

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DERİ PRİK TESTİ VE SPESİFİK IGE ÖLÇÜMLERİ İLE
HEM BAL HEM DE YABAN ARISI POZİTİFLİĞİ OLAN
HASTALARDA BAT VE ALLERJEN KOMPONENT
TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI**

**Hazırlayan
Esra ÖZSOY**

**Danışman
Prof. Dr. İnsu YILMAZ**

Yüksek Lisans Tezi

**Mayıs 2024
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DERİ PRİK TESTİ VE SPESİFİK IGE ÖLÇÜMLERİ İLE
HEM BAL HEM DE YABAN ARISI POZİTİFLİĞİ OLAN
HASTALARDA BAT VE ALLERJEN KOMPONENT
TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI**

**Hazırlayan
Esra ÖZSOY**

**Danışman
Prof. Dr. İnsu YILMAZ**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2023-12741 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Mayıs 2024
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Esra ÖZSOY

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Deri Prik Testi ve Spesifik IgE Ölçümleri ile hem Bal hem de Yaban Arısı Pozitifliği Olan Hastalarda BAT ve Allerjen Komponent Testlerinin Karşılaştırması” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Esra ÖZSOY

Danışman
Prof. Dr. İnsu YILMAZ

İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

KABUL ve ONAY SAYFASI

Prof. Dr. İnsu YILMAZ danışmanlığında **Esra ÖZSOY** tarafından hazırlanan “**Deri Prik Testi ve Spesifik IgE Ölçümleri ile hem Bal hem de Yaban Arısı Pozitifliği Olan Hastalarda BAT ve Allerjen Komponent Testlerinin Karşılaştırması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.../.../2024

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. İnsu YILMAZ

.....

Üye : Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

.....

Üye : Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

.....

ONAY

Bu tezin kabulü Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılmasında göstermiş olduğu destek ve yardımlarından ötürü başta tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İnsu YILMAZ'a, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı yaparken çalışma yöntem ve tekniklerini uygulamaya koymamızda bilgi, yüksek lisansım ve tezimin her aşamasında bana destek olan ablam Dr. Sevil ŞİMŞEK, tecrübe ve emeklerini esirgemeyen biyolog Tuğba RIHTİM'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca araştırmacı olarak çalıştığım TYL-2023-12741 nolu projedeki finans destekleri için Erciyes Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Esra ÖZSOY

Mayıs 2024, KAYSERİ

DERİ PRİK TESTİ VE SPESİFİK IGE ÖLÇÜMLERİ İLE HEM BAL HEM DE YABAN ARISI POZİTİFLİĞİ OLAN HASTALARDA BAT VE ALLERJEN KOMPONENT TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI

Esra ÖZSOY

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İmmünoloji Anabilim Dalı

İmmünoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi, Mayıs 2024

Danışman: Prof. Dr. İnsu YILMAZ

ÖZET

Çalışmamızda; özellikle arı venomuna çift duyarlılığı saptanan hastalarda arı venom immünoterapi (VIT) seçiminde bu testlerin ne kadar önemli olabileceğinin ortaya konulması, bazofil aktivasyon testi (BAT) ve allerjen komponent testi (CRD) değerlendirilmelerinin araştırma amaçlı olmaktan çıkmaya başlayıp klinik rutinde kullanımına yönelik literatüre önemli bir katkıda bulunması ve hangi yöntemin bu çifte pozitiflikte öncelikle tercih edilmesi ile ilgili çalışmaların önünü açması amaçlanmıştır. Çalışmamız arı ile sistemik reaksiyon öyküsü olan ve arı venom duyarlılığı, deri prik testi (DPT) ve/veya spesifik immünglobülin E (sIgE) ölçümleri ile klavuzlar doğrultusunda VIT kararı verilen arı venom allerjisine çift duyarlılığı olan 10 hasta ile yürütüldü. Hastalardan heparin ile antikoagüle tüpe 3ml'lik kanlar alındı. Hastalardan alınan venöz kan örnekleri pozitif kontrol (PK), negatif kontrol (NK) ve 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml olmak üzere üç ayrı dilüsyonda hazırlanan venom ekstraktlarından oluşan test tüplerine ayrıldı ve tüplerdeki bazofil aktivasyonu; CD63 yüzde ve CD203c ortalama floresan yoğunluk (mean floresan intensity- MFI) ölçümü yapılarak akım sitometri cihazı ile değerlendirildi. Ek olarak CRD testi ile serum sIgE antikorlarının ölçümü yapıldı.

VIT kararı verilen arı venom allerjisine çift duyarlılığı olan 10 hastanın bazofil aktivasyonlarındaki değişim negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (IgE, FMLP) ve üç ayrı dilüsyondaki venom ekstraktındaki (0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml) CD63 yüzde ve CD203c MFI değerleri kullanılarak ölçüldü. Hem bal hem de yaban arısı allerjen ekstraktlarının 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml konsantrasyonlarında CD63 ekspresyonunda, negatif kontrole oranla ortalama % 70.2 artış gösterildi. CD203c MFI değerlerinde ise her üç konsantrasyonda da negatif kontrole oranla ortalama %50 artış saptandı. CD63 ekspresyonuyla CD203c MFI değerleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı ($p<0.01$). BAT testi ile hastaların CD63% değerleri göz önünde bulundurulduğunda 5'inin bal arısına 4'ünün ise yaban arısına karşı daha fazla pozitiflik gösterdiği saptandı. 1 hasta da ise iki venom allerjenine karşı eşit oranda pozitiflik saptandı. CRD testinde ise 3 hasta bal arısına 3 hasta yaban

arısına 1 hasta da ikisine karşı da serum IgE antikoru pozitifliği gösterdi. 3 hastada ise hiç pozitiflik saptanmadı.

Bu araştırma BAT ve CRD testlerinin birlikte kullanımının, erken tanıyı ve çift pozitiflik durumunun netleştirilmesini kolaylaştırmada birbirlerini tamamlayacak etkili in-vitro testler olduğu gösterilmiş oldu. Çift pozitiflik saptanan hastalarda CRD ile allerjik reaksiyondan sorumlu gerçek arı türü daha net olarak saptanabilmektedir. Fakat diğer yandan da CRD negatif saptanan hastalarda BAT pozitiflikleri saptanabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda çift pozitiflik saptanan hastalarda VIT kararı verilmeden önce CRD ve/veya BAT testlerinin uygulanması allerjiden sorumlu gerçek arı türünü belirleme ve etkin VIT uygulama açısından oldukça önemli olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Allerjen Komponent Testi; Arı Venomu; Bazofil Aktivasyon Testi; CD63 ve CD203c; Çift Pozitiflik

**COMPARISON OF SKIN PRICK TEST AND SPECIFIC IGE
MEASUREMENTS WITH BAT AND ALLERGEN COMPONENT TESTS IN
PATIENTS WITH BOTH HONEY AND WASP POSITIVE**

Esra ÖZSOY

Erciyes University, Graduate School of Healthy Sciences

Department of Immunology

M.Sc. Thesis, May 2024

Supervisor: Prof. Dr. İnsu YILMAZ

ABSTRACT

In our study; Revealing how important these tests can be in the selection of bee venom immunotherapy (VIT), especially in patients with double sensitivity to bee venom, will make a significant contribution to the literature on the use of basophil activation test (BAT) and allergen component test (CRD) in clinical routine, rather than being used for research purposes. It is aimed to pave the way for studies on finding out and which method should be preferred first in this double positivity.

Our study was conducted with 10 patients with double sensitivity to bee venom allergy, who had a history of systemic reaction to bees and were decided to use VIT in line with the guidelines based on bee venom sensitivity, skin prick test (DPT) and/or specific immunoglobulin E (sIgE) measurements. 3ml of blood was taken from the patients into a tube anticoagulated with heparin. Venous blood samples taken from the patients were divided into test tubes consisting of positive control (PK), negative control (NC) and venom extracts prepared in three separate dilutions: 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, and basophil activation in the tubes; CD63 percentage and CD203c mean fluorescence intensity (MFI) were measured by flow cytometry device. Additionally, serum sIgE antibodies were measured with the CRD test.

The change in basophil activation of 10 patients with double sensitivity to bee venom allergy, for whom VIT was decided, was observed in the negative control (NK), positive control (PK) (IgE, FMLP) and venom extract in three separate dilutions (0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml). CD63 percentage and CD203c were measured using MFI values. An average increase of 70.2% in CD63 expression was shown in the concentrations of 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml of both honey and bumblebee allergen extracts compared to the negative control. An average 50% increase in CD203c MFI values was detected in all three concentrations compared to the negative control. A statistically significant difference was found when CD63 expression and CD203c MFI values were compared ($p<0.01$). Considering the CD63% values of the patients with the BAT test, it was determined that 5 of them were more positive for honey bees and 4 of them were more positive for bumblebees. In 1 patient, equal positivity was detected for two venom allergens. In the CRD test, 3 patients showed serum IgE antibody positivity against honeybees, 3 patients against bumblebees, and 1 patient against both. No positivity was detected in 3 patients.

This study showed that the combined use of BAT and CRD tests are effective in-vitro tests that complement each other in facilitating early diagnosis and clarification of

double positivity. In patients with double positivity, CRD can detect the actual bee species responsible for the allergic reaction more clearly. However, on the other hand, BAT positivity can be detected in patients who are found to be CRD negative. Therefore, in our study, it has been shown that applying CRD and/or BAT tests before deciding on VIT in patients with double positivity is very important in terms of determining the real bee species responsible for allergy and applying effective VIT.

Key Words: Allergen Component Test; Basophil Activation Test; Bee Venom; CD63 and CD203c; Double Positivity.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Hymenoptera Allerjisinin Endotipleri ve Klinik Belirtileri	6
2.1.1. Klinik Öykü	6
2.1.2. Hymenoptera Allerjilerinin Allerjik Semptomları	7
2.1.3. Sağlıklı Bireylerde Arı Sokma Reaksiyonu / Toksik Venom Etkileri	8
2.1.4. Normal Lokal Reaksiyon.....	9
2.1.5. Büyük Lokal Reaksiyon	9
2.1.6. Anafilaksi	10
2.1.7. Toksik (Bağıışıklık Dışı) Reaksiyon	11
2.1.8. İmmünoglobulin E (IgE) Aracılı Sistemik Reaksiyonlar	12
2.1.9. Eşzamanlı Mast Hücre Bozukluğu Olan Hastalarda IgE Aracılı Reaksiyonlar	13

2.1.10. Aseptomatik Duyarlanma ile Gelişen Reaksiyonlar	14
2.1.11. Olağandışı Reaksiyonlar.....	14
2.2. Hymenoptera Takımı ve Özellikleri.....	14
2.2.1. Hymenoptera	14
2.2.2. Hymenoptera Venomu ve Epidemiyolojisi	16
2.2.3. Bal Arısı Venomu Allerjenleri	17
2.2.4. Yaban Arısı Venomu Allerjenleri	24
2.2.5. Hymenoptera Venom Allerjisinin Mekanizması.....	28
2.3. Hymenoptera Allerjisinde Çift Pozitiflik ve Çapraz Reaksiyon,	30
2.3.1. Çapraz Reaktivitenin Nedeni Olarak Karbonhidrat Belirleyicileri.....	31
2.3.2. Anti-CCD Antikorlarının Yüksek Özgüllüğü ve Afinitesi.....	32
2.3.3. Arı CCD'lerinin Biyolojik Önemi	33
2.3.4. Çapraz Reaktivite Olgusunun Nedeni	34
2.3.5. CCD'ler Nedeniyle Yanlış Pozitif Tanı ve Olası Çözümler	35
2.3.6. CCD Sorunu İçin Dört Olası Çözüm.....	36
2.4. Hymenoptera Venom Allerjisinde Teşhis, Biyobelirteçler ve Tanısal Testler.....	37
2.4.1. Deri Testleri.....	38
2.4.2. Venom Ekstraktlarına Spesifik IgE (slgE)	39
2.4.3. sIgG4	42
2.5. Ek Testler	43
2.5.1. Bazofil Hücresi ve Önemi	43
2.5.2. Bazofil Aktivasyon Testi	44
2.5.3. BAT için Çalışmada Kullanılan Antikorlar ve Özellikleri.....	49
2.5.4. Bazofil Aktivasyon Testinin Klinik Uygulamaları.....	51

2.5.5. Venom Allerjisinin Tanısında BAT	51
2.5.6. Allerjik Hastalığın Bağışıklık Mekanizmalarını Keşfetmek İçin BAT'ı Bir Araç Olarak Kullanmak	52
2.6. Daha İleri Teşhis Testleri	53
2.6.1. Allerjen Komponent Testi	53
2.6.2. Allerjen Komponent Testi (Bileşene Bağlı Tanı: CRD)	55
2.6.3. CRD Tekniği	55
2.6.4. Allerjen Komponent Testinin Hymenoptera Aşırı Duyarlılığındaki Faydaları.....	57
2.6.5. Hymenoptera Venom Allerjisinde CRD	58
2.6.6. CRD için Allerji Laboratuvarı Testleri.....	59
2.6.7. ImmunoCAP ve ISAC Ana Allerjen Komponentlerin Klinik Değeri	60
2.7. Hymenoptera Venom Allerjisinin Tedavisi	61
3. GEREÇ VE YÖNTEM	65
3.1. Gereçler	66
3.1.1. Alet ve Ekipman	66
3.1.2. Deneysel Malzemeler, Kimyasal Kitler ve Solüsyonlar.....	66
3.1.3. Akım Sitometride Kullanılan Antikorlar ve Altyapı	66
3.2. Akım Sitometri ile Test İşlemleri.....	66
3.2.1. Solüsyon ve Kimyasalların Hazırlanması	67
3.3. Akım sitometrinin okuma ve analiz için hazırlanması	67
3.4. Akım Sitometrik Analiz Uygulamaları	68
3.5. Akım Sitometri Örnek Hazırlama İşlem Basamakları.....	68
3.6. Bazofil Hücrelerinin Akım Sitometri ile Tanımlanması	70
3.7. Ortalama Floresans Yoğunluğu (Mean Flurescence İntensity: MFI).....	71

3.8. Sonuçların Değerlendirilmesi	72
3.9. Uygulanan BAT Testinin Optimizasyonu	73
3.10. Allerjen Komponent Testi Çalışma Protokolü:	76
3.11. İstatistiksel Analiz	78
4. BULGULAR	80
4.1. Hasta Grubu.....	80
4.2. Bazofil Aktivasyon Testinin Akım Sitometrik Analiz Sonuçları.....	81
4.3. Arı Venom Allerjen Komponent Test Analiz Sonuçları	84
4.4. Allerjen Komponent Testinde Analiz Sonuçlarında Beklenen Test Değerleri.....	87
4.5. Bazofil Aktivasyon Testi İstatistiksel Analiz Sonuçlarından Elde Edilen Bulgular	89
5. TARTIŞMA	102
6. SONUÇLAR	116
7. KAYNAKLAR	118
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ACD	: Asit Sitrat Dekstroz
APC	: Antijen Sunan Hücrelerde
Asn	: Asparajinin
BaP	: Bazofil Öncüleri
BAT	: Bazofil Aktivasyon Testi
BAV	: Bal Arısı Venomu
BMCP	: Bazofil-Mast Hücre Öncülleri
Breg	: Düzenleyici Fenotipli B Hücrelerinin
CCD	: Çapraz Reaktif Karbonhidrat Belirleyicileri
CD-sens	: EC50'nin tersinin 100 ile çarpımı olarak tanımlanır
CRD	: Allerjen Komponent Testi
DPT	: Deri Prik Testi
EAACI	: Avrupa Allerji ve Klinik İmmünoloji Akademisi
EC50	: Maksimum bazofil tepkisinin %50'sinin olduğu konsantrasyon
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMH	: Ekstramedüller Hematopoez
E-NPP3	: Ektonükleotid Pirofosfataz / Fosfodiesteraz 3
FcεRI	: Yüksek Afiniteli IgE Reseptörü
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
Fuc	: Fukoz
GCS	: Glukokortikosteroid
GMP	: Granülosit-Monosit Progenitör Hücrelerden
HLA	: Human Leucocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
HVA	: Hymenoptera Venom Allerjisi

IL-3R α	: Interlökin-3 Alfa Reseptörü
ISAC	: Immuno Solid-Phase Allergen Chip
ISU	: Yarı niceliksel sonuçlar standardize birimlerinde
ITAM	: Bağışıklık Reseptörü Tirozin Bazlı Aktivasyon Motifinin
ITIM	: İmmünoreseptör Tirozin Bazlı İnhibisyon Motifi
LAMP	: Lizozomal ilişkili Membran Proteini
LAMP3	: Lizozomal Membranla ilişkili Glikoprotein 3
MAPK	: Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
MCP	: Mast Hücresi Öncülleri
MFI	: Mean Fluorescent İndeks (Floresan Yoğunluğu)
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
MMXF	: Yaban Turpu Peroksidaz
MRJP	: Majör Arı Sütü Proteini
MUXF	: Bromelain
N	: Saflaştırılmış (doğal)
PBMC	: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PDV	: Polistes Dominula Venomu
PMN	: Polimorfonükleer Lökositlerin
r	: Rekombinant
REMA	: İspanyol Mastositoz Ağı
sIGE	: Spesifik İmmunglobulin E
SPL	: Zincir Serin Proteaz Benzeri
STAT	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
tIgE	: Toplam İmmunglobulin E
TM4SF	: Tetraspanin

Treg : Düzenleyici T Hücrelerinin
VIT : Venom İmmunoterapi
WHO/IUIS : Dünya Sağlık Örgütü'nün Allerjen İsimlendirme Alt Komitesi
YAV : Yaban Arısı Venomunu



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1.	Mueller skalasına göre Hymenoptera venomuna karşı allerjinin şiddet derecesi.....	10
Tablo 2.2.	Anafilaksiyi taklit eden semptomlara neden olabilecek durumlar.....	11
Tablo 2.3.	Bal ve yaban arıları arasındaki ayırıcı özellikler	15
Tablo 2.5.	Aşırı duyarlı reaksiyonların klasik Gell Coombs sınıflandırması.	29
Tablo 2.6.	BAV ve YAV ile deri testleri, anafilaksi şiddetine ve bireysel hasta risk faktörlerine bağlı olarak aşamalı olarak veya eş zamanlı olarak gerçekleştirilebilir	39
Tablo 2.7.	Deri testlerini baskılayan, sıklıkla kullanılan ilaçlar ve bunların testten önce kesilmesi gereken süreler.....	39
Tablo 2.8.	Bazofil tanımlama ve aktivasyon belirteçleri	48
Tablo 4.1.	Hastaların Demografik Özellikleri.....	80
Tablo 4.2.	Hasta grubunun arı venom allerjen komponent test sonuçları.....	85
Tablo 4.3.	Hasta Grubunun Deri Prik, sIgE, Allerjen Komponent Test ve Bazofil Aktivasyon Test Sonuçlarının Birlikte Gösterimi.....	88
Tablo 4.4.	Hasta grubunda bal arısı allerjisinde negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel sonuçları.....	89
Tablo 4.5.	Hasta grubunda yaban arısı allerjeninin kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel sonuçları.....	92
Tablo 4.6.	Hasta grubunda bal ve yaban arısı allerjeninin birbiri ile karşılaştırmasına göre negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel sonuçları.....	95

Tablo 4.7.	Bazofil aktivasyon testi sonucu hasta grubunda bal arısı allerjeninin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsatrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63 % değerlerindeki değişimleri	97
Tablo 4.8.	Bazofil aktivasyon testi sonucu hasta grubunda bal arısı allerjeninin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsatrasyonu (K0.1, K1, K10), CD203c hücrelerin MFI değerlerindeki değişimleri	98
Tablo 4.9.	Bazofil aktivasyon testi sonucu hasta grubunda yaban arısı allerjeninin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), %CD63 değerlerindeki değişimleri	99
Tablo 4.10.	Bazofil aktivasyon testi sonucu hasta grubunda yaban arısı allerjeninin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD203c hücrelerin MFI değerlerindeki değişimleri	100

