowy odczyn, definiowany jako obrzęk, o średnicy >10 cm trwający powyżej 24h, który nie zagraża życiu jeżeli występuje w obrębie kończyn. Możliwy jest także zagrażający życiu wstrząs anafilaktyczny. W przypadku użądlenia w okolicy szyi, głowy, wewnątrz jamy ustnej i języka lub, gdy owad został połknięty może dojść do obrzęku gardła lub krtani, co może skutkować śmiercią wskutek uduszenia [9,10]. Częstość występowania reakcji ogólnoustrojowych w europejskiej populacji dorosłych po użądleniu przez owady błonkoskrzydłe wynosi 0,3–8,9%. Jest to najczęstsza przyczyna anafilaksji u osób dorosłych wynosząca 48,2% wszystkich tych zdarzeń. U dzieci ogólnoustrojowe reakcje po użądleniu przez owady są rzadsze. Wahają się od 0,9% do 3,4% w przypadku łagodnych oraz 0,5-0,9% w przypadku ciężkich objawów ogólnoustrojowych. Stanowią one 20,2% wszystkich epizodów anafilaksji u dzieci i młodzieży, stanowiąc drugą najważniejszą ich przyczynę, tuż po anafilaksji na pokarmy [11]. Szacowana liczba rocznych zgonów z powodu anafilaksji wywołanej użądleniem owadów waha się od 0,03 do 0,45 na milion mieszkańców. Wśród pszczół najczęściej obserwowanym gatunkiem żądłym, wywołującym ogólnoustrojowe odczyny po ukąszeniu, na terenie środkowej Europy jest pszczoła miodna (*Apis mellifera*). Jest to jedyny gatunek z rodziny pszczołowatych (*Apidae*) występujący w Polsce [9,12-14].

Tabela I Systematyka [1,5]

Królestwo	Animalia
Typ	Arthropoda
Podtyp	Tracheata
Gromada	Insecta
Rząd	Hymenoptera
Podrząd	Apocrita
Nadrodzina	Apoidea
Rodzina	Apidae
Podrodzina	Apinae
Rodzaj	Apis
Gatunek	<i>A. mellifera</i>

## Alergeny pszczoły miodnej

Alergenami specyficznymi dla jadu pszczoły, które nie występują w jadach innych owadów błonkoskrzydłych są fosfolipaza A2 (Api m 1), kwaśna fosfataza (Api m 3), melityna (Api m 4) i ikarapina (Api m 10). Ponadto wyróżnić można trzy alergeny homologiczne, określane również jako reagujące krzyżowo, które wykazują wysoką identyczność sekwencji między jadem pszczoły i jadem osy. Są to: hialuronidazy (Api m 2 i Ves v 2), dipeptydylopeptydazy IV (Api m 5 i Ves v 3) oraz witellogeniny (Api m 12 i Ves v 6). Warto również wspomnieć, że większość alergenów obecnych w jademie pszczoły to glikoproteiny zawierające w swojej cząsteczce resztę fukozy z wiązaniem  $\alpha$ -1,3 na rdzeniu N-glikanowym. Struktury te są znane jako determinanty węglowodanowe reagujące krzyżowo (CCD; *ang. cross-reacting carbohydrate determinants*). Ze względu na powszechność ich występowania, są one wysoce immunogennymi epitopami, które mogą prowokować produkcję swoistego IgE (sIgE). Przeciwciała IgE anty-CCD z reguły nie mają znaczenia klinicznego, mogą jednak być przyczyną fałszywie dodatnich wyników oznaczanie sIgE w testach *in vitro* [15].

Jad pszczoły zawiera wiele glikoprotein, które mają potencjalne właściwości alergenne. Dotychczas scharakteryzowano 12 z nich.

### Api m 1

Fosfolipaza A2 (PLA2) jest białkiem o masie cząsteczkowej 13 kDa, stanowiącym około 12% suchej masy jadu pszczoły [9,16]. Stanowi jego główny alergen. Jako enzym zdolny jest specyficznie rozpoznać oraz hydrolizować wiązanie acylowe w pozycji 2-sn fosfolipidów. W procesie tym zostaje uwolniony kwas lizofosfatydowy oraz kwas arachidonowy. Kwas arachidonowy stanowi prekursor eikozanoidów takich jak prostaglandyny i leukotrieny, które uczestniczą w reakcji zapalnej [17-19]. Fosfolipazy (PL) stanowią liczną grupę białek, które dzieli się na cztery główne klasy A, B, C i D. Istnieją dwa typy fosfolipazy A - PLA1 oraz PLA2. Podklasę A2 można podzielić na 16 grup na podstawie homologii struktury, źródła i miejsca występowania. Fosfolipaza jadu pszczoły klasyfikowana jest jako sPLA 2 (wydzielnicza) w grupie III. Zdolna jest do wywoływania reakcji alergicznych u ludzi. W swojej strukturze posiada od czterech do siedmiu wiązań dwusiarczkowych odpowiedzialnych za stabilność oraz konformację przestrzenną, dwie domeny katalityczne oraz trzy miejsca wiązania wapnia, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania tego enzymu. Od ssaczego sPLA2 różni ją 130-aminokwasowe wydłużenie domeny N-końcowej i 219-aminokwasowe wydłużenie domeny C-końcowej oraz znacznie większa masa cząsteczkowa, wynosząca 55 kDa [20,21]. Fosfolipaza A2 zdolna jest do uszkodzania tkanek oraz rozkładania kluczowych fosfolipidów osocza, co może prowadzić do zaburzenia wytwarzania trombiny [22]. Działanie alergizujące Api m 1 jest wynikiem, zakłócania głównej konformacji i wytwarzania lizofosfolipidów oraz długołańcuchowych anionowych kwasów tłuszczowych [23]. Czułość diagnostyczna, wykrywania alergii na jad pszczoły, na podstawie oznaczania u pacjentów pojedynczej komponenty Api m 1 wynosi, w zależności od doboru grupy badanej, od 58% do 80% [9].

### Api m 2

Hialuronidaza jest to enzym hydrolityczny (endo-N-acetylo-D-heksozoaminidaza) o masie 45 kDa, bogaty w kwas asparaginowy i glutaminowy. Stanowi 1-3% suchej masy jadu [16,24-26]. Jest alergenem głównym, wykrywanym u 71% osób ze stwierdzoną alergią na jad pszczoły [26]. Bierze udział w rozczepianiu liniowego polimeru składającego się z prostych powtórzeń disacharydu złożonego z kwasu D-glukuronowego (GlcA) połączonego wiązaniami  $\beta$ -1,4 a N-acetylo-glukozaminy (GlcNAc). W procesie tym powstaje tetrasacharyd GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcNAc [25]. Kwas hialuronowy występuje w prawie wszystkich tkankach ustrojowych, a w szczególności w tkance łącznej chrząstki, mazi stawowej oraz cieple szklistym oka. Natomiast w macierzy zewnątrzkomórkowej jest składnikiem substancji podstawowej, która łączy włókna białkowe, włókna kolagenowe i komórki tkanki łącznej [26]. Hialuronidaza wstępuje powszechnie w przyrodzie i można ją znaleźć u takich zwierząt jak: węże, osy, pszczoły, skorpiony, pająki, płaszczki słodkowodne, szerszenie, ryby jak również w organizmie ludzkim. U wyższych kręgowców hialuronidaza związana jest z szerokim zakresem procesów fizjologicznych i patologicznych, takich jak zapłodnienie, rozwój

