

“La inmunoterapia con veneno de himenópteros como modelo de eficacia terapéutica”

Dra. Arantza Vega.

Servicio de Alergia. Hospital Universitario de Guadalajara

Resumen

La inmunoterapia con veneno de himenópteros (ITVH) es el único tratamiento que puede prevenir la aparición de una reacción sistémica tras una picadura en pacientes alérgicos al veneno de himenópteros, con una eficacia del 77-98%. A diferencia de la inmunoterapia con aeroalérgenos los inicios suelen ser rápidos, el mantenimiento es en una dosis fija cuya administración se va espaciando, a pesar de la aparición de reacciones adversas no se suspende el tratamiento ni se reducen dosis. La ITVH disminuye el riesgo de reacciones sistémicas tras una picadura, disminuye las reacciones locales extensas y mejora la calidad de vida de los pacientes.

Durante la tolerancia adquirida al veneno se observan varios mecanismos: en la fase de inicio de ITVH o aumento de dosis se observa una protección a corto plazo no específica, mientras que en la fase de mantenimiento se inducen los mecanismos de tolerancia específica a largo plazo, originando un cambio de respuesta Th2 a Th1. En apicultores las células Tregs productoras de IL-10 inhiben la proliferación de células T efectoras específicas de alérgenos del veneno de abeja poco después del comienzo de la estación activa. Además, el veneno per se puede tener un efecto inmunomodulador.

La falta de eficacia en la ITVH se estima entre el 10 y el 15 % de todos los pacientes tratados. La alergia al veneno de abeja se asocia a menor protección. En pacientes con reacciones graves, alta exposición o síndromes de activación mastocitaria clonal hay que plantearse una inmunoterapia por tiempo indefinido.

Introducción

La anafilaxia por alergia al veneno de himenópteros (AVH) representa un 7,3-59% de los casos de anafilaxia¹ dependiendo de la población estudiada. En el registro europeo de anafilaxia, la AVH es la causa más frecuente de reacciones graves en la población adulta (48,2%) y la segunda en población infantil (20,2%) tras la alergia a alimentos².



La inmunoterapia con veneno de himenópteros (ITVH) es el único tratamiento que puede prevenir la aparición de una reacción sistémica tras una picadura en pacientes alérgicos al veneno de himenópteros. Es eficaz en el 77-84% de los pacientes tratados con veneno de abeja y en el 91-98 % de los tratados con venenos de vespídeos³. Como todo tratamiento no está exento de reacciones adversas sistémicas (RAS), cuya frecuencia oscila entre el 8 y el 40%, según diversos estudios.

Inicialmente la inmunoterapia con veneno de himenópteros se realizaba con extracto de cuerpo entero. En los años 50 del pasado siglo MH Loveless⁴ publicó un estudio donde demostraba la eficacia del tratamiento con extracto de veneno que ella misma recogía y administraba a sus pacientes, eficacia que medía mediante prueba de repicadura controlada. A pesar de ello se siguió vacunando con extracto de cuerpo hasta que en los años 70 un estudio doble ciego demostró la eficacia del extracto de veneno, siendo el extracto de cuerpo entero igual al placebo⁵.

Diferencias entre inmunoterapia con aeroalérgenos e inmunoterapia con veneno de himenópteros

Hay una serie de diferencias entre la inmunoterapia con aeroalérgenos (ITA) y la ITVH⁶ (Tabla 1). La abordaremos según diferentes puntos:

Patología: Con respecto a la gravedad de la patología a tratar, la primera se aplica en alergia respiratoria, en pacientes que presentan rinitis y/o asma bronquial alérgicos, mientras que la ITVH se utiliza en pacientes que han sufrido una reacción sistémica con la picadura de un himenóptero, reacción que a veces pone en riesgo la vida del paciente³.

Vía de administración: La ITA se ha usado con diferentes vías: subcutánea, sublingual o intradérmica; la ITVH solo está comercializada vía subcutánea, aunque en algún estudio se haya usado también vía sublingual⁷.

Dosis: La ITVH se usa a dosis fija de 100 µg, con intervalos de administración que se van aumentando según los años administrados. Si la dosis no fuese suficiente se puede subir a 200 µg. Las dosis usadas en la ITA varían según el alérgeno administrado, la vía elegida y casa farmacéutica.