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Hymenoptera arı sokmasını takip eden allerjik semptomlar	7
Şekil 2.2.	Hymenoptera sokmalarına karşı reaksiyonların Endotipleri ve Fenotipleri.....	8
Şekil 2.3.	Hymenoptera taksonomisi	16
Şekil 2.7.	Hymenoptera venom allerjenleri	26
Şekil 2.5.	Arı venomu N-glikan yapısı.	31
Şekil 2.6.	Anti-CCD IgE'nin rekabetçi inhibisyonunun prensibi ve etkisi.	37
Şekil 2.4.	Hymenoptera venom allerjisinde tanı araçları.	43
Şekil 3.1.	Bazofil aktivasyon testi örnek hazırlama işlem basamakları.....	70
Şekil 3.2.	CD203c MFI değerlerinin kontrol tüpü ve venom allerjen türlerinde karşılaştırmalı gösterimi.	72
Şekil 3.3.	Allergen test protokol çubuğu ve venom ekstraktlarının pozitiflik bölgesi.....	77
Şekil 4.1.	Bazofil aktivasyon testinde bal arısı venom allerjeninin H7 hasta örneğinde negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (FMLP-anti-IgE) ile CD123, CD63 yüzde ve CD203c hem yüzde hem de MFI değerlerinin ve yüzde değerlerinin akım sitometri ile gösterimi.	81
Şekil 4.2.	Bazofil aktivasyon testinde arı venom titreleri ile bal arısı allerjeninin H7 hasta örneğinde CD63 yüzde ve CD203c hem yüzde hem de MFI değerlerinin akım sitometri ile gösterimi.....	82
Şekil 4.3.	Bazofil aktivasyon testinde yaban arısı venom allerjeninin H7 hasta örneğinde negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (FMLP-anti-IgE) ile CD123, CD63 yüzde ve CD203c hem yüzde hem de MFI değerlerinin ve yüzde değerlerinin akım sitometri ile gösterimi.	83
Şekil 4.4.	Bazofil aktivasyon testinde arı venom titreleri ile yaban arısı allerjeninin H7 hasta örneğinde CD63 yüzde ve CD203c hem yüzde hem de MFI değerlerinin akım sitometri ile gösterimi.	84

Şekil 4.5.	Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda bal arısı allerjeninin CD203c% değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği.....	90
Şekil 4.6.	Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda bal arısı allerjeninin CD63% değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği.....	90
Şekil 4.7.	Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda bal arısı allerjeninin CD203c MFI değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği.....	91
Şekil 4.8.	Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda yaban arısı allerjeninin CD203c % değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği.....	93
Şekil 4.9.	Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda yaban arısı allerjeninin CD63% değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği.....	93
Şekil 4.10.	Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda yaban arısı allerjeninin CD203c MFI değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği.....	94
Şekil 4.11.	Hasta grubunda CD63% değerlerinin bal arısı allerjeninin NK ve PK değerlerinin 0,1,1,10 konsantrasyonlarındaki değerlere göre karşılaştırmalı değişim grafiği	97
Şekil 4.12.	Hasta grubunda CD203c MFI değerlerinin bal arısı allerjeninin PK ve NK değerlerinin 0,1,1,10 konsantrasyonlarındaki değerlere göre karşılaştırmalı değişim grafiği	98

- Şekil 4.13.** Hasta grubunda CD63% değerlerinin yaban arısı allerjeninin PK ve NK değerlerinin 0,1,1,10 konsantrasyonlarındaki değerlere göre karşılaştırmalı değişim grafiği99
- Şekil 4.14.** Hasta grubunda CD203c MFI değerlerinin yaban arısı allerjeninin NK ve PK değerlerinin 0,1,1,10 konsantrasyonlarındaki değerlere göre karşılaştırmalı değişim grafiği100



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hymenoptera venom allerjisi (HVA), yetişkinlerde anafilaksinin en sık nedenlerinden birisidir ve sıklıkla ciddi anafilaksi ile ilişkilidir (Worm ve ark., 2014). Önemli morbiditeye ve yaşam kalitesinde bozulmaya neden olur. Allerjik reaksiyonların çoğu, Apidae ve Vespidae familyalarına ait arı türlerinden kaynaklanır. Apidea familyasının önemli temsilcisi bal arısıdır (*Apis mellifera*). Vespidae familyası, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerin'de sırasıyla yaban arıları *vespula* spp. (*vespula vulgaris*, *vespula germanica*), eşek arısı (*vespa crabro*) içerir (Bilò ve ark., 2019). Sistemik semptomlar cildi (kaşıntı, ürtiker, anjiyoödem), solunumu (stridor, nefes darlığı, öksürük, bronş tıkanıklığı), kardiyovasküler (hipotansiyon, taşikardi, aritmiler, kalp durması) ve gastrointestinal (kusma, mide ağrısı, diyare), sistemi etkileyebilir (Golden, 2015). HVA bu nedenle yaşamı tehdit eden bir allerjidir ve arı sokmasından sonra sistemik semptomlar gelişen tüm hastaların ayrıntılı bir tanıya ihtiyacı vardır. Doğru teşhis, venom immünoterapisinin (VIT) uygun şekilde yönetilmesine ve uygulanmasına olanak tanır (Golden ve ark., 2017).

HVA'nın rutin tanı testleri arasında deri prik testleri (DPT) ve venom spesifik immünoglobulin E (sIgE) düzeyinin belirlenmesi yer alır. Bütün arı venomuna karşı sIgE antikorlarının saptanması bal arısı venomunun (BAV) ana tanı yöntemlerinden biridir. Aynı zamanda, arı venomuna karşı sIgE'nin saptanması, yalnızca IgE aracılı duyarlılığın varlığının veya yokluğunun saptanmasına izin veren analitik bir ölçümdür. Hymenoptera venomuna karşı allerjide yaygın bir tanı sorunu, bal arısı ve yaban arısı venomuna özgü IgE antikorları için yapılan testlerde çift pozitifliktir. Bu tür hastalarda, gerçek ikili duyarlılık ve venom hiyalüronidaz ile karbonhidrat belirleyicilerinin olası çapraz reaktivitesi dikkate alınmalıdır (Eržen ve ark., 2009). Çift duyarlılık, ilk olarak hem BAV hem de yaban arısı venomu (YAV) allerjenlerine

karşı gerçek bir çift duyarlılığı temsil edebilir ve bu arı türlerinin her ikisinin de daha önceki sokmalarından kaynaklanabilir. Gerçek çift duyarlılığın klinik önemi hastanın geçmişine bağlıdır. İkincisi, BAV ve YAV'da bulunan çapraz reaktif homolog venom allerjenlerine karşı IgE aracılı duyarlılıktan kaynaklanabilir ve arıların herhangi birinden kaynaklanan bir sokmadan kaynaklanır. BAV ve YAV'a karşı çift duyarlılığın üçüncü ve en yaygın nedeni çapraz reaktif karbonhidrat belirleyicilerine (CCD) karşı sIgE'nin varlığıdır. Bu, BAV ve YAV'a karşı çift duyarlılığın %50'si kadarını oluşturur (Mari ve ark., 1999). Çift duyarlılaşma ve çapraz reaktivite arasındaki ayrım, suçlu arı türünü tanımayan hastalarda spesifik immünoterapi için bir allerjenin seçilmesinde kritik öneme sahiptir. Çapraz reaksiyona giren CCD'ler glikoproteinler üzerinde bulunur, bitkilerde ve hymenoptera venomunda yaygındır (Aalberse ve ark., 1981).

Bu nedenle anti-CCD IgE antikorları, bitki veya hymenoptera venom allerjenlerine karşı duyarlılığı yansıtabilir ve in vitro çift pozitif sonuçların önemli bir nedenidir. Deri testleri ve venom sIgE ile yapılan tanısal testlerde hem BAV hem de YAV'a karşı çift duyarlılık göstermektedir. Bu, suçlu arı türü bilinmediğinde immünoterapi için doğru venomun seçilmesini zorlaştırmaktadır (Leimgruber ve ark., 1993). Çoğu zaman sistemik reaksiyondan sorumlu olan arı türü tanımlanamamaktadır. Klinik olarak ilgili duyarlılıkların tespit edilememesi riskini en aza indirmek için, venom duyarlılığını doğru bir şekilde tanımlayan güvenilir tanısal testler önemlidir. Tanısal testler DPT, intradermal ve sIgE testlerini içerir. Buna ek olarak daha ileri testler olan Bazofil Aktivasyon Testi (BAT) ve allerjen komponent testleri (CRD) tanı ve tedavi de test duyarlılığını daha avantajlı hale getirebilmektedir.

BAT, bazofilleri içeren tam kan veya izole edilmiş periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) kullanılarak gerçekleştirilir. Ana mantığı allerjen veya anti-IgE stimülasyonundan kaynaklanan yüksek afiniteli IgE reseptörüne (FcεRI) bağlanan IgE antikorlarının çapraz bağlanması ile bazofillerin yüzeyindeki aktivasyon işaretleyicilerinin ekspresyonunu ölçmek için kullanılan bir testtir. Bazofilleri tanımlamak ve akım sitometrisi ile aktivasyonlarını ölçmek için kullanılacak çok sayıda farklı belirteç vardır (Vachova ve ark., 2018). CD63 ve CD203c en sık kullanılan bazofil aktivasyon belirteçleridir. CD203c ve CD63 moleküllerinin her

ikisi de bazofil granül membranlarında eksprese edilir. CD63, dinlenme halindeki bazofillerin yüzeyinde değil, yalnızca hücrelerin içindeki granüllerin zarında eksprese edilen lizozomal ilişkili bir membran proteinidir (LAMP). Granüller, degranülasyon sırasında bazofillerin plazmatik membranı ile birleştiğinde, CD63 bazofillerin yüzeyinde eksprese edilir (Foetisch ve ark., 2003). CD203c fosfodiester ve fosfosülfat bağlarını parçalayan, oligonükleotidlerin 3'-hidroksi terminallerinden 5'-nükleotidleri hidrolitik olarak uzaklaştıran bir enzimdir. Bazofillerin ve mast hücrelerinin yüzeyinde yalnızca ve yapısal olarak düşük seviyelerde eksprese edilir ve ekspresyonu hücre aktivasyonu ile artar. Bazofil aktivasyon belirteçleri, eşzamanlı olarak yukarı regüle edilen iki farklı belirteç grubu oluşturuyor gibi görünmektedir. Bazofil aktivasyonu IgE'den bağımsız bir şekilde meydana gelebilir ve allerjene aktivasyon mekanizmasını doğrulamak için BAT yapılabilir.

BAT sonuçları, tanımlanmış aktivasyon işaretleyicisini ifade eden bazofillerin yüzdesi veya ortalama floresans yoğunluğu (MFI) açısından stimülasyon indeksi, yani seçilen durumun MFI'si ile seçilen durumun negatif kontrol MFI'si arasındaki oran hesaplanarak belirlenebilir. CD63 dinlenme hücrelerinde eksprese edilmediğinden ve aktivasyondan sonraki ekspresyonu iki aşamalı olduğundan, ilki genellikle CD63 için kullanılır. İkincisi genellikle dinlenme halindeki hücrelerde ifade edilen CD203c için kullanılır ve allerjen stimülasyonunu takiben artışı tek modludur. BAT değerli bir araştırma aracıdır ve klinik açıdan yararlı bir test olarak umut vaat etmektedir.

İn vitro testlerin çok daha yüksek duyarlılığı CRD gerçekleştirilerek elde edilir. Bu yenilikçi yöntem, günümüzde giderek daha iyi bir teşhis aracı haline gelmiştir. CRD sayesinde tek allerjenik proteine karşı sIgE belirlenebilmektedir. CRD kullanılarak, tüm ekstraktlara çift pozitif sonuç veren hastalarda birincil duyarlılık ve çapraz reaktivite ayırt edilebilir (Jakob ve ark., 2017). Çoğu zaman (%75'e kadar), bal arısı ve yaban arısı venomuna karşı çifte duyarlılık, çapraz reaktif CCD'lerden kaynaklanmaktadır. Şu anda CRD testi için allerjenler, doğal olarak oluşan hymenoptera glikosilasyonu CCD'ler olmadan rekombinant allerjenler olarak üretilmektedir. CRD için ticari olarak temin edilebilen Hymenoptera allerjenleri

şunlardır: rApi m1, rApi m2, rApi m3, rApi m5, rApi m10, rVes v1, rVes v5, rPol d5. Bahsedilen rekombinant allerjenlerin tümü CCD içermeyen formdadır.

CRD'nin tanısal yetenekleri kullanıldığında, arı venomu allerjisi testlerinin duyarlılığı %94,4'e ulaşmaktadır (Köhler ve ark., 2014). BAV'a karşı allerjiye yönelik teşhis testlerinin %94-95 duyarlılığına ulaşmak için, allerjen bileşenlerinin altısı (Api m1- 5 ve Api m10) belirlenmelidir. Hastaların %74'ünde birden fazla arı venomu allerjeninin olduğu da tespit edilmiştir. YAV allerjisinde kombinasyon sayesinde %98'e varan duyarlılık gözlenmiştir (Müller ve ark., 2009). CRD araçları, BAV ve YAV allerjenleri arasındaki çapraz reaksiyonların ayırt edilmesini kolaylaştırır ve aynı zamanda çok düşük seviyelerde sIgE bulunan hastalarda tam ekstraktlara karşı daha duyarlıdır (Korošec, ve ark., 2012). Çift duyarlılaşmada CRD yöntemi faydalıdır, ancak olanakları hala sınırlıdır ve tüm belirsiz klinik vakalar için bir çözüm sağlamamaktadır. Farklı yaban arısı türlerine karşı allerji durumunda (genellikle Vespa ve Polistes arasında), CCD'lerle ilişkili çapraz reaksiyonlardan bağımsız olması nedeniyle ayırıcı tanı daha karmaşıktır (Monsalve ve ark., 2012). Bu problem kesinlikle daha fazla araştırmayı gerektirmektedir. CRD'nin teşhis yeteneklerini kullanarak arı venomu allerjisi testlerinin duyarlılığı, rutin teşhislere başka allerjenlerin (en azından Pol d1) dahil edilmesinde faydalı olabilir. CRD'nin sunduğu olanaklar, yalnızca HVA tanısının iyileştirilmesine değil, aynı zamanda daha iyi tedaviye, özellikle de VIT için uygun bir algortimanın geliştirilmesine de katkıda bulunur. Şimdiye kadar tanısal test sonuçları (CRD testleri dahil) ile arı sokması sonrası allerjik reaksiyonun şiddeti arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

VIT, gelecekteki olası arı sokmaları sonrası gelişebilecek ciddi allerjik reaksiyonlara karşı hastaları etkili bir şekilde koruyabilen tek tedavidir. VIT şu anda venom allerjileri için en iyi tedavi şeklidir çünkü daha sonraki ciddi reaksiyonların riskini azaltır. Aynı zamanda yaşam kalitesini önemli ölçüde artıran bir tedavidir. Bu nedenle VIT başarılı olabilmesi için doğru tanı oldukça önemlidir. Bugün, teşhis ve tedavinin tek bir hastanın ihtiyaçlarına göre kişiselleştirilebilmesi sayesinde daha iyi teşhis araçlarına erişilebilmiştir (Sturm ve ark., 2019). Suçlu arı venomu ile spesifik immünoterapi, BAV allerjisinde %80 ila 84 ve YAV allerjisinde %90-95 arasında değişen yüksek derecede koruma sağlar (Bilo ve Bonifazi, 2009). VIT tarafından

indüklenen koruma derecesi, ya doğal hayattaki sokmalarının oluşumu ve toleransı hakkındaki hasta bilgilerinden tahmin edilir ya da VIT alan hastaların klinik ortamda kontrollü bir arı sokulmasına tabi tutulduğu klinik verilerden elde edilir. BAV ve YAV allerjisinin tanı ve tedavisinde, yalnızca allerjik reaksiyon klinik geçmişi olan hastalara tanısal test yapılmalı ve yalnızca Hymenoptera venomuna karşı IgE aracılı duyarlılık kanıtı olanlara tanı testi uygulanmalıdır. HVA'nın güvenilir bir şekilde teşhis edilmesi çeşitli faktörler nedeniyle karmaşık hale gelebilmektedir: Genel popülasyonda yüksek oranda asemptomatik Hymenoptera venomu duyarlılığı, suçlu arı türünün tespit edilememesi veya test edilememesi, zaman içinde duyarlılık profillerinin kaybı yanlış tanıya yol açabilir (Müller ve ark., 2014).

BAT venom allerjisinin teşhisi için çok hassas ve spesifik bir yöntemdir. Yüksek özgüllüğü (%83-100) ve duyarlılığı (%85-100) antijen stimülasyonunu takiben ortaya çıkan hücresel yanıtın gerçek zamanlı ölçülebilmesinden kaynaklıdır. Ek bir test olan CRD testi de BAT kadar duyarlı ve özgül bir test yöntemidir. Özgüllüğü (%85-100) ve duyarlılığı (%94-100) dır. BAT ve CRD, in-vivo yaşanan IgE aracılı erken tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, in-vitro tüp ortamında yapabilmeyi mümkün kılar. Bu nedenle DPT ve sIgE ölçümüne göre daha kullanışlı ve etkin yöntemlerdir. Bu özelliğiyle BAT hem antijen duyarlılığının tespitini hem de VIT etkinliğinin değerlendirilmesini olağan kılar.

Bu çalışmada öykü, DPT, sIgE ölçümleri ile tespit edilen arı venom allerjisine çift duyarlılığı olan hastalarda BAT ve CRD tespiti yapılmıştır. Ayrıca, öykü ve testler ile doğrulanan arı venom allerjisi saptanan hastaların BAT ve CRD sonuçlarının karşılaştırması yapıp iki testin birbiri arasındaki tutarlılığı değerlendirilmiştir. Çalışmamızda; özellikle arı venomuna çift duyarlılığı saptanan hastalarda arı VIT seçiminde bu testlerin ne kadar önemli olabileceğinin ortaya konulması, BAT ve CRD değerlendirilmelerinin araştırma amaçlı olmaktan çıkmaya başlayıp klinik rutinde kullanımına yönelik literatüre önemli bir katkıda bulunması ve hangi yöntemin bu çifte pozitiflikte öncelikle tercih edilmesi ile ilgili çalışmaların önünü açması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Arı sokmalarına karşı gelişen allerjik reaksiyonlar ciddi morbiditeye, hatta ölüme yol açabilir. Hymenoptera venom allerjisi (HVA), suçlu arı türünün doğru bir şekilde tanımlanması koşulu ile venom immünoterapi (VIT) ile etkili bir şekilde tedavi edilebilir. Bal arısı venomu (BAV) içeren VIT'in, BAV allerjisi olan hastaların %77 ila 84'ünde, yaban arısı venomu (YAV) içeren VIT'in ise YAV allerjisi olan hastaların %91-96 etkili olduğu gösterilmiştir (Sturm ve ark., 2018).

2.1. Hymenoptera Allerjisinin Endotipleri ve Klinik Belirtileri

2.1.1. Klinik Öykü

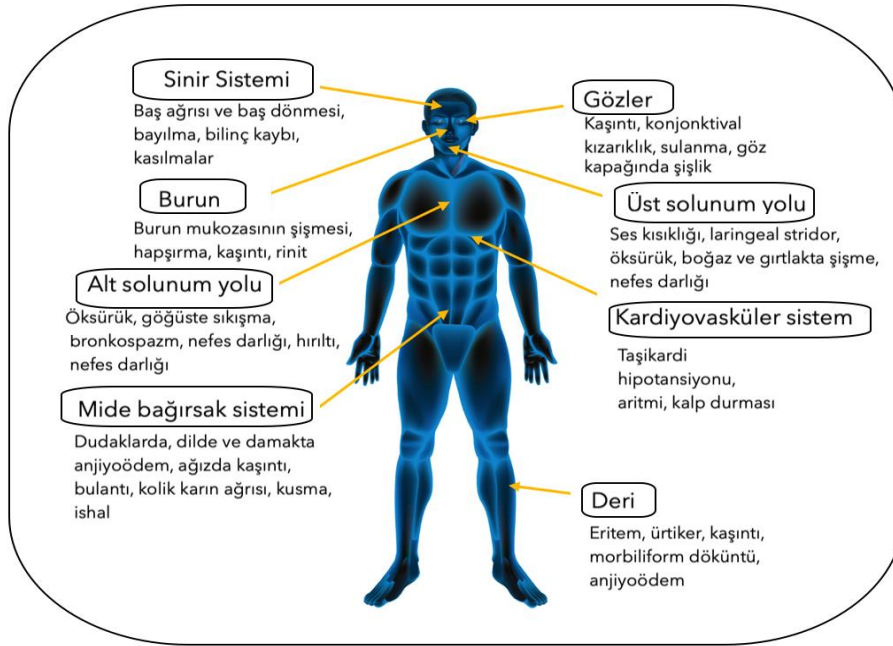
Hymenoptera venomuna karşı asemptomatik duyarlılık sıklıkla gözlemlendiğinden, önceki bir sistemik reaksiyonun klinik öyküyle doğrulanması, daha sonraki tanısal incelemeler için temel oluşturmaktadır. Kapsamlı bir klinik öykü; arı sokması reaksiyonlarının sayısı ve tarihi, semptomları, şiddeti ve reaksiyonun seyri ve uygulanan tedavi hakkında bilgileri içerir. Ek olarak, mast hücre bozuklukları, ilaçlar, kardiyovasküler riskler ve diğer hastalıkların yanı sıra ilgili arı türlerine sık sık maruz kalma gibi bireysel risk faktörleri de dikkate alınmalıdır.