embrionalny, gojenie się ran czy angiogeneza. Ze względu na pochodzenie oraz pozycję rozszczepianego wiązania hialuronidazy można podzielić na trzy grupy. W pierwszej (EC 3.2.1.35), następuje rozczepienie wiązania (1 $\rightarrow$ 4)- między N-acetyloglukozaminą i glukuronianem. W drugiej hialuronoglukuronidazy (EC 3.2.1.36), rozszczepiają wiązania (1 $\rightarrow$ 3) między resztami beta-D-glukuronianu i N-acetylo-D-glukozaminy. Ponadto można wskazać bakteryjne liazы hialuronowe (EC 4.2.2.1) rozcinające łańcuchy hialuronianu w miejscu wiązania beta-D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-beta-D-GlcA, w procesie tym powstają polisacharydy 3-(4-deoksy-beta-D-gluc-4-enuronozylo)-N -acetylo-D-glukozamina [27]. Aktywność hialuronidazy może być modulowana przez różne aktywatory (jak np. adrenalina, histamina i fosfataza kwaśna) oraz inhibitory (np. leki przeciwhistaminowe, salicylany, heparyna, dikumaryna, witamina C i flawonoidy) [20]. Hialuronidaza jadu pszczoły, poprzez degradację kwasu hialuronowego w macierzy zewnątrzkomórkowej skóry, ułatwia jego przenikanie w głąb tkanek. Dzięki działaniu tego enzymu szybkość penetracji tkanek zwiększa się nawet 20-krotnie dla cząsteczek o średnicy poniżej 200 nm [26].

### Api m 3

Kwaśna fosfataza (fosfohydrolaza monoestru ortofosforowego, EC 3.1.3.2) jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 43,9 kDa. Stanowi około 1% suchej masy jadu. Hydrolizuje wiązanie monoestrowe kwasu fosforowego, tworząc jony fosforanowe oraz białka. Proces ten odbywa się poprzez fosforylowanie reszty histydyny w miejscu aktywnym enzymu. Kwaśna fosfataza jadu pszczoły miodnej jest glikoproteina składającą się z 4 potencjalnych miejsc glikozylacji. Stanowi główny alergen jadu pszczoły. Zawiera wiele epitopów oddziałujących z ludzkim IgE, za sprawą których dochodzi do uwolnienia histaminy z uczulonych bazofilów. Przekłada się to na zdolność do natychmiastowego wytworzenia bąbla oraz zaczerwienienia skóry w miejscu użądlenia, a w cięższych przypadkach wstrząsu anafilaktycznego [20,28-31]. Badania z użyciem oczyszczonego natywnego Api m 3 wykazały obecność przeciwciał sIgE przeciwko temu składnikowi jadu w 60% surowic pacjentów z alergią na jad pszczoły [30].

### Api m 4

Melityna to zasadowy peptyd składający się z 26 aminokwasów, o masie cząsteczkowej wynoszącej 2,84 kDa. Uważany jest za drugorzędny alergen, związany z niską alergenicnością. Stanowi około 50% suchej masy jadu pszczoły. W worku jadowym jest magazynowana jako tetramer, ale po uwolnieniu i rozpuszczeniu dysocjuje do formy monomerycznej [19,23,32,33]. Koniec aminowy melityny składa się głównie z aminokwasów hydrofobowych, podczas gdy na końcu karboksylowym znajduje się odcinek hydrofilowy, nadający jej charakter amfifilowy. Cecha ta sprawia, że melityna łatwo łączy się z innymi strukturami amfifilowymi, takimi jak dwuwarstwę lipidową błon komórkowych [34]. Uważa się, że melityna wpływa na przepuszczalność błon przez indukowanie tworzenia w nich porów. Zdolna jest wywołać lizę wielu różnych komórek, takich jak komórki mięśniowe, leukocyty i komórki tłuszczne, co może prowadzić na przykład do uwalniania, do otaczających tkanek, histaminy i innych składników wewnątrzkomórkowych w procesie IgE niezależnym [32]. Melityna ma różne działa-

nia biologiczne, farmakologiczne i toksykologiczne, w tym silne działanie powierzchniowe na błony lipidowe komórek, hemolizujące, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Przypuszcza się, iż substancja ta ma właściwości przeciwnowotworowe [35]. Melityna działa synergistycznie z Api m 1. Wytworzone, za sprawą Api m 4, pory w błonie komórkowej, odsłaniają katalityczne miejsca cząsteczek fosfolipidów, umożliwiając ich hydrolizę przez Api m 1 [23]. Dostępne badania sugerują, że melityna odpowiedzialna jest za depolaryzację nerwów, co przekłada się na intensywny ból w miejscu użądlenia przez pszczołę [23]. Okres półtrwania melityny w osoczu wynosi około 30 minut. Substancja ta jest szybko sekwestrowana w płucach, śledzionie, wątrobie i erytrocytach [24].

### Api m 5

Peptydaza dwupeptydylowa VI określana jest również jako alergen C. Jest to enzym o wysokiej masie cząsteczkowej wynoszącej 100 kDa. Należy do głównych alergenów jadu pszczoły, jednak zawartość jego w suchej masie jadu wynosi jedynie ok 1%. Przekłada się to na wprowadzenie w pojedynczym użądleniu od 50 do 150  $\mu$ g tego białka [36]. U 60% osób z potwierdzoną alergią na jad pszczoły, stwierdza się dodatnie wyniki dla Api m 5 [37]. Pszczela peptydaza dwupeptydylowa VI wykazuje wysoki stopień homologii do Ves v 3 (dwupeptydylopeptydaza IV) obecnej w jadzie osy. Oba białka mają także sekwencje identyczne z ludzką dwupeptydylopeptydazą VI (CD26) [36]. Rola jaką odgrywa Api m 5 w jadzie pszczoły, nie jest jeszcze dokładnie znana. Przypuszcza się, że może brać udział w przekształcaniu składników jadu w ich aktywne formy w gruczole jadowym oraz wpływać na aktywność chemoaktywną komórek odpornościowych po użądleniu przez owada [38]. Ludzka dwupeptydylopeptydaza VI jest zdolna do odcinania dwupeptydów od polipeptydów, w których w przedostatniej pozycji łańcucha znajduje się prolina lub alanina. Bierze udział w regulacji odpowiedzi zapalnych i immunologicznych, transdukcji sygnału, apoptozie, degradacji substancji fizjologicznych, takich jak gonadotropina kosmówkowa i substancja P, TNF- $\alpha$ , IL-2, chemokiny, w tym CCL5 (RANTES) [36].

