

## Diagnostica della allergia a veleno di Insetti

**M. Beatrice Bilò, Feliciano Brianzoni, Barbara Cinti, Grazia Napoli, Floriano Bonifazi**  
U.O. Allergologia - Dipartimento di Malattie Respiratorie ed Allergiche- Ospedali Riuniti di Ancona

### ABSTRACT

#### Diagnosis of Hymenoptera venom sensitivity

The purpose of diagnostics is to classify a sting reaction, identify the underlying pathogenetic mechanism, and to identify the offending insect. Diagnostic tests should be done in all patients with a history of a systemic sting reaction. Testing comprises skin tests with Hymenoptera venoms and analysis of the serum for Hymenoptera venom-specific IgE. Sensitivity of skin tests is higher than that of venom specific IgE serum tests. If both skin tests and specific IgE stay negative additional in-vitro tests should be carried out. Serum tryptase should be analysed in patients with a history of a severe sting reaction. Recombinant venom allergens will improve the diagnosis of venom allergy in a near future.

### RIASSUNTO

Scopo della diagnosi è quello di classificare il tipo di reazione, identificare il meccanismo patogenetico e l'imenottero pungitore. I tests cutanei rappresentano la metodica diagnostica più sensibile; devono essere effettuati in ambiente idoneo e da personale specializzato. Per la ricerca di IgE specifiche su siero, è indispensabile scegliere i tests più sensibili. Solo nel caso di ripetuta negatività sia dei test cutanei che del RAST, si può ricorrere ad altre metodiche in vitro, sebbene la loro validità non sia ancora stata confermata. Nei pazienti con anamnesi di reazione grave, è consigliabile misurare il livello di triptasi sierica. Alcuni recenti lavori indicano nell'utilizzo di allergeni ricombinanti la possibilità di migliorare la diagnostica in un prossimo futuro.

### INTRODUZIONE

Sebbene sulla superficie terrestre siano presenti dai tre ai sei milioni di specie di insetti, le reazioni allergiche da punture di insetti non imenotteri sono poco frequenti e generalmente meno pericolose (1,2); pertanto, anche in considerazione della assenza di estratti standardizzati a scopo diagnostico e terapeutico, questo capitolo tratterà unicamente di allergia a veleno di Imenotteri.

Per ciò che attiene la loro tassonomia, la maggior parte degli autori segue la classificazione di Chinery (3), alla quale negli ultimi anni sono state apportate alcune piccole modifiche (Tabella 1).

Dal punto di vista allergologico, il ruolo clinico più importante è svolto dagli Aculeati *sociali* rappresentati da vespe, api e formiche.

La famiglia *Apidae* comprende un ampio numero di insetti che si differenziano sia per aspetto che per abitudini (4,5); i più importanti dal punto di vista allergologico sono rappresentati dall'*Apis Mellifera* (Ape) e dal *Bombus* (Bombo).

La famiglia *Vespidae* comprende le sottofamiglie *Vespiniae* e *Polistinae*, che si differenziano nel segmento che unisce il torace all'addome, di aspetto troncato nelle *Vespiniae*, di forma arrotondata nelle *Polistinae* (4,5).

Le *Vespiniae* comprendono i generi *Vespula*, *Dolichovespula* e *Vespa*. Nell'ambito della *Vespula* (Giallone), le specie più importanti in Europa sono *V. germanica*, *V. Vulgaris* e *V. Rufa*. Il genere *Vespula* si distingue da quello *Vespa* (Calabrone) per le dimensioni inferiori e da quello

*Dolichovespula* per la minore distanza tra gli occhi e per la mascella superiore (4,5).

*Dolichovespula media*, *D. Saxonica* e *D. Sylvestris* rappresentano le specie prevalenti in Europa.

Nell'ambito del genere *Vespa*, *Vespa Crabro* è quella predominante in Europa.

Le *Polistinae* si trovano in tutto il mondo. In Europa *Polistes Gallicus*, *P. Nimpha* e soprattutto *P. dominulus* sono ampiamente rappresentati, in particolare nelle aree Mediterranee (5,6).

### MANIFESTAZIONI CLINICHE

Le reazioni a punture di imenotteri vengono generalmente classificate in reazioni locali normali, reazioni locali estese (7-10), reazioni sistemiche tossiche, reazioni sistemiche di tipo anafilattico e reazioni atipiche (4).

Secondo una recente revisione della nomenclatura allergologica, da un punto di vista patogenetico si può distinguere l'ipersensibilità verso i veleni mediata da meccanismi immunologici (allergia IgE-mediata e non-IgE-mediata) da quella mediata da meccanismi non immunologici (11).

Le reazioni locali e quelle atipiche possono riconoscere una eziopatogenesi tossica o immunologica.

Le reazioni locali estese vengono definite tali in presenza di eritema ed edema in sede di puntura con diametro superiore a 8-10 cm e durata di almeno 24-48 ore, potendo a volte estendersi ad una intera regione anatomica. Sono state segnalate anche reazioni cutanee ritardate,

con meccanismo patogenetico di tipo cellulo-mediato.

Le reazioni anafilattiche sistemiche presentano generalmente un meccanismo patogenetico IgE- mediato, anche se sono stati ipotizzati meccanismi alternativi che implicano la presenza di anticorpi IgG sensibilizzanti o la formazione di immunocomplessi IgG-allergene del veleno, in grado di attivare il complemento.

In alcuni casi di anamnesi di reazione anafilattica sia il dosaggio delle IgE specifiche che i tests cutanei hanno esito negativo; ciò è particolarmente frequente in pazienti affetti da mastocitosi, in cui è ipotizzabile un meccanismo tossico, di rilascio aspecifico dei mediatori dai mastociti (12-14), sebbene nella maggior parte dei pazienti affetti da mastocitosi sia possibile dimostrare una sensibilizzazione allergica (15).

Sono state proposte molte classificazioni del grado di severità delle reazioni sistemiche (16,17), tra le quali una delle più utilizzate è quella di Mueller (Tabella 2).

Generalmente i sintomi compaiono poco dopo la puntura, da 5 minuti ad un'ora (4), anche se occasionalmente possono manifestarsi a distanza di ore o anche giorni dopo la puntura (18).

L'anafilassi può essere bifasica, con un rapido esordio

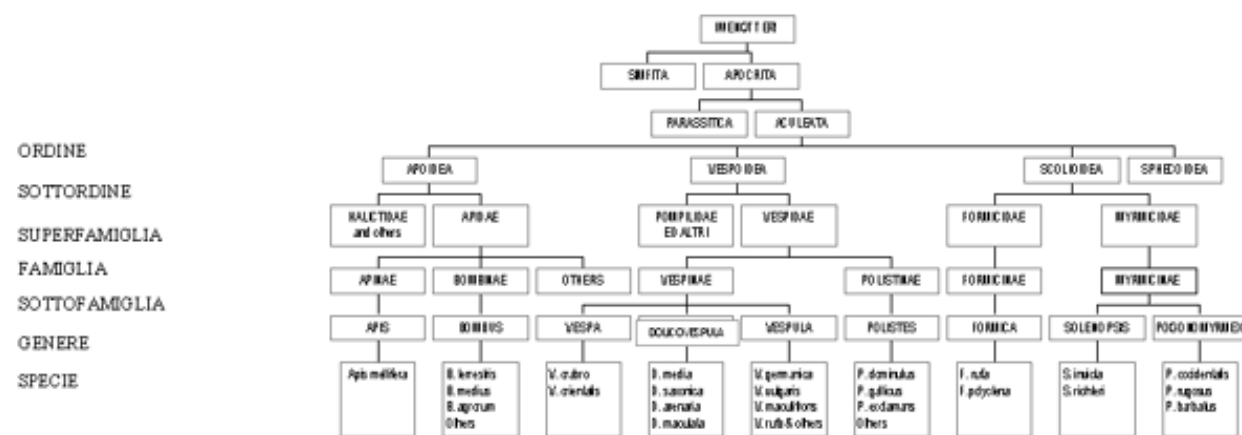
dei sintomi, una apparente risoluzione e una successiva ricomparsa dopo 4-24 ore.

Le reazioni più gravi possono determinare danni permanenti, come ischemia cerebrale (19) o infarto del miocardio (4) o addirittura essere fatali: autopsie effettuate su pazienti deceduti a seguito di puntura di imenottero mostrano una co-morbilità cardiopolmonare nel 50% dei casi o più (20,21).

Una reazione anafilattica da puntura di imenottero costituisce un evento traumatico per il paziente e per i familiari. Pertanto i pazienti tendono a sviluppare una sindrome ansiosa che li spinge ad adottare una serie di comportamenti di evitamento tali da compromettere in maniera significativa la qualità della vita, con condizionamento del carattere, della vita sociale e a volte dell'attività lavorativa.