Hasta geçmişinin değerlendirilmesi sırasında özel bir odak noktası, suçlu arı türünün tanımlanmasıdır. Bununla birlikte, birçok hasta farklı arı türlerini (Baker ve ark., 2014a; Baker ve ark., 2016b) ayırt edemediğinden, tüm bilgilerin dikkatle kullanılması ve sorumlu arı türünün ek teşhis testleriyle doğrulanması gerekmektedir.

Diğer hastalıklar gibi arı sokmalarına karşı reaksiyonlar da farklı endotiplere ayrılabilir; örneğin sağlıklı bireylerdeki fizyolojik arı sokma reaksiyonu, IgE ve T hücreleri aracılığıyla allerjik reaksiyonlardır. Mast hücre bozukluğu olan hastalarda venom allerjisi, asemptomatik duyarlılık ve toksik veya olağandışı reaksiyonlardır.

2.1.2. Hymenoptera Allerjilerinin Allerjik Semptomları

HVA semptomları genellikle arı sokmasından sonraki otuz dakika içinde ortaya çıkar ve sıklıkla kaşıntı, kızarıklık, ürtikeryal ve anjiyoödem gibi cilt belirtileriyle ilişkilidir. HVA'da sık görülen gastrointestinal semptomlar bulantı ve kusmadır. Ağır allerjik reaksiyonda (anafilaksi) solunum ve kardiyovasküler sistemleri içerir. Anafilaksinin karakteristik özellikleri ürtiker/anjiyoödem gibi cilt bulguları, dispne, taşikardi, hipotansiyon ve bilinç kaybıdır. İdrar ve fekal inkontinans, derin dolaşım düzensizliği ile ortaya çıkar ve ciddi sistemik reaksiyonlar kardiyorespiratuvar arrest ile sonuçlanabilir. Ürtiker gibi başlangıç deri belirtilerini kardiyovasküler veya solunumsal semptomlar takip ettiğinde HVA'nın klinik tanısı daha kolaydır. Bu karakteristik semptom gelişimi olmadığında tanı zor olabilir. Kronik spontan ürtiker, vazovagal senkop, anksiyete bozuklukları, kardiyojenik şok ve aritmiler dahil olmak üzere birçok durum HVA'yı simüle edebilir. Göz önünde bulundurulması gereken ayırıcı tanıların bir listesi (Ring ve ark., 2014) şekil 2.1. 'de gösterilmiştir.



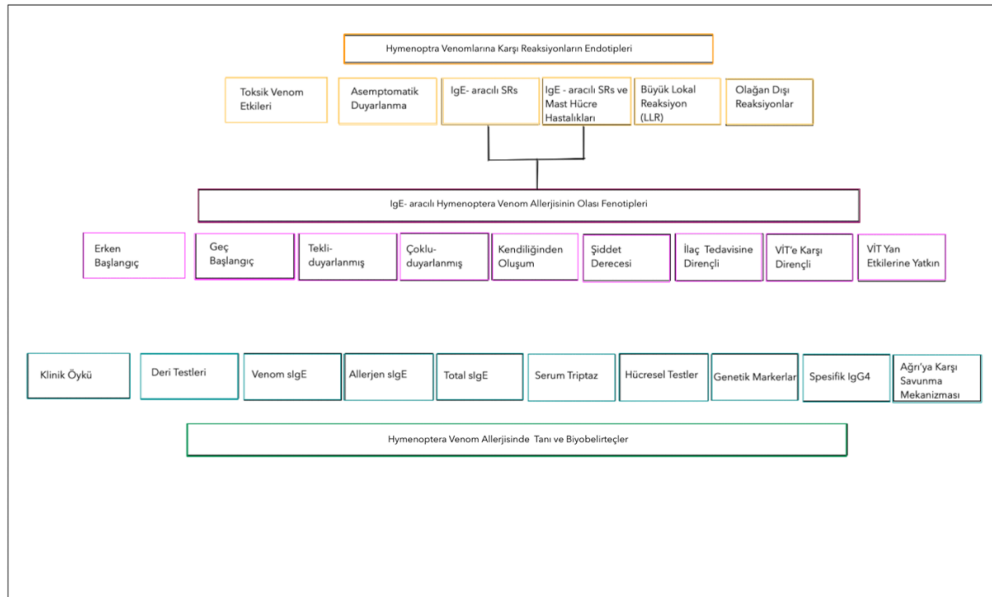
Şekil 2.1. Hymenoptera arı sokmasını takip eden allerjik semptomlar (Golden, 2015).

Suçlu arı türü açıklığa kavuşturulmalıdır. Bu nedenle hastaların suçlu arı türüne ilişkin açıklamalarına şüpheyle yaklaşmak önemlidir. Genellikle suçlu arı türünün,

iğnesinin enjeksiyondan sonra deride kalıp kalmadığına göre belirlenebileceği varsayılır. Yapısal farklılıklar nedeniyle bal arısının iğne aparatının deriye yerleşme olasılığı yaban arısına göre daha fazladır. Bununla birlikte, iğnenin deride kalıp kalmayacağı, sokma bölgesindeki cilt özelliklerinden etkilenir. İğnenin geri kalanına ilişkin bilgi gösterge niteliğindedir ancak sokan arı türünün tanımlanması için güvenilir değildir.

2.1.3. Sağlıklı Bireylerde Arı Sokma Reaksiyonu / Toksik Venom Etkileri

Genel nüfusun %56,6 ila %94,5'i yaşamları boyunca en az bir kez Hymenoptera takımına ait bir arı türü tarafından sokulduğunu belirtmektedir (Şekil 2.2.). Normal sokulma reaksiyonu ağrı ve iltihaplanmadan (şişme, kızarıklık ve kaşıntı) oluşur ve tehlikeli değildir. Bununla birlikte, bal arıları tarafından gerçekleştirilen çok sayıda sokma olayıyla sonuçlanan saldırılar, venomun toksisitesi nedeniyle insanlar için yaşamı tehdit edici olabilir. Nadir durumlarda tek orofaringeal sokma, allerjik olmayan bireylerde lokal şişlik yoluyla kritik hava yolu tıkanıklığına neden olabilir (Antonicelli ve ark., 2002; Smoley, 2002). Bu reaksiyonun orofarenkste büyük lokal reaksiyon olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği net değildir.



Şekil 2.2. Hymenoptera sokmalarına karşı reaksiyonların Endotipleri ve Fenotipleri. Hymenoptera venomuna karşı önerilen reaksiyon endotiplerinin yanı sıra IgE aracılı sistemik allerjik reaksiyonların önerilen fenotipleri de gösterilmektedir. Ek olarak reaksiyonun değerlendirilmesine yönelik mevcut teşhis araçları ve biyobelirteçler gösterilmektedir.

2.1.4. Normal Lokal Reaksiyon

Normal lokal reaksiyon arı sokmasının en yaygın belirtisidir. Sokmadan sonra hafif şişlik, kızarıklık ve ağrının ortaya çıkması ile karakterizedir. Semptomlar birkaç dakikadan birkaç saate kadar herhangi bir süre devam edebilir. Eğer sokma mukozayı (örneğin ağız) veya gevşek bağ dokusundan zengin bir alanı (örneğin göz kapakları, parmak uçları veya dudaklar) etkiliyorsa reaksiyon daha şiddetli olabilir. Ayrıca, ateş ve çevredeki lenf düğümlerinin genişlemesinin eşlik ettiği sokma yeri enfeksiyonu şeklinde komplikasyonlar da olabilir.

2.1.5. Büyük Lokal Reaksiyon

Genel popülasyonun %26'sına kadar büyük lokal sokma reaksiyonları meydana gelir ve >24 saat süren >10 cm çapındaki şişlikler olarak tanımlanır. Bazı allerjisi olan kişilerde, allerjik reaksiyonun geç evresinin neden olduğu büyük lokal reaksiyon gelişebilir. Bu, 10 cm'den büyük, 24 saatten uzun süren, sokmadan 6-12 saat sonra yoğunlaşan ve 24-48 saat sonra en büyük boyutuna ulaşan bir şişliği içerir. Şişmeye halsizlik, titreme, ateş veya baş ağrısı ya da lenfatik sistemde iltihabi bir reaksiyon eşlik edebilir. Yukarıda belirtilen değişiklikler birkaç gün içinde yavaş yavaş ve kademeli olarak düzelir. Sokma bölgesi üst solunum yolu bölgesindeyse büyük lokal reaksiyonlar hayatı tehdit edici olabilir, ancak daha sonraki sokmalarda genel reaksiyon riski önemli ölçüde artmamaktadır (Boyce ve ark., 2010). Semptomların diğer bir sınıflandırması, Mueller tarafından geliştirilen klasik dört dereceli ölçeğe göre genelleştirilmiş allerjik reaksiyonundur (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Mueller skalasına göre Hymenoptera venomuna karşı allerjinin şiddet derecesi (Fehr ve ark., 2019).

Derece	Sokma Sonrası Belirtiler
0	Yaygın lokal reaksiyon (şişlik> 10 cm kalıcı, >24 saat).
I	Şişlik, kaşıntı.
II	Yukarıda listelenen semptomlardan herhangi biri ve aşağıdakilerden en az ikisi: Quincke ödemi (tek bir semptom olarak derece II olarak kabul edilir), göğüste sıkışma, bulantı, kusma, diyare, karın koliği, baş dönmesi.
III	Yukarıda belirtilen semptomlardan herhangi biri ve aşağıdakilerden en az ikisi: nefes darlığı (tek bir semptom olarak derece III olarak kabul edilir), hışıltı (tek bir semptom olarak derece III olarak nitelendirilir), disfaji, halsizlik, yaşamı tehdit eden bir durumda olma hissi, kaygı.
IV	Yukarıda listelenen semptomlardan herhangi biri ve aşağıdakilerden en az ikisi: kan basıncında düşme, bayılma, bilinç kaybı, idrar ve dışkı tutamama, siyanoz.

2.1.6. Anafilaksi

Anafilaksinin karakteristik semptomları ürtiker/anjioödem, nefes darlığı, taşikardi, hipotansiyon ve bilinç kaybıdır. İdrar ve fekal inkontinans şiddetli dolaşım bozukluğu ile ortaya çıkar. Kalp ve solunum durması en şiddetli sistemik reaksiyonlardır. Ürtiker gibi ilk deri belirtilerinden sonra kardiyovasküler veya solunum semptomları ortaya çıktığında, HVA'a karşı gelişen anafilaksi klinik tanısını koymak daha kolaydır (Simons, 2010). BAV ve YAV allerjisinin tanı ve tedavisine yönelik güncel kılavuza göre, yalnızca arı sokması sonrasında sistemik reaksiyon klinik geçmişi olan hastalara tanısal test yapılmalı ve yalnızca Hymenoptera venomuna karşı IgE aracılı duyarlılık kanıtı olanlara tanı testi uygulanmalıdır. HVA'nın güvenilir bir şekilde teşhis edilmesi çeşitli faktörler nedeniyle karmaşık hale gelmektedir. Genel popülasyonda yüksek oranda asemptomatik Hymenoptera venomuna duyarlılığı, suçlu arı türünün tespit edilememesi veya test edilememesi, zaman içinde duyarlılık profillerinin kaybı ve onu taklit eden koşullarının tümü yanlış tanıya yol açabilir.

Hymenoptera venomuna karşı klinikle ilişkisiz duyarlılıklar genel yetişkin popülasyonun %27-40'ında ve çocukların %50'sine görülebilir. Bu nedenle arı sokmasını takiben sistemik allerjik reaksiyon ile tutarlı semptomların ortaya çıkıp çıkmadığının açıklığa kavuşturulması önemlidir.

Çoğu zaman sistemik reaksiyondan sorumlu olan arı türü tanımlanamamaktadır. Arı türü tanımlandığında, genel popülasyonun Hymenoptera'yı doğru şekilde tanımlama yeteneğinin sınırlı olduğu unutulmamalıdır. Klinik olarak ilgili duyarlılıkların tespit edilememesi riskini en aza indirmek için, venom duyarlılığını doğru bir şekilde tanımlayan güvenilir tanısal testler önemlidir (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. Anafilaksiyi taklit eden semptomlara neden olabilecek durumlar (Ring ve ark., 2014)

No	Semptomlar
1	Kardiyak aritmiler
2	Hipertansif kriz
3	Pulmoner emboli
4	Astım
5	Trakeobronşiyal tıkanıklık
6	Karsinoid sendromu
7	Feokromositoma
8	Hipoglisemi
9	Dissosiyatif bozukluklar ve dönüşüm (örn. Globus hystericus)
10	Somatoform bozukluklar (örn. psikojenikdispne, “ses teli işlev bozukluğu”)
11	Nöbet bozuklukları
12	Kalıtsal/edinilmiş anjiyoödem
13	Zehirlenme (alkol, opioidler, histaminoz)

2.1.7. Toksik (Bağışıklık Dışı) Reaksiyon

Diğer bir semptom türü, aynı anda birçok arı türü tarafından sokulan hastalarda ortaya çıkan ve semptomlarının tanımına dayanan genelleştirilmiş toksik (bağışıklık dışı) reaksiyondur. Semptomlar; rabdomiyoliz, kalp kasına zarar, karaciğer veya böbrek fonksiyon bozukluğu, hemolitik anemi, kanama diyatezi ve yaygın damar içi pıhtılaşma sendromudur. Beşinci semptom sınıflandırması çok nadir, atipik reaksiyonları içerir (örn. serum hastalığı, vaskülit veya Guillain-Barre sendromu). Anafilaksi sırasında kardiyak aritmiler ve akut koroner sendrom ortaya çıkabilir. Ayrıca, allerjik miyokard enfarktüsü (Kounis sendromu) olarak adlandırılan, damar duvarındaki mast hücrelerinden salınan aracılardan etkisi altında koroner arterlerin daralmasından kaynaklanan spesifik bir anafilaksi şekli de vardır. Çok sayıda arı sokmasından kaynaklanan serum hastalığı benzeri reaksiyonlar veya toksik reaksiyonlar gibi olağandışı Hymenoptera sokması reaksiyonları herhangi bir teşhis çalışması gerektirmez (Przybilla ve ark., 2011) (Tablo 2.1.5.).

2.1.8. İmmünoglobulin E (IgE) Aracılı Sistemik Reaksiyonlar

Allerjik bireylerde tek bir sokma, ciddi ve ölümcül reaksiyonlara yol açabilmektedir. Bu IgE aracılı reaksiyonlar, duyarlılığın ilk adımına bağlıdır. Sokma yoluyla venomla karşılaşma sırasında venom allerjenleri vücuda girer. Dendritik hücreler, B hücreleri veya makrofajlar gibi antijen sunan hücreler, allerjenleri saf CD4+ T hücrelerine dahil eder, işler ve ardından sunar. Bu T hücreleri ya Th1, Th2 ya da Th17 efektör hücrelerine farklılaşır ya da düzenleyici T hücreleri (Treg) olarak düzenleyici bir işlev üstlenir. B hücresi sınıfı değişimi ve IgE üreten plazma hücrelerine farklılaşma, olgun Th2 hücreleri tarafından salgılanan IL-4 ve IL-13 sitokinleri tarafından indüklenir. Duyarlılaşmanın ardından, mast hücrelerinin yüzeyindeki yüksek afiniteli IgE reseptörü (FcεRI) ve allerjene özgü IgE antikorları yüklü bazofiller, allerjenlerle daha sonraki bir karşılaşma sırasında çapraz bağlanırsa gerçek allerjik reaksiyon meydana gelebilir. Bu da mast hücrelerinin ve bazofillerin degranülasyonuna ve histamin, proteazlar, sitokinler ve lipid araçları gibi proinflamatuvar bileşiklerin salgılanmasına yol açar. İmmünolojik aktif bileşiklerin bu karışımı duyarlı hastalarda allerjik semptomların tetiklenmesine yol açar (Blank ve ark., 2010).

Sistemik reaksiyonlar; hafif (ürtiker veya anjiyoödem gibi genel cilt semptomları), orta (örn. dispne, gastrointestinal semptomlar veya baş dönmesi) veya şiddetli (örn. bilinç kaybı, anafilaktik şok, solunum veya kalp durması) olabilir. Dikkat edilmesi gereken nokta, iki farklı zamandaki sokma reaksiyonlarının şiddeti arasında gerekli bir korelasyonun bulunmadığıdır. Daha önce HVA öyküsü olmayan duyarlı kişilerde sistemik reaksiyon riski %3,3 ile %5 arasındadır (Sturm ve ark., 2015).

En kötü sistemik reaksiyon olan anafilaksi, en az iki organ sisteminin etkilenmesi ile karakterizedir. En sık etkilenen organlar deri ve mukoza olup bunu kardiyovasküler sistem takip etmektedir. Hastaların üçte birinde gastrointestinal semptomlar ortaya çıkar. Tüm anafilaksi vakalarının %0,7 ila %2'sinin fatal olduğu ve arı sokmalarına bağlı anafilaktik ölümlerin çoğu vakada maruziyetten sonraki 15-20 dakika içinde meydana geldiği rapor edilmiştir. Sistemik reaksiyonlar genellikle sokmadan 10 ila 30 dakika sonra başlar ancak aynı zamanda daha hızlı (örneğin mast hücre bozukluğu olan kişilerde) veya daha yavaş (1-4 saat) ortaya çıkabilir. Ancak ikinci durumda

yaşamı daha az tehdit eder. Semptomların şiddeti; mast hücre bozuklukları, fiziksel efor, erkek cinsiyet veya ileri yaş gibi farklı risk faktörleri tarafından artırılabilir (Pumphrey, 2004; Worm ve ark., 2018).

2.1.9. Eşzamanlı Mast Hücre Bozukluğu Olan Hastalarda IgE Aracılı Reaksiyonlar

Mastositoz gibi mast hücre bozuklukları, Hymenoptera venomuna karşı ciddi allerjik reaksiyonlar için bir risk faktörüdür. Mastositoz, mast hücrelerinin deri, kemik iliği ve diğer dokularda çoğalması ve birikmesi ile karakterize, klonal ve heterojen (kutanöz, sistemik ve nadir alt tipler) bir hastalıktır. Mastositoz sıklıkla somatik c-kit D816V mutasyonunu ve yüksek serum triptaz seviyelerini içerir (Valent ve ark.,2007). HVA'lı hastalarda mastositoz prevalansı %7,9'a kadar çıkabilir ve bu oran genel popülasyona göre anlamlı derecede yüksektir. Benzer şekilde HVA mastositozlu hastaların yaklaşık %30'unda anafilaksiye neden olur. Daha yüksek insidansa ek olarak, mast hücre bozuklukları ile arı sokmasına bağlı anafilaksi şiddetinin artması arasında güçlü bir ilişki olduğuna dair ikna edici kanıtlar da vardır. Sistemik mastositozlu hastalarda anafilaktik reaksiyonlar, vakaların çoğunda anjiyoödem ve eritem olmaması ve bilinç kaybına yol açan hipotansiyon gibi kardiyovasküler semptomların baskın olması ile karakterize edilir. İspanyol Mastositoz Ağı (REMA), cilt lezyonları yokluğunda mast hücre aktivasyonu semptomlarıyla başvuran hastalar arasında sistemik mastositozu öngörmek için hem yüksek duyarlılık hem de özgüllük ile ilişkili basit bir klinik skor oluşturmuş ve doğrulamıştır. Mastositoz hastalarında anafilaktik reaksiyonlarının, mast hücresi degranülasyonunun potansiyel farmakolojik mekanizmaları nedeniyle sIgE (Alvarez-Twose ve ark., 2012; Gonzalez-de-Olanove ark., 2011) yokluğunda da ortaya çıktığı daha önce düşünülmüştür. Ancak tanısal çalışmalarda yeni değerlendirme yöntemleri ve parametrelerinin kullanıma sunulmasıyla bu tarihi tanısal boşluk kapatılmış ve hastaların büyük çoğunluğunda sIgE tespit edilebilmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, YAV allerjisi olan mastositoz hastalarında, özgüllükte belirgin değişiklikler olmaksızın pozitif sIgE tespiti için cut-off (kesme) değerinin düşürülmesiyle tanısal duyarlılığın iyileştirilebileceğini göstermiştir (Vos ve ark., 2015). Burada 0,17 kUA/l'lik bir kesim kabul edilebilir bir duyarlılık ve özgüllük vermiştir (sırasıyla %83,6 ve %85,0). Gerçekten de mast hücre hastalıklarının

varlığına bakılmaksızın, 0,1 ila 0,35 kUA/l arasındaki sIgE düzeylerinin, klinik öyküsü açık olan hastalarda anlamlı olduğu düşünülmelidir. Başlangıç sistemik reaksiyonları şiddetli olan ve mastositozu olan ve/veya serum triptaz yüksekliği (>11,4 ng/ml) olan hastalarda VIT daha az koruyucu olabilir. Bu nedenle güvenlik açısından bu hastalarda sürenin uzatılması gerekir; ömür boyumu verilmesi gerektiği ya da hangi tedavi süresinden sonra kesilmesi gerektiği belirsizliğini korumaktadır.