### Api m 6

Inhibitor proteazy serynowej to cząsteczka o niskiej masie cząsteczkowej wynoszącej około 8 kDa. Składa się z domeny bogatej w cysteinę podobnej do inhibitora trypsyny, co jest typową cechą inhibitorów proteaz serynowych [39,40]. Mostki dwusiarczkowe znacznie zwiększają sztywność tego enzymu, czyniąc Api m 6 odporną na łagodne warunki redukujące i denaturujące [41]. Po raz pierwszy Api m 6 została scharakteryzowana i opisana w 2001 roku przez Kettnera i wsp. [41], którzy stwierdzili, że alergen ten wiąże przeciwciała IgE u około 42% pacjentów z nadwrażliwością na jad pszczeli, co czyni ją alergenem mniejszym [41]. W suchej masie jadu pszczelego stanowi od 1% do 2%. Pozbawiona jest potencjalnych miejsc N-glikozylacji, dzięki czemu Api m 6 natiwnego pochodzenia nie wchodzi w reaktywność krzyżową z przeciwciałami anti-CCD [39]. W jadzie pszczoły zidentyfikowano cztery izoformy tej proteazy (Api m 6.01, Api m 6.02, Api m 6.03, Api m 6.04) o zbliżonej alergenności [23]. Wszystkie wykazują podobieństwo w rdzeniu cząsteczki, obejmującym 67 aminokwasów. Różnice dotyczą nie więcej niż 6 aminokwasów

umiejscowionych na końcu aminowym i karboksylowym [42]. Api m 6.01 oraz Api m 6.03 z pięcioma mostkami dwusiarczkowymi, mają masę cząsteczkową 7,2 i 7,6 kDa. Izofomy Api m 6.02 i 6.04 posiadają dwa dodatkowe aminokwasy na końcu karboksylowym, a ich masy cząsteczkowe wynoszą odpowiednio 7,4 i 7,8 kDa [23]. Obecnie funkcja jaką pełni Api m 6 u pszczoły miodnej nie została jednoznacznie określona. Biorąc pod uwagę, że inhibitory proteazy serynowej jadu pszczelego mają różne działania biologiczne, w tym przeciw fibrynolityczne, przeciw elastolityczne i przeciw drobnoustrojowe przypuszcza się, że Api m 6 może również wykazywać działania biologiczne podobne do inhibitora proteazy serynowej o małej masie cząsteczkowej [40].

### Api m 7

Proteaza serynowa CUB jest białkiem o masie 39 kDa i aktywności proteolitycznej. W budowie jej cząsteczki można wyróżnić domenę podobną do proteinazy serynowej (SPL) której przypisuje się udział w aktywacji zymogenów poprzez rozszczepienie wiązań peptydowych, domenę CUB (proteaza CUB), oddziałującej z naturalnymi substratami oraz spajającym je peptydem łącznikowym. Api m 7 wykazuje podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do enzymów rodziny PPAF-II (czynnik aktywujący profenoloksydazę 2; *ang. prophenoloxidase activation factor*). PPAF-II aktywuje profenoloksydazę (ProPO) w osoczu krwi do fenoloksydazy (PO), co stanowi jeden spośród mechanizmów odpowiedzi immunologicznej u stawonogów. Fenoloksydaza katalizuje utlenianie monofenoli do o-difenoli, a następnie do o-chinonów. Chinony biorą udział w tworzeniu melaniny, cytotoksycznych nadtlenków i rodników hydroksylowych. Domena CUB jest motywem strukturalnym występującym w składowych układach dopełniacza, gdzie bierze udział m.in. w aktywacji komplementu, w procesach naprawy tkanek, hemostazie oraz procesach zapalnych [43]. Api m 7 składa się z 245 aminokwasów zawiera cztery potencjalne miejsca N-glikozylacji, z których co najmniej jedno jest glikozylowane [44]. Dokładna funkcja oraz substraty dla proteazy serynowej CUB u pszczoły, nie zostały jeszcze w pełni poznane [43].

### Api m 8

Karboksyloesteraza (EC: 3.1.1.1) należąca do rodziny karboksyloesterazy typu B o masie cząsteczkowej 70 kDa. Zbudowana jest z 536 aminokwasów, a w jej cząsteczce znajdują się cztery miejsca glikozylowane, stanowiące potencjalne miejsca reakcji krzyżowych opartych na CCD. Api m 8 stanowi mniej niż 1% suchej masy jadu pszczoły. Funkcja tej molekuly nie jest do końca wyjaśniona [45]. U pszczoł miodnych karboksyloesterazy najprawdopodobniej biorą udział w regulacji stresu oksydacyjnego, detoksykacji lub metabolizmie insektycydów opartych na nikotynie. Ze względu na stosowanie związków do ochrony upraw rolnych, zarówno w nektarze kwiatów jak i w pyłku można znaleźć śladowe ilości nikotyny. Związek ten jest wysoce toksycznym alkaloidem, naśladującym acetylocholinę w złączu nerwowo-mięśniowym. U ssaków, w zależności od dawki, może spowodować drżenie, konwulsje, a nawet śmierć. Dawka śmiertelna dla człowieka wynosi 1-1,5 mg/kg. U owadów identyczny mechanizm obserwuje się w zwojach ośrodkowego układu nerwowego. W niewielkich dawkach może powodować zaburzenia latania

i żerowania. W większych stężeniach prowadzić może do porażenia oraz śmierci owadów [46].

### Api m 9

Karboksypeptydaza serynowa (EC: 3.4.16.5) jest to, enzym o masie 60 kDa i aktywności proteolitycznej, hydrolizujący wiązanie peptydowe od C-końca białka lub peptydu. W swojej cząsteczce zawiera 449 aminokwasów oraz 5 miejsc N-glikozylacji [44]. Karboksypeptydazy serynowe posiadają w swojej strukturze charakterystyczną dla nich triadę katalityczną Ser-Asp-His. W organizmie człowieka występują jako enzymy trawienne oraz uczestniczą w modyfikacji potranslacyjnej poprzez usuwanie aminokwasów z C-końca polipeptydów. Dokładna rola jaką pełni Api m 9 u pszczoły miodnej, nie jest jednak poznana. Przypisuje jej się degradację cząsteczki melityny w roztworach wodnych [47].

### Api m 10

Ikarpiina jest białkiem o masie 50-55 kDa i cząsteczce liczącej 204 aminokwasów z potencjalnymi 2-4 miejscami N-glikozylacji. W jadzie stanowi około 1% suchej masy. Funkcja Api m 10 jest obecnie nieznaną. Wiadomo jednak, że stanowi ważny, główny alergen jadu pszczoły [48,49]. W zależności od badań, procent osób uczulonych na Api m 10 wśród wszystkich osób z alergią na jad pszczoły wynosi od 49 do 70 [50]. Ikarpiina jest również alergenem markerowym, który umożliwia odróżnienie u osób z podwójnie dodatnimi wynikami testów, dla ekstraktu dla jadu pszczoły oraz osy, prawdziwego uczulenia na jad pszczoły [48]. Alergia na Api m 10 wiąże się z wyższym ryzykiem niepowodzenia podczas immunoterapii (AIT). Związane jest to ze słabą reprezentacją lub nawet brakiem tej cząsteczki w preparatach używanych do AIT [48]. Jest to spowodowane m.in. łatwością z jaką Api m 10 ulega degradacji w roztworach wodnych [48]. Badania nad tą cząsteczką dowiodły, że stosowanie rozcieńczalników zawierających albuminę surowicy ludzkiej oraz fenol stabilizuje na jej strukturę [51]. Ikarpiina jest kodowana przez pojedynczy gen, zawierający 4 eksony. Obecnie zidentyfikowano jedenaście różnych wariantów transkrypcyjnych Api m 10 co może mieć ważne konsekwencje w diagnostyce. Dwa pierwsze warianty różnią się od siebie 12 parami zasad, pozostałe dziewięć jest krótszych. Powstają one bowiem przez łączenie eksonów z dwóch lub więcej różnych transkryptów genów, co może prowadzić do przesunięcia ramki odczytu i przedwczesnego powstania kodonu stop, generującego skrócone wersje białka [49,50,52]. Na podstawie zdolności do reagowania tych wariantów Api m 10 z surowicami pacjentów, z potwierdzoną alergią na jad pszczoły, wyróżniono trzy grupy. Do pierwszej należą warianty od 1 do 4 rozpoznawane są przez większość surowic pacjentów. Do drugiej grupy zaliczono warianty 5 do 8 rozpoznawane przez mniej niż połowę badanych surowic. Do ostatniej należą warianty od 9 do 11, które nie reagują z surowicami osób o udowodnionym uczuleniu na jad pszczoły. Według Vaerenbergha M. i wsp [52] wariant 2 wydaje się być najlepszym biomarkerem do rozpoznawania IgE skierowanych przeciwko Api m 10. Natomiast warianty 3 i 4 mogą mieć szczególne znaczenie dla rozpoznawania alergii na jad pszczoły u pacjentów, którzy nie reagują na wariant 2 [52].