Recentemente sono stati costruiti e validati questionari specifici (22,23), con i quali è stato possibile confermare che l'allergia al veleno degli imenotteri, indipendentemente dalla gravità della reazione, è in grado di incidere pesantemente sulla qualità della vita dei soggetti che ne soffrono (22,23).

**Tabella 1**  
Tassonomia degli Imenotteri



**Tabella 2**  
Classificazione delle reazioni sistemiche da punture di imenotteri secondo H. L. Mueller (16)

Grado I	Orticaria generalizzata, prurito, malessere, ansia
Grado II	Ciascuno dei precedenti, con due o più dei seguenti: angioedema, costrizione toracica, nausea, vomito, diarrea, dolore addominale, vertigini
Grado III	Ciascuno dei precedenti, con due o più dei seguenti: dispnea, sibilo, stridore, disartria, raucedine, astenia, confusione, sensazione di morte imminente
Grado IV	Ciascuno dei precedenti, con due o più dei seguenti: calo pressorio, collasso, perdita di coscienza, incontinenza, cianosi

**EPIDEMIOLOGIA, STORIA NATURALE E FATTORI DI RISCHIO**

La prevalenza di sensibilizzazione asintomatica al veleno di imenotteri è piuttosto elevata nella popolazione generale: IgE specifiche sono state riscontrate nel 16%-24% (24-26) della popolazione, mentre test cutanei positivi nel 15%-29% degli adulti (27,28).

Molti studi epidemiologici indicano che la frequenza di sensibilizzazione è legata al grado di esposizione alle punture (4,28-31), all'intervallo di tempo tra le punture (4,28,32,33), all'atopia (26) e al tipo di insetto, in quanto le api sembrano indurre sensibilizzazione con maggiore frequenza rispetto ai vespidi (25,26).

La prevalenza delle reazioni locali estese varia tra il

2,4%, il 4,6%, il 18,6%, fino al 26,4% (27,28,34); nei bambini è del 19% (35) e negli apicoltori arriva fino al 38% (33,36).

Gli studi epidemiologici indicano una frequenza di reazione sistemica anafilattica (basata su dati anamnestici) tra lo 0,3% ed il 7,5 (4,25,26,28,29,30,34,35), negli apicoltori tra il 14% ed il 43% (32,33,36).

Nei bambini la prevalenza di reazioni sistemiche che emerge da studi ormai datati, che tuttavia includono più di 10.000 soggetti, si posiziona su valori dello 0,15-3,9% (35,37-39).

L'incidenza di mortalità da puntura di insetto è bassa: da 0,03 a 0,48 decessi per 1.000.000 abitanti/anno (4,20,25,29,40,41). In Italia gli unici dati disponibili sono quelli ISTAT, che parlano di 13 morti in un periodo di osservazione di 10 anni (1980-90); anche per i dati più recenti, disponibili fino al 1997, si mantiene lo stesso tasso di mortalità.

Tuttavia il numero reale di decessi potrebbe essere sottostimato, dal momento che è stata riportata una frequenza di IgE specifiche per i veleni nel 23% dei sieri post-mortem di pazienti deceduti per morte improvvisa e senza causa apparente tra la fine di maggio e l'inizio di novembre (42).

Dal 40% all'85% (20,29) di soggetti con reazioni fatali da puntura di Imenottero ha una anamnesi negativa per precedenti reazioni anafilattiche.

Nell'ambito dei fattori di rischio, è importante distinguere i fattori che condizionano la ripuntura da quelli che condizionano la gravità della reazione. Il luogo, il clima, la temperatura, le abitudini degli insetti e l'esposizione individuale (attività lavorativa o hobbistica) sono fattori che determinano la probabilità di essere punti e il tipo di insetto pungitore.

I fattori di rischio associati alla comparsa di una reazione sistemica anafilattica e alla severità della stessa finora identificati sono molteplici. Tuttavia non si conosce ancora il motivo per cui alcuni pazienti sensibilizzati verso i veleni, quando ripunti, non sviluppino alcuna reazione, mentre altri manifestino sintomi di varia gravità o anche fatali.

Il 5- 15% (4,8) dei soggetti allergici con anamnesi di reazione locale estesa sviluppa una reazione sistemica ad una successiva puntura. In quelli con reazione sistemica lieve il rischio di reazione sistemica successiva è del 18% tra i bambini (43,44) e del 14-79% tra gli adulti (45,46).

Nella popolazione adulta, maggiore è la gravità della prima reazione sistemica, maggiore è il rischio di una reazione sistemica severa ad una puntura successiva (46).

Negli adulti con anamnesi negativa per precedente reazione anafilattica sistemica e test cutaneo positivo, da un unico studio pubblicato sull'argomento è emerso un rischio di reazione sistemica ad una puntura successiva del 17% rispetto allo 0% dei soggetti con test negativo (47).

Un breve intervallo tra una puntura precedentemente tollerata e quella che induce la reazione allergica sembra costituire un fattore di rischio per lo sviluppo di reazione sistemica (48).

Studi a lungo termine su soggetti allergici con precedente reazione anafilattica hanno mostrato che il rischio di sviluppare la reazione ad una puntura successiva si riduce con il tempo, senza tuttavia scomparire completamente anche a distanza di dieci anni (47).

D'altronde, un altissimo numero di punture sembra indurre la tolleranza, come pare verificarsi negli apicoltori (32).

I pazienti più anziani sviluppano più spesso reazioni particolarmente severe (49,50); la mortalità è maggiore rispetto ai bambini o ai giovani adulti (4). In effetti ulteriori fattori di rischio per gravità della reazione sono stati identificati nelle malattie cardio-vascolari (20,51) e nel trattamento con beta-bloccanti (51). I beta-bloccanti non sembrano incrementare di per sé il rischio di reazione sistemica, ma nel caso in cui questa si manifesti, è da temere una evoluzione peggiore.

I pazienti allergici al veleno di api hanno un rischio maggiore di reazione sistemica alla ripuntura rispetto a quelli allergici ai vespidi (52-55). Un studio più recente condotto nell'area mediterranea ha evidenziato che il rischio relativo di sviluppare reazioni sistemiche gravi è tre volte superiore se si viene punti dal calabrone rispetto alle api o alle vespe (56).

Pazienti affetti da mastocitosi sistemica o orticaria pigmentosa possono manifestare reazioni particolarmente gravi, anche fatali (12,14,57-59). Peraltro in pazienti allergici al veleno di imenotteri elevati livelli di triptasi sierica, indipendentemente dalla presenza di mastocitosi, si associano a reazioni anafilattiche molto gravi (60-62).

## ALLERGENI DEI VELENI E CROSS-REATTIVITÀ

Per una corretta diagnosi e terapia della allergia al veleno di imenotteri è essenziale conoscere la composizione dei veleni.

La maggior parte degli allergeni maggiori è stata clonata e sequenziata; molti di essi sono stati prodotti in forma ricombinante. Sono per lo più glicoproteine di 10-50 kDa, costituite da 100-400 residui aminoacidici (63). Altre componenti dei veleni sono più piccole, come la mellitina del veleno dell'ape e l'antigene Api m6, recentemente descritto, di p.m. 7,9 kDa.

La dose di veleno iniettata con una puntura varia da specie a specie ed anche nell'ambito della stessa specie: le api rilasciano una media di 50 µg (64) fino a 140 µg (65) di proteine di veleno per puntura; tuttavia il sacco velenifero ne può contenere più di 300 µg (66). Il bombo rilascia da 10 a 31 µg di veleno (64).

Al contrario i Vespidi, che possono pungere ripetutamente, iniettano generalmente meno veleno per singola puntura: la *Vespula* (giallone) rilascia da 1,7 a 3,1 µg di veleno, la *Dolichovespula* da 2,4 a 5 µg e il *Polistes* da 4,2 a 17 µg di proteine (64). Non si sa esattamente quanto sia il veleno iniettato con una puntura di calabrone Europeo: secondo alcuni Autori il peso secco del veleno contenuto in un sacco velenifero può arrivare anche a 260 µg (67).

Il veleno delle api contiene 5 allergeni di cui si conoscono le sequenze aminoacidiche: fosfolipasi A2 (Api m1),

ialuronidasi (Api m2), mellitina (Api m4), Api m6 e una fosfatasi acida (Api m3) (Tabella 3). L'allergene più importante è rappresentato dalla fosfolipasi A2, una glicoproteina composta da 134 residui aminoacidici, che svolge attività citotossica e citolitica (68).

La ialuronidasi è un altro degli allergeni maggiori del veleno dell'ape; essendo una proteasi, un enzima di circa 39 kDa, probabilmente rappresenta un allergene maggiore.