Eficacia: La ITVH previene de forma casi completa frente a reacciones. En los pacientes que no están protegidos con dosis de 100 µg al aumentar la dosis se consigue protección⁸. La prueba de oro para verificar la eficacia de la ITVH es la prueba de repicadura controlada. La eficacia de la ITA no es siempre predecible; hay descrita una eficacia del 67,4% en el segundo año en IT con ácaros. En estos la eficacia del tratamiento a los 4 meses predijo la eficacia al 2º año⁹. Otro estudio con IT sublingual establece los 6 meses como tiempo crítico para evaluar la eficacia y ajuste de dosis de ITSL¹⁰.

Seguridad: No se han comunicado muertes con la ITVH mientras que sí han ocurrido con la ITA en los años 80, en los que el uso de extractos con mayor potencia en pacientes con asma no controlado ocasionó reacciones mortales que impusieron limitaciones en su uso y en algún país el abandono del tratamiento^{11,12}.

Buscando una explicación sobre las diferencias encontradas entre los 2 tipos de IT se postula que en los pacientes alérgicos a inhalantes suele haber una inflamación persistente mientras que en los alérgicos a venenos la inflamación es esporádica, durante el cuadro agudo. Se ha visto en un estudio que el 60% de las reacciones tras picaduras aparecían en pacientes que había tolerado picaduras previas en los 2 meses anteriores¹³.

IT aeroalérgenos	IT venenos
Indicaciones	
Rinitis y asma bronquial	Anafilaxia
Vía de administración	
Subcutánea	Subcutánea
Sublingual	
Intradérmica	
Dosis	
Variable, según alérgeno y vía	Fija 100 µg Mantenimiento espaciado
Duración	
3-5 años	5 años Indefinida en algunos pacientes
Seguridad	
Reacciones mortales en los años 80 asociadas a asma mal controlada	Reacciones sistémicas en fase de inicio No muertes
Eficacia	
60-80 %	Hasta el 97%
Predicción de eficacia	
Historia clínica, tipo de alérgeno, otras patologías alérgicas.	Test de repicadura
Eficacia a los 4-6 meses predice eficacia a los 24-36 meses	

Tabla 1: Diferencias entre la inmunoterapia con aeroalérgenos (ITA) y la ITVH6. Modificado de Incorvaia C et al⁶

Indicaciones y acciones de la ITVH

Como se ha comentado anteriormente, hay una serie de actitudes con respecto al uso de la ITVH que se mantienen desde hace años. Los inicios suelen ser rápidos, el mantenimiento es en una dosis fija cuya administración se va espaciando. A pesar de la aparición de reacciones adversas no se suspende el tratamiento ni se reducen dosis; se premedica o se readapta la pauta para que el paciente la tolere.

La ITVH disminuye el riesgo de reacciones sistémicas tras una picadura³, disminuye las reacciones locales extensas^{7,14} y mejora la calidad de vida de los pacientes^{15,16}. Su alta eficacia se fundamenta en 2 pilares principales: por una parte, la correcta elección del



paciente candidato a IT y del veneno a administrar y por otra la administración en dosis e intervalos adecuados.

Con respecto a la elección del extracto, actualmente en nuestro país disponemos de extractos acuosos para los venenos de *Apis mellifera*, *Vespula spp.* (mezcla de *Vespula vulgaris*, *V. germánica*, *V. macularis*), *Vespa velutina*, *Polistes dominula* y *Polistes spp.* (mezcla de *Polistes americanas*); extractos depot absorbidos en hidróxido de aluminio para *Apis mellifera* y *Vespula spp* y extractos purificados de *Apis mellifera* y *Vespula spp.*

En caso de pacientes alérgicos a *Vespa* (*V. crabro* o *V. velutina*) la IT con veneno de *Vespula* se ha mostrado eficaz^{17,18}, aunque un estudio comparativo en pacientes alérgicos a veneno de *V. crabro* mostró una mayor eficacia en aquellos que fueron tratados con veneno de *V. crabro* (93,8%) frente a los tratados con veneno de *Vespula spp.* (87%)¹⁹. Esa menor eficacia fue más evidente en los pacientes que habían sufrido reacciones más graves, por lo que los autores recomiendan la vacunación con el veneno del insecto responsable de la reacción. Algo similar se puede ver en los pacientes alérgicos al veneno de *Bombus*. En general el tratamiento con veneno de abeja puede ser suficiente para proteger a los alérgicos al veneno de abejorro porque dada la menor frecuencia de picadura por estos insectos se estima que la sensibilización primaria de los pacientes es a veneno de abeja. Sin embargo, los pacientes trabajadores de invernaderos, donde se utiliza al abejorro como polinizador, se suelen sensibilizar primariamente al veneno de *Bombus* por lo que la IT con veneno de abeja ofrecería una menor protección^{20,21}.