### Api m 11

Główne białko mleczka pszczelego (MRJP ang. major royal jelly protein), jest wysoce homologiczną grupą białek, występującą tylko w rodzaju Apis. Białka te stanowią około 90% wszystkich białek zawartych w mleczku pszczelim. U pszczoły zidentyfikowano dwie izoformy: MRJP 8 (Api m 11.0101a) o masie cząsteczkowej 65 kDa i MRJP 9 (Api m 11.0201a) o masie cząsteczkowej 60 kDa [45]. Mleczko pszczele (RJ) stanowi żółtawobiałą, kremową, kwaśną wydzielinę o lekko ostrym zapachu i smaku wytwarzaną przez gruczoły dolnego gardła i żuchwy robotnic pszczoł miodnych na wczesnych etapach ich rozwoju. Składa się w 60-70% z wody, 12-15% białka, 10-16% węglowodanów, 3-6% lipidów oraz z niewielkiej ilości witamin i wolnych aminokwasów [53,54]. Dla pszczoł stanowi pożywienie ich larw przez trzy pierwsze dni życia. Królowa natomiast, żywi się mleczkiem pszczelim przez całe swoje życie [55,56]. Oprócz roli odżywczej MRJP jest kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój pszczoł miodnych. Odgrywa ważną rolę w funkcjach mózgu pszczoł, takich jak uczenie się, pamięć i zachowania społeczne. Ludzie wykorzystują RJ jako zdrową żywność i suplement diety. Przypisuje mu się rolę w redukcji stresu oksydacyjnego, działanie przeciwdrobnoustrojowe, neurohormonalne, przeciwnowotworowe i insulinopodobne. Składniki aktywne mleczka pszczelego uczestniczą w rozszerzaniu naczyń co przekłada się na obniżenie ciśnienia krwi [55,57]. Główne białko mleczka pszczelego występuje również jako dominujące białko w miodzie (całkowita zawartość waha się od 1% do 2%) [58,59]. MRJP 8 i MRJP 9 zostały zidentyfikowane także jako składniki jadu pszczoły, co podkreśla wielofunkcyjną rolę MRJP w całym organizmie pszczoły miodnej, wykraczającą poza samą funkcję żywieniową [60]. Pomimo małej liczby przypadków alergii RJ i miód alergiczna reakcja krzyżowa jadu i produktów odżywczych pochodzących z pszczoł jest możliwa i powinna być brana pod uwagę w niektórych przypadkach uczulenia [60].

### Api m 12

Witellogenina (Vg) to monomeryczne białko wolne od CCD. W jego budowie można wyróżnić trzy konserwatywne domeny: N-końcową (ND), domenę o nieznannej funkcji 1943 (DUF1943) i domenę czynnika von Willebranda (vWF) typu D. U pszczoł miodnych w ND wyróżnia się dwie podkategorie strukturalne, domenę  $\beta$ -beczkową i  $\alpha$ -helikalną, z silnie nieuporządkowanym regionem poliserynowym łączącym te dwie domeny [61,62]. U owadów syntezowana jest w komórkach tłuszczowych gdzie jest magazynowana i rozszczepiana na fragmenty o masie 40 i 150 kDa. Następnie jest uwalniana do hemolimfy gdzie stanowi głównym składnik białkowy [61,62,63]. Wykazuje szeroki zakres funkcji. U większości zwierząt, zarówno bezkręgowców, jak i kręgowców, witellogenina bierze udział w tworzeniu żółtka podczas oogenezy, chroni również komórki przed uszkodzeniem oksydacyjnym. Witellogenina odgrywa istotną rolę w sygnalizacji hormonalnej w przejściu pszczoł pielęgniarek, które mają wysokie stężenie witellogeniny, do pszczoł robotnic, które mają niższe stężenie witellogeniny. Pszczoły pielęgniarce to kilkudniowe pszczoły, nie w pełni rozwinięte fizjologicznie. Ich zadaniem jest oczyszczanie komórek lęgowych, karmienie królowej oraz larw wytworzonym w aparacie gębowym mleczkiem pszczelim. Pszczoły

robotnice stanowią w pełni rozwinięte pszczoły, tracą zdolność produkcji mleczka pszczelego, odpowiedzialne są za zbieranie nektaru i produkcję wosku do budowy plastrów [64]. U bezkręgowców brak jest pamięci immunologicznej opartej na przeciwciałach. Występuje jednak międzypokoleniowe pobudzanie odporności, w procesie przenoszenia przez samicę, połączonych fragmentów patogenów do rozwijających się jaj, gdzie wywołują odpowiedź immunologiczną w rozwijającym się zarodku. W procesie tym pośredniczy witellogenina, która transportuje aktywatory odpornościowe do rozwijających się jaj oraz zdolna jest wiązać wzorce molekularne związane z patogenami PAMP [64]. Podwyższone stężenie Vg u pszczół robotnic zapewnia ochronę przed stresem oksydacyjnym. Wynika to z właściwości przeciwutleniających białka, które może neutralizować wolne rodniki [61]. Witellogenina obecna w jadzie pszczoły jest syntezowana w gruczole jadowym, skąd następuje wydzielanie do jadu poprzez endocytozę za pośrednictwem receptorów. Występuje 40% podobieństwo strukturalne między witellogeniną pszczoły miodnej (Api m 12) i witellogeniną osy (*Ves v 6*), co może odpowiadać za reaktywność krzyżową u niektórych pacjentów [4, 45,58].

## Diagnostyka

Pierwszym etapem w procesie diagnozowania pacjenta z historią niepożądanych objawów po użądleniu przez owady błonkoskrzydłe, jest staranne zebranie wywiadu. Ma to na celu próbę ustalenia owada sprawczego, co ma zasadnicze znaczenie z punktu widzenia planowania diagnostyki. Pacjent nie zawsze jest w stanie jednoznacznie i poprawnie zidentyfikować owada [65]. Jakob T. i wsp [15] podają, że nawet co trzeci badany może mieć problem z rozpoznaniem osy, a co dziesiąty błędnie klasyfikuje pszczołę. Uważa się, że cechą charakterystyczną użądleń przez pszczołę jest pozostawianie w miejscu w wklucia żądła. Czasami może to prowadzić do błędnego rozpoznania owada sprawczego. Zdarza się bowiem, że przez teksturę skóry lub co jest bardziej prawdopodobne, gdy pacjent

straci osę w chwili wklucia, żądło zostaje odłamane i pozostaje w skórze. Z punktu widzenia przyszłych incydentów i ryzyka anafilaksji, istotnie jest, aby zapytać pacjenta czy było to pierwsze użądlenie, a jeżeli nie, to kiedy doszło do poprzednich oraz czy obecna reakcja jest słabsza (wygaszanie uczulenia) czy silniejsza (narastanie uczulenia) od wcześniejszych [65].