La mellitina, formata da 26 aminoacidi, è il maggiore costituente del veleno delle api (50% del peso secco), ma solamente il 28% dei pazienti possiede IgE specifiche dirette contro questo peptide (69).

Il veleno del bombo contiene la fosfolipasi A2 (Bom p1), la proteasi Bom p4, la ialuronidasi, la fosfatasi acida e molte altre proteine non dimostrate nel veleno delle api (70).

Gli allergeni maggiori del veleno dei vespidi sono rappresentati da: fosfolipasi A1 (Ves v1), ialuronidasi (Ves v2) e antigene 5 (Ves v5) (64,71,72) (Tabella 3).

L'antigene 5 rappresenta l'allergene maggiore del veleno di tutti i Vespidi ed è strutturalmente correlato con proteine di mammiferi, rettili, insetti, funghi e piante (73).

Sensibilizzazioni doppie o anche multiple possono essere causate da anticorpi cross-reattivi che riconoscono epitopi simili di differenti veleni o epitopi simili tra veleni e allergeni comuni (74).

La distinzione tra cross-reattività e vera doppia sensibilizzazione è importante per la scelta dei veleni da utilizzare per l'immunoterapia.

I dati a disposizione indicano che i veleni e gli allergeni maggiori di differenti api nel mondo sono molto simili e che la struttura dell'allergene maggiore fosfolipasi A2 ha una grandissima omologia (66,75,76). Al contrario, nell'ambito dei bombi, esiste una notevole variabilità allergenica (70). Esiste una cross-reattività immunologica tra i veleni di api e bombi; tuttavia in molti pazienti è possibile riscontrare una sensibilizzazione multipla (70,77,78).

I veleni dei Vespidi sono altamente cross-reattivi in quanto simili nella composizione e nella struttura dei singoli allergeni (79,80). Gli allergeni delle differenti specie di *Vespula* hanno una omologia del 95% (79,80), di conseguenza i differenti veleni cross-reagiscono (72,81). Esiste anche una importante cross-reazione tra i veleni di *Vespula*, *Vespa* e *Dolichovespula* (82,83).

La cross-reattività di *Vespula*, *Dolichovespula* e *Vespa* con il *Polistes* è generalmente minore rispetto a quella presente tra le *Vespinæ* (71,82,84-86).

La cross-reattività tra le specie Europee di *Polistes* (*P. Gallicus*, *P. Dominulus*) è molto alta, mentre quella tra specie Europee ed Americane è più debole (6,87).

Per ciò che attiene la cross-reattività tra i veleni di *Apidae* e *Vespidæ*, la ialuronidasi, che ha una sequenza identica per il 50% tra api e vespe (80) rappresenta la componente maggiormente cross-reattiva (88), tuttavia non si sa quale sia il significato clinico di questo dato.

Studi di RAST inibizione con veleni di api e vespe (prevalentemente giallone) hanno evidenziato diversi patterns di cross-reattività (89,90).

Un problema particolare nell'ambito della cross-reattività è costituito da IgE specifiche dirette contro epitopi

carboidrati (CCD), che possono causare positività dei tests (sia cutanei che in vitro), probabilmente prive di significato clinico (91).

## DIAGNOSI

### Anamnesi

L'anamnesi deve essere orientata verso la raccolta del maggior numero possibile di informazioni: insetto pungitore, caratteristiche del nido, orario della giornata in cui si è stati punti, punture multiple da parte dello stesso imenottero, assenza o presenza del pungiglione, numero delle punture, tempo intercorso tra puntura ed esordio della sintomatologia, tipologia della manifestazione clinica (secondo la classificazione di Mueller), attività del paziente, condizioni generali di salute, con particolare attenzione a quelle cardiovascolari in relazione sia alla possibile neces-

**Tabella 3**  
Allergeni dei veleni di Imenotteri

Veleni	Allergeni	Nome comune	MW KD	maggior/minore	
<b>Apis mellifera</b>	Api m 1	Fosfolipasi A2	16	maggior	
	Api m 2	Ialuronidasi	43	maggior	
	Api m 3	Fosfatasi acida	49	maggior ?	
	Api m 4	mellitina	2,9	minore	
	Api m 6		7,6	minore	
			Proteasi	39	maggior ?
<b>Bombus pennsylvanicus</b>	Bom p1	Fosfolipasi A2		maggior	
	Bom p4	Proteasi serica		maggior ?	
<b>Vespula vulgaris</b>	Ves v1	Fosfolipasi A1	35	maggior	
	<i>V. germanica</i> , <i>maculifrons</i> , <i>pennsylvanica</i> , <i>squamosa</i> ecc.	Ves v2 Antigene 5 Ves v5	Ialuronidasi 5 25	maggior maggior	
<b>Dolichovespula maculata</b>	Dol m 1	Fosfolipasi A1	35	maggior	
	<i>D. arenaria</i>	Dol m 2	Ialuronidasi	45	maggior
	<i>D. media</i> etc	Dol m 5	Antigene 5	25	maggior
<b>Polistes annularis</b>	Pol a 1	Fosfolipasi A1		maggior	
	<b>P. dominulus</b>	Pol a 2	Ialuronidasi		maggior
<b>P. dominulus gallicus, fuscatus</b> etc	Pol a 5	Antigene 5	25	maggior	
	<b>Vespa crabro</b>	Vesp c 1	Fosfolipasi A1		maggior ?
<b>Solenopsis invicta</b>	Vesp c 5	Antigene 5		maggior ?	
	Sol i 1	Fosfolipasi A1	37	maggior ?	
	Sol i 2 Sol i 3	Antigene 5	24	maggior ?	

sità di utilizzo di adrenalina sia al possibile trattamento con beta-bloccanti e ACE-inibitori.

Tutti i medici dovrebbero inserire nel raccordo anamnestico dei loro pazienti domande relative a pregresse reazioni da punture di imenotteri, dal momento che molti di essi dimenticano di riferire tali episodi nel corso di una anamnesi generica (27).

### Indicazione alla effettuazione dei tests diagnostici

L'indicazione alla effettuazione di test diagnostici per l'allergia al veleno di imenotteri si basa fondamentalmente sull'anamnesi del paziente, in particolare si applica ai soggetti con una storia di pregressa reazione sistemica (92-94).

Ai pazienti con basso rischio di sviluppo di reazioni sistemiche alla ripuntura (es. quelli con reazioni locali estese) non viene generalmente suggerita l'immunoterapia specifica, quindi secondo alcuni autori questi soggetti non dovrebbero eseguire tests diagnostici.

A maggior ragione né i test cutanei né quelli sierologici debbono essere effettuati in pazienti con anamnesi negativa. Esempi tipici sono rappresentati dalle richieste di accertamenti allergologici a seguito di decessi riportati dai mass media oppure in presenza di una anamnesi familiare di una grave reazione sistemica da puntura di imenotteri, sebbene non sia mai stata dimostrata una correlazione statisticamente significativa tra anafilassi da puntura di imenotteri e anamnesi familiare positiva (27).

Un'altra tipica e frequente situazione in cui vengono richiesti i tests è quella del paziente atopico, anche se non vi è alcuna correlazione tra le allergopatie respiratorie e il rischio di sviluppare una reazione anafilattica da veleno. Peraltro in questi soggetti la presenza di carboidrati cross-reattivi tra gli allergeni inalanti e quelli dei veleni potrebbe causare una falsa positività e quindi una falsa diagnosi di sensibilizzazione allergica (74,95).

### Tests cutanei

I tests cutanei (prick e intradermoreazioni) vanno effettuati da personale esperto con utilizzo di metodica standardizzata e in presenza di ambiente idoneamente attrezzato, per la possibilità di reazioni sistemiche in corso di allergometria cutanea, comunque poco frequenti se effettuata in maniera appropriata (96).

I veleni da utilizzare sono rappresentati dal veleno di *Apis mellifera*, *Vespula sp.*, *Polistes sp.* e, ove disponibile, *Vespa crabro*; non devono essere usati estratti di veleni di imenotteri non presenti in Italia (*Dolichovespula maculata* e *Dolichovespula arenaria*).

Per ciò che attiene il veleno di *Polistes*, in Italia sono attualmente disponibili, oltre che estratti di specie americane, anche estratti di *P. dominulus*, imenottero molto diffuso in Europa. Infatti, pur in presenza di elevata cross-reattività tra i veleni di *Polistes* di varie specie, la recente evidenza di una specificità selettiva unicamente diretta verso allergeni di *Polistes* europei (87) solleva il problema della necessità di avere a disposizione anche i veleni di questa specie.