Con respecto a la administración del extracto elegido, la dosis a administrar es de 100 µg durante 5 años completos. Algunos autores indican que con 3 años podría ser suficiente, pero la eficacia a largo plazo es menor³. La pauta de inicio a elegir puede ser desde ultrarrápida, en la que se llega a dosis de mantenimiento en un solo día, hasta una pauta convencional, con incrementos semanales en un tiempo variable que, en nuestro país, suele oscilar entre 7-9 semanas²². Una vez alcanzada la dosis de mantenimiento esta se repite de forma mensual el primer año, cada 6 semanas el segundo y cada 8 semanas del tercero al quinto. Hay estudios que demuestran que aumentar el intervalo a 12 o 16 semanas es igualmente eficaz^{23,24}. En pacientes que precisan ITVH durante un tiempo indefinido, más allá de los 5 años, los intervalos se espacian a una dosis cada 12 semanas³.

Mecanismos inmunológicos de protección y tolerancia en itvh

El tratamiento con ITVH puede revertir la hipersensibilidad al veneno y ocasionar el reconocimiento del mismo sin menoscabo de la salud, pero modificando la memoria inmunológica a nivel de células B y T. La exposición repetida a dosis bajas de un alérgeno ocasiona una diferenciación o activación de las células T naive hacia células Th1 y una respuesta de células T reguladoras (Tregs). Esto modifica la respuesta de células B, ocasionando un aumento de AC IgG₄²⁵.

Durante la tolerancia adquirida al alérgeno se observan varios mecanismos. Durante la fase de inicio de ITVH o aumento de dosis se observa una protección a corto plazo no

específica, mientras que en la fase de mantenimiento se inducen los mecanismos de tolerancia específica a largo plazo.

1. Mecanismos de protección a corto plazo

Aunque se necesiten 3-5 años de ITVH para conseguir una protección mantenida, se ha objetivado una protección tras alcanzar la dosis de mantenimiento, durante los primeros días de ITVH. Es la protección a corto plazo²⁵. En un estudio con veneno de abeja se objetiva una protección del 89% mediante prueba de repicadura a la semana de alcanzar la dosis de mantenimiento²⁶.

Hay varios cambios que se evidencian de forma temprana y que no son específicos del veneno²⁵:

- Aumento de la expresión del receptor 2 de la histamina (HR2) en las primeras 6 horas de la fase de inicio. Al ser un receptor asociado a la respuesta inmune tolerogénica puede contribuir a silenciar a las células efectoras, ya que se objetiva una desensibilización de mastocitos y basófilos, con disminución de la degranulación, menor activación y disminución de la producción de IL-4 e IL-13. Esta reducción progresiva de IL-4 es evidente a las 24 h de iniciada la ITVH, con lo que disminuye la respuesta Th2. A la vez hay disminución de la expresión de FcεRI en basófilos. Esta disminución del recuento de basófilos durante la fase de inicio, se normaliza en la fase de mantenimiento.
- Uno de los mecanismos tolerogénicos más precoces, detectado unas horas después de la primera inyección del alérgeno, es el aumento de la degradación de triptófano por células T, que se relaciona directamente con supresión de las respuestas de células T, mediante la expresión de los receptores inhibidores de las células presentadoras de Ag (APCs) (Ig-like transcript 3 (ILT3) y 4 (ILT4)) y el aumento de niveles de IL-10. El aumento de los niveles de IL-10 que aparece al tercer día de la fase de inicio de ITVH hace que en el día 28 de tratamiento se evidencie una desensibilización en las células T alérgeno específicas asociada a los efectos supresores directos de la IL-10. El aumento de estos marcadores de superficie tolerogénicos afecta negativamente la activación de las APCs. Como consecuencia, al tercer día de la fase de inicio se produce una apoptosis de monocitos. Los monocitos se diferencian en macrófagos y en células dendríticas (DC) APCs y así inductoras de activación de células T. Por ello se suprime la activación de células T.
- La ITVH induce aumento de neutrófilos e IL-8 tras 2 días²⁸.