## Diagnostyka *in vivo*

Punktowe testy skórne (PTS) oraz testy śródskórne (IDT) stanowią szybką, tanią i prostą metodę diagnostyczną. W handlu dostępne są standaryzowane preparaty jadowe, pozbawione substancji o niskiej masie cząsteczkowej, takich jak aminy biogenne, które mogłyby powodować reakcje niespecyficzne. Pomimo niskiego ryzyka reakcji ogólnoustrojowych, zaleca się stopniowe (zaczynając od niższych stężeń, kończąc na wyższych) wykonywanie testów skórnych u pacjentów z ciężką anafilaksją w wywiadzie. Aby określić próg wyzwalania reakcji, można zastosować stężenia jadu 1,0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml oraz jeżeli to konieczne, 300 µg/ml. Ze względu na ryzyko wystąpienia ciężkich reakcji ogólnoustrojowych po wykonaniu śródskórnych testów skórnych, zaleca się poprzedzić je testami punktowymi. Jeśli wynik PTS jest ujemny, można po nim wykonać badanie śródskórne z maksymalnym stężeniem jadu 1,0 µg/ml. Możliwe jest również wykonanie tylko IDT, przy użyciu stężeń jadu 0,001 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml i 1,0 µg/ml [15, 65].

Należy unikać wykonywania testów skórnych bezpośrednio po zdarzeniu, ponieważ efekt wzmocnienia jest nadal niewystarczający, co może skutkować fałszywie ujemnymi wynikami. Uważa się, że najlepszy przedział czasowy do wykonania testów skórnych wynosi od jednego do sześciu tygodni po użądleniu. Wraz z upływem czasu od użądlenia, pacjenci tracą wrażliwość do odpowiedzi na jad owadów błonkoskrzydłych w testach skórnych. Szacuje się, że utrata reaktywności wynosi ok 12% rocznie, przy czym 33% testów skórnych jest ujemnych po upływie

Tabela II Wykaz leków hamujących testy skórne oraz czas na jaki trzeba je odstawić przed badaniem [15,65]

Grupa leków	Stopień hamowania	Okres odstawienia
Antyhistamina H1 pierwszej generacji	+++	> 3 dni
Antyhistamina H1 nowej generacji	+++	> 7 dni
Antyhistamina H2	-/+	2 dni
Ketotifen	+++	> 5 dni
Miejscowe glikokortykosteroidy (GCS) w obszarze testowym >4 tygodnie	+	> 1 tygodnia
<10 mg prednizolon	-	0
>10 mg prednizolonu	-/+	> 3 tygodnie
Benzodiazepiny	+++	> 7 dni
Omalizumab	+++	4-8 tygodnie
Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne	+++	> 14 dni
Prometazyna	++	> 5 dni

Stopień hamowania w teście skórny: „-” brak interakcji, „0” brak dowodów, „+” niski, „+++” umiarkowane, „++++” wysoki.

2,5 roku [15]. Stosowanie leków takich jak kortykosteroidy, leki przeciwhistaminowe i leki przeciwpsychotyczne działające przez receptory histaminowe, może hamować odpowiedź w testach skórnych i dawać wyniki fałszywie ujemne [41]. W tabeli II zestawiono wpływ leków na wyniki testów skórnych oraz zalecany czas odstawienia leków przed wykonaniem badania.

### Diagnostyka *in vitro*

Aktualnie dostępnych jest wiele testów diagnostycznych, zarówno single- jak i multipleksowych, umożliwiających wykrywanie sIgE przeciwko ekstraktowi jadu pszczoły oraz pięciu pojedynczym jego komponent (Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 oraz Api m 10). Oznaczenie sIgE dla jadu pszczoły u pacjentów uczulonych charakteryzuje się wysoką czułością (98–100%) [15]. W tabeli III przedstawiono zestawienie dostępnych testów laboratoryjnych do diagnostyki alergii na jad pszczoły.

Przeciwciała sIgE dla jadu pszczoły najlepiej oznaczać między 1 a 6 tygodniem po użądleniu. Zbyt długi okres od incydentu, nawet u pacjentów z przekonującą historią anafilaksji, może skutkować niewykryciem we krwi przeciwciał. Z danych przedstawionych przez Jakob T. i wsp. [15] wynika, że stężenie sIgE zmniejsza się w czasie od roku do czterech lat po anafilaksji wywołanej użądleniem i może w tym czasie spaść poniżej stężenia możliwego do wykrycia komercyjnie dostępnymi testami [15].

Oznaczenie sIgE dla jadu owadów, stanowi jedną z głównych metod diagnostyki alergii na jad pszczoły, jednak pozwala jedynie na wykrycie obecności lub braku uczulenia IgE-zależnego. Rozpoznanie alergii zawsze wymaga zweryfikowania otrzymanych wyników z historią kliniczną pacjenta [15].

Obecnie diagnostyka molekularna z wykorzystaniem rekombinowanych, wolnych od CCD, alergenów jadu pszczoły ma niezwykle potencjał do rozróżniania fałszywie dodatnich wyników, związanych z występowaniem nieistotnych klinicznie przeciwciał anty-CDD. Ponadto zastosowanie alergenów swoistych dla gatunku, wolnych od CCD, ułatwia wykluczenie reaktywności krzyżowej wynikającej z obecności homologicznych epitopów białkowych zarówno w jadzie pszczoły jak i jadzie osy [9].

### Prowokacja żywym owadem

W niektórych krajach celowa prowokacja użądlenia jest uwzględniana w diagnostyce pacjentów z podejrzeniem

alergii na jad pszczoły. Wystąpienie reakcji ogólnoustrojowej, po indukowanym użądleniu, jednoznacznie potwierdza kliniczne znaczenie uczulenia. Jednak metoda ta może prowadzić do bardzo ciężkich reakcji przez co wzbudza silne kontrowersje. Halteren H i wsp. [72] badali ujemną wartość predykcyjną prowokacji żywym owadem, prowadzonej w warunkach szpitalnych. U 327 osób, u których próba prowokacji była negatywna lub nie przekraczająca drugiego stopnia w klasyfikacji Müllera i jednocześnie nie została podjęta immunoterapia swoista na jad został następnie zebrany wywiad obejmujący okres od 4 do 14 lat od próby prowokacji. Miała ona na celu ustalenie czy wystąpiło w tym okresie użądlenie oraz stopień reakcji na jad, w przypadku wystąpienia użądlenia. Ustalono, że 129 osób z tej grupy doszło do ponownego użądlenia. Spośród nich tylko 6 miało reakcję ogólnoustrojową. Badacze stwierdzili, że w przypadku pozostałych 123 pacjentów, co stanowiło 95% tej grupy ujemny wynik testu prowokacji owadem stanowił skuteczny marker pozwalający przewidzieć tolerancję na kolejne przypadkowe użądlenie [72]. Jakob T. i wsp. [15] czułość testu prowokacji żywym owadem do potwierdzenia klinicznego uczulenia na jad błonkoskrzydłych oszacowali na 83%. Badacze cytują również inne badanie, z którego wynika, iż 21% pacjentów tolerujących początkową prowokację owadem, rozwija jednak anafilaksję po drugiej prowokacji żywą pszczołą. Jakob T i wsp. [15] zauważają, iż w wielu przypadkach ryzyko związane z tą metodą diagnostyki, przewyższa potencjalne korzyści jakie można dzięki niej osiągnąć.