Generalmente si raccomanda di eseguire i tests cuta-

nei almeno due settimane dopo la reazione per evitare false negatività durante il periodo refrattario; in presenza di anamnesi suggestiva per reazione sistemica, se i test sono negativi, essi vanno ripetuti dopo 1-2 mesi (97).

La negatività dei tests cutanei può essere legata, oltre che all'eccessivo intervallo di tempo o al contrario al troppo breve lasso di tempo trascorso rispetto alla reazione, all'utilizzo del veleno non responsabile della reazione, ad una terapia antistaminica o fenotiazinica concomitante, o ad un meccanismo patogenetico non IgE-mediato (es. concomitante mastocitosi).

Le norme procedurali generali, incluse le misure di precauzione da adottare, le interferenze con i farmaci e la lettura dei test cutanei (prick e intradermotest) sono descritte altrove (98).

Per il prick test si utilizzano concentrazioni da 0,01 fino a 100 µg/ml, per l'intradermoreazione da 0,001 a 1 µg/ml. A seconda degli studi, la sensibilità dei prick tests alle diverse concentrazioni varia tra il 50% e il 90% (99,100), mentre la sensibilità dei tests intradermici può essere stimata complessivamente in circa il 90% per la concentrazione di 1 µg/ml, variabile dal 65 al 94% per la concentrazione di 0,1 µg/ml (101-105).

È difficile definire la specificità dei test cutanei con veleni dal momento che i soggetti esposti che non hanno mai sviluppato una reazione sistemica possono essersi sensibilizzati a seguito dell'ultima puntura; infatti il 10-49% di tali individui presenta test cutanei intradermici positivi alla concentrazione di 1 µg/ml (101-105).

Non esiste alcuna correlazione tra il grado di sensibilità cutanea e gravità della reazione; le reazioni più intense ai test cutanei si verificano spesso in pazienti con reazioni locali estese, per contro alcuni pazienti con reazioni gravissime dimostrano una debolissima reattività cutanea (o sierologica) (104,106).

### Test in vitro

Per la determinazione delle IgE specifiche su siero possono essere utilizzati tests in vitro come il RAST (Radio Allergo Sorbent test) ed altre metodiche da esso derivate (es. CAP-system) (107-109).

Rispetto ai tests di prima-generazione, in quelli più recenti (di seconda-generazione) sono stati apportati netti miglioramenti in termini di reagenti, di supporti per l'assorbimento dell'allergene e di strumentazione, tanto da conferire loro una maggiore sensibilità (107,110,111).

Nei primi giorni dopo una puntura i livelli IgE specifiche per il veleno iniettato possono essere molto bassi o addirittura non determinabili, pertanto il test dovrebbe essere ripetuto a poche settimane di distanza (97). Generalmente la puntura agisce da stimolo iniziale, le IgE aumentano con il passare dei giorni e delle settimane dalla puntura; dopo questa fase iniziale si riducono progressivamente con una ampia variabilità individuale (112).

La sensibilità dei test in vitro per la determinazione delle IgE specifiche in pazienti con anamnesi di reazione sistemica rimane tuttavia minore di quella dei test cutanei, soprattutto dopo il primo anno dalla reazione (4); per la specificità, si ripropongono le stesse problematiche osser-

vate per i test in vivo.

La determinazione delle IgG specifiche non costituisce una indagine diagnostica di routine; la sua effettuazione non è raccomandabile né prima né dopo un trattamento vaccinic.

I livelli di IgG in primo luogo sono un indice di esposizione, non correlano con la gravità della reazione, incrementano dopo una puntura, si riducono più rapidamente rispetto alle IgE (112).

La metodica della RAST-inibizione nei soggetti polisensibili consente di distinguere tra cross-reattività e sensibilizzazioni distinte verso più veleni contemporaneamente (90,113,114); questo riveste un ruolo importante soprattutto qualora si debba avviare il paziente all'immunoterapia specifica (85,114).

La presenza di determinanti carboidrati comuni tra veleni di ape e di vespe e tra veleni ed allergeni da inalazione potrebbe interferire con il significato diagnostico dei test sia in vivo che in vitro.

E' stata infatti dimostrata mediante CAP-inibizione la presenza di IgE specifiche verso determinanti carboidrati (CCD) nell'80,5% dei sieri di soggetti con doppia positività delle IgE specifiche verso il veleno di ape e di giallone (91). L'importanza delle IgE specifiche verso i CCD come causa di doppia sensibilizzazione è stata recentemente ribadita dagli stessi Autori (115), i quali hanno identificato alcuni glicoallergeni maggiori dei veleni che legano IgE specifiche verso carboidrati sia nel veleno di ape che di giallone, suggerendo che l'utilizzo di N-glicani 1-3-fucosilati (es. polline di colza-brassica napus) e N-glicani fucosilati sintetici derivati dalla bromelina possa consentire di individuare gli anticorpi anti-CCD e quindi discriminare quei soggetti con carboidrati cross-reattivi da quelli con reale doppia sensibilizzazione al veleno di ape e di giallone.

Un altro gruppo, mediante l'utilizzo della glicoproteina bromelina allo scopo di identificare i soggetti con IgE specifiche verso CCD, ha confrontato pazienti atopici con allergia inalatoria, individui con allergia al lattice e con anafilassi da puntura di imenotteri. In particolare la sensibilizzazione alla bromelina è stata riscontrata nel 21% dei pazienti allergici al veleno (116).

Nei soggetti con anamnesi di reazione anafilattica, qualora i tests cutanei e la determinazione delle IgE specifiche con il RAST o con un metodo equivalente abbiano dato esito negativo, possono essere effettuati tests *in vitro* aggiuntivi, generalmente effettuati in laboratori specializzati e caratterizzati da costi più elevati (117-119). Non essendo ancora sufficientemente standardizzati, i risultati di tali tests eseguiti in centri diversi non sono comparabili tra loro; il loro utilizzo viene consigliato, al momento attuale, a scopo di ricerca o, nella pratica clinica, limitatamente a quei casi di difficile risoluzione nei quali tutti gli altri accertamenti allergologici abbiano dato esito negativo (94,111)

E' stato recentemente rivalutato il significato del Western-blot nella diagnosi *in vitro* della allergia al veleno di imenotteri (117); tuttavia, a fronte di una discreta sensibilità, la sua scarsa specificità continua a relegare tale metodica unicamente nel settore della ricerca (94,111).

Nel test di rilascio di istamina dai basofili, i leucociti del sangue periferico vengono incubati con gli allergeni dei veleni che si legano alle IgE adese alla superficie cellulare con conseguente stimolazione e degranolazione delle cellule, soprattutto basofili, che quindi rilasciano l'istamina.

La sua sensibilità e specificità sono tali da non giustificare l'utilizzo di routine (94,111).

Nel CAST (cellular antigen stimulation test), i leucociti pre-stimolati con IL-3 vengono incubati con gli allergeni, con conseguente attivazione cellulare e liberazione di sulfidoleucotrieni, a loro volta individuati mediante metodica ELISA (118).

Un recente studio di confronto tra varie metodiche diagnostiche ha evidenziato una buona correlazione tra i risultati dei test cutanei, del RAST e del Western blot, ma nessuna correlazione tra tali risultati e quelli del CAST (119).

Il test di attivazione dei basofili rappresenta la più nuova delle metodiche *in vitro* introdotte in commercio ed è basata sulla dimostrazione citofluorimetrica di un marker di attivazione superficiale dei basofili, generalmente rappresentato dal CD63 (120).

I pochi risultati disponibili in tale settore dell'allergologia appaiono contrastanti. Infatti alcuni Autori, confrontando i risultati dei test cutanei e del CAP-System con quelli dell'attivazione dei basofili (flow CAST) e del rilascio di istamina e di leucotrieni (CAST), hanno documentato una maggiore sensibilità e specificità del flow CAST rispetto ai test in vivo e al CAP-System e una correlazione significativa con i risultati del rilascio di istamina e di leucotrieni (121),

Al contrario Lambert e coll. (122) concludono che tale metodica sia paragonabile al test di rilascio di istamina in termini di sensibilità e specificità, quindi di scarso significato clinico.

Analoghe limitazioni metodologiche sono state evidenziate con la determinazione citofluorimetrica del CD203, che rappresenta un altro marker di attivazione dei basofili (123).

Alla luce dei fattori di rischio per gravità della reazione recentemente identificati (58-61), è consigliabile effettuare il dosaggio della triptasi sierica basale in tutti i pazienti con anamnesi di reazione sistemica severa (94).

Si sottolinea inoltre che, in virtù della sua cinetica, il dosaggio della triptasi in fase acuta (dopo circa 1 ora dall'evento sistemico) può confermare la patogenesi da degranolazione mastocitaria (62) a seguito di una reazione da puntura di insetti.