2. Mecanismos de protección a largo plazo

Está establecido un periodo de ITVH de 5 años para conseguir una protección a largo plazo, aunque en algunos pacientes 3 años podrían ser suficientes. La recaída tras 1-2 años de ITVH es del 22-27%³. Hay cambios inmunológicos objetivados, aunque hoy por hoy no hay ningún biomarcador que monitorice la eficacia clínica de la ITVH. Se ha evidenciado²⁵:



- Disminución en la infiltración tisular y en la liberación de mastocitos y basófilos. La tolerancia a la repicadura se asocia con una disminución de la reactividad de basófilos y de su umbral de activación medido por la expresión en CD63 en citometría de flujo. Lo AC IgG suprimen la actividad del FcεRI en basófilos en relación con los receptores de baja afinidad de la IgG (FcγRIIIa y FcγRIIb). El número de basófilos expresando estos receptores de baja afinidad aumenta de forma significativa tras un año de ITVH. Tras la estimulación con alérgeno los niveles intracelulares de DAO en basófilos decrecen de forma paralela a la liberación de histamina intracelular. Esta reducción se ha observado en los pacientes tratados con IT de *Vesputa*, lo que es importante para aumentar el umbral de veneno para inducir reacciones alérgicas en pacientes con ITVH. También hay una reducción en la producción y liberación de mediadores sintetizados de *novo* en basófilos sanguíneos como el leucotrieno C4 en pacientes con ITVH²⁷. La menor presencia de mastocitos en tejidos se correlaciona con un descenso continuado de los niveles de triptasa sérica durante la ITVH.
- Aumento de las células reguladoras²⁵:
 - Las Tregs periféricas: células CD4+ que expresan niveles altos de CD25 y FOXP3, tanto en cifras absolutas como en proporción. Los pacientes alérgicos muestran al diagnóstico un número bajo de células T CD4+ CD25+ y CD4+ CD25+ FOXP3+, que se normalizan a los 6 meses de la ITVH, alcanzando valores similares a los individuos no alérgicos. FOXP3 aumenta de forma significativa tras un año de ITVH. FOXP3 es vital en la regulación negativa de la inflamación mediada inmunológicamente.
 - Aumento de las células B reguladoras (Bregs) alérgeno específicas CD73- CD25+ CD71+ que segregan IL-10, con capacidad de suprimir la proliferación de células T Ag-específicas CD4+. Las células B capaces de producir IgG₄ aumentan de 2 a 5 veces tras 3-4 meses de ITVH. Bregs inhiben las respuestas de las células T efectoras, inducen la diferenciación de Tregs, inhiben la maduración de DC y promueven la producción de IgG₄. Estas células Breg alérgeno específicas secretoras de IL-10 han sido objetivadas también en apicultores tolerantes.
 - También hay natural *killer* reguladoras (NKreg) secretoras de IL-10 que suprimen la proliferación de células T ante el estímulo alérgico y que pueden tener su importancia en la inducción de tolerancia²⁷.
- Anticuerpos: aumento de los AC bloqueantes alérgeno-específicos IgA, IgG₁ e IgG₄. Estos AC compiten con la IgE por los receptores, bloqueando su acción. La IgG₄ además detiene la producción de IgE específica (IgEe) por células memoria al bloquear los receptores de baja afinidad de la IgE en las células B (FcγRIIb). A los 4 años sus niveles disminuyen, lo que sugiere un mecanismo de tolerancia a largo plazo independiente de la IgG₄²⁵. En apicultores no alérgicos las concentraciones de IgG₄ específica son mil veces mayores que las de IgEe. Las concentraciones de IgG₄ se correlacionan con el número de picaduras anuales y el tiempo de apicultura²⁷. La IgG₄ promueve el cambio de macrófagos M2a en macrófagos M2b-like supresores, capaces de producir IL-10.

Hay un incremento inicial de IgEe transitorio que no se correlaciona con aumento de síntomas clínicos. Con la ITVH prolongada hay disminución de los niveles de IgEe que, a diferencia de la ITA, en himenópteros parece jugar un papel en la tolerancia a largo plazo de la ITVH. A pesar de que con el tiempo los niveles de IgG se reducen, su impacto en la activación de basófilos parece persistir.