### BAT

Konwencjonalne metody *in vivo* i *in vitro* mogą dawać fałszywie ujemne wyniki u 6 – 20% badanych. Ponadto uzyskane dane są często niejednoznaczne, ponieważ u tego samego pacjenta mogą być wykrywane zarówno IgE specyficzne dla jadu pszczoły, jak i jadu osy. Test aktywacji bazofilów, oparte na analizie ekspresji markerów powierzchniowych komórek bazofilów CD63 i/lub CD203c wykazują obiecujące wyniki kliniczne w badaniach dorosłych pacjentów z alergią na jad owadów [73].

Ott H. i wsp. [73] oceniali przydatność badania BAT u 15 dzieci w wieku  $13 \pm 3,5$  lat, którzy zgłosili się do przychodni z podejrzeniem alergii na jad pszczoły lub osy. U badanych przeprowadzono dla jadów pszczoły oraz osy: test aktywacji bazofilów, punktowe testy skórne oraz zmierzono stężenia swoistych przeciwciał IgE. Uzyskane wyniki są przedstawione w tabeli IV. W badaniach tych czułość

Tabela III Zestawienie dostępności testów alergenowych, pomocnych w diagnostyce alergii na jad pszczoły [66-71]

	ALEX <sup>2</sup>	ImmunoCAP	HYCOR Biomedical	SIEMENS	EUROIMMUN
Jad pszczeli	E	E	E	E	E
Api m 1	N	R		R	
Api m 2		R		R	
Api m 3		R			
Api m 5		R			
Api m 10	R	R			

Legenda: E - ekstrakt, N - komponenta natywna, R - komponenta rekombinowana

testu BAT w diagnostyce alergii na jad pszczoły wyniosła 67% i była niższa niż czułość testów skórnych (89%) oraz czułość oznaczenie swoistych przeciwciał IgE (100%). Podobną analizę przeprowadzono u osób z alergią na jad osy. W tym przypadku czułość testu BAT wyniosła 75% przy 100% czułości oszacowanej dla punktowe testy skórne oraz oznaczenia swoistych dla jadu IgE. Autorzy ci wyliczyli, że wewnętrzna swoistość testu BAT dla konkretnego pacjenta z alergią na jad pojedynczego owada, potwierdzoną przy pomocy punktowych testów skórnych oraz oznaczania swoistych przeciwciał IgE wyniosła 100%. Niestety brak grupy kontrolnej uniemożliwia ocenę globalnej swoistości testu BAT w tym badaniu [73].

Także Scherer K. i wsp. [74] ocenili przydatność testu aktywacji bazofilii u pacjentów z alergią na owady błonkoskrzydłe. W tym celu porównali otrzymane wynik BAT

z wynikami punktowych testów skórnych oraz swoistego IgE dla jadów owadów u 134 pacjentów w wieku  $39 \pm 17$  lat oraz 44 osób grupy kontrolnej w wieku  $39 \pm 11$  lat. Pacjenci zostali wybrani spośród osób zgłaszających ogólnoustrojowe reakcje po użądleniu i hospitalizowanych z tego. U pacjentów wykonano test aktywacji bazofilii, punktowe testy skórne oraz oznaczenie stężenia sIgE dla ekstraktu z jadu pszczoły oraz osy. Na podstawie wyników oraz wywiadu postawiono rozpoznanie alergii na jad pszczoły u 67 badanych oraz alergii na jad osy u 78 osób z tej grupy. W tabeli V zestawiono uzyskane wartości czułości oraz swoistości dal testu BAT, punktowych testów skórnych oraz oznaczeni stężenia swoistego IgE. Według Scherer K. i wsp. [74] u osób z alergią na jady owadów czułość i swoistość wszystkich testów in vitro były niezmiennie wysokie. Kombinacja wszystkich testów (testy skórne, sIgE, testy komór-

Tabela IV Wyniki testu aktywacji bazofilów (BAT), punktowych testów skórnych (PTS) oraz alergenowo-swoistych przeciwciał IgE (sIgE) w badaniu Ott H. i wsp. [73].

Nr pacjenta	BAT kontrola negatywna [%CD63]	BAT kontrola pozytywna [%CD63]	BAT jad pszczoły [%CD63]	BAT jad osy [%CD63]	PTS jad pszczoły	PTS jad osy	sIgE jad pszczoły [klasa]	sIgE jad osy [klasa]
1	4,7	21,8	4,4	4,0	-	+	0	2
2	0,9	41,9	3,5	37,0	+	+	3	3
3	1,3	98,2	2,3	58,2	-	+	2	3
4	6,3	82,8	4,5	10,6	+	+	0	2
5	0,4	71,9	1,2	24,7	+	+	2	4
6	3,4	55,3	4,4	37,4	-	+	6	4
7	3,8	69,3	6,9	2,2	+	-	3	1
8	2,5	15,5	6,7	0,9	-	-	3	0
9	4,4	74,7	4,8	0,9	+	+	2	0
10	9,1	81,0	75,5	2,3	+	-	3	2
11	2,4	18,4	10,2	5,0	+	+	2	2
12	4,9	90,7	87,0	5,3	+	-	4	3
13	2,6	61,9	38,5	3,4	+	-	3	2
14	0,3	10,6	31,9	27,6	+	+	3	3
15	5,1	20,7	5,8	4,6	+	+	2	2

Legenda: Klasa 0: < 0.35 kU /l, Klasa 1: 0.35 – 0.70 kU /l, Klasa 2: 0.70 – 3.50 kU /l, Klasa 3: 3.50 – 17.50 kU /l, Klasa 4: 17.50 – 50.00 kU /l, Klasa 5: 50.00 – 100 kU /l, Klasa 6: > 100 kU /l

Tabela V Wartości czułości oraz swoistości uzyskane w badaniu Scherer K. i wsp. [74].

	BAT	Punktowe testy skórne	Swoiste IgE
Pacjenci z alergią na jad pszczoły	Czułość	89,5%	92,5%
	Swoistość	94,9%	83,7%
Pacjenci z alergią na jad osy	Czułość	88,5%	92,4%
	Swoistość	100%	93%



kowe) dała pozytywną wartość predykcyjną 100% dla obu jadów, jeśli wszystkie 3 były pozytywne, i negatywną wartość predykcyjną 100%, jeśli przynajmniej 1 test był pozytywny. Swoistości względne dla testów BAT wynosiły 85,7% dla jadu pszczoły miodnej oraz 92,1% dla jadu osy. Ważną obserwacją stanowi fakt, iż testy te pozwalały na wykrycie owada sprawcy u pacjentów ze współreaktywnością na oba owady. Co ciekawe badacze ci nie zaobserwowali korelacji między ciężkością reakcji klinicznej a wynikami testu BAT. Według nich testy BAT są cennymi dodatkowymi narzędziami diagnostycznymi do ustalenia rzeczywistego owada uczulającego u pacjentów z niejasną historią kliniczną lub u pacjentów podwójnie uczulonych [74].