Il dosaggio della triptasi, oltre alla ricerca di IgE specifiche su siero verso i veleni, può risultare utile nel confermare una reazione anafilattica da puntura di imenottero come causa di decesso, soprattutto in assenza di una puntura sicura (124).

Sebbene la validità dei test sierologici di campioni di sangue emolizzato da cadavere sia tuttora oggetto di dibattito, recentemente è stata dimostrata l'abilità di una metodica RAST non commercializzata ed utilizzata presso il Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio di Greenville (Carolina dell'est) nell'individuare la presenza

di IgE specifiche post-mortem, nonostante una cospicua emolisi dei campioni (125). Peraltro in questo interessante studio (125), Hoffman ha confrontato i livelli di IgE specifiche verso i veleni in soggetti deceduti a seguito della puntura di imenotteri con quelli di pazienti deceduti per altri tipi di allergia (farmaci e alimenti) e per altre cause. Non sono stati individuati anticorpi allergici nel 10% dei sieri prelevati dai soggetti deceduti per puntura di imenotteri, mentre bassi livelli di IgE specifiche (0,35-0,65 ng/ml) sono stati dosati nel 24% dei decessi correlati alla allergia al veleno (125), portando gli Autori a confermare che il livello di IgE specifiche sieriche verso i veleni non è predittivo della severità della reazione anafilattica.

Infine deve essere sottolineato che a tutt'oggi non è stato identificato alcun marker in grado di predire future reazioni sistemiche da puntura di imenotteri. Infatti l'esito dei tests cutanei o dei tests in vitro non può essere considerato predittivo delle reazioni successive sia nei pazienti trattati con immunoterapia specifica che nei non trattati, dal momento che fino all'84% dei soggetti cutipositivi non reagisce a successive punture dell'insetto verso cui sono allergici e fino al 31% di soggetti cutinegativi sviluppa una reazione sistemica a seguito di ripuntura (52,53,126,127).

### **Il "dilemma" del paziente con anamnesi positiva e tests diagnostici negativi**

I tests cutanei vengono considerati i test diagnostici di elezione nella allergia al veleno di imenotteri, in quanto più sensibili; infatti circa il 20% dei soggetti con anamnesi positiva e test cutanei positivi hanno un test sierologico negativo.

Tuttavia, una piccola percentuale di pazienti con reazione sistemica da puntura di insetto presenta livelli di IgE specifiche non dimostrabili e tests cutanei negativi (128); ciò potrebbe essere dovuto non solo ad una insufficiente sensibilità dei tests diagnostici, ma anche ad un lungo intervallo di tempo intercorso tra la reazione e gli accertamenti allergologici con spontaneo e progressivo declino del tasso di IgE specifiche o ad una mastocitosi sub-clinica.

Purtroppo l'impossibilità di dimostrare gli anticorpi allergici specifici non garantisce che anche la reattività clinica sia scomparsa.

In uno studio recente il 22% (11 soggetti) di un gruppo di 51 pazienti con anamnesi positiva e tests intradermici negativi fino alla concentrazione di 1 µg/ml hanno sviluppato reazioni sistemiche al challenge con insetto; di questi, la maggior parte (9 soggetti) aveva livelli sierici molto bassi di IgE specifiche, indicando come anche livelli minimi di anticorpi siano sufficienti ad evocare una reazione sistemica grave (129). Gli Autori sottolineano come alcune metodiche di laboratorio per la determinazione delle IgE specifiche verso i veleni, in particolare il RAST utilizzato presso la John Hopkins University di Baltimora (JHU RAST), possano dimostrare una sensibilità diagnostica superiore a quella dei reagenti per test cutanei attualmente in commercio (129).

E' stato recentemente riportato il risultato di uno studio di confronto della sensibilità del JHU RAST con la meto-

dica RAST commerciale più diffusa ed affidabile (Pharmacia CAP System): per la maggior parte dei sieri (93,2%) le due metodiche sono risultate equivalenti in termini diagnostici, nel 6,8% solo il JHU RAST è riuscito ad individuare la presenza di IgE specifiche per livelli superiori a 1 ng/ml (130).

Sebbene nella maggior parte dei pazienti con storia di reazione anafilattica i test cutanei rappresentino la metodica diagnostica più accurata e sensibile (131,132), nei soggetti con anamnesi di grave reazione sistemica e test cutanei negativi, è necessario ripetere i test cutanei ad intervalli periodici ed eseguire un test sierologico per IgE specifiche (129), pur non disponendo della metodica JHU RAST.

Questo ha recentemente portato l'Accademia Americana di Allergologia, Asma ed Immunologia (AAAAI) a modificare le Linee Guida per la gestione del paziente allergico al veleno di imenotteri, soprattutto per ciò che riguarda l'algoritmo diagnostico (133); in tal senso si sono adeguate anche le nuove Linee Guida Europee dell'Accademia Europea di Allergologia ed Immunologia Clinica (EAACI) (94).

In un editoriale americano del 2001 viene sottolineato il concetto che in ultima analisi la responsabilità della qualità della metodica sierologica di determinazione delle IgE specifiche risiede anche nello specialista che sceglie il laboratorio di riferimento (134).

Allo scopo di garantire la qualità dei risultati, negli Stati Uniti sono stati stabiliti rigidi criteri di accreditamento dei laboratori (135,136); è auspicabile che ciò possa avvenire anche in Italia.

### **Test di provocazione con insetto**

In considerazione della storia naturale della allergia al veleno di imenotteri e quindi della dicotomia esistente tra sensibilizzazione allergica e reattività clinica, il challenge con insetto vivo è stato utilizzato da alcuni Autori in soggetti allergici non trattati con immunoterapia (52-54,126,129), allo scopo di individuare quei pazienti che necessitano realmente di vaccinazione.

Procedure e misure precauzionali sono state descritte altrove in maniera dettagliata (137).

Il valore prognostico di un challenge tollerato con insetto verso l'outcome di una successiva puntura appare compreso tra il 85% (138) e il 95% in pazienti selezionati (139). Tuttavia, in considerazione del fatto che il 6,5% dei pazienti pediatrici (140) e il 21% degli adulti (54) hanno manifestato una reazione sistemica solo a seguito di un secondo challenge e del rischio di sviluppare reazioni anche molto gravi (53), tale procedura non è consigliabile come indagine diagnostica di routine in soggetti non in trattamento immunoterapico (137,141,142).

D'altra parte il challenge con dosi crescenti di veleno iniettato sottocute o per via intradermica non è affidabile, dal momento che è stato dimostrato come pazienti che tollerano l'immunoterapia possono ugualmente sviluppare reazioni sistemiche a nuove punture dello stesso insetto (55).

## STRATEGIE FUTURE PER LA DIAGNOSI DELLA ALLERGIA AL VELENO DI IMENOTTERI

Grazie alla moderna tecnologia della biologia molecolare possiamo oggi disporre di un considerevole numero di allergeni maggiori del veleno sia delle api che dei diversi vespidi in forma ricombinante (tabella 4).

L'utilizzo di allergeni ricombinanti potrebbe migliorare la specificità delle procedure diagnostiche (69,143): la reattività immunologica di forme ricombinanti degli allergeni dei veleni è stata confrontata con quella delle forme native purificate dello stesso allergene, dimostrando una correlazione molto stretta (144).

I ricombinanti potrebbero inoltre fornire un valido aiuto nel chiarire le cross-reattività esistenti tra gli allergeni dei veleni di specie, generi o addirittura famiglie diverse di imenotteri (69,143).

Infine si sta rivelando promettente l'uso di cocktails di ricombinanti, che potrebbero esprimere il pattern di specificità anticorpale IgE tipico del singolo paziente. In uno studio preliminare (145) che ha misurato gli anticorpi IgE specifici in pazienti allergici al veleno di ape e in controlli non allergici, è stata documentata per il cocktail di ricombinanti una specificità simile a quella riscontrata per l'intero veleno di ape (1 vs 0,85), ma una sensibilità lievemente inferiore (0,87 vs 0,95), potenzialmente migliorabile con l'aggiunta di ulteriori allergeni rilevanti, come la fosfatasi acida e la proteasi in forma ricombinante.

## CONCLUSIONI

Scopo della diagnosi è quello di classificare il tipo di reazione, identificare il meccanismo patogenetico sottostante ed identificare l'insetto pungitore.