2.1.10. Aseptomatik Duyarlanma ile Gelişen Reaksiyonlar

Popülasyonun %9 ila %29'u, daha önce herhangi bir klinik sokma reaksiyonu öyküsü olmaksızın Hymenoptera venomuna karşı duyarlı hale gelmiştir. İlginçtir ki, sIgE'nin varlığı mutlaka klinik olarak anlamlı venom allerjisi anlamına gelmez. Bu hastaların çoğunda duyarlılığın aseptomatik olması muhtemeldir ve dolayısıyla klinik önemi yoktur. Ancak gelecekteki bir sokmaya tepki verme olasılığı tamamen göz ardı edilemez. Bugüne kadar bu vakaların nasıl etkili bir şekilde yönetileceğine dair hiçbir gösterge mevcut değildir (Blank ve ark., 2018).

2.1.11. Olağandışı Reaksiyonlar

Hymenoptera sokmalarına karşı iyi tanımlanmış allerjik reaksiyonlara ek olarak, son derece nadir ve olağandışı çeşitli reaksiyonlar meydana gelebilir. Örnekler arasında serum hastalığı benzeri belirtiler, trombositopenik purpura, hemolitik anemi, Schönlein-Henoch purpurası, Guillain-Barré sendromu, vaskülit, glomerülonefrit ve demiyelinizasyona bağlı nörolojik komplikasyonlar sayılabilir (Reisman, 2005). Bu alışılmadık reaksiyonların çoğunun patogenezi belirsizliğini koruyor ancak toksik, otoimmün ve tip II ve III aşırı duyarlılık reaksiyonlarını kapsayabilir.

2.2. Hymenoptera Takımı ve Özellikleri

2.2.1. Hymenoptera

Hymenoptera arı grubu Apidae ve Vespidae alt gruplarını ve ayrıca bu incelemenin kapsamı dışında kalan Formicidae'yi içermektedir. Apidae, *Apis mellifera* (bal arıları) ve Bumble bee (*bombus* arıları) türlerini içerir. Vespidae, *Vespula* spp. *Vespula vulgaris* (yaban arısı) ve *Polistes* türlerini (kâğıt yaban arısı) içerir (Krishna ve ark., 2011; Tan, 2013). Bal arısı sokmaları daha fazla venom enjekte ederler. Bal

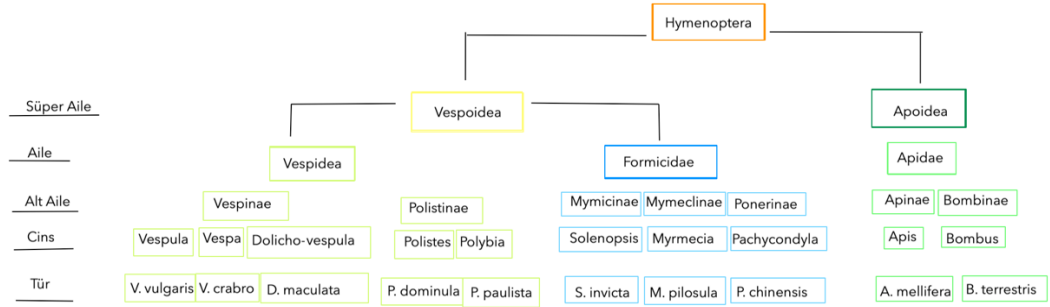
arıları 50-140 mikrogram venom enjekte ederken yaban arısı her sokmada yaklaşık 3 mikrogram venom verir. Bal arılar bir kez sokabilir ama yaban arısı birden çok kez sokma kapasitesine sahiptir. HVA lokal, büyük lokal (>10 cm çapında), sistemik reaksiyonlar ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden anafilaktik reaksiyonlara neden olabilir (Ludman ve Boyle, 2015) (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. Bal ve yaban arıları arasındaki ayırıcı özellikler

Bal Arısı (<i>Apis mellifera</i>)	Yaban Arısı (<i>Vespula spp.</i>)
Kovanın dışında oldukça sakin	Oldukça agresiftir
İlkbahar ve yaz mevsiminde görülür	Yaz ve sonbahar mevsiminde görülür
İğne ve venom kesesini genellikle ciltte bırakır	İğne ve venom kesesini genellikle ciltte bırakmaz
Kovan çevresinde ve çiçeklerin etrafında görülür	Yiyeceklerin ve çöplerin çevresinde görülür

Venom allerjisinin teşhisinde temel unsur, hastayı sokan arı türünün tanımlanmasıdır. Bu nedenle Hymenoptera arı türlerinin taksonomisini bilmek görüşlerini ve özelliklerini belirlemek önemlidir (Tablo 2.3. ve Şekil 2.3.). Avrupa'da arı sokmalarından sonraki allerjik reaksiyonların çoğu, Apidae ve Vespidae familyalarına ait arı türlerinden kaynaklanır. Çok nadiren Formicidae familyasından kaynaklanan allerjik reaksiyonlar görülebilir. Şekil 2.3.' de hymenoptera taksonomisi gösterilmiştir.

Hymenoptera venomuna karşı allerjik reaksiyonların, çeşitli biyobelirteçler ve tanı araçları (Şekil 2.7.) yoluyla atanabilen farklı endotipler ve fenotipler halinde sınıflandırılması, hastalar için bireysel risk sınıflandırmasına ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerine olanak tanır



Şekil 2.3. Hymenoptera taksonomisi

2.2.2. Hymenoptera Venomu ve Epidemiyolojisi

Hymenoptera venomu arıların karın boşluğunda bulunan bezler tarafından salgılanır. Arılar ve diğer türler venomu çoğunlukla yırtıcı hayvanlara karşı savunma amacıyla kullanırlar. Dolayısıyla Hymenoptera venomu davetsiz misafirin vücudunu etkileyen farklı biyoaktif moleküllerin karmaşık karışımlarıdır. Bu kokusuz, şeffaf ve asidik sıvılar biyojen aminler, bazik peptidler ve proteinlerden oluşur ve bunların çoğu enzimatik aktiviteye sahiptir. Ayrıca venomlar; şekerler, fosfolipitler, feromonlar, uçucu bileşikler içerir ve yaklaşık %80'i sudan oluşur (Khalil ve ark., 2021). Şu ana kadar incelenen en iyi Hymenoptera venomu BAV'dır. Arı venomunda bulunan birkaç yüz protein ve peptid tanımlanmış olmasına rağmen, tam bileşimi hala tanımlanmamıştır. Şimdiye kadar BAV'ın en az 18 bileşiğinin biyolojik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Abd El-Wahed ve ark., 2019). Bunlar arasında venoma maruz kaldıktan sonra ortaya çıkan allerjik reaksiyonlardan sorumlu olan 12 allerjen bulunmaktadır. Diğer Hymenoptera arı türlerinin venomlarında; *Vespula vulgaris* ve *Polistes dominula* venomlarında beş allerjen ve *Vespa Crabro* ve *Bombus terrestris* venomunda iki allerjen tespit edilmiştir.

Yaşam boyunca Hymenoptera arı türleri tarafından sokulma prevalansı erişkinlerde %56,6 ile 94,5, çocuklarda ise 14 yaşına kadar %37,5 arasında değişmektedir. Pozitif deri prik testi (DPT) veya sIgE pozitifliği ile gösterilen duyarlılık oranı yetişkinlerde %9,3 ile %28,7 arasında değişmektedir. Bir çalışmada çocuklarda DPT ile

Hymenoptera arı türlerine (çoğunlukla bal arısı) %3,7 pozitiflik tespit edilmiştir (Jennings ve ark., 2010).

Avrupa'daki epidemiyolojik çalışmalarda sistemik sokma reaksiyonlarının oranı erişkinlerde %0,3 ile %7,5 arasında değişmektedir. Bu reaksiyonlar arasında anafilaktik şok sıklığı %0,6 ile %42,8 arasındadır (Novembre ve ark., 1998). Sistemik reaksiyonların %70 kadarında solunum ve kardiyovasküler semptomlar ortaya çıkabilir. Bu geniş aralık, anafilaksin tanımı konusunda fikir birliğinin olmayışını, veri toplama tekniklerindeki farklılıkları ve farklı iklim koşullarında arı sokmalarına maruz kalma derecesinin değişkenliğini yansıtmaktadır. Çocuklarda sistemik reaksiyonların görülme sıklığı çok daha düşük olup %0,15 ile %3,4 arasında değişmektedir (Novembre ve ark., 1998). Ayrıca çocuklarda sistemik reaksiyonların yaklaşık %60'ı hafiftir ve sadece ciltle sınırlıdır.

Arıcılar, bal arısı sokmalarına karşı allerjik reaksiyonların gelişmesi açısından hassas ve yüksek riskli bir popülasyondur. Bunda spesifik grupta sistemik reaksiyon oranları genel popülasyona göre daha yüksektir ve %14 ile %38 arasında değişmektedir. Yılda 200'den fazla arı sokmasına maruz kalmak sistemik reaksiyona karşı neredeyse tamamen koruyucu iken, yılda 25'ten az sokmaya maruz kalmak %45'lik bir sistemik reaksiyon oranıyla ilişkilidir (Muller, 2005).

2.2.3. Bal Arısı Venomu Allerjenleri

Dünya Sağlık Örgütü'nün Allerjen İsimlendirme Alt Komitesi (WHO/IUIS), bilinen allerjenleri sınıflandırmak için bir yöntem oluşturmuştur. Bu sistem cinsin ismine, belirli bir allerjenin izole edildiği türe ve sırayla rapor edilen allerjenleri işaretlemek için kullanılan numaraya dayanmaktadır. Bal arısından (*Apis mellifera*) elde edilen toplam 12 allerjenik fraksiyon bilinmektedir ve bunlar WHO/IUIS'un resmi allerjen veri tabanında bulunabilir. Bu allerjenlerin 11 kadarı arı venomundan gelir (Api m1-10, Api m12), iki allerjenik izoform ise arı sütü üreten bezlerden gelen arı salgılarından elde edilir (Api m 11a(0101) ve Api m 11b(0201)). Arı venomu bezleri, proteinler, peptitler, amino asitler, fosfolipitler, şekerler, biyojen aminler, uçucu bileşikler, feromonlar ve %80'e yakın su içeriği içeren bileşiklerin karmaşık bir karışımı olan venom üretir (Hossen ve ark., 2016).

BAV proteinlerinin bileşimi, en az 113 tanımlanmış protein ve peptidi içermektedir. Bu kompleksite, N-glikosilasyon bölgeleri ve proteinlerin heterojenliği (örn. Api m1 veya Api m6) (Blank ve ark., 2011; Peiren ve ark.;2006) tarafından daha da arttırılır. Arı venomunun allerjenik bileşenleri, molekül ağırlığı 3 ila 200 kDa arasında değişen enzimler ve glikoproteinlerdir. BAV aynı zamanda lokal toksisite gösteren feromonlar ve peptidler de dahil olmak üzere çok sayıda küçük moleküllu madde içerir. Biyolojik rolleri açısından, venomda tanımlanan allerjenler majör ve daha zayıf allerjenlere ayrılır; allerjik kişilerin %50'sinden fazlasının, venomun belirli bir bileşeni için pozitif sIgE antikorlarına sahip olacağı varsayılarak, bunlar arasında ayırım yapılmasına yönelik bir kriter olarak kabul edilir (Alvarez-Cuesta ve ark., 2006). Feromonlar iletişim için kullanılan bileşiklerdir (örn. diğer arılara yakın tehlike ve kendilerini savunma ihtiyaçları hakkında bilgi aktarırlar). Öte yandan, BAV'un ana bileşeni hyaluronidaz asit, fosfataz ve fosfolipaz A2 gibi enzimatik proteinlerin yanı sıra melittin, secapin, MCD-peptid, apamin (bir nörotoksin olan) gibi peptitler ve enzimatik olmayan proteinler prokamin ve miniminden oluşur. Allerjik reaksiyonlar açısından bakıldığında: fosfolipaz A2 (Api m1) sitotoksik etkiye sahip bir enzimdir. Hyaluronidaz (Api m2), asit fosfataz (Api m3) ve melittin (Api m4) kalp atış hızını uyarabilen ve olumsuz yönde etkileyebilen hemolitik özelliklere sahip enzimlerdir. BAV'ın diğer bileşenleri arasında vazoaktif aminler bulunur bunlar sırasıyla ağrıya neden olan ve kan basıncını düşüren histamin, lokal olarak yüksek sitotoksik potansiyele sahip olan ve birden fazla arı sokması durumunda kapsamı artabilen dopamin ve katekolaminler. Potansiyel glikosilasyon bölgelerinin sayısı da dahil olmak üzere hymenoptera allerjenlerine genel bakış Tablo 2.4.'de sunulmuştur.

Başlıca Apidae venomu allerjenleri şunları içerir (Burzyn' ska ve Piasecka kwiatkowska, 2021):

- **Api m1:** BAV'ın ana allerjenlerinden biri olan yaklaşık 16 kDa moleküler ağırlığa sahip bir enzim proteini olan bir fosfolipaz A2'dir (EC: 3.1.1.4) (kısa adı: bvPLA2). BAV'ın kuru ağırlığının %10-12'sini fosfolipaz A2 oluşturur ve bilinen en aktif fosfolipazdır. Fosfolipaz A2, 128 amino asit kalıntısından oluşan tek bir zincirden oluşur ve bağlı karbonhidrat kalıntıları içerir. Bu proteinin venoma salgılanması

mevsimsel bir düzen izler. Bu varyasyon melittin varyasyonu ile senkronizedir (yani üretimleri aynı hızda artar) (Ferreira ve ark., 2010). Api m1'in allerjik etkisi hücre zarı lipidlerinin parçalanmasında rol oynayan bir enzimin aktivitesiyle ilişkilidir. Salgılanan fosfolipaz A2 enzime uygun üçüncül yapısını stabilize eden yaklaşık 6-8 disülfid köprüsü içeren, moleküler ağırlığı 14 ila 18 kDa olan enzim proteinleridir (Cezmi ve Mubeccel, 2011). Fosfolipaz A2, 3-sn-fosfogliceridlerdeki 2-asil gruplarının kalsiyuma bağımlı hidrolizini katalize eden asil hidrolazlara aittir. Bu reaksiyon sırasında yağ asitleri (örneğin araşidonik asit) ve lisofosfolipid oluşarak hücre zarı yapısının bozulmasına neden olur. Bu enzimler merkezi sinir sisteminde ikincil haberciler olarak görev yapabilen araşidonik asit metabolitleri gibi hücre içi eikosanoid sinyal moleküllerinin oluşumundan sorumludur. Salgılanan fosfolipazlar ayrıca endositoz ve ekzositoz sürecinde ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde rol oynar. Fosfolipazların enzimatik aktivitesinin etkisi altında membran fosfolipidlerinin hidrolizi meydana gelir ve membran potansiyelini kaybederek Ca^{2+} iyonlarına karşı geçirgen hale gelir. Sitoplazmada Ca^{2+} iyonlarının konsantrasyonundaki bu artış mitokondriyal fonksiyonda bozulmalara neden olur. Arı venomuna allerjisi olan bireylerin %97'sinin serumunda Api m1'e sIgE antikorları mevcuttur. Api m1, test edilen bal örneklerinde tanımlanan ilk allerjenik fraksiyondur (Erban ve ark.,2019).

- **Api m2:** WHO/IUIS sınıflandırmasına göre 44 kDa moleküler ağırlığa sahip, hyaluronidaz aktivitesi gösteren ve 382 amino asit içeren bir protein olan hyaluronidazdır (EC: 3.2.1.35) (kısa adı: Hya). Api m2 BAV'ın kuru ağırlığının yalnızca %1-2'sini oluştursa da ikinci ana allerjeni olarak kabul edilir. Hyaluronidazlar hyaluronik asidin parçalanmasından sorumlu olan dolayısıyla bağ dokusunun geçirgenliğini artıran ve vücut sıvılarının viskozitesini azaltan böylece toksinlerin ve enjekte edilen sıvıların yayılmasını kolaylaştıran enzimlerdir. Hymenoptera venomunda bulunan hiyalüronidaz anafilaktik şok da dahil olmak üzere allerjik reaksiyonlara neden olabilir. Arı venomu allerjisi olan popülasyonun yaklaşık yarısında hyaluronidaza özgü IgE antikorları vardır. Bal ve yaban arısı hiyalüronidazının yapılarının benzerliğinden dolayı bu allerjen her iki arı türünün venomuna karşı yönlendirilen sIgE antikorları ile çapraz reaksiyonların ana nedenidir (Marković-Housley ve ark., 2000). Ancak bazı yazarlara göre, BAV ve YAV

arasındaki IgE antikorlarının çapraz reaktivitesi, hyaluronidazların benzer yapısından değil daha ziyade BAV ve YAV tarafından salgılanan çapraz reaksiyona giren çapraz reaktif karbonhidrat belirleyicileri (CCD) ile reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Hymenoptera venomuna allerjisi olan kişilerde anti-CCD IgE insidansı genellikle %20'den fazladır. Yaban arısı hiyalüronidazı iki izoformda mevcuttur: Ves v2.0101 ve Ves v2.0201.

- **Api m3:** Fosfomonoesteraz olarak da bilinen histidin asit fosfataz ailesine (EC: 3.1.3.2) ait asidik ortamda optimum aktivite sergileyen 43 kDa ağırlığında bir protein olan venom asit fosfataz Acph-1'dir (pH 4,4-4,8). İlk kez 1960'lı yıllarda Benton tarafından BAV'u tanımlanmıştır. Allerjen 373 amino asit içerir ve 3 potansiyel N-glikosilasyon bölgesi ve 2 disülfid bağı içerir (Grunwald ve ark., 2006). Proteinin izoelektrik noktası 5.64'tür. BAV da tespit edilen asit fosfataz, yüksek sıcaklıklara dayanıklı asidik bir proteindir. Hyaluronidaza (Api m 2) benzer şekilde arı venomunda da az miktarda bulunur ve venomun yalnızca %1-2'sini oluşturur. Asit fosfataza karşı antikorlar, allerjisi olanların %60'ında tespit edilir. Asit fosfataz, fosforik asitin monoesterlerinin ve anhidritlerinin hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Api m1 ve Api m2 en güçlü venom allerjenlerinden biri olarak kabul edilir. Asit fosfataz, duyarlı bazofilleri histamin salmaları için uyabilir, ancak etkisinin mekanizması tam olarak açıklanmamıştır (Hoffman, 2006).