## Podsumowanie

Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych, w tym pszczoły jest istotnym problemem w populacji ogólnej, sta-

nowią najczęstsza przyczyna anafilaksji u dorosłych oraz drugą u dzieci i młodzieży. Duży problem stanowi dla chorych, próba unikania narażenia na użądlenie, zwłaszcza w wiosną i latem na które przypada aktywność tego owada. Obecnie posiadamy szeroki panel metod umożliwiających diagnozowanie pacjentów po użądleniu. Diagnostyka molekularna oparta na rekombinowanych wolnych od CCD alergenach gatunkowych umożliwia odróżnienie prawdziwej sensytyzacji od reaktywności krzyżowej, a tym samym u wielu pacjentów poprawia wybór odpowiedniej immunoterapii jadem lub niepotrzebną terapię wieloma jadami zamiast właściwym. Rozwój technik i dalsze badania nad potencjalnymi alergenami w jadzie pszczoły, być może w przyszłości przyczynią się do jeszcze lepszej możliwości diagnozowania oraz leczenia pacjentów z alergią na jad pszczoły.

## Piśmiennictwo

- Peters RS., Krogmann L., Mayer C i wsp.: Evolutionary History of the Hymenoptera. *Current Biology*, 2017; 27: 1013–1018
- Zoologia: Stawonogi. Szczękoczułkopodobne, skorupiaki. T. 2, cz. 1.. Red. nauk. Czesław Błaszak. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2011
- Arif F., Williams M., Hymenoptera Stings. *StatPearls*, 2021
- Tomsitz D., Brockow K., Component Resolved Diagnosis in Hymenoptera Anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2017; 17: 38
- [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=T-SN&search\\_value=154396#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=T-SN&search_value=154396#null) 17.01.2022
- Pucca MB., Cerni FA., Oliveira IS i wsp.: Bee Updated: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Envenoming Therapy. *Front Immunol.* 2019; 10: 2090
- Whitfield CH., Behura SK., Berlocher SH i wsp.: Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *SCIENCE*, 2006; 314: 642-645
- Khalil A., Elesawy BH., Ali MT i wsp.: Bee Venom: From Venom to Drug, *Molecules* 2021; 26(16): 4941
- Ollert M., Blank S., Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015; 15(5): 26
- Matysiak J., Matysiak J., Bręborowicz A., The correlation between anti phospholipase A2 specific IgE and clinical symptoms after a bee sting in beekeepers, *Postepy Dermatol Alergol.* 2016; 33(3): 206-10
- Bilo MB., Tontini C., Martini M i wsp.: Clinical aspects of hymenoptera venom allergy and venom immunotherapy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2019; 51: 244-257
- Blank S., Grosch J., Ollert M i wsp.: Precision Medicine in Hymenoptera Venom Allergy: Diagnostics, Biomarkers, and Therapy of Different Endotypes and Phenotypes. *Front Immunol.* 2020; 11
- Fauna Polski – charakterystyka i wykaz gatunków. Bogdanowicz W., Chudzicka E., Pilipiuk I. i Skibińska E. (red.). T. I. Warszawa: Muzeum i Instytut Zoologii PAN, 2004
- Gorska L., Chelminska M., Kuziemska K., Analysis of Safety, Risk Factors and Pretreatment Methods during Rush Hymenoptera Venom Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147: 241–245
- Jakob T., Rafei-Shamsabadi D., Spillner E i wsp., Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics, *Allergo J Int.* 2017; 26(3): 93–105.
- Hirata H., Sato K., Ogasawara T., Sensitization to Api m 1, Api m 2, and Api m 4 in Japanese beekeepers who had experienced systemic reactions to honeybee stings. *Allergology International*, 2019; 68: 261-263
- Hirata, H., Sato, K., Ogasawara, T i wsp.: Sensitization to Api m 1, Api m 2, and Api m 4 in Japanese beekeepers who had experienced systemic reactions to honeybee stings, *Allergology International* 2019; 68: 261-263
- Yaacoub C., Rifl M., El-Obeid D., The Cytotoxic Effect of *Apis mellifera* Venom with a Synergistic Potential of Its Two Main Components—Melittin and PLA2—On Colon Cancer HCT116 Cell Lines, *Molecules.* 2021; 26(8): 2264
- Frangieh J., Salma Y., Haddad K i wsp.: First Characterization of The Venom from *Apis mellifera syriaca*, A Honeybee from The Middle East, *Toxins (Basel).* 2019; 11(4): 191
- Hossen SM., Shapla MU., Gan HS i wsp.: Impact of Bee Venom Enzymes on Diseases and Immune Responses, *Molecules.* 2017; 22(1): 25.
- Shen L-R., Ding M-H., Zhang L-W i wsp.: Expression of a bee venom phospholipase A2 from *Apis cerana cerana* in the baculovirus-insect cell, *J Zhejiang Univ Sci B.* 2010; 11(5): 342–349
- Nielsen VG., The anticoagulant effect of *Apis mellifera* phospholipase A2 is inhibited by CORM-2 via a carbon monoxide-independent mechanism. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2020; 49:100–107
- Francese F., Lambardi D., Mastrobuoni G. i wsp.: Detection of Honeybee Venom in Envenomed Tissues by Direct MALDI MSI, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009; 20: 112–123
- Teixeira-Cruz MJ., Strauch MA., Monteiro-Machado M., A Novel Apilic Antivenom to Treat Massive, Africanized Honeybee Attacks: A Preclinical Study from the Lethality to Some Biochemical and Pharmacological Activities Neutralization, *Toxins (Basel).* 2021; 13(1): 30
- Padavattan S., Schirmer T., Schmidt M., Identification of a B-cell Epitope of Hyaluronidase, a Major Bee Venom Allergen, from its Crystal Structure in Complex with a Specific Fab, *J. Mol. Biol.* (2007); 368: 742–752
- Marković-Housley Z., Miglierini G., Soldatova L i wsp.: Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom, *Structure*, 2020; 8: 1025–1035
- <https://enzyme.expasy.org/cgi-bin/enzyme/enzyme-search-de> (22.01.2022)
- Georgieva D., Greunke K., Genov N i wsp.: 3-D Model of the bee venom acid phosphatase: Insights into allergenicity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009; 378: 711–715
- Heavner M., Gueguen G., Rajwani R i wsp.: Partial venom gland transcriptome of a *Drosophila* parasitoid wasp, *Leptopilina heterotoma*, reveals novel and shared bioactive profiles with stinging Hymenoptera, *Gene.*, 2013; 526(2): 195–204.