I tests cutanei dovrebbero essere effettuati a tutti i pazienti con anamnesi di reazione sistemica, eseguiti in ambiente idoneo e da personale specializzato, utilizzando

**Tabella 4**  
Allergeni dei veleni di imenotteri in forma ricombinante (143)

Specie	allergene		MW kD
Apis mellifera	Api m 1	fosfolipasi A2	16-20
	Api m 2	ialuronidasi	43
	Api m 3	melittina	2,9
	Api m 4	fosfolipasi acida	49
Vespula vulgaris	Ves v 1	fosfolipasi A1	35
	Ves v 2		
	Ves v 5	ialuronidasi	45
Dolichovespula maculata	Dol m 1	fosfolipasi A1	35
	Dol m 2		
	Dol m 5	ialuronidasi	45
Polistes annularis		antigene 5	25
	Pol a 5	antigene 5	25

concentrazioni progressivamente crescenti di veleno; se negativi, vanno ripetuti (92-94).

Nell'ambito delle metodiche in vitro, è indispensabile scegliere i tests più sensibili e ripeterli in caso di negatività. Se i risultati permangono negativi, si può ricorrere ad altre metodiche in vitro, sebbene la loro validità non sia ancora stata confermata (93,94).

Il livello di triptasi sierica dovrebbe essere misurato in tutti i pazienti con anamnesi di reazione grave (93,94).

Infine alcuni recenti lavori indicano nell'utilizzo di allergeni ricombinanti la possibilità di migliorare la diagnostica in un prossimo futuro (69,143).

Una diagnosi corretta consente di ottimizzare il trattamento del paziente allergico al veleno di imenotteri. In particolare si sottolinea che l'immunoterapia specifica rappresenta attualmente l'unico presidio terapeutico in grado di prevenire efficacemente le reazioni anafilattiche da punture di imenotteri nei soggetti sensibilizzati, con un grado di protezione che nel caso del veleno di Vespidi può superare il 95% (146,147).

A ciò si aggiunge la sua dimostrata capacità di migliorare la qualità della vita dei pazienti, riducendo l'ansia e talvolta l'angoscia manifestata dal soggetto allergico e dalla sua famiglia (23,148).

## BIBLIOGRAFIA

- Jarisch R, Hemmer W. Mosquito and horsefly allergy. In: Insect Allergy. Up to date 2000. Proceedings of the International Symposium. Editors: Bonifazi F, Bilò MB, Antonicelli L. JGC Editions 2002:87-107.
- Senna GE, Castellani L, Mason F, et al. Allergic reactions to insects: not only hymenoptera. In: Insect Allergy. Up to date 2000. Proceedings of the International Symposium. Editors: Bonifazi F, Bilò MB, Antonicelli L. JGC Editions 2002:87-107.
- Chinery M. A field guide to the insects of Britain and Northern Europe. 1984. William Collins Sons & Co. Ltd., London.
- Muller UR. Insect Sting Allergy. 1990. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Turillazzi S. Le Società delle Vespe. Alberto Perdisa Editore, 2003.
- Sánchez F, Blanca M, Fernández J, et al. Comparative study between European and American species of polistes using sera from European sensitised subjects. Clin Experimental Allergy 1995;25:281-87.
- Green AW, Reisman RE, Arbesman CE. Clinical and immunologic studies of patients with large local reactions following insect stings. J Allergy Clin Immunol 1980;66:186-189.
- Graft DF, Schuberth KC, Kagey-Sobotka A, et al. A prospective study on the natural history of large local reactions after Hymenoptera stings in children. J Pediatr 1984;104:664-668.
- Abrecht I, Eichler G, Müller U, Hoigné R. On the significance of severe local reactions to Hymenoptera stings. Clin Allergy 1980;10:675-682.
- Wright DN, Lockey RF. Local reactions to stinging insects (Hymenoptera). Allergy Proc 1990; 11:23-8.
- Johansson SGO, Hourihane JO'B, Bousquet J, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Allergy 2001;56:813-824.
- Müller UR, Horat W, Wüthrich B, Conroy M, Reisman RE.

- Anaphylaxis after Hymenoptera stings in three patients with urticaria pigmentosa. *J Allergy Clin Immunol* 1983;72:685-689.
13. Kors JW, van Doormaal JJ, de Monchy JG. Anaphylactoid shock following Hymenoptera sting as a presenting symptom of systemic mastocytosis. *J Intern Med*. 1993;233(3):255-8.
  14. Bücher C, Simic P, Furrer J, Wüthrich B. Mastocytosis: an important differential diagnosis in anaphylactoid reactions to Hymenoptera sting. A case report and overview of clinical aspects, diagnosis and current therapy of mastocytosis. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2000;89:411-418.
  15. Fricker M, Helbling A, Schwartz L, Muller U. Hymenoptera sting anaphylaxis and urticaria pigmentosa: clinical findings and results of venom immunotherapy in ten patients. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:11-5.
  16. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* 1966;3:331-333.
  17. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* 1977;466-469.
  18. Reisman RE, Livingston A. Late-onset allergic reactions, including serum sickness, after insect stings. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:331-7.
  19. Bilò MB, Garritani MS, Brianzoni MF, Napoli G, Bonifazi F. Insect sting anoxic encephalopathy after stopping venom immunotherapy. XXIII EAACI Congress, Amsterdam 12-16 June 2004. *Allergy* 2004;155.
  20. Mosbech H. Death caused by wasp and bee stings in Denmark 1960-1980. *Allergy* 1983;38:195-200.
  21. McGain F, Winkel KD. Ant sting mortality in Australia. *Toxicol* 2002;40:1095-100.
  22. Oude Elberink JNG, de Monchy JGR, Brouwer JLP, Golden DBK, Guyatt GH, Dubois AEJ. Development and validation of the Vespidae allergy quality of Life questionnaire (VQLQ). *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:162-70.
  23. Bilò MB. Health-related quality of life in Hymenoptera venom allergic patients. In: *Insect Allergy. Up to date 2000. Proceedings of the International Symposium*. Editors: Bonifazi F, Bilò MB, Antonicelli L. JGC Editions 2002:155-162.
  24. Fernandez J, Blanca M, Soriano J, et al. Epidemiological study of the prevalence of allergic reactions to hymenoptera in a rural population in the mediterranean area. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1069-74.
  25. Kalyoncu AF, Demir AU, Ozcan U, Ozkuyumcu C, Sahin AA, Baris YI. Bee and wasp venom allergy in Turkey. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 78:408-12.
  26. Schäfer T, Przybilla B. IgE antibodies to Hymenoptera venoms in the serum are common in the general population and are related to indications of atopy. *Allergy* 1996; 51:372-377.
  27. Golden DBK, Marsh DG, Kagey-Sobotka A, et al. Epidemiology of insect venom sensitivity. *JAMA* 1989;262:240-4.
  28. Grigoreas Ch, Galatas ID, Kiamouris Ch, et al. Insect venom allergy in Greek adults. *Allergy* 1997;52: 51-7.
  29. Charpin D, Birnbaum J, Vervloet D. Epidemiology of hymenoptera allergy. *Clin Exp Allergy* 1994;24:1010-15.
  30. Antonicelli L, Bilò MB, Napoli G, Garritani MS, Bonifazi F. Prevalence and treatment of insect sting reactions in emergency departments. *Allergy* 2001;56 (68 suppl):37.
  31. Shimizu T, Hori T, Tokuyama K, Morikawa A, Kuroume T. Clinical and immunologic surveys of Hymenoptera hypersensitivity in Japanese forestry workers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74:495-500.
  32. Bousquet J, Menardo JL, Aznar R, et al. Clinical and immunological survey in beekeepers in relation to their sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:332-40.
  33. de la Torre-Morin F, Garcia-Robaina JC, Vazquez-Moncholi C, Fierro J, Bonnet-Moreno C. Epidemiology of allergic reactions in beekeepers: a lower prevalence in subjects with more than 5 years exposure. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1995; 23:127-32.
  34. Incorvaia C, Mauro M, Pastorello EA. Hymenoptera stings in conscripts. *Allergy* 1997; 52:680-1.
  35. Novembre E, Cianferoni A, Bernardini R A, et al. Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin Exp Allergy* 1998;28:834-8.
  36. Annala IT, Karjalainen ES, Annala PA, et al. Bee and wasp sting reactions in current beekeepers. *Ann Allergy asthma Immunol* 1996;77:423-7.
  37. Abrishami MH, Boyd GK, Settupane GA. Prevalence of bee sting allergy in 2010 girl scouts. *Acta Allergol* 1971;26:117-120.
  38. Settupane GA, Boyd GK. Prevalence of bee sting allergy in 4992 boy scouts. *Acta Allergol* 1970;25:286-91.
  39. Settupane GA, Newstead GJ, Boyd GK. Frequency of Hymenoptera allergy in an atopic and normal population. *J Allergy Clin Immunol* 1972;50:146-150.
  40. Barnard JH. Studies of 400 Hymenoptera sting deaths in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 1973;52:259-64.
  41. Antonicelli A, Bilò MB, Bonifazi F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2:1-6.
  42. Schwartz HJ, Squillace DL, Sher TH, Teigland JD, Yunginger JW. Studies in stinging insect hypersensitivity: postmortem demonstration of antivenom IgE antibody in possible sting-related sudden death. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:607-610.
  43. Schuberth KC, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Szklo M, Kwitrovich KA, Valentine MD. Epidemiologic study of insect allergy in children. II. Effect of accidental stings in allergic children. *J Pediatr* 1983;102:361-5.
  44. Valentine MD, Schuberth KC, Kagey-Sobotka A, et al. The value of immunotherapy with venom in children with allergy to insect stings. *N Engl J Med* 1990;323:1601.
  45. Engel T, Heinig JH, Weeke ER. Prognosis of patients reacting with urticaria to insect sting. Results of an in-hospital sting challenge. *Allergy* 1988;43:289-93.
  46. Reisman RE. Natural history of insect sting allergy: relationship of severity of symptoms of initial sting anaphylaxis to re-sting reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:335-9.
  47. Golden DBK, Marsh DG, Freidhoff LR, et al. Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:760-6.
  48. Pucci S, Antonicelli L, Bilò MB, et al. The short interval between two stings as a risk factor for developing hymenoptera venom allergy. *Allergy* 1994;49:894-6.
  49. Lockey RF, Turkeltaub PC, Baird-Warren IA, Olive CA, Olive ES, Peppe BC, Bukantz SC. The Hymenoptera venom study I, 1979-1982: demographics and history-sting data. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:370-81.
  50. Przybilla B, Ring J, Grieshammer B. Association of features of atopy and diagnostic parameters in hymenoptera venom allergy. *Allergy* 1991;46:570-6.
  51. Lantner R, Reisman RE. Clinical and immunologic features and subsequent course of patients with severe insect-sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:900-6.
  52. Blaauw PJ, Smithuis LO. The evaluation of the common diagnostic methods of hypersensitivity for bee and yellow jacket venom by means of an in-hospital insect sting. *J Allergy Clin Immunol* 1985;75:556-62.
  53. 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-ve-