- **Api m4:** Api m4 bir melittindir (kısa adı: MEL/MLT) [1.C.18.1.1], hidrofobik yapıda (hidrofilik C terminali hariç) 3 kDa'lık düşük moleküler ağırlığa sahip sitotoksik 26 amino asitli bir peptiddir. Trans konformasyonunun ana form olduğu 56-Leu-Pro-57'deki cis-trans izomerizasyonundan dolayı iki formda bulunur (Brown ve ark., 1980). Melittin, güçlü hemolitik ve antimikrobiyal aktiviteye sahip, arı venomunda bulunan ana toksindir. Arı venomunun ağırlığının ana bileşenidir ve kuru ağırlığının yaklaşık yarısını (%40-60) oluşturur. Api m4, fosfolipaz A2 veya hyaluronidazinkinden çok daha düşük allerjenik özelliklere sahiptir. Melittin, hücre zarlarının lipid tabakasına etki eder ve güçlü litik özelliklere sahiptir. Bu peptid fosfolipaz A2 ile sinerjistik etki gösterir. Melittin, lipid çift katmanına bağlanarak yapısını bozar bu da membran fosfolipidlerinin fosfolipaz A2'nin enzimatik etkisine duyarlı olmasına neden olur. Sonuç olarak bu fosfolipidler hücre lizisine neden olur

(eritrosit hemolizinden sorumludurlar). Api m4 aynı zamanda ağrıya neden olan ana bileşiktir. Plazma zarı fosfolipaz A2'yi aktive etme yeteneği ve gözenek oluşturu aktivitesi nedeniyle birincil nosiseptör hücrelerini doğrudan ve dolaylı olarak aktive ederek ağrıya neden olur (Chen ve ark., 2016). Arı venomu tam olarak melittin varlığından dolayı bakteriyostatik ve bakteri yok edici özelliklerle karakterize edilir. Aynı zamanda arı sokma bölgesindeki lokal inflamasyon ve ağrı hissinden de sorumludur. Bu proteinin venoma salgılanması mevsimsel bir düzen izler. Bu varyasyon fosfolipaz A2 varyasyonu ile senkronizedir (yani üretimleri aynı oranda artar). Arı venomuna allerjisi olan hastaların %25-50'sinin serumu Api m4'e karşı antikorlar içerir (Hoffman, 2006). Api m4 analiz edilen bal türlerinden yalnızca birinde tespit edilmiştir.

Api m5: Api m5 dipeptidil peptidaz IV aktivitesine sahip, molekül ağırlığı 100 kDa olan bir proteindir. Bu enzimin YAV'da (*Vespula vulgaris*) bulunan enzime yapısal benzerliğinden dolayı Ves v3 adını alır ve arı türleri arasındaki allerjenik çapraz reaksiyonların (hyaluronidazdan sonra) ikinci en yaygın nedenidir (Hoffman, 2006). Dipeptidil peptidaz IV, arının venöz kanalında promelitin melittine dönüştürülmesinden ve arı sokmalarını takiben bağışıklık hücrelerinin kemotaktik aktivitesinin modüle edilmesinden sorumludur. Allerjen C olarak da bilinen Api m5'in, çoğu BAV allerjisi olan hastalarda sIgE tarafından tanınan başka bir majör allerjen olması muhtemeldir. Ancak Api m1, Api m2, Api m3 ve Api m4 dahil olmak üzere diğer önemli arı venomu allerjenleriyle çapraz reaksiyona girmez (Wachinger ve ark., 1992). Ves v3 ve Pol d3 ile yüksek çapraz reaktivite gösteren başlıca allerjenlerdir.

Antijen 5: Antijen 5 neredeyse tüm Vespoidea arı türlerinin venomunda bulunan bir allerjendir. Ves v5 yaban arısı ve Pol d5 kağıt eşek arısı venomunda bulunur. İşlevi henüz bilinmiyor. Ancak oldukça allerjen olduğu ve çapraz reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Antijen 5, BAV ve YAV allerjisini ayırt etmek için allerjen komponent testi için anahtar bir unsurdur (Blank ve ark., 2020).

Diğer Apidae venom allerjenleri küçük allerjenlerdir:

Api m6: Arı venomunun kuru ağırlığının yalnızca %1-2'sini oluşturur ve arı venomunun en zayıf allerjenlerinden biri olarak kabul edilir. Çünkü bu allerjene karşı sIgE antikorlarının varlığı, venom allerjisi olan insanların kan serumunda %40'tan azında bulunur (Brown ve ark., 1980). Bir serin proteaz inhibitörünün aktivitesine sahip, 8 kDa'lık bir kütleyle, düşük moleküler ağırlığa ve 4 izoformdan (Api m6.01 ile 6.04) oluşan 9.7 izoelektrik noktaya sahip bazik bir proteindir. Bu allerjenin bireysel izoformları, 67 amino asitten oluşan karakteristik bir merkezi diziliş ile benzer molekül ağırlıklarına ve birincil yapılarına sahiptir. Amino ve karboksil terminallerinde bulunan 6'ya kadar amino asit bakımından farklılık gösterirler. Polipeptit zincirinde, 5 disülfid bağı oluşturan ve sIgE tarafından tanınan bir epitop olan kanonik inhibitörlerin döngü karakteristiğini stabilize eden 10 sistein kalıntısı vardır. Arı venomundan tüm Api m6 izoformları eşmolar miktarlarda bulunur ve allerjik reaksiyonlarda benzer bir rol oynar (Michel ve ark., 2012). Varsayılan proteaz inhibitörüdür. Venomun kuru ağırlığının yalnızca %1-2'sini temsil eder ve en zayıf arı venomu allerjenlerinden biri olarak kabul edilir.

Api m7: Proteaz aktivitesine sahip 39 kDa moleküler ağırlıklı bir proteindir. Zincir serin proteaz benzeri (SPL) ve CUB alanı (CUB-proteaz) olmak üzere iki alan oluşturan 245 amino asitten oluşur. Api m7'nin yapısı, CUB alanının doğal substratlarla etkileşime girdiğini, SPL alanının ise zimojenleri aktive etme olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Api m7 yüksek IgE bağlanma aktivitesi gösterir. Arı venomu allerjisi olan kişilerin serumlarının %80 kadarı, 39 kDa fraksiyonuyla immünoreaktiviteyi doğrulamıştır (Winningham ve ark., 2004). Ek olarak, test edilen tüm bal türlerinde Api m7 (CUB serin proteaz) analoglarının varlığını gösteren bir analiz yapılmıştır (Simons, 2010).

Api m8: 70 kDa moleküler ağırlığa sahip B tipi karboksilesteraz/lipaz ailesine ait bir karboksilesteraz-6'dır (EC: 3.1.1.1). Proteini 536 amino asitten oluşur 4 pozisyonda glikozile edilir ve ayrıca iki disülfid köprüsüne sahiptir. Api m8 arı venomunun ihmal edilebilir bir kısmıdır ve %1'den azını oluşturur ve işlevi henüz tam olarak açıklanmamıştır (Matysiak ve ark., 2013). Öte yandan arı venomuna allerjisi olan 28 kişiden alınan serum numunelerinin %46'sı, rApi m8.0101 ile reaksiyona giren IgE içermektedir. (Api m8 Allergen Details. (Erişim tarihi: 23 Eylül 2023)).

Api m9: S10 peptidaz ailesine ait bir venomlu serin karboksipeptidazdır (EC: 3.4.16.5). Protein 449 amino asitten oluşur ve 5 N-glikosilasyon bölgesine sahiptir (Venom Serine Carboxy peptidase Precursor Apis Mellifera (Honeybee). (Erişim Tarihi: 23 Eylül 2023). Api m9'un immünojenik özelliklerine ilişkin bilgi bulunmamaktadır.

Api m10: İlk olarak Peiren ve arkadaşları tarafından tanımlanan, 223 amino asitten oluşan, moleküler ağırlığı 50-55 kDa olan glikoproteindir. Api m10 için önerilen isim, Yunan mitolojisindeki "Icarus" ile cins adı "Apis"i birbirine bağlayan ve onun kararsız doğasını ve hızlı bozunmasını gösteren yapay bir terim olan icarapine'dir (VanVaerenbergh ve ark., 2015). İcarpin, karbonhidrat açısından zengin olan bu protein, yalnızca arı venomu allerjisinin teşhisinde değil aynı zamanda immünoterapide de taşıdığı önem nedeniyle önemli bir allerjen olarak tanımlanmaktadır. Ek olarak, çapraz reaksiyona giren CCD bikarbonat kalıntılarından bağımsız aktiviteye sahip bir allerjendir bu da onu arı venomu allerjisinin tanısında kullanılacak potansiyel olarak çok önemli bir unsur haline getirmiştir. Api m10'un en iyi bilinen iki izoformu varyant 1 ve 2'dir; bunların her ikisi de CCD'lerden bağımsız IgE reaktivitesini gösterir. Venom bezinde bulunan ilave yedi Api m10 allerjen izoformu yakın zamanda tanımlanmıştır (VanVaerenbergh ve ark., 2015). VIT, bazı terapötik ekstraktlarda yeterince temsil edilmemesi nedeniyle Api m10'a allerjisi olan hastalarda etkisiz olabilir.

Api m11: İki izoformda oluşur: 65 kDa moleküler ağırlığa sahip majör arı sütü proteini (MRJP) 8 (Api m 11.0101a) ve 60 kDa moleküler ağırlığa sahip MRJP9'dir (Api m11.0201a). MRJP, şu ana kadar yalnızca tüm arı sütü proteinlerinin %90'ını oluşturan Apis cinsinde tanımlanan, oldukça homolog proteinlerden oluşan bir ailedir. Arı sütü, işçi arıların salgı bezleri tarafından üretilen ve larvaları beslemek için kullanılan, 400 amino asitten oluşan ve altı adet N-glikosilasyon bölgesi içeren bir maddedir. MRJP9, üç N-bağlı glikosilasyon bölgesine sahip 403 amino asitten oluşur (Schmitzová ve ark., 1998). MRJP9, bal arısının üç farklı organında bağımsız olarak tanımlanmıştır: antenler, mandibular bezler ve venom kesesi. MRJP1'i tanıyan insan IgE antikorları, arı sütüne allerjisi olan hastaların serumlarında, aynı zamanda arı venomuna allerjisi olan kişilerin serumlarında (yanıt verenlerin %38'i) ve

solunum ve/veya sindirim allerjisi olan hastaların %52'sinde mevcuttur (Thien ve ark., 1996). Yazarlar, IgE antikorlarının, arı sütü proteinleri ile çapraz reaksiyona giren, yaygın olarak solunan allerjenlere yanıt olarak ortaya çıkabileceği sonucuna vardı. Arı venomunda bu proteinin varlığının, en azından bazı sIgE hastalarında arı sütüne karşı allerjinin gelişmesinden sorumlu olası faktörlerden biri olabileceği hipotezine yol açmıştır. Sonuç olarak, arı sütüne allerjisi olan bazı kişiler (arı sütü ile önceden teması olmayanlar), arı venomunda bulunan MRJP9 ile temas yoluyla bir allerji geliştirmiş olabilirler.

Api m12: Molekül ağırlığı 200 kDa olan bir vitellogenindir. Çoğu hayvanda, hem omurgasızlarda (bal arıları dahil) hem de omurgalılarda, vitellogenin oogenezi sırasında yumurta sarısının oluşumunda rol oynar (Hayward ve ark., 2010). Bir çalışmada tandem kütle spektrometresine dayalı protein dizilimi kullanarak BAV da (Api m12) ve *Vespula vulgaris*'te (Ves v6) iki vitellogenin tanımladılar (Blank ve ark., 2013). Her iki allerjenin rekombinant proteinleri glikosile edilmiştir ancak CCD içermez, çünkü a-1,3 çekirdek N-glikan fukosilasyonuna özgü tavşan anti-HRP serumu ile herhangi bir reaksiyon tespit edilmemiştir. Bu özellik çapraz reaktivite oluşumunu dışlayarak Api m12 ve Ves v6'nın BAV ve YAV allerjilerinin tanısını iyileştirmek için ilginç alternatifler olduğunu göstermektedir. Balda Api m12 çok nadir bulunur ve analiz edilen on üç numuneden yalnızca birinde tespit edilmiştir (Simons, 2010).

2.2.4. Yaban Arısı Venomları Allerjenleri

Vespula vulgaris ve *Polistes dominula* venomlarında beş allerjen ve *Vespa Crabro* ve *Bombus terrestris* venomlarında iki allerjen tespit edilmiştir.

Vespinae ve *Polistinae* allerjenleri arasında şunları ayırt ederiz:

Ves v1 ve Pol d1: Fosfolipaz A1, hemolitik aktiviteye sahip bir peptittir.

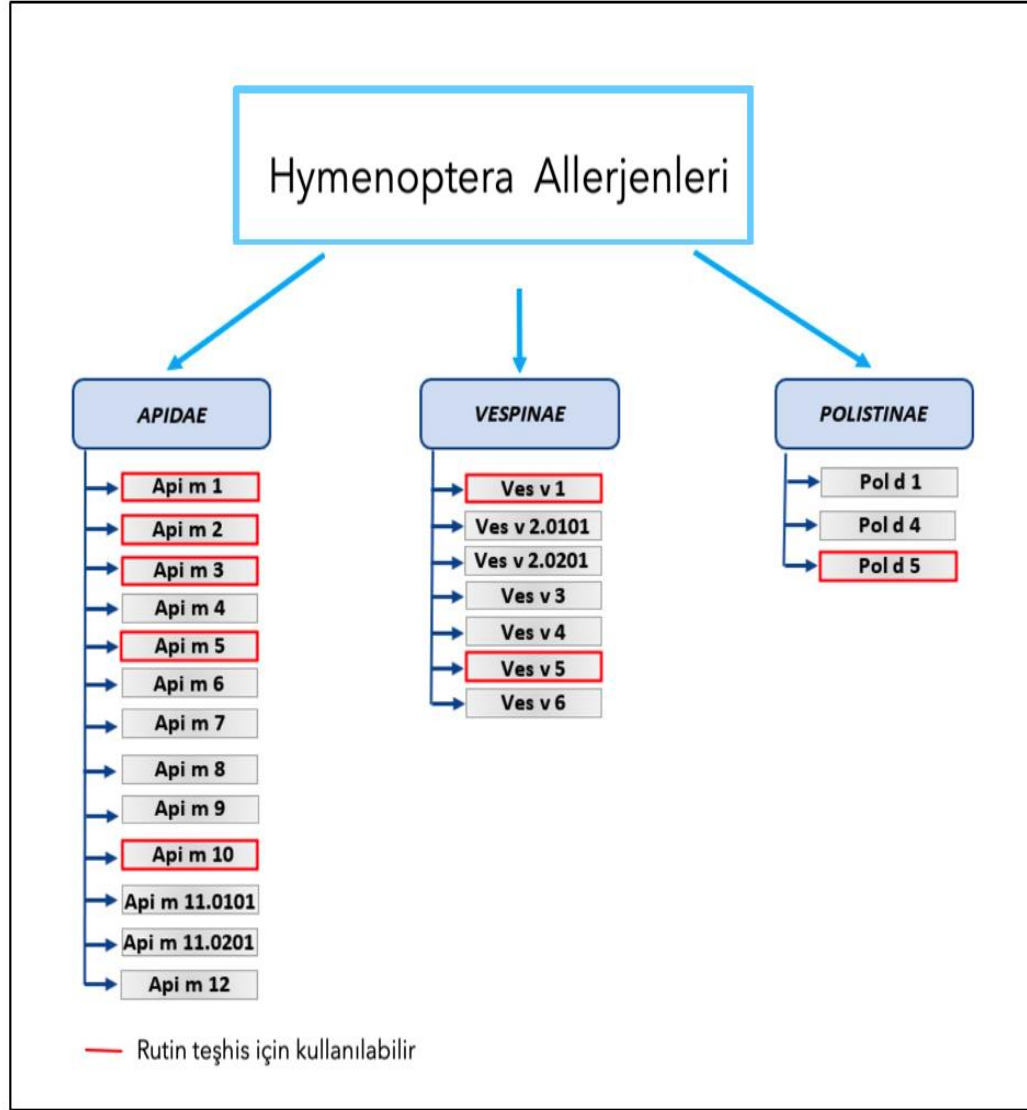
Ves v2 ve Pol d2: Hyaluronidaz (*Vespinae* izoformlarında Ves v2.0101, Ves v2.0201 mevcuttur) hyaluronik asidi hidrolize eder. Bu allerjik hastalarda patojenik reaksiyona neden olabilir.

Ves v3 ve Pol d3: Dipeptidil peptidaz-IV, yüksek çapraz reaktiviteye sahip, %76,1 sekans özdeşliğinden kaynaklanan peptitlerdir. İşlevleri, dipeptitleri parçalayarak substratları aktive etmek veya etkisiz hale getirmektir.

Ves v5, Pol d5 antijen 5: En önemli yaban arısı allerjeni olarak kabul edilir, ancak işlevi hala bilinmemektedir.

Ves v6: Vitellogenin, bir IgE duyarlılaştırıcı olarak kabul edilir.

Venom allerjenlerine karşı aşırı duyarlılık reaksiyonlarının anlaşılması genellikle kaynak materyalin karmaşıklığı nedeniyle engellenir. Bugüne kadar bilindiği üzere (Tablo 2.4. ve Şekil 2.7.) bal arısının (*Apis mellifera*) ve yaban arısının (*Vespula vulgaris*) venom allerjen bileşenleri örneklendirilmiştir. En belirgin BAV allerjenleri fosfolipaz A2(Api m1), hiyalüronidaz (Api m2) ve temel 26 amino asitli peptid melittini (Api m4) içermektedir (Bilo ve ark., 2008). Klasik YAV allerjenleri fosfolipaz A1 (Ves v1), hiyalüronidaz (Ves v2) ve antijen 5'tir (King ve ark., 1983). Bunların tümü venomun %12,2 ve 50'si kadar tahmini daha yüksek miktarlarda proteinler oluşturur ve işlevleri hala bilinmemektedir. Bu iki protein grubu, çoğu Hymenoptera türünde modifikasyonlarla bulunur ve tanımlanan allerjenlerin çoğu, bu protein sınıflarına karşılık gelir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Hymenoptera venom allerjenleri

Tablo 2.4. Avrupa'da geçerli Hymenoptera venomu allerjenlerine genel bakış (Markovic'-Housley ve ark., 2000)

Allerjen	Adı/fonksiyonu	Moment büyüklüğü (MW) (kDa)	Potansiyel N-glikozilasyonlar
Bal arısı allerjenleri (<i>Apis mellifera</i>)			
Api m1	Fosfolipaz A2	17	1
Api m2a	Hiyalüronidaz	45	3
Api m3	Asit fosfataz	49	2
Api m4	Melittin	3	-
Api m5b	Allerjen C/DPP IV	100	6
Api m6	Proteaz inhibitörü	8	-
Api m7c	Proteaz 39 3		
Api m8	Karboksilesteraz	70	4
Api m9	Karboksipeptidaz	60	4
Api m10	CRP/İkarapin	55	2
Api m11.0101	MRJP 8	65	6
Api m11.0201	MRJP 9	60	3
Api m12d	Vitellogenin	200	1
Bombus arısı allerjenleri (<i>Bombus</i> spp.)			
Bom p1, Bom t1	Fosfolipaz A2	16	1
Bom p4, Bom t4	Proteaz	27	0,1
Yaban arısı allerjenleri (<i>Vespula</i> spp.)			
Ves v1	Fosfolipaz A1	35	-
Ves v2.0101a	Hiyalüronidaz	45	4
Ves v2.0201a	Hiyalüronidaz	45	2
Ves v3b	DPP IV	100	6
Ves v5	Antijen 5	25	-
Ves v6	Vitellogenin	200	4
Dolicho eşek arısı allerjenleri (<i>Dolicho vespula</i> spp.)			
Dol m1	Fosfolipaz A1	34	2
Dol m2	Hiyalüronidaz	42	2
Dol m5	Antijen 5	23	0
Hornet allerjenleri (<i>Vespa</i> spp.)			
Vesp c1	Fosfolipaz A1	34	0
Vesp ma2	Hiyalüronidaz	35	4
Vesp c5	Antijen 5	23	0
Avrupa yaban arısı allerjenleri (<i>Polistes</i> spp.)			
Pol d1	Fosfolipaz A1	34	1
Pol d4	Proteaz	33	6
Pol d5	Antijen 5	23	0

2.2.5. Hymenoptera Venom Allerjisinin Mekanizması

HVA, Hymenoptera takımından arıların sokmalarına yanıt olarak ortaya çıkan sistemik allerjik veya anafilaktik reaksiyonlar olarak tanımlanır. Orta ve Batı Avrupa'da bu durum en yaygın olarak bal ve yaban arılarının sokmasını, daha az sıklıkla ise bombus arılarının sokmasını içerir. Hymenoptera arı sokmalarına karşı sistemik allerjik reaksiyonların prevalansı genel popülasyonda %0,3 ila %3,4 arasında değişmektedir. En düşük vaka çocuklarda, en yüksek vaka ise arı yetiştiricilerinde rapor edilmiştir (Bilo ve Bonifazi, 2009). HVA tanısı rutin olarak klinik geçmişe ve IgE aracılı duyarlılığın cilt testi ve/veya venoma özgü IgE'nin in vitro tespiti yoluyla saptanmasına dayanır. Ek olarak, rutin testlerin sonuç vermediği durumlarda duyarlılaştırıcı venomu tanımlamak için bazofil aktivasyon testi veya histamin salınım testi gibi hücresel testler kullanılır. Teşhis doğrulandıktan sonra suçlu venom ile yapılan immünoterapi, arı venomu allerjisinde %80 ila %84 ve YAV allerjisinde %90 ila %95 arasında değişen koruma sağlar (Bilo ve Bonifazi, 2009).