30. Grunwald T, Bockisch B., Spillner E i wsp.: Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3), *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 2005; 117: 848-854
31. Barboni E., Kemeny DM., Campos S i wsp.: The Purification of acid phosphatase from honet bee vebon (apis mellifica), *Toxicon*, 1997; 25: 1097-1103
32. Seppälä U., Francese S., Turillazzi S i wsp.: In situ imaging of honeybee (*Apis mellifera*) venom components from aqueous and aluminum hydroxide-adsorbed venom immunotherapy preparations, *FOOD, DRUG, INSECT STING ALLERGY, AND ANAPHYLAXIS*, 2012; 129: 1314-1320
33. Wessman P., Stromstedt AA., Malmsten M i wsp.: Melittin-Lipid Bilayer Interactions and the Role of Cholesterol, *Biophys J.*, 2008; 95(9): 4324-4336.
34. Klocek G., Seelig J.: Melittin Interaction with Sulfated Cell Surface Sugars, *Biochemistry* 2008; 47: 2841-2849
35. Chen J., Guan S-M., Sun Wei i wsp.: Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom, *Neurosci Bull.*, 2016; 32(3): 265-272
36. Blank S., Seusnabb G., Bockiscg B i wsp.: Identification, Recombinant Expression, and Characterization of the 100 kDa High Molecular Weight Hymenoptera Venom Allergens Api m 5 and Ves v 3, *J Immunol*, 2010; 184: 5403-5413
37. Blank S., Etzold S., Darsow U i wsp.: Component-resolved evaluation of the content of major allergens in therapeutic extracts for specific immunotherapy of honeybee venom allergy, *Hum Vaccin Immunother*. 2017; 13(10): 2482-2489
38. Hemmer W. Kreuzreaktionen zwischen den Giften von Hymenopteren unterschiedlicher Familien, Gattungen und Arten, *Hautarzt*, 2014; 65: 775-779
39. Vega-Castro A., Rodriguez-Gil D., Martinez-Gomariz M i wsp.: Api m 6 and Api m 10 as Major Allergens in Patients with Honeybee Venom, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2022; 32(2): 1-23
40. Yang J., Lee KS., Kim BY i wsp.: Anti-fibrinolytic and anti-microbial activities of a serine protease inhibitor from honeybee (*Apis cerana*) venom, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2017; 201: 11-18
41. Kettner A., Hughes GJ., Frutiger S.: Api m 6: A new bee venom allergen, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001; 107(5), 914-920
42. Michel Y., McIntyre M., Ginglinger H.: The Putative Serine Protease Inhibitor Api m 6 From *Apis mellifera* Venom: Recombinant and Structural Evaluation, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2012; 22(7): 476-484
43. Geirgueva D., Greunke K., Betzel C.: Three-dimensional model of the honeybee venom allergen Api m 7: structural and functional insights, *Mol. BioSyst.*, 2010; 6: 1056-1060
44. Winningham KM., Christian MS., Schmidt M.: Hymenoptera venom protease allergens, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004; 114(4): 928-933
45. Burzyńska M., Piasecka-Kwiatkowska D.; A Review of Honeybee Venom Allergens and Allergenicity, *Int J Mol Sci.*, 2021; 22(16): 8371
46. Rand EE., Smit S., Beukes M.: Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine, *Scientific Reports* 2015; 5: 11779
47. Tusiimire J.: A Study of the Biological Activity of Bee Venom and its Fractions With Regard to Cosmetic Science and Immunology, *Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences at the University of Strathclyde*, 2016: 30-45
48. Rauber MM., Roßbach, A., Jung, A i wsp.: The honey bee venom allergen Api m 10 displays one major IgE epitope, *Api m 10160-174, Allergy*, 2020; 75(7): 1756-1759
49. Jakob T., Rauber MM., Perez-Rivero A i wsp.: The Honeybee Venom Major Allergen Api m 10 (Icarapin) and Its Role in Diagnostics and Treatment of Hymenoptera Venom, *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020; 20(9): 48
50. Pereira Santos MC., Lourenco T., Pedro E., Evolution of Api m10 specific IgE and IgG4 after one year of bee venom immunotherapy, *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2020; 52: 175-181
51. Feindor M., Heath M., Hewings SJ i wsp.: *Venom Immunotherapy: From Proteins to Product to Patient Protection*, *Toxins (Basel)*. 2021; 13(9): 616
52. Vaerenbergha M., Smet L., Rafei-Shamsabadi i wsp.: IgE recognition of chimeric isoforms of the honeybee (*Apis mellifera*) venom allergen Api m 10 evaluated by protein array technology, *Molecular Immunology*, 2015; 63: 449-455
53. Mandacaru S., Vale LHG., Vahidi S i wsp.: Characterizing the Structure and Oligomerization of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) by Mass Spectrometry and Complementary Biophysical Tools, *Biochemistry*. 2017; 56(11): 1645-1655
54. Rosmilah, M., Shahnaz, M., Patel G i wsp.: Characterization of major allergens of royal jelly *Apis mellifera*, *Tropical Biomedicine*, 2008; 25(3): 243-251
55. Matsuoka T., Kawashima T., Nakamura T i wsp.: Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, *Apis mellifera*, *Apidologie*, 2012; 43: 685-697
56. Furusawa T., Rakwal R., Nam HW i wsp.: Comprehensive Royal Jelly (RJ) Proteomics Using One- and Two-Dimensional Proteomics Platforms Reveals Novel RJ Proteins and Potential Phospho/Glycoproteins, *Journal of Proteome Research* 2008; 7: 3194-3229
57. Schönleben S., Sickmann A., Mueller MJ i wsp.: Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007; 389: 1087
58. Blank S., Seismann H., McIntyre M., Vitellogenins Are New High Molecular Weight Components and Allergens (Api m 12 and Ves v 6) of *Apis mellifera* and *Vespula vulgaris* Venom, *PLoS One*. 2013; 8(4): e62009
59. Zhang Y., Chen Y., Cai Y., Novel polyclonal antibody-based rapid gold sandwich immunochromatographic strip for detecting the major royal jelly protein 1 (MRJP1) in honey, *PLoS One*. 2019; 14(2): e0212335
60. Blank S., Bantleon FI., McIntyre M., 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, *Clinical & Experimental Allergy*, 2012; 42: 976-985
61. Salmela H., Stark T., Stucki D i wsp., Ancient Duplications Have Led to Functional Divergence of Vitellogenin-Like Genes Potentially Involved in Inflammation and Oxidative Stress in Honey Bees, *Genome Biol Evol*. 2016; 8(3): 495-506
62. Leipart V., Montserrat-Canals M., Cunha ES i wsp., Structure prediction of honey bee vitellogenin: a multi-domain protein important for insect immunity, *FEBS Open Bio* 2021; 12: 51-70
63. BenVan LR., Nieh JC., Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults, *Sci Rep.*, 2017; 7: 14144
64. Harwood G., Amdam G., Freitag D., The role of Vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*), *Journal of Insect Physiology* 2019; 112: 90-100
65. Adib-Tezer H., Bayerl C., Honeybee and wasp venom allergy: Sensitization and immunotherapy, *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2018; 16(10): 1228-1247
66. Lis K, Bartuzi Z. Testy wieloparametrowe do diagnostyki molekularnej alergii – aktualne możliwości, *Alergia Astma Immunologia* 2020, 25 (3): 122-140
67. <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/en/product-catalog.html?solution=ImmunoCAP&region=PL> (20.01.2022)
68. <https://www.hycorbiomedical.com/products> (20.01.2022)
69. <https://www.siemens-healthineers.com/laboratory-diagnostics/assays-by-diseases-conditions/allergy/laboratorian-information> (20.01.2022)

70. <https://www.euroimmun.com/documents/Catalogue/EUROIMMUN-Product-Catalogue.pdf> (20.01.2022)
71. <https://www.emma-mdt.pl/diagnostyka/polycheck/alerlogia/pa-nele-molekularne-specjalne> (11.02.2022)
72. Halteren H., Lindern P-W., Burgers S. i wsp., Hymenoptera sting challenge of 348 patients: Relation to subsequent field stings, *J Allergy clin immunol*, 1994; 97(5): 1058-1063
73. Ott H., Tenbrock H., Baron J. i wsp., Basophil Activation Test for the Diagnosis of Hymenoptera Venom Allergy in Childhood: a Pilot Study, *Klin Padiatr*, 2011; 223: 27-32.
74. Scherer K, Weber JM, Jermann TM i wsp. Cellular in vitro assays in the diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008;146(2):122-32.