- nom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:151-9.
54. 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;93:431-6.
  55. Hunt K, Valentine M, Sobotka A, Benton A, Amodio F, Lichtenstein L. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* 1978; 299: 157-161.
  56. Antonicelli L, Bilò MB, Napoli G, Farabollini B, Bonifazi F. European hornet (*Vespa crabro*) sting: a new risk factor for life-threatening reaction in hymenoptera allergic patients? *Allerg Immunol (Paris)* 2003;35:199-203.
  57. Biedermann T, Rueff F, Sander CA, Przybilla B. Mastocytosis associated with severe wasp sting anaphylaxis detected by elevated serum mast cell tryptase levels. *Br J Dermatol* 1999;14:1110-2.
  58. Muller UR. New developments in the diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:447-53.
  59. Oude Elberink JN, de Monchy JG, Kors JW, van Doormaal JJ, Dubois AE. Fatal anaphylaxis after a yellow jacket sting, despite venom immunotherapy, in two patients with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:153-4.
  60. Ludolph-Hauser D, Rueff F, Fries C, Schopf P, Przybilla B. Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. *Lancet*. 2001;357:361-2.
  61. Haeberli G, Bronnimann M, Hunziker T, Muller U. Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1216-20.
  62. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani AM, Rasp G, Van der Zwan JK, Van der Linden PW. Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol* 1994;14:190-204.
  63. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123:99-106.
  64. Hoffman DR, Jacobson RS. Allergens in Hymenoptera venom XII: How much protein is in a sting? *Ann Allergy* 1984;52:276-278.
  65. Schumacher MJ, Tveten MS, Egen NB. Rate and quality of delivery of venom from honeybee stings. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:831-5.
  66. Schumacher MJ, Schmidt JO, Egen NB, Dillon KA. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:59-65.
  67. Ederly H, Ishay J, Gitter S, Joshua H. Venoms of Vespidae. In: S. Bettini Ed. *Arthropod Venoms*. Springer Verlag Berlin, New York 1978;691-77.
  68. Habermann E. Bee and Wasp venoms. *Science* 1972; 177: 314-322.
  69. Müller U. Recombinant venom allergens. *Allergy* 2002; 57:570-576.
  70. Hoffman DR, El-Choufani SE, Smith MM, de Groot H. Occupational allergy to bumblebees: allergens of *Bombus terrestris*. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:855-60.
  71. King TP, Kochoumian L, Joslyn A. Wasp venom proteins: phospholipase A1 and B. *Arch Biochem Biophys* 1984; 230: 1-12.
  72. King TP, Alagon AC, Kuan J, Sobotka AF, Lichtenstein LM. Immunochemical studies of yellow jacket venom proteins. *Mol Immunol* 1983; 20: 297-308.
  73. Henriksen A, King TP, Mirza O, Monsalve RI, Meno K, Ipsen H, Larsen JN, Gajhede M, Spangfort MD. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. *Proteins* 2001; 45:438-48.
  74. Aalberse RC, Koshte V, Clemens JGJ. Cross-reactions between vegetable food, pollen and bee venom due to IgE antibodies to a ubiquitous carbohydrate determinant. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1981;66:259-260.
  75. Nelson DR, Collins AM, Hellmich RL, Jones RT, Hel RM, et al. Biochemical and immunochemical comparison of Africanized and European honeybee venoms. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:80-5.
  76. Schuhmacher MJ, Schmidt JO, Egen NB, Lowry JE. Quantity, analysis, and lethality of European and Africanized honey bee venoms. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43: 79-86.
  77. Stapel SO, Waanders-Lijster de Raadt J, van Toorenbergen AW, de Groot H. Allergy to bumblebee venom. II. IgE cross-reactivity between bumblebee and honeybee venom. *Allergy* 1998; 53: 769-77.
  78. Bucher C, Korner P, Wüthrich B. Allergy to bumblebee venom. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 361-5.
  79. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:707-16.
  80. King TP, Lu G, Gonzales M, Qian N, Soldatova L. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase. Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:588-600.
  81. Wicher K, Reisman RE, Wypych J, Elliott W, Steger R, Mathews RS, Arbesman CE. Comparison of the immunogenicity of venoms of various species of yellow jackets (genus *Vespula*). *J Allergy Clin Immunol* 1980;66:244-249.
  82. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venoms XVI. Studies of the structures and cross-reactivities of vespid venom phospholipases. *J Allergy Clin Immunol* 1986;78:337-343.
  83. Panzani R, Blanca M, Sanchez F, Juarez C. Sensitivity to European wasps in a group of allergic patients in Marseille: preliminary results. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1994;4:42-46.
  84. Blanca M, Garcia F, Miranda A, Carmona MJ, Garcia J, Fernandez J, Terrados S, Vega JM, Juarez C. Determination of IgE antibodies to *Polistes dominulus*, *Vespula germanica* and *Vespa crabro* in sera of patients allergic to vespids. *Allergy* 1991;46:109-114.
  85. Hamilton RG, Wiesenauer JA, Golden DBK, Valentine MD, Adkinson FA. Selection of Hymenoptera venoms for immunotherapy on the basis of patient's IgE antibody cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:651-659.
  86. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venoms XV. The immunologic basis of vespid venom cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1985;75:611-613.
  87. Pantera B, Hoffman DR, Carresi L, Cappugi G, Turillazzi S, Manao G, Severino M, Spadolini I, Orsomando G, Moneti G, Pazzagli L. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. *Biochim Biophys Acta*. 2003 13; 1623:72-81.
  88. Wypych J, Abenounis C, Reisman R. Analysis of differing patterns of cross-reactivity of honey bee and yellowjacket venom-specific IgE: use of purified venom fractions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989;89:60-66.
  89. Reisman RE, Wypych JI, Lazell MI. Further studies in patients with both honeybee- and yellow-jacket-venom-specific IgE. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;82:190-194.