- Citoquinas IL-10 y TGF- β . IL-10 es producida por Tregs, Bregs, NKregs, macrófagos M2b-like supresores y está implicada en la supresión de la respuesta efectora alérgeno-específica de la célula T durante la ITVH. TGF- β bloquea la expresión de Fc ϵ RI en mastocitos, convierte las células T CD4+CD25- naive en Tregs funcionales. TGF- β Tiene un papel más importante en la IT oral que en la subcutánea.
- Los niveles bajos de IL-4 en la fase de inicio aumentan a los 3 meses de ITVH.
- Todo esto conlleva un cambio de respuesta de Th2 hacia Th1²⁵.

No hay conocimiento de los mecanismos de tolerancia a largo plazo, tras suspender la IT.

Mecanismos de inmunotolerancia en apicultores

En apicultores las células Tregs productoras de IL-10 inhiben la proliferación de células T efectoras específicas de Fosfolipasa A2 poco después del comienzo de la estación activa. Este efecto supresor puede revertirse bloqueando los receptores de CTLA-4, PD-1, e IL-10. Adicionalmente la estimulación de la enzima indoleamina 2,3-dioxygenasa en DC por efecto de las Tregs origina la transformación de DC inflamatorias en DC reguladoras. De forma similar durante la ITVH las respuestas de citoquinas frente al Api m 1 se suprimen de forma significativa al final de la primera semana de tratamiento²⁷.

En un estudio comparando pacientes alérgicos al veneno de abeja con apicultores tolerantes que reciben >50 picaduras/año y con controles sanos, los autores encuentran niveles mayores de IgG₄ ($p < 0,001$) e IL-10 ($p < 0,001$) en los apicultores tolerantes, así como aumento de las poblaciones de células Tregs CTLA-4 ($p = 0,001$) Tregs Helios ($p < 0,003$) y una reducción en las poblaciones Th1, Th2 y Th17. En los apicultores tolerantes encuentran un perfil tolerogénico marcado por la actividad Tregs. Esa actividad conduciría a la expansión de células Tregs Helios inducibles a nivel periférico. Estas células desempeñan una función importante en las células reguladoras CD4+CD25+FoxP3+. Se ha demostrado que Helios aumenta la expresión de FoxP3 al unirse al promotor de FoxP3. Los autores preconizan que las células Tregs Helios podrían ser un biomarcador para monitorizar la tolerancia²⁹.

Papel del veneno de himenópteros

Además de los cambios inmunológicos comentados, hay que tener en cuenta que el veneno de himenópteros es una fuente abundante de toxinas con complejas funciones biológicas que pueden jugar a su vez un papel inmunomodulador. Los componentes del veneno de himenópteros tienen un amplio rango de dianas farmacológicas y han sido estudiados en diversas patologías³⁰.



Dentro del veneno de vespídeos caben destacar los **mastoparanos**. Tienen acción citolítica y antimicrobiana, con actividad citotóxica y antiproliferativa altamente selectiva frente a diversos tumores como los prostáticos, de vejiga y frente a leucemia.

Dentro del veneno de abeja destacan varios péptidos como la **apamina**, que tiene efecto neuroprotector mejorando la memoria y el aprendizaje, se usa actualmente en el diagnóstico precoz del Alzheimer, o la **adolapina**, con efecto antinociceptivo, antiinflamatorio y antipirético. Puede inhibir las prostaglandinas inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa. Actúa como un AINE.

Mención especial merece la **melitina**. Supone casi el 50% del peso en seco del veneno. Tiene actividad hemolizante, actividad antifúngica y antibacteriana frente a Gram+ y Gram-. Puede formar poros en insertarse en la membrana celular. También puede inducir cambios neurales y en el flujo de las señales nociceptivas al activar a las células nociceptivas.