Yakın zamana kadar, tek venom allerjenleri hakkındaki sınırlı bilgi ve bunların teşhis ve tedavi amaçlı olarak bulunmaması, özellikle diğer allerji türlerinin moleküler anlaşılmasında kaydedilen ilerlemeyle karşılaştırıldığında, HVA'yı daha geride bırakılmış bir alan haline getiriyordu.

HVA, savunma mekanizması olarak venomu enjekte eden Hymenoptera takımına ait arılardan kaynaklanır. Kuzey ve Orta Avrupa'da venom allerjisinin en yaygın tetikleyicileri bal arıları (*Apis mellifera*) ve yaban arılarıdır (*Vespula* spp.). Eşek arılarına (*Vespa* spp.) karşı venom allerjisi daha az yaygındır ve eşek arısı venomuna karşı anafilaktik reaksiyonları olan hastaların büyük çoğunluğunun öncelikle YAV karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir (Kosnik ve ark., 2002). Bombus arıları (*Bombus* spp.) seralarda tozlaşma amacıyla giderek daha fazla kullanıldıkça, venomuna karşı allerji daha önemli hale geldi ancak hala nadir olarak değerlendiriliyor. Bal arıları ve yaban arılarının yanı sıra kağıt yaban arısı (*Polistes* spp.) venomu allerjisi de Güney Avrupa ve Kuzey Amerika'da önemlidir. *Polybia paulista* gibi diğer *Polistinae* venomuna karşı allerji Güney Amerika'da yaygındır (Bazon ve ark., 2017). Allerjiyle ilişkili Hymenoptera'nın taksonomisi Şekil 2.3.'de gösterilmektedir.

Arı sokmalarının ve dolayısıyla allerjik reaksiyonların sıklığı, hızla değişebilen coğrafi, çevresel ve ekolojik faktörlere bağlıdır. Örneğin Güney Avrupa'da yaşayan *Polistes dominula*, Amerika Birleşik Devletleri'ni, Güney Afrika'yı ve Orta Avrupa'yı işgal etmiştir. Bu nedenle *Polistes dominula* venomuna (PDV) karşı allerji gelecekte muhtemelen daha önemli hale gelecektir. Oldukça istilacı ikinci bir Hymenoptera türü olan *Vespa velutina nigrithorax* (sarı bacaklı veya Asya eşek arısı), doğal yaşam alanı Güneydoğu Asya'nın tropikal bölgeleri olmasına rağmen Avrupa'da zemin kazanıyor. Fransa'dan başlayarak uygun iklim koşullarının da etkisiyle Avrupa'ya hızla yayılmıştır (Budge ve ark., 2017). *Vespa velutina nigrithorax*, Avrupa'nın endemik olduğu bölgelerde Hymenoptera anafilaksisinin yaygın bir nedeni haline gelmiştir (Vidal ve ark., 2020).

Allerji, bağışıklık sisteminin aşırı duyarlılık reaksiyonudur ve klasik gell coombs, sınıflandırmada dört alt tipe ayrılabilir (Tablo 2.5.) (Rajan, 2003).

Tablo 2.5. Aşırı duyarlı reaksiyonların klasik gell coombs sınıflandırması.

Aşırı Duyarlılığın Türü	Aracılık eden	Efektör mekanizması
I	IgE	Mast hücrelerinin degranülasyonu ve histamin ve diğer inflamatuvar medyatörlerin salınmasıdır. - ani reaksiyon
II	IgG, IgM	Kompleman sisteminin aktivasyonuna ve hücre hasarına veya lizisine yol açar. -sitotoksik reaksiyon
III	IgG,IgM,bazen IgA	Polimorfonükleer lökositlerin (PMN) kemotaksisine yol açan ve sonunda doku hasarına neden olan karmaşık reaksiyonlara yol açan kompleman sistemi aktivasyonu ile sonuçlanan bağışıklık komplekslerinin birikmesidir.
IV	T hücreler	T hücreleri veya makrofajlar, doku hasarına yol açan sitokin salınımının bir sonucu olarak aktive edilir. -gecikmeli tip reaksiyon

HVA'nın ana mekanizması, mast hücreleri ve bazofiller üzerindeki yüksek afiniteli FcεRI reseptörüne bağlanan venom allerjenine spesifik bir IgE'nin aracılık ettiği tip I aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Bu reseptörlerin allerjenle çapraz bağlanmasıyla aracılar (örn. histamin) salınır. Duyarlılığı olanlarda bal arısı sokmasını takip eden allerjik semptomlar genellikle dakikalar içinde ortaya çıkar. Sıklıkla kaşıntı,

kızarıklık, ürtiker ve anjiyoödem gibi cilt reaksiyonları eşlik ederken, anafilaksi gibi daha ağır sistemik reaksiyonlar görülebilir (Fehr ve ark., 2019). Ancak sIgE konsantrasyonu yüksek olan bazı kişilerde klinik allerji belirtileri görülmez veya sIgE düzeyi çok düşük, hatta tespit edilemeyecek düzeyde olan bazı hastalarda yaşamı tehdit eden sistemik reaksiyonlar görülebilir. Arı venomuna karşı allerjinin klinik semptomlarının ortaya çıkmasında kompleman sisteminin önemli bir rol oynayabileceğine dair kanıtlar vardır. Hymenoptera venomuna karşı tip III (immün kompleks reaksiyon) ve tip IV (gecikmiş tip reaksiyon) aşırı duyarlılık reaksiyonları şeklinde başka olası allerji mekanizmaları da vardır. Tip III reaksiyon, üretilen antikorlara bağlı olarak çeşitli sendromlara yol açabilir. Venom antijenlerine karşı yönelik immünoglobulin G (IgG) antikorlarının üretimi, IgG ve venom antijenlerini içeren immün komplekslerin birikmesinden kaynaklanan serum hastalığı benzeri sendrom ve glomerülonefrit ile sonuçlanabilir (Nittner-Marszalska ve ark., 2004; Nittner-Marszalska ve ark., 2013). Allerjisi olan kişilerin %20'sinde bile aşırı duyarlılık reaksiyonu iki fazlı olabilir ve ikinci aşama sokmadan 1-72 saat sonra gelişebilir. Arı sokmalarına verilen tepkiler aynı zamanda immün olmayan (yani toksik) reaksiyonlar şeklinde de olabilir.

2.3. Hymenoptera Allerjisinde Çift Pozitiflik ve Çapraz Reaksiyon,

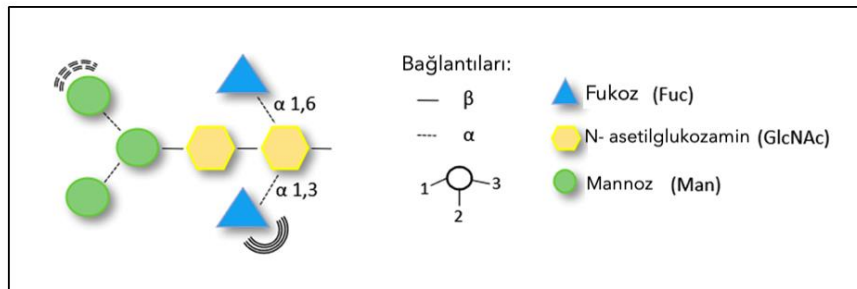
Allerji tanısı durumunda zararsız allerjenleri suçlamaktan kaçınırken, gerçek suçlu allerjenin tanımlanmasını gerektirir. Çeşitli "allerji taklitçileri" arasında (Ebo ve ark., 2004), proteine bağlı karbonhidratlar, yanlış pozitif reaksiyonların önde gelen ve iyi tanımlanmış bir nedenidir.

Teşhis ve tedavi amaçlı olarak genel olarak bütün venom preparatları kullanılır. Tam venom preparatlarını kullanan tüm teşhis sistemleri, gerçek çift duyarlılık ile farklı venomlar arasındaki çapraz reaktivite arasında kesin bir ayrım yapılmasına izin vermeyen IgE çapraz reaktivitesi nedeniyle potansiyel olarak engellenmektedir. Bu çapraz reaktivite, farklı ailelerin venomlarında bulunan homolog tek venom allerjenlerine karşı IgE reaktivitesine veya CCD'ye karşı IgE reaktivitesine dayanabilir (Aalberse ve ark., 2001).

2.3.1. Çapraz Reaktivitenin Nedeni Olarak Karbonhidrat Belirleyicileri

Hymenoptera venomuna karşı allerjiyle ilgili olarak yaygın bir tanı sorunu, BAV ve YAV'a özgü IgE antikorları için yapılan testlerde çift pozitifliktir. Bu tür hastalarda, gerçek ikili duyarlılık ve venom hiyalüronidaz ile CCD olası çapraz reaktivitesi dikkate alınmalıdır. Çift duyarlılaşma ve çapraz reaktivite arasındaki ayırım, suçlu arı türünü tanımayan hastalarda spesifik immünoterapi için bir allerjenin seçilmesinde kritik öneme sahiptir. Çapraz reaksiyona giren CCD glikoproteinler üzerinde bulunur, bitkilerde ve arı venomunda yaygındır (Aalberse ve ark., 1981). Bu nedenle anti-CCD IgE antikorları, bitki veya Hymenoptera venomu allerjenlerine karşı duyarlılığı yansıtabilir ve in vitro çift pozitif sonuçların önemli bir nedenidir.

BAV ve YAV'daki allerjenlerin çoğu, N-glikan yapısına sahip glikoproteinlerdir. Api m1, Api m2 ve Ves v2 gibi başlıca allerjenler glikosile edilmiştir. Hem protein hem de CCD yapıları IgE antikorları için epitop görevi görebilir. Glikosilasyon (proteinin translasyon sonrası modifikasyonu) endoplazmik retikulumda meydana gelir. Bitki glikoproteinleri, çekirdek alfa1,3-fukoz (fuc) ve beta1,2-ksiloz taşıyan asparajin (N)-bağlı glikanlardan oluşur ve iki N-glikan yapısıyla temsil edilir: MUXF (bromelain) ve MMXF (yaban turpu peroksidaz). Arı glikoproteinleri çekirdeğe bağlı fuc içerir ve MMF3F6 bunların tipik yapısını temsil eder (Şekil 2.5.). Arı ve bitki CCD'leri arasındaki temel farklar, ksiloz veya al1,6-fuc'un varlığıdır. Bu glikan epitoplarına karşı yönlendirilen IgE antikorları, çeşitli kaynaklardan gelen allerjenlerin in vitro çapraz reaktivitesinin temelini oluşturur. MMXF, askorbat oksidaz ve MUXF, CCD belirleyicilerine karşı IgE reaktivitesini tanımlamak için rutin olarak kullanılan glikoproteinlerdir (Brehler ve ark., 2013; Altmann, 2007).



Şekil 2.5. Arı venomu N-glikan yapısı.

Araştırmalar, HVA'sı olan hastaların %59'a kadarının birden fazla venoma karşı pozitif sonuçlar ortaya çıkardığını göstermektedir. Yarısından fazlası CCD'lere karşı sIgE antikorları göstermektedir.

Anti-CCD IgE antikorlarının klinik önemi tartışmalıdır; ancak klinik olarak önemsiz olduklarına inanılmaktadır. Arıcılarda CCD'ye karşı tolerans nedeniyle CCD'ye özgü IgE antikorları yalnızca %7,7 oranında tespit edilmiştir (Mari ve ark., 2002; Matricardi ve ark., 2016). Anti-CCD antikorlarının klinik açıdan ilgisizliğinin halen tartışılmakta olduğu unutulmamalıdır. CCD'nin bazı kişilerde klinik semptomlara neden olduğu göz ardı edilemez.

BAV ve YAV'a karşı gerçek çifte duyarlılık ile çapraz tepkime arasındaki ayrım hâlâ bir sorun olmaya devam ediyor ve suçlu arı türünün belirlenmesini zorlaştırıyor. Şu anda, çift hassasiyet ile çapraz reaktivite arasında ayrım yapmak için inhibisyon testi yerine CRD kullanılmaktadır. CCD içermeyen venom allerjenleri için gelişmiş CRD araçlarının kullanılması, duyarlılık profillerinin ayrıntılı karakterizasyonuna ve klinik semptomlara neden olan venomun tanımlanmasına olanak sağlar (Mari ve ark., 2002; Matricardi ve ark., 2016).

2.3.2. Anti-CCD Antikorlarının Yüksek Özgüllüğü ve Afinitesi

Kimyasal deglikosilasyon sınırlı spesifikliğe sahip yıkıcı bir süreçtir. Bu nedenle amaçlananın dışında değişiklikler oluşabilir. Bireysel şeker parçalarının rolüne kanıt olarak, yapıyı yok etmek yerine onu oluşturarak sağlanabilir. Bu durumda, araştırılan şeker kalıntılarından kesinlikle arınmış olan, memelilerden elde edilen rekombinant, saf ksilosil ve α -1,3-fukoziltransferaz ve N-glikan alıcıları kullanılarak başarı sağlanmıştır. CCD'lere karşı insan IgE'nin karakterizasyonu, afiniteyle saflaştırılmış anti-CCD IgE ve anti-CCD IgG, MMF3 ve MMXF3 glikanlara bağlanma afiniteleri açısından analiz edilmesiyle mümkün olur. Düşük bağlanma afiniteleriyle bilinen lektinler gibi diğer karbonhidrat proteinlerinin aksine, anti-CCD antikorları çok yüksek afinite gösterebilir. IgE durumunda ayrışma sabitleri protein allerjenleriyle karşılaştırılabilir düzeyde ve IgG durumunda afinite açıkça daha yüksek çıkabilir (Jin ve ark., 2008).

Hymenoptera venomunun çoğu allerjeni, N-glikan çekirdeğine (çapraz reaksiyona giren karbonhidrat determinantı) bir alfa-1,3 fuc bağı olan karbonhidrat kalıntısının yüksek düzeyde immünojenik olduğu ve IgE ile çapraz reaksiyona girdiği glikoproteinleri olduğu bilinir. Böylelikle, allerji teşhisinde yanlış pozitif sonuçlar verebilir. Bu mekanizma öncelikle BAV veya YAV'a karşı çift duyarlılığı olan (Sturm ve ark.,2018; Nittner-Marszalska, 2018) ve/veya polen allerjenlerine karşı çoklu duyarlılığı olan hastalarda bulunur. Glikoproteinler polende, yiyeceklerde ve Hymenoptera venomunda çok yaygındır. Allerjisi olan kişilerin serumlarında anti-CCD IgE varlığına ilişkin çalışmalar, bu antikorların varlığının görünür klinik semptomlara neden olmadığını göstermektedir. CCD'li glikosile edilmiş proteinler, yüksek IgE reaktivitesi frekansına sahiptir ancak düşük allerjeniteye sahiptir; bu nedenle duyarlı bireyler, antijenik CCD'ye karşı IgE antikorları geliştirir. Bu nedenle Hymenoptera venomuna duyarlı hastalarda pozitif tanı, serumlarında CCD-sIgE varlığına da bağlı olabilir (Kołaczek ve ark., 2017).

2.3.3. Arı CCD'lerinin Biyolojik Önemi

Allerjinin klinik semptomlarına yol açan süreç, salınan histamin, interlökin 4 veya vezikül spesifik protein belirteçleri ölçülerek bazofilik granüositlerin degranülasyonunun testle izlenmesi yoluyla yeniden canlandırılabilir. Bu tür histamin salınım testleri, domates β -fruktofuranosidaz veya albüminle birleştirilmiş CCD-glikopeptidler ile gerçekleştirilmiştir (Foetisch ve ark., 2003) ve Bet v1 gibi şüphesiz allerjenlerinkine çok benzer biyolojik aktiviteye işaret etmektedir. Çekirdek α -1,3 fukosile edilmiş N-glikanlar, klinik semptomlara neden olan ilgili allerjenik epitoplardır.

Açık allerjik semptomların ortaya çıkarılmasındaki bu esasen tam başarısızlığın nedeni hala belirsizdir. Jin ve arkadaşları, anti-CCD IgG'nin iyi bilinen protein allerjenlerine karşı IgG'den daha yüksek bir afinite göstermesi nedeniyle, IgG'nin inhibitör rolü üzerinde spekülasyon yapmışlardır (Jin ve ark., 2008). Bazı kişilerin neden anti-CCD IgE geliştirdiği bilinmemektedir.

2.3.4. Çapraz Reaktivite Olgusunun Nedeni

Çapraz reaktivite olgusunun nedeni arılar tarafından oluşturulan N-glikan çekirdeğinin alfa 1,3 bağlantılı fuc kalıntısına karşı yönlendirilen IgE antikorlarıdır. CCD'ye özgü IgE antikorlarının, BAV ve YAV'ye karşı çift duyarlılığın %50'den fazlasından sorumlu olduğu bilinmektedir ki, bu da uygun terapötik müdahalenin seçimini zorlaştırmaktadır. CCD-reaktif IgE antikorlarının klinik önemi tartışılmaktadır, ancak arı venomu allerjisi durumunda düşük veya hiç olmadığı görülmektedir. Buna göre, CCD taşıyan glikoproteinler bazofillerden aracı salınımını etkileyebilir. Ancak CCD'ye özgü IgE'si olan bireylerde anlamlı yanıtları tetiklemez. Bununla birlikte anti-CCD IgE arı venomu allerjisi ile çoklu reaktivitelere neden olduğundan ve dolayısıyla proteine karşı klinik olarak ilgili duyarlılığın saptanmasına müdahale ettiğinden, in vitro allerji teşhisini zorlaştırabilir. Teşhis kesinliği ile CCD bazlı müdahalenin göze çarpan bir örneği, doğal formunda bir N-glikan çekirdek yapısı üzerinde alfa 1,3'e bağlı bir fuc taşıyan ve dolayısıyla IgE ile reaktif olan BAV'ın ana allerjisi Api m1'dir. Api m1'in çekirdek glikanının tamamını içermeyen veya yalnızca 1,3 fuc kalıntısını içermeyen rekombinant formlarının üretilmesi, nApi m1 ile karşılaştırıldığında türe özgü protein epitoplarına karşı duyarlılığın tespit edilmesinde yüksek güvenilirliğe sahip olduğunu göstermiştir (Jakob ve ark., 2012). Api m1 ve Ves v5 gibi glikosile edilmemiş türe özgü allerjenlerin uygulanmasıyla moleküler tanı ve CCD'lerin varlığını atlatmaya yönelik stratejiler, gerçek çift duyarlılaşmaya karşı alakasız çapraz reaktivitenin ayrıştırılmasında önemli bir ilerlemeye sebep olmuştur. CCD içermeyen, doğru şekilde katlanmış Ves v2.0101 ve Ves v2.0201'i kullanarak, önceki varsayımların aksine, hyaluronidazların YAV'nin ana allerjenleri olarak önemli bir rol oynamadığını açıkça gösterilebilmiştir (Seismann ve ark., 2010). Bunun tersine, Api m5, Api m10 ve Api m11 gibi yüksek oranda glikosile edilmiş proteinler için bile CCD'lerin ötesinde klinik açıdan anlamlı belirgin bir IgE reaktivitesi gösterilmiştir (Blank ve ark., 2012).