90. Straumann F, Bucher C, Wüthrich B: Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with both venoms? Value of FEIA inhibition for the identification of the cross-reacting IgE antibodies in double-sensitized patients to honeybee and wasp venom. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 268-74.
91. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson IB, Altmann F, Wöhrl S, Götz M, Jarisch R. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:1045-1052.
92. Portnoy JM, Moffitt JE, Golden BDK, et al. Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:963-980.
93. Linee Guida AAITO sulla Diagnosi della allergia al veleno di imenotteri. Editori: F. Bonifazi, M.B. Bilò. Con la collaborazione del Consiglio Direttivo AAITO. *Allerg Immunol (Paris)* 2004, in press.
94. Bonifazi F, Muller U. Position Paper Part I: Diagnosis of Hymenoptera Venom Allergy: *Allergy* 2004 in press.
95. Broichmann PW, Kästner H, Kalveram KJ. Pseudopolyvalent immediate-type sensitization within the meaning of cross-allergy between bee and wasp venom, pollen, vegetable foods and crustaceans. *Allergologie* 1992;15:295-299.
96. Pucci S, Antonicelli L, Bilò MB, Bonifazi F. Side effects during skin testing with hymenoptera venom extracts. *ACI news* 1994 (Suppl. 2):180.
97. Goldberg A, Confino-Cohen R. Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:182-4.
98. Position paper: Allergen standardisation and skin tests. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*. 1993; 48 (14 Suppl):48-82.
99. Bjorkander J, Belin L. Diagnostic skin testing in Hymenoptera sensitivity. In Oehling A (ed): *Advances in allergology and applied immunology*. New York, Pergamon Press. 1980:733.
100. Bar-Sela S, Shalit M, Kalbfleisch JH, Fink JN. The relative value of skin tests and radioallergosorbent test in the diagnosis of bee sting hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72:690-694.
101. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Diagnosis of allergy to stinging insects by skin testing with Hymenoptera venoms. *Ann Intern Med* 1976;86:56-59.
102. Patrizzi R, Müller U, Yman L, Hoigné R. Comparison of skin tests and RAST for the diagnosis of bee sting allergy. *Allergy* 1979;34:249-256.
103. Meriney D, Nall TH, Wallace D, Rosenzweig D, Goel Z. Comparison of venom and whole-body RAST and intradermal testing in vespid-sensitive patients. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1980;62:442-452.
104. Wüthrich B, Wick H, Crass B, Wyss S. Zur Diagnostik der Hymenopterenstich-Allergie: ein Vergleich zwischen Anamnese, Hauttesten und IgE-Bestimmungen (RAST) mit Giftextrakten. *Praxis* 1981;70:934-943.
105. Georgitis JW, Reisman RE. Venom skin tests in insect-allergic and insect-nonallergic populations. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:803-807.
106. Day JH, Buckeridge DL, Welsh AC. Risk assessment in determining systemic reactivity to honeybee stings in stinging-threatened individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:691-705.
107. Leimgruber A, Lantin J-P, Frei PC. Comparison of two in vitro assays, RAST and CAP, when applied to the diagnosis of anaphylactic reactions to honeybee or yellow jacket venoms. *Allergy* 1993;48:415-420.
108. Fischer H, Skrbic D, Weber M, Muller U. Comparison of RAST, magic lite and CAP for the diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy and Clin Immunol News* 1994;Suppl 2:498.
109. Hamilton RG. Diagnosis of Hymenoptera venom sensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2:347-351.
110. Hamilton RG, Adkinson NF Jr. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:687-701.
111. Hamilton RG. Diagnostic methods for insect sting allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:297-306.
112. Mosbech H, Christensen J, Dirksen A, Söborg M. Insect allergy. Predictive value of diagnostic tests: a three-year follow-up study. *Clin Allergy* 1986;16:433-440.
113. Zerboni R, Campi P, Severino M. The many faces of diagnosis: combined use of skin testing and RAST inhibition in patients allergic to Hymenoptera venom. *Int J Immunopathol Pharmacol* 1997;10:2(5),169.
114. Severino M, Macchia D, Manfredi M, Campi P. Multiple positive tests with Hymenoptera venoms: RAST inhibition studies in 144 patients. In: *Insect Allergy. Up to date 2000. Proceedings of the International Symposium*. Editors: Bonifazi F, Bilò MB, Antonicelli L. JGC Editions 2002:59-65.
115. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, et al. Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E binding N glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clin Exp Allergy* 2004;34:460-469.
116. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, et al. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. *Clin Exp Allergy* 2004;34:137-144.
117. Zollner TM, Spengler K, Podda M, Ergezinger K, Kaufmann R, Boehncke WH. The Western blot is a highly sensitive and efficient technique in diagnosing allergy to wasp venom. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1754-61.
118. Maly FE, Marti-Wyss S, Blumer S, Cuhat-Stark I, Wüthrich B. Mononuclear blood cell sulfidoleukotriene generation in the presence of interleukin-3 and whole blood histamine release in honey bee and yellow jacket venom allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997;7:217-24.
119. Santos MC, Carlos ML, Pedro E, Carlos AG. Laboratory diagnosis of hymenoptera venom allergy: comparative study between specific IgE, Western blot and allergen-leukocyte stimulation (CAST). *Allerg Immunol (Paris)* 2002;34:6-9.
120. Ebo D, Hagendorens M, Bridts C, et al. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004;34:332-339.
121. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1166-71.
122. Lambert C, Guilloux L, Dzviga C et al. Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to hymenoptera venom. *Cytometry* 2003;52B:13-19.
123. Binder M, Fierlbeck G, King TP, et al. Individual hymenoptera venom compounds induce up regulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3(CD203c) in sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:160-168.
124. Riches KJ, Gillis D, James RA. An autopsy approach to bee sting related deaths. *Pathology* 2002;34:257-62.
125. Hoffman DR. Fatal reactions to hymenoptera stings. *Ann Asthma Proc* 2003;24:123-127.
126. Parker JL, Santrach PJ, Dahlberg MJE, Yunginger JW.

- Evaluation of Hymenoptera-sting sensitivity with deliberate sting challenges: inadequacy of present diagnostic methods. *J Allergy Clin Immunol* 1982;96:200-207.
127. Mosbech H. Insect allergy. A comparative study including case histories and immunological parameters. *Allergy*. 1984;39:543-9.
  128. Kontou-Fili K. Patients with negative skin tests. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2:353-7.
  129. Golden DBK, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Hamilton RG, Lichtenstein M. Insect sting allergy with negative venom skin test responses. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:897-901.
  130. Hamilton RG. Diagnostic methods for insect sting allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:297-306.
  131. Reisman RE. Insect sting allergy: the dilemma of the negative skin test reactor (Editorial). *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:781-2.
  132. Reisman RE. Guidelines for management of people with histories of insect sting anaphylaxis and subsequent negative venom skin tests. *J Allergy Clin Immunol* 2003;113:364-5.
  133. Golden DBK, Tracy JM, Freeman TM, Hoffman DR, the Insect Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Negative venom skin test results in patients with histories of systemic reaction to a sting. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:495-8.
  134. Hamilton RG. Responsibility for quality IgE antibodies results rests ultimately with the referring physician. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:353-4.
  135. College of American Pathologists, Participant Summary Report, SE-B, Diagnostic Allergy Proficiency Survey, Northfield, IL 2002.
  136. Diagnostic Immunology Resource Committee. College of American Pathologists Diagnostic Allergy (SE-C-2002 e SE-A-2003) Participants Surveys. Northfield, IL: College of American Pathologists; 2003. <http://www.cap.org>.
  137. Ruëff F, Przybilla B, Müller U, Mosbech H. The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 1996;51:216-225.
  138. Blaauw PJ, Smithuis LOMJ. Report of the meeting of the Dutch Society for Allergology. *Ned Tijdschr Geneesk* 1993;137:1903.
  139. Van Halteren HK, van der Linden P-WG, Burgers SA, Bartelink AKM. Hymenoptera sting challenge of 348 patients: Relation to subsequent field stings. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1058-63.
  140. Hauk P, Friedl K, Kaufmehl K, Urbanek R, Forster J. Subsequent insect stings in children with hypersensitivity to Hymenoptera. *J Pediatr* 1995;126:185-90.
  141. Dubois A. Investigational and clinical use of the sting challenge. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3: 283-285.
  142. Bilò MB, Brianzoni MF, Garritani MS, Antonicelli L, Farabolini B, Bonifazi F. The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy: pros and cons. *Allerg Immunol (Paris)*. 2003;35:377-81.
  143. Müller U. Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect venom allergy. *Current Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3:299-303.
  144. 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; 27:915-20.
  145. Müller U, Soldatova L, Weber M. Bee venom allergy: Comparison of IgE-binding capacity of purified natural and recombinant-synthetic venom allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 33.
  146. Bonifazi F, Muller U. Position Paper Part II: Prevention and Treatment of Hymenoptera Venom Allergy: *Allergy* 2004 in press.
  147. Linee Guida AAITO sulla Terapia della allergia la veleno di imenotteri. Editori: F. Bonifazi, M.B. Bilò. Con la collaborazione del Consiglio Direttivo AAITO. *Allerg Immunol (Paris)* 2004, in press.
  148. Oude Elberink J, de Monchy J, van der Heide S, Guyatt G, Dubois A. Venom immunotherapy improves health related quality of life in patients allergic to yellow jacket venom. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:174-182.