La melitina tiene efectos citotóxicos y de apoptosis por lo que se ha estudiado en el tratamiento de diferentes tipos de tumores. Tiene la propiedad de inhibir la proliferación de células cancerosas, destruir su ciclo vital, inducir apoptosis, evitar la aparición de metástasis inhibiendo la motilidad y migración celular³¹. La melitina puede jugar un papel en el tratamiento de la inmunoterapia anticáncer. Se ha usado una proteína de fusión mutante IL2-melitina en modelos murinos frente a múltiples tipos de tumores. La melitina a concentración baja estimula la proliferación de timocitos. La elaboración de α -melitina-nanopartículas mantiene la propiedad de la melitina de inducir necrosis de las células tumorales, produciendo así la liberación de antígenos tumorales. Estas nanopartículas se acumulan en los nódulos linfáticos activando las APCs, aumentando las respuestas efectoras de células T e inhibiendo el crecimiento local y a distancia en un modelo murino de melanoma³².

La melitina también se ha usado como adyuvante de vacunas: 4 μ g de melitina dada con el toxoide tetánico producen un aumento marcado en los títulos de AC frente a los que reciben el antígeno de forma aislada³¹.

Fracasos de la ITVH

La falta de eficacia, entendida como la aparición de reacciones sistémicas (SR) tras una picadura mientras el paciente se encuentra en fase de mantenimiento o tras finalizar el tratamiento, se estima entre el 10 y el 15 % de todos los pacientes tratados^{33,34}. Las causas pueden ser variadas: insecto incorrecto, IT mal administrada, sensibilización de antígenos no presentes en el veneno, ...

Hay una serie de factores que se asocian con menor protección. Con la dosis estándar, los pacientes con alergia a veneno de abeja (AVA) tienen mayor riesgo de sufrir una reacción sistémica con una repicadura (11%) que los alérgicos a veneno de vespídeos (4%), durante la ITVH. El incremento de la dosis de mantenimiento en estos pacientes ha demostrado una protección completa, durante el tratamiento, en la mayoría de los casos⁸. La AVA también se ha asociado con mayor tasa de recaídas tras finalizar la inmunoterapia¹⁸. Los motivos de esta diferencia podrían ser varios. La avispa, en una picadura, inyecta

unos 3-5 μg de veneno frente a los 50 μg de la abeja. Entonces con la misma dosis de mantenimiento, los pacientes con AVA reciben proporcionalmente mucha menos cantidad. Por otro lado, se ha demostrado que en algunos extractos comerciales empleados en la ITVH no aparecen o están infrarrepresentados determinados alérgenos como Api m3, Api m4 y Api m10, lo que explicaría una protección incompleta, especialmente para el 5% de pacientes que están sensibilizados exclusivamente a estos componentes³⁵. Frick y cols encuentran que los pacientes en los que la IgEe frente a Api m 10 supone más del 50% del total de IgEe frente al veneno completo de abeja presentan un riesgo de reacción con repicadura (OR 8,44 $p=0,013$)³⁶. Todos los pacientes cuya IgEe frente a Api m10 excedía el 60% de la IgEe frente a veneno completo tuvieron reacción sistémica con repicadura. Preconizan que la sensibilización a Api m 10 es riesgo de fracaso terapéutico.

En un estudio realizado en nuestro hospital en 51 pacientes, 38 de ellos (74,5%) estaban sensibilizados a Api m10, siendo el valor de IgEe frente a Api m10 en la mitad de ellos (37% de la muestra total) más del 50% del valor de IgEe frente al veneno completo. Se repicaron 15 de los 19 pacientes una vez alcanzada la dosis de mantenimiento sin que ninguno presentase síntomas sistémicos con la repicadura, a pesar de recibir la dosis estándar de 100 μg (EAACI Congress 2020).

El 50% de los pacientes que tienen SR con repicadura tras suspender la ITVH también tuvieron SR mientras se vacunaban (bien con la ITVH o con picaduras espontáneas)³⁷.

Además de estos factores influye el grado de exposición a picaduras y la presencia de síndromes de activación mastocitaria clonal^{18,38}. Por ello hay que plantearse una ITVH indefinida en pacientes que han presentado reacciones graves con picadura pre IT y tienen alta exposición a insectos, en aquellos que presenten reacciones sistémicas con la ITVH o con repicaduras durante la misma y en los pacientes con síndromes de activación mastocitaria clonal⁹.