Ayrıca, duyarlı hastalardan alınan serumlar birden fazla reaktivite (%30-50) sunabilir ve başka bir Hymenoptera venomu (%60-70) ile çapraz reaksiyona girebilir. Bu reaksiyonlar, her bir venoma karşı duyarlılıktan bağımsız olarak yüksek sIgE

seviyeleri gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak ortaya çıkabilir. Venomlarda bulunan homolog proteinlere karşı çapraz reaktivite gösteren veya IgE antikorlarının CCD'ler ile bağlanmasıyla IgE antikorları CCD'ler ile glikosile edilmiş proteinlerde bulunur ve glikosilasyon işlemi, endoplazmik retikulumda ve golgi kompleksinde, proteinlerin spesifik amino asit kalıntılarına karbonhidratların eklenmesiyle gerçekleşir. Hymenopteran proteinlerinde, oligosakaritlerin (glikanlar) asparajinin (Asn) amino asit kalıntılarında bulunan nitrojen atomuna bağlandığı N-glikosilasyon meydana gelir (Brehler, ve ark., 2013; Altmann, 2007).

Her ne kadar CCD immünojenik bir molekül olarak kabul edilse de klinik olarak konuyla ilgisi yoktur çünkü bu epitoplara karşı tetiklenen immün yanıtın bir sonucu olarak ortaya çıkan allerjik reaksiyonlara ilişkin herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Allerjik reaksiyonların olmaması, CCD'nin, CCD ile mast hücresi üzerindeki FcεRI reseptörlerine bağlı anti-CCD IgE arasında çapraz bağlantıya izin vermeyen, dolayısıyla mast hücresi degranülasyonuna neden olmayan ve vazoaaktif aminler ve sitokinler gibi inflamatuvar araçların salınması tek değerlikli bir yapı olduğu gerçeğine gösterebilir. Ancak anti-CCD IgE, hymenopteran allerjisi tanısıyla ilişkilidir, çünkü allerjik hastaların %20'sinden fazlası bu antikorları geliştirir ve bu, Radyoallergosorbent testi (RAST) testlerinde yanlış pozitif sonuçların oluşmasıyla ilişkili olabilir (Yokoi, ve ark., 2017).

2.3.5. CCD'ler Nedeniyle Yanlış Pozitif Tanı ve Olası Çözümler

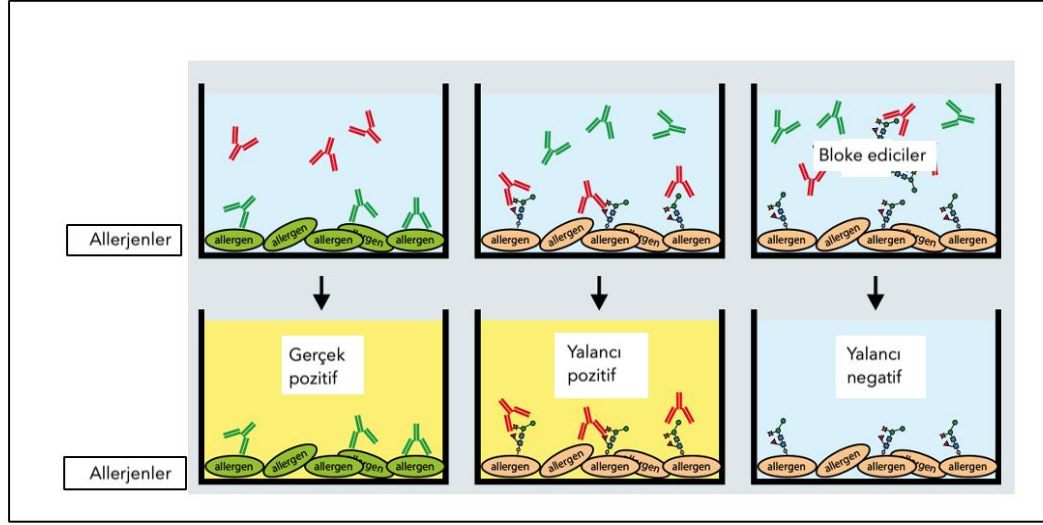
Arı CCD'lerine duyarlı allerjik bireylerin yüzdeleri, serumların oldukça tarafsız bir şekilde toplandığı ve anti-CCD IgE'nin hasta gruplarının %23'ünde ve %22'sinde bulunduğu iki büyük çalışmadan tahmin edilebilir. Daha 1998'de Aalberse şunu belirtmişti: Bu sonuçlar, CCD ile ilişkili reaktivite önlenbilirse serolojik allerji testlerinin doğruluğunun artacağı kavramını desteklemektedir. Ancak uzmanların bilincinde CCD'lerin klinik önemsizliğini tespit etmek için Mari'nin temel çalışmasını (Mari, 2002) gerektirdi. Mari'nin vardığı sonuçlar "allerji taklitçileri" üzerine yapılan bir çalışmayla desteklendi. Bu çalışmada, Polen (timothy otu, pelin) veya hymenoptera venomu allerjenlerinin neden olduğu profilin ve/veya MUXF tipi CCD'ye karşı duyarlılık, doğal kauçuk lateksine ve elmaya karşı yanlış pozitif IgE antikorlarını ortaya çıkarabileceği gösterilmiştir (Ebo ve ark., 2004).

Özel bir sorun, BAV ve YAV'a karşı, çoğunlukla yalnızca CCD çapraz reaktivitesine ve nadiren gerçek bir çift duyarlılığa dayanan belirgin çift duyarlılık durumunda, suçlu arı türünün belirlenmesi durumudur. Dokuz yıl sonra, CCD'lerin masumiyeti fikri daha da güçlenmiştir.

Birlikte ele alındığında, neredeyse tüm bitki allerjen ekstraktlarında ve tüm hymenoptera venomunda bulunan CCD'ler, ekstrakt bazlı sIgE belirlemelerinde yanlış pozitif teşhis sonuçlarının sık görülen bir nedenidir.

2.3.6. CCD Sorunu İçin Dört Olası Çözüm

1. DPT veya plasebo kontrollü gıda testleri gibi in vivo testler kullanılmalıdır.
2. BAT gibi in vitro testler, ancak CCD'lerden tamamen etkilenmez (Ebo ve ark., 2004).
3. CRD gibi rekombinant allerjenlerle in vitro testler, tekli allerjen testlerinde veya şeritler veya biyoçip dizilerinde "bileşen çözümlü teşhis" etiketiyle giderek daha fazla yapılmaktadır; bunların en belirginini şu anda bileşen kaynaklı oluşan ImmunoCAP ISAC sistemidir (Phadia-VBC Genomics. (Erişim tarihi: 10 Şubat 2024). CRD, çoğu zaman pozitif bir reaksiyonun sonucu olarak atılacak adımlar birincil duyarlılaştırıcı ajanın açığa çıkmasına yardımcı olduğu için daha iyi bir rehberlik sağlar (Hamilton ve ark., 2015; Huss-Marp ve ark., 2015).
4. Spesifik bir CCD inhibitörüyle rekabetçi inhibisyonla in vitro test (Şekil 2.6.). MMXF veya MUXF yapısını taşıyan herhangi bir bitki glikoproteini, inhibitör olarak kullanılabilir. Glikoprotein, çoklu değerlik etkisinden yararlanmak için çeşitli CCD yapıları içermesi ve araştırılacak allerjenlerle homolojiye sahip olabilecek safsızlıkların olumsuz etkisini önlemek için çok saf olması gerekir. Benzer şekilde glikoprotein kendisi de çapraz reaktif protein epitopları içermemelidir. Bu gereksinim, glikoprotein proteolitik bozunması, saflaştırılması ve son olarak glikopeptidin immünolojik olarak inert bir taşıyıcıya bağlanmasıyla tamamlanabilir (Holzweber ve ark., 2013).



Şekil 2.6. Anti-CCD IgE'nin rekabetçi inhibisyonunun prensibi ve etkisi. Soldaki kap, bir protein allerjeni ile onun spesifik IgE'si arasındaki reaksiyonu göstermektedir. Ortadaki kap, anti-CCD IgE ile çapraz reaksiyona giren bir glikoprotein ile kaplanmıştır. Her iki örnek de olumlu sonuçlar veriyor. Sağ kaptaki, çok değerlikli bir inhibitör (örn., Holzweber ve ark.) tarafından kullanılan yarı sentetik glikoprotein) eklendi ve bu, CCD'ye özgü IgE'nin bağlanması için kaplama allerjeni ile rekabetçi inhibisyona ve dolayısıyla haklı olarak negatif bir sonuca yol açmıştır (Holzweber ve ark., 2013).

2.4. Hymenoptera Venom Allerjisinde Teşhis, Biyobelirteçler ve Tanısal Testler

HVA tanısı, sistemik arı sokma reaksiyonunun klinik geçmişini ve ilgili venoma karşı duyarlılığın in vivo veya in vitro testlerle kanıtlanmasını içerir (Golden ve ark., 2017). Başarılı VIT için tedavide doğru venom büyük önem taşımaktadır. Venomlar arasındaki belirgin çapraz reaktivite nedeniyle, hastanın allerjiye neden olan arı türünü tanımlayamadığı durumlarda tedavi için doğru venomu seçmek zordur. Bununla birlikte, doğru tanıyı kolaylaştıran ve HVA'da kişiselleştirilmiş risk sınıflandırmasına katkıda bulunan çeşitli gelişmiş tanı araçları ve biyobelirteçler mevcuttur (Şekil 2.7.).

Hymenoptera venomuna karşı allerjiye yönelik tanısal testler, Hymenoptera sokmasını takiben sistemik reaksiyon öyküsü olan tüm hastalarda yapılmalıdır. Arı, çitçiler vb. gibi yeniden sokma riski özellikle yüksek olan ve bu nedenle yaşam kalitesinde önemli bir azalma olan büyük lokal reaksiyon öyküsü olan hastalarda da testler isteğe bağlı olarak yapılmalıdır.

Yukarıda belirtilen tüm vakalarda Hymenoptera venomu allerjisinin tanısı VIT için yeterliliği sağlar. İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin allerjene karşı immünolojik bir tolerans geliştirdiği allerji tedavisinin en etkili yöntemidir. Ancak zaman alıcı bir yöntemdir (3-5 yıllık tedavi) ve bazı yan etki riski taşır. Bu nedenle doğru tanıyı koymak ve hastada VIT'e başlamak çok önemlidir.

Rutin tanı testleri arasında DPT ve venom sIgE düzeyinin belirlenmesi yer alır. Yanlış negatif sonuçları önlemek için, söz konusu testlerin sokmadan en az 2-4 hafta sonra (refraktör dönem olarak adlandırılır) yapılması gerekir. Avrupa kurallarına göre öncelikle DPT'lerin yapılması gerekir ve sonuçlar negatifse bir sonraki adım intradermal testleri içerir (Pfaar ve ark., 2014). İntradermal testlerin duyarlılığı klinik çalışmalarda da gösterildiği gibi prik testlerine göre çok daha yüksektir. DPT'ler HVA olan hastaların %49'unu tanımlarken, DPT'ler ve intradermal testlerin kombinasyonu hastaların %94'ünün teşhis edilmesini mümkün kılmıştır. Avrupa'da *Apis mellifera*, *Vespula* spp., *Polistes* spp. ve *Vespa Crabro*'nun standartlaştırılmış venomları mevcuttur ve cilt testleri için kullanılabilir. Ayrıca cilt testlerinin mastositozlu hastalarda bile güvenli olduğu gösterilmiştir (Vos ve ark., 2013).

2.4.1. Deri Testleri

Sistemik reaksiyon öyküsü olan hastalarda hem venom ekstraktlarıyla deri testi hem de sIgE ölçümleri yapılmalıdır. Venom ekstraktlarıyla cilt testi, farklı protokoller izlenerek deri delme veya intradermal test olarak yapılabilir. DPT'leri 1 ila 100 mg/ml arasındaki konsantrasyonda yapılırken, intradermal testler için 0,001-0,01 µg/ml aralığındaki başlangıç konsantrasyonu yeterlidir (Tablo 2.6. ve 2.7.). Tek başına DPT'nin duyarlılığı %64 civarında iken, DPT ve intradermal test kombinasyonunun duyarlılığı %94'e ulaşmaktadır. Düşük sistemik reaksiyon riskine rağmen, birçok kurum cilt testi için kademeli bir yaklaşım uygulanmasını önermektedir (Golden ve ark., 2011; Jakob ve ark., 2017). Farklı venomlarla eş zamanlı intradermal test yapılması güvenli ve etkilidir. İntradermal testin güvenliği ve etkinliği değerlendirilmiş olup, %0,6'lık bir sistemik reaksiyon insidansı rapor edilmiştir. İntradermal test daha duyarlı olduğundan negatif DPT sonuçlarını doğrulamak için kullanılmalıdır. Refrakter dönemde yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak için sokma reaksiyonundan en az 2 hafta sonra deri testleri yapılmalıdır.

İkna edici bir sistemik reaksiyon öyküsüne rağmen testlerin negatif çıkması durumunda, deri testleri 1-2 ay sonra tekrarlanmalıdır. Dikkat edilmesi gereken nokta, sokma reaksiyonunun ciddiyeti ile deri testindeki reaktivite arasında bir korelasyon bulunmadığıdır (Strohmeier ve ark., 2013; Ludman ve ark., 2015).

Tablo 2.6. BAV ve YAV ile deri testleri, anafilaksi şiddetine ve bireysel hasta risk faktörlerine bağlı olarak aşamalı olarak veya eş zamanlı olarak gerçekleştirilebilir

1) Prik testi: 1, 10, 100, 300 µg/ml
2) İntradermal testler: 0,001; 0,01; 0,1; ve 1 µg/ml

Tablo 2.7. Deri testlerini baskılayan, sıklıkla kullanılan ilaçlar ve bunların testten önce kesilmesi gereken süreler

İlaç grubu	Baskılanma	Kesilme süresi
H1 Antihistaminik 1. nesil	+++	>3 gün
H1 Antihistaminik yeni nesil	+++	>7 gün
H2 Antihistamin	-/+	2 gün
Ketotifen (mast hücre stabilizatörü)	+++	>5 gün
Test alanında topikal glukokortikosteroid (GCS)>4	+	>1 hafta
Sistemik kısa süreli GCS		
<50 mg prednizolon	-	3 gün
>50 mg prednizolon	+/-	>1 hafta
Sistemik uzun vadeli GCS		
<10 mg prednizolon	-	0
>10 mg prednizolon	-/+	>3hafta
Benzodiazepinler	+++	>7gün
Omalizumab	+++	4-8hafta
Trisiklik antidepresanlar	+++	>14gün
Prometazin (nöroleptik)	++	>5gün

2.4.2. Venom Ekstraktlarına Spesifik IgE (slgE)

Cilt testinin yanı sıra, tüm venom ekstraktlarında slgE'nin tespiti, Hymenoptera venomlarına karşı duyarlılığı tespit etmek için en yerleşik teşhis yöntemidir. Bununla birlikte, klinik olarak anlamlı allerjinin tanısı yalnızca ilgili klinik öyküyle birlikte

yapılabilir. Bu aynı zamanda cilt testleri ve diğer teşhis yaklaşımları için de geçerlidir.

Her ne kadar sIgE tespiti için alt eşik olarak 0,35 kUA/L yaygın olarak kullanılsa da sIgE konsantrasyonları, 0,1 kUA/L'lik alt uç eşiğiyle ana singleplex sIgE immünolojik test platformlarında yüksek doğrulukla ölçülebilir. Dolayısıyla 0,1 ile 0,35 kUA/L arasındaki sIgE düzeyleri, açık bir klinik öykü bağlamında değerlendirilebilir (Hamilton ve ark., 2016). İdeal olarak, sIgE ölçümleri sokma olayından 1 ila 6 hafta sonra yapılmalıdır. Anafilaksi öyküsü olan hastalarda negatif sIgE testi sonuçlarının, sIgE düzeylerinin çok düşük olmasından veya son sokma ile tanısal ölçüm arasındaki gecikmenin çok uzun olmasından kaynaklanabileceği akılda tutulmalıdır (Goldberg ve ark., 1997).

0,35 kUA/L'lik eşik değeri kullanıldığında, BAV allerjisi olan hastaların %90-100'ünün sIgE ile BAV açısından pozitif olduğu test edilir. YAV allerjisi olan hastalarda sIgE tespitinin YAV'ye duyarlılığı %83 ile %97 arasında değişmektedir. Bununla birlikte, allerjik hastaların klinik rutinde venom ekstraktları ile sIgE testi sıklıkla farklı venomlarla birden fazla pozitif test sonucuna yol açmaktadır. İlginç bir şekilde, bu hastaların çoğu için yalnızca bir venom allerjiyle alakalıdır. Sistemik semptomlar açısından diğer venomlarla pozitif test sonuçlarının klinik ilişkisi sınırlıdır (Leimgruber ve ark., 1993; Muller ve ark., 2014). Ancak birçok hasta allerjiye neden olan arı türünü tanımlayamadığı için klinik açıdan anlamlı allerji göz ardı edilemez. Birden fazla venoma karşı birincil allerjiye ek olarak, klinik açıdan sınırlı veya hiç olmayan çoklu pozitif test sonuçlarına şunlar neden olabilir: venomlarda bulunan homolog allerjenlerdeki protein epitoplarına yönelik IgE antikorları, klinik olarak alakasız çaprazlamalara karşı sIgE CCD'leri ve asemptomatik duyarlılaşma. Bu nedenle, genellikle birden fazla venomla gereksiz VIT'e yol açarak daha yüksek maliyetlere, potansiyel olarak artan yan etki riskine ve yeniden duyarlılaşma olasılığına neden olur.

Genel olarak, venom ekstraktı bazlı teşhisin, gerçek birincil allerji ile çapraz reaktivitenin ayrımını ve dolayısıyla allerjiyle ilgili venomun tanımlanmasını ve optimal tedavi stratejisinin seçimini zorlaştıran bazı tuzakları vardır.

Tam venom ekstraktları ile IgE inhibisyon testleri, belirli durumlarda, marker allerjenleri olmayan venomlara karşı çift pozitif olan hastalarda birincil duyarlılaştırıcı venomu tespit etmek için kullanılabilir. Ancak IgE inhibisyon testleri pahalıdır, zaman alıcıdır ve sonuçların yorumlanması bazen zordur (Quercia ve ark., 2018).

Bireysel venom allerjenlerine sIgE yakın geçmişte, ilgili venom allerjenlerinin tanımlanması HVA'da moleküler veya CRD geliştirilmesine yol açmıştır (Ollert ve ark., 2015). CRD'de venomların tek allerjenlerine karşı sIgE belirlenir. Böylece, CRD yalnızca bir hastanın tüm venoma karşı sIgE'ye sahip olup olmadığı hakkında bilgi vermekle kalmaz, aynı zamanda hasta için tam olarak hangi allerjenlerin ilgili olduğu hakkında da bilgi sağlar.

Rekombinant allerjenler, doğal allerjenlerin tam protein epitop spektrumuyla ancak CCD'ler olmadan üretilebilir. Bu nedenle, pozitif sIgE testi sonuçları CCD'lere değil, yalnızca protein epitoplarına karşı duyarlılığı gösterir, böylece klinik olarak alakasız birçok duyarlılığı hariç tutar (Seismann ve ark.,2010).

CCD'lere ek olarak, farklı venomlar arasındaki çapraz reaktivite, ortak IgE epitoplarını paylaşan homolog allerjenlerden kaynaklanabilir. CRD'nin potansiyeli, homolog allerjenlere ek olarak BAV ve vespid venomlarının türe spesifik işaret allerjenleri (BAV için Api m1, Api m3, Api m4, Api m10 ve fosfolipazlar A1 ve vespid venomları için antijen 5) içermesi gerçeğinden açıkça anlaşılmaktadır. Birçok hasta için bu işaretleyici allerjenlere karşı yönlendirilen sIgE ölçümü, allerjiyle ilişkili venomun tanımlanmasına ve çapraz reaktivite ile birincil allerji arasındaki ayırım yapılmasına olanak sağlar (Frick ve ark., 2015). Bununla birlikte, mevcut CRD'nin açık bir sınırlaması, belirli hastalar için önemli olabileceğinden, sIgE tespiti için oluşturulan allerjenler olarak hyaluronidazlar ve dipeptidilpeptidazlar IV gibi vespid venomlarına potansiyel olarak çapraz reaktif allerjenlerinin mevcut olmamasıdır.

CRD, BAV ve vespid venomuna (özellikle YAV) karşı allerjileri yeterince ayırt edebilse de çeşitli vespid venomlarına karşı allerjiler arasında bir ayırım yapılmasının gerekli olduğu durum bu değildir. Örneğin, Güney Avrupa'da YAV ve PDV'ye karşı

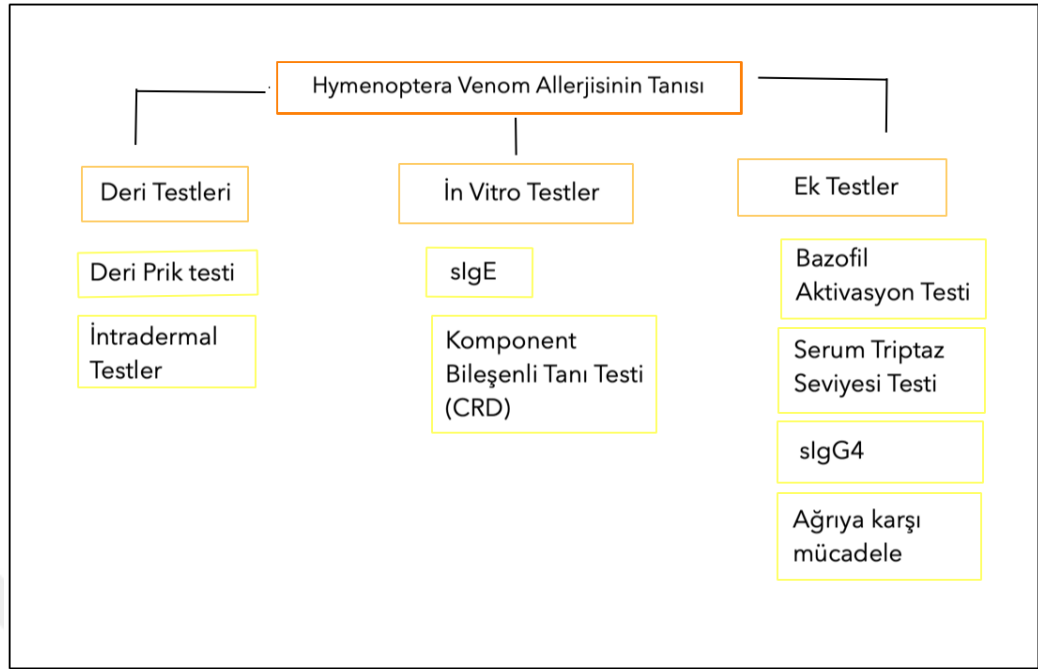
çift duyarlılık, YAV/PDV ve BAV'ye göre çok daha sıktır. (Severino ve ark., 2006; Schiener ve ark., 2017). Bu nedenle, CRD için vespil venomalarına elde edilen bu ve diğer (örn. dipeptidilpeptidazlar IV) çapraz reaktif allerjenlerin ek kullanılabilirliği, HVA'da gelişmiş hassas teşhisler için katma bir değeri temsil edecektir.

Ek olarak bazı allerjenler, VIT uygulanan hastalarda kişiselleştirilmiş risk sınıflandırması için biyobelirteç görevi görebilir (Blank ve ark., 2017; Ruiz-Leon ve ark., 2020).

2.4.3. sIgG4

Toplam IgG'nin %5'inden daha azına sahip olan IgG4, insan serumunda en az bulunan IgG alt sınıfıdır. Bununla birlikte, IgG4 düzeyleri kronik antijene maruz kalmayla birlikte artar ve immün toleransı indüklediğine ve inflamatuvar yanıtları zayıflatığına inanılır. IgE aracılı aşırı duyarlılık reaksiyonları, IgE aktivitesinin inhibe edilmesiyle IgG4 tarafından bastırılır (James ve ark., 2011; van Neerven ve ark., 1999). İki farklı mekanizma öne sürülmüştür: i) IgG4, antijenler üzerindeki immünojenik epitoplara temizler ve FcεRI'nin aşağı yönlü çapraz bağlanmasını önleyen bloke edici bir antikor görevi görür ii) IgG4, inhibitör FcγRIIb'yi birlikte uyarır. Bu IgG reseptörü sinyal iletimini düzenler ve efektör hücrelerin aktivasyonunu inhibe eder.

VIT, sIgG4 antikorlarında anlamlı bir artışla ilişkilidir. Ancak VIT durdurulduktan sonra sIgG4 düzeyleri düşmeye başlar (Kepley ve ark., 2000; Mobs ve ark., 2015). Çimen poleni allerjisinde, IgE bloke etme kapasitesinin birkaç yıl devam ettiği ve klinik etkinlikle ilişkili olduğu gösterilmiştir, ancak allerjene spesifik immünoterapi durdurulduktan sonra IgG4 seviyeleri hızla düşmüştür. Bu, sIgG4 seviyelerinin değil, fonksiyonel aktivitelerinin klinik etkinlik ve uzun vadeli koruma ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (James ve ark., 2011; Shamji ve Durham, 2017). Bu nedenle, VIT'de tedavi başarısının öngörülmesinde biyobelirteç olarak venom-sIgG4 düzeylerinin kullanımına ilişkin herhangi bir kanıt verilmemiştir. Bununla birlikte, IgG4 indüksiyonu tek başına terapötik başarının belirteci olmasa da IgG4 indüksiyonunun olmaması immünolojik yanıtızlığın bir belirteci olabilir.



Şekil 2.4. Hymenoptera venom allerjisinin tanı araçları.

2.5. Ek Testler

Hücresel Testler: Bazofil aktivasyon testi birinci basamak bir test değildir ancak HVA tanısındaki rolü iyi bilinmektedir. Hem pratik uygulaması hem de sonuçların yorumlanması açısından uzmanlık gerektirir ve genellikle üçüncü basamak sağlık merkezlerinde kullanılmak üzere araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

2.5.1. Bazofil Hücresi ve Önemi

Bazofiller, periferik kanda en az miktarda bulunan granülosit popülasyonudur ve tüm lökositlerin yüzde birinden daha azını oluşturur (Schroeder, 2009). Bazofiller histamin içerdiği ve yüksek afiniteli IgE reseptörü FcεRIα 'i eksprese ettiğini bilinmektedir. Bununla birlikte, göreceli olarak bol miktarda bulunmamaları ve mast hücrelerine fenotipik ve fonksiyonel benzerlikleri nedeniyle, bazofiller, benzersiz işlevlere sahip olmayan yedek bir granülosit popülasyonu olarak kabul edilir. Ek olarak, periferik kanda bazofillerin varlığı, bunların dokuda yerleşik mast hücrelerine göre daha kolay elde edilmesine olanak sağlamış ve granülosit biyolojisinin daha iyi anlaşılması için fonksiyonel analizlerde mast hücrelerinin vekilleri olarak kullanılmaya başlanmıştır (Schroeder, 2009). Bazofil popülasyonlarının çeşitli

helmint parazitlerine ve parazit kaynaklı antijenlere yanıt olarak önemli oranda artış gözlemlendiği gösterilmiştir; bu, bazofillerin bazı parazitlere karşı koruyucu TH2 sitokin aracılı bağışıklıkta rol oynayabileceğini öne sürmektedir (Rothwell ve Dineen ,1972).

Bazofillerin, kemik iliğinde bulunan yaygın hematopoietik kök hücre (HCS) türevli granülosit-monosit progenitör hücrelerden (GMP) geliştiği rapor edilmiştir. GMP'ler, makrofajlar, eozinofiller, mast hücreleri ve bazofiller dahil olmak üzere birden fazla hücre soyuna dönüşme kapasitesini korur. Kritik olarak, GMP'ler olgunlaştıkça, ara taahhüt adımlarına girdikleri bilinmektedir ve mast hücresi öncülleri (MCP), bazofil-mast hücre öncülleri (BMCP) veya bazofil öncülleri (BaP) haline gelebilirler (Arock ve ark., 2002; Arinobu ve ark., 2005). Kemik iliğinden olgunlaşmamış bir fenotiple çıktığı ve olgunlaşmasını periferik dokularda tamamladığı bilinen mast hücrelerinin aksine, bazofillerin tamamen olgunlaştıktan sonra kemik iliğinden çıktığı bildirilmektedir (Iwasaki ve Akashi, 2007). Bununla birlikte, son araştırmalar, GMP'ler de dahil olmak üzere çok sayıda kemik iliğinde yerleşik progenitör hücre popülasyonunun, inflamatuvar bağlamında kemik iliğinden çıktığını ve periferde ekstramedüller hematopoez (EMH) geçirdiğini tespit etmiştir (Griseri ve ark., 2012). Bazofiller, sitokinlerin, antikorların, proteazların ve doğrudan antijenlerin aracılık ettiği sinyaller de dahil olmak üzere bir dizi sinyal ile aktive edilebilir.

Klasik olarak allerjik veya atopik hastalıklar, TH2 sitokin tepkileri tarafından yönlendirilir ve dolayısıyla IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13'ün üretimiyle ilişkilidir. Ayrıca, bu koşulların altında yatan inflamatuvar yanıtlar periferik eozinofili, IgE üretimi ve dokuda yerleşik mast hücre yanıtları ile ilişkilidir. Son yıllarda bazofiller, birçok allerjik hastalık modelinin patogeneze katkıda bulunan bir faktör olarak ortaya çıkmıştır (Mukai ve ark., 2005).

2.5.2. Bazofil Aktivasyon Testi

BAT, allerjen veya anti-IgE stimülasyonundan kaynaklanan yüksek afiniteli IgE reseptörüne (FcεRI) bağlanan IgE antikorlarının çapraz bağlanmasının ardından yukarı doğru düzenlenen bazofillerin yüzeyindeki aktivasyon işaretleyicilerinin ekspresyonunu ölçmek için akım sitometrisini kullanır. Bazofilleri tanımlamak ve

akış sitometrisi ile aktivasyonlarını ölçmek için kullanılabilecek çok sayıda farklı belirteç vardır (Tablo 2.8.).

Hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonuna ek olarak bazofil aktivasyonu, p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) veya sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) gibi belirli hücre içi moleküllerin fosforilasyonuna bakılarak da incelenebilir. IgE ve onun yüksek afiniteli reseptörünün aşağı akışındaki sinyalleme kademesinin bir parçasıdır (Ebo ve ark., 2007; Verweij ve ark., 2012). Cytometry by time-of-flight (CYTOF) (Mukai ve ark., 2017) ve floresan-avidin gibi teknolojiler kullanılarak bazofil aktivasyonunun değerlendirilmesine yönelik başka yöntemler önerilmiştir (Ebo ve ark., 2007; Verweij ve ark., 2012).

BAT, bazofilleri içeren tam kan veya izole edilmiş periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) kullanılarak gerçekleştirilebilir. PBMC izolasyonu, yoğunluk gradyan ayrımı kullanılarak gerçekleştirilebilir ve manyetik parçacıklar kullanılarak ilave negatif seçim, bazofiller için zenginleştirmeye izin verir; ancak santrifüj adımlarından dolayı hücre kaybı riski artar ve hücrelerin aşırı kullanımı arka planda aktivasyona neden olabilir (Ebo ve ark., 2008). Akım sitometrisi ve floresan boyama teknikleri, daha fazla manipülasyona gerek kalmadan tam kandaki bazofillerin spesifik olarak araştırılmasına olanak sağlamıştır (Metcalf ve ark., 2016).

Ek olarak, izole edilmiş bazofillerin aksine tam kanın kullanımı daha fizyolojik olabilir ve kan bazofillerinin in vivo ortamına daha çok benzeyebilir; allerjik reaksiyonda rol oynayabilen antikorların bloke edilmesi veya bireylerin allerjik olmayan fenotipi gibi diğer faktörler de mevcuttur (Metcalf ve ark., 2016).

Tam kan BAT, bazofillerin canlılığını ve işlevselliğini en üst düzeye çıkarmak için ideal olarak kan alındıktan sonraki 4 saat içinde gerçekleştirilmelidir (Sturm ve ark., 2009). Çünkü bazofil reaktivitesi zamanla önemli ölçüde azalır. Kan alımı ile BAT'ın uygulanması arasında daha uzun bir süre gerekiyorsa (örneğin, çok merkezli çalışmalar veya referans laboratuvarından uzakta bulunan klinik merkezler), kan 24 saat içinde işlenebilir (Glaumann ve ark., 2012). Mukai ve arkadaşları (Mukai ve ark., 2017), heparinde 4 °C'de saklanan kan üzerinde kan alımını takip eden 4. ve 24. saatlerde uygulanan BAT'ın anlamlı farklar göstermediğini ve bu süre zarfındaki

nakil işleminin anlamlı bir etki yaratmadığını göstermişlerdir. Sonuçlar, BAT için tam kanın toplanması genellikle heparinle yapılır; etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) veya asit sitrat dekstrozu (ACD) gibi diğer antikoagülanlar bazofil degranülasyonunu önleyebilir. Örneğin EDTA, daha sonraki inkübasyon adımlarında hücre dışı kalsiyumun eklenmesiyle tersine çevrilebilen kalsiyumu şelatlayabilir; ancak muhtemelen orijinal kan örneğindeki fizyolojik konsantrasyondan farklı konsantrasyonlardadır. Bazofillerin IL-3 ile hazırlanması, allerjene karşı IgE aracılı CD63 yanıtlarının artırılmasına yardımcı olabilir, ancak CD203c ve p38 MAPK sinyal yollarının spesifik olmayan yukarı regülasyonunu indükleyebilir (Sturm ve ark., 2009; Bühring ve ark., 2009). Sturm ve meslektaşları ayrıca bazofil tepkilerini arttırmak için BAT uygulanmadan önce numunelerin ve reaktiflerin 37 °C'de 10 dakika süreyle ön ısıtılmasının hiçbir etkisinin olmadığını gözlemlediler (Sturm ve ark., 2009).

Allergen kaynağı BAT'ın hem klinik hem de araştırma uygulamalarında bir diğer kritik faktördür. Allergen uyarıcıları ham ekstraktlardan rekombinant veya saflaştırılmış tekli allergen kaynaklarına kadar değişir. Farklı laboratuvarlardan alınan performans verilerini karşılaştırırken ve zaman içinde testler gerçekleştirirken standartlaştırılmış hazırlıklar önerilir. BAT'ta test için rekombinant allergenlerin mevcudiyeti sınırlı olabilir, ancak ham allergen veya ekstraktlarla karşılaştırıldığında en yüksek stabiliteye ve tutarlılığa sahiptirler ve bazı durumlarda tanısal doğruluğu artırmaya yardımcı olabilirler. İlaç allerjisini test etmek için parenteral uygulama için kullanılan saf ilaç preparatı tercih edilir ve dilüsyonlar, BAT gerçekleştirilmeden kısa bir süre önce hazırlanmalıdır (Hoffmann ve ark., 2015).

Bireyler arasındaki bazofil yanıtlarının değişkenliği göz önüne alındığında, tek bir allergen konsantrasyonunun aksine, en az beş farklı allergen konsantrasyonundan oluşan bir doz yanıtının (örneğin 10 kat artışlarla) test edilmesi önerilir. Bu değişkenlik kısmen antijenlerin karmaşıklığına, IgE'nin allergen epitoplarına yönelik değişen afinitesine ve içsel bazofil duyarlılığına bağlıdır. Sonuç olarak, doz-yanıt profili, tipik çan şeklindeki doz-yanıt eğrisinden önemli ölçüde farklılık gösterebilir (MacGlashan, 2013; Santos ve Lack, 2016). Doz-yanıt eğrisinden elde edilen BAT sonuçları, bazofil reaktivitesi, bazofil duyarlılığı veya her ikisi olarak ifade edilebilir

(Santos ve Lack, 2016). Bazofil reaktivitesi, belirli bir konsantrasyonda %CD63+ bazofiller kullanılarak veya CD-max, yani maksimum bazofil aktivasyonunun meydana geldiği konsantrasyon kullanılarak ölçülebilir. Tersine, bazofil duyarlılığı EC50 (maksimum bazofil tepkisinin %50'sinin olduğu konsantrasyon) veya CD-sens (EC50'nin tersinin 100 ile çarpımı olarak tanımlanır ve bu doz-cevap eğimin eğrisinden hesaplanabilir) olarak ifade edilebilir). Doz-yanıt eğrisinin altındaki alan, son zamanlarda bazofil reaktivitesini ve duyarlılığını aynı anda değerlendirmek için kullanılmıştır (Patil ve Shreffler, 2012).

Bireylerin yaklaşık %5-10'unda yanıt vermeyen bazofiller bulunur; burada IgE aracılı allerjen stimülasyonuna yanıt olarak CD203c veya CD63'te artış olmaz, sadece IgE aracılı olmayan uyarıcılara yanıt olarak ortaya çıkar. Bu nedenle BAT'a hem IgE'ye bağımlı (örn. anti-IgE veya anti-FcεRI) hem de IgE'den bağımsız (örn. fMLP veya iyonomisin) pozitif kontrollerin dahil edilmesi önerilir (Eberlein ve ark., 2010). Ayrıca, bazofillerin arka plan düzeyini veya spontan aktivasyonunu değerlendirmek için tek başına stimülasyon tamponundan oluşan bir negatif kontrolün de dahil edilmesi gerekir. IL-3 kullanılıyorsa stimülasyon tamponuna IL-3 için ek bir kontrol dahil edilmelidir.

BAT'ın araştırma laboratuvarından klinik uygulamaya geçişi, BAT'ın farklı allerjenlere yönelik tanısal performansının klinik doğrulanmasına ek olarak laboratuvar prosedürünün, akış sitometrisinin ve veri analizlerinin standardizasyonu ve kalite güvencesine bağlıdır. Akım sitometrisi veri analizlerinin otomasyonu, analizlerin verimliliğini ve şeffaflığını ve verilerin tekrarlanabilirliğini artırmaya yardımcı olabilir (Patil ve ark., 2017). Ham veriler de dahil olmak üzere biyoinformatik araçları ve kaynakları giderek daha fazla kamuya açık hale geliyor ve bu da metodolojinin standardizasyonunu ve paylaşımını daha da kolaylaştırabilir. Şu anda, Avrupa Allerji ve Klinik İmmünoloji Akademisinin (EAACI) uluslararası bir görev gücü, BAT'ın kalite güvencesini ele almaya başlamak için BAT'ın klinik uygulamasında geniş deneyime sahip uzmanları bir araya getirmiştir. Maliyet etkinliğinin ve klinik karar verme üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi, BAT'ın klinik kullanım için düzenleyici onayı açısından merkezi bir öneme sahiptir ve daha fazla araştırmayı hak etmektedir (Santos ve Lack, 2016).

Tablo 2.8. Bazofil tanımlama ve aktivasyon belirteçleri

	Marker	Hücre Ekspresyonu	Açıklama ve geçit stratejisi
Tanımlama Markerları	CCR3	Bazofiller, mast hücreleri, Th2 lenfositleri	Tanımlama için kararlı işaretleyici, CD3 kullanımı gibi diğer hücrelerden daha fazla farklılaşmaya ihtiyaç duyabilir
	CD203c	Bazofiller, mast hücreleri, CD34+ progenitör hücreler	Yaygın olarak kullanılan tanımlama işaretçisi ve dinlenme halindeki hücrelerin düşük seviyelerinde ifade edilir. Düzenlemenin parça parça degranülasyonu temsil ettiği bildirildi
	CD123	Bazofiller, plazmasitoid dendritik hücreler	Bu hücrelerde yüksek oranda ifade edilir; HLA-DR, HLA-DR+ dendritik hücreleri ayırt etmek için kullanılabilir
	IgE	Bazofiller, monositler, dendritik hücreler	Yüksek afiniteli IgE reseptörü FcεRI'yi eksprese eden diğer hücreler, HLA-DR kullanılarak da farklılaştırılabilir. Bireylerde yüksek değişkenlik rapor edilmiştir
	CRTH2	Bazofiller, eozinofiller, Th2 lenfositleri	Yan dağılım yoluyla eozinofillerden veya CD3 ile T lenfositlerinden farklılaşma rapor edilmiştir
Aktivasyon Markerları	CD63	Bazofiller, mast hücreleri, trombositler, makrofajlar	Yaygın olarak kullanılan aktivasyon belirteci ve anafilaktik degranülasyonun doğru bir belirteci
	CD107a, CD107b	Bazofiller, mast hücreleri