Bibliografía

1. Bilò BM, Bonifazi F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008;8(4):330-337. doi:10.1097/ACI.0b013e32830638c5
2. Worm M, Moneret-Vautrin A, Scherer K, Lang R, Fernandez-Rivas M, Cardona V, et al. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). *Allergy*. 2014;69(10):1397-1404. doi:10.1111/all.12475
3. Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2018;73(4):744-764. doi:10.1111/all.13262
4. Loveless MH. Immunization in wasp-sting allergy through venom-repositories and periodic insect stings. *J Immunol*. 1962;89(2):204-215.
5. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Benton AW, Amodio FJ, Lichtenstein LM. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med*. 1978;299(4):157-161. doi:10.1056/NEJM197807272990401
6. Incorvaia C, Ridolo E, Mauro M, Pucciarini F, Heffler E, Canonica GW. Venom Immunotherapy and Aeroallergen Immunotherapy: How Do Their Outcomes Differ? *Front Allergy*. 2022;3(February):3-7. doi:10.3389/falgy.2022.854080
7. Severino MG, Cortellini G, Bonadonna P, Francescato E, Panzini I, Macchia D, et al. Sublingual immunotherapy for large local reactions caused by honeybee sting: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(1):44-48. doi:10.1016/j.jaci.2008.03.031
8. Ruëff 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(6):1027-1032. doi:10.1067/mai.2001.119154
9. Liu Z, Lu H, Feng X, Hu L, Wang J, Yu H. Predictive methods for efficacy of house dust mite subcutaneous immunotherapy in allergic rhinitis patients: a prospective study in a Chinese population. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;10(3):314-319. doi:10.1002/alr.22508
10. Gao Y, Lin X, Ma J, Wei X, Wang Q, Wang M. Enhanced Efficacy of Dust Mite Sublingual Immunotherapy in Low-Response Allergic Rhinitis Patients after Dose Increment at 6 Months: A Prospective Study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020;181(4):311-319. doi:10.1159/000505746
11. Reid MJ, Lockey RF, Turkeltaub PC, Platts-Mills TA. Survey of fatalities from skin testing and immunotherapy 1985-1989. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92(1 Pt 1):6-15. doi:10.1016/0091-6749(93)90030-j
12. Frew AJ. Injection immunotherapy. British Society for Allergy and Clinical Immunology Working Party. *BMJ*. 1993;307(6909):919-923. doi:10.1136/bmj.307.6909.919
13. Pucci S, Antonicelli L, Bilò MB, Garritani MS, Bonifazi F. Shortness of interval between two stings as risk factor for developing Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 1994;49(10):894-896. doi:10.1111/j.1398-9995.1994.tb00796.x
14. Kelly D, Golden DBK, Hamilton RG, Craig TJ, D. Kelly, D. B. K. Golden RGHJJC. Venom Immunotherapy (VIT) Reduces Large Local Reactions (LLR) to Insect Stings. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(1):Abstracts S79. doi:10.1016/j.jaci.2010.12.880
15. Oude Elberink JNG, De Monchy JGR, Van Der Heide S, Guyatt GH, Dubois AEJ. Venom immunotherapy improves health-related quality of life in patients allergic to yellow jacket venom. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(1):174-182. doi:10.1067/mai.2002.125827

16. Oude Elberink JNG, van der Heide S, Guyatt GH, Dubois AEJ. Immunotherapy improves health-related quality of life of adult patients with dermal reactions following yellow jacket stings. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(6):883-889. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03230.x
17. Vidal C, Armisén M, Monsalve R, González-Vidal T, Lojo S, López-Freire S, et al. Anaphylaxis to *Vespa velutina nigrithorax*: Pattern of Sensitization for an Emerging Problem in Western Countries. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021;31(3):228-235. doi:10.18176/jiaci.0474
18. Alfaya Arias T, Soriano Gómis V, Soto Mera T, Vega Castro A, Vega Gutiérrez J, Alonso Llamazares A, et al. Key Issues in Hymenoptera Venom Allergy: An Update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(1):19-31. doi:10.18176/jiaci.0123
19. Macchia D, Cortellini G, Mauro M, Meucci E, Quercia O, Manfredi M, et al. *Vespa crabro* immunotherapy versus *Vespula*-venom immunotherapy in *Vespa crabro* allergy: A comparison study in field re-stings. *World Allergy Organ J*. 2018;11(1):3. doi:10.1186/s40413-018-0183-6
20. Stern A, Wüthrich B, Müllner G. Successful treatment of occupational allergy to bumblebee venom after failure with honeybee venom extract. *Allergy*. 2000;55(1):88-91. doi:10.1034/j.1398-9995.2000.00202.x
21. Stapel SO, Waanders-Lijster de Raadt J, van Toorenenbergen AW, de Groot H. Allergy to bumblebee venom. II. IgE cross-reactivity between bumblebee and honeybee venom. *Allergy*. 1998;53(8):769-777. doi:10.1111/j.1398-9995.1998.tb03973.x
22. Gutierrez Fernandez D, Moreno-Ancillo A, Fernandez Melendez S, Dominguez-Noche C, Galvez Ruiz P, Alfaya Arias T, et al. Insect Venom Immunotherapy: Analysis of the Safety and Tolerance of 3 Buildup Protocols Frequently Used in Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(6):366-373. doi:10.18176/jiaci.0073
23. 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;20(1):63-68.
24. 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(1):51-54. doi:10.1016/j.anai.2012.09.014
25. Demšar Luzar A, Korošec P, Košnik M, Zidarn M, Rijavec M. Hymenoptera venom immunotherapy: Immune mechanisms of induced protection and tolerance. *Cells*. 2021;10(7). doi:10.3390/cells10071575
26. Goldberg A, Confino-Cohen R. Bee venom immunotherapy - how early is it effective? *Allergy*. 2010;65(3):391-395. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02198.x
27. Sahiner UM, Durham SR. Hymenoptera venom allergy: How does venom immunotherapy prevent anaphylaxis from bee and wasp stings? *Front Immunol*. 2019;10(AUG). doi:10.3389/fimmu.2019.01959
28. Pałgan K, bikowska-Gotz M, Zacniewski R, Bartuzi Z. The effect of hymenoptera venom immunotherapy on neutrophils, interleukin 8 (IL-8) and interleukin 17 (IL-17). *Int J Occup Med Environ Health*. 2020;33(6):811-817. doi:10.13075/ijomeh.1896.01435
29. Ruiz-Leon B, Navas A, Serrano P, Espinazo M, Guler I, Alonso C, et al. Helios-Negative Regulatory T Cells as a Key Factor of Immune Tolerance in Nonallergic Beekeepers. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2022;32(6):451-459. doi:10.18176/jiaci.0722
30. dos Santos-Pinto JRA, Perez-Riverol A, Lasa AM, Palma MS. Diversity of peptidic and proteinaceous toxins from social Hymenoptera venoms. *Toxicon*. 2018;148:172-196. doi:10.1016/j.toxicon.2018.04.029
31. Guha S, Ferrie RP, Ghimire J, Ventura CR, Wu E, Sun L, et al. Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. *Biochem Pharmacol*. 2021;193. doi:10.1016/j.bcp.2021.114769
32. Yu X, Dai Y, Zhao Y, Qi S, Liu L, Lu L, et al. Melittin-lipid nanoparticles target to lymph nodes and elicit a systemic anti-tumor immune response. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-14906-9
33. Golden DBK. Long-term outcome after venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(4):337-341. doi:10.1097/ACI.0b013e32833bc0ba
34. Fiedler C, Mieke U, Treudler R, Kiess W, Prenzel F. Long-Term Follow-Up of Children after Venom Immunotherapy: Low Adherence to Anaphylaxis Guidelines. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;172(3):167-172. doi:10.1159/000458707



35. Blank S, Etzold S, Darsow U, Schiener M, Eberlein B, Russkamp D, et al. Component-resolved evaluation of the content of major allergens in therapeutic extracts for specific immunotherapy of honeybee venom allergy. *Hum Vaccines Immunother.* 2017;13(10):2482-2489. doi:10.1080/21645515.2017.1323603
36. Frick M, Fischer J, Helbling A, Ruëff F, Wieczorek D, Ollert M, et al. Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(6):1663-1671. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.024
37. Lichtenstein M, Golden DBK. Survey venom of patients after immunotherapy discontinuing.
38. Bonadonna P, Zanotti R, Pagani M, Bonifacio M, Scaffidi L, Olivieri E, et al. Anaphylactic Reactions After Discontinuation of Hymenoptera Venom Immunotherapy: A Clonal Mast Cell Disorder Should Be Suspected. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(4):1368-1372. doi:10.1016/j.jaip.2017.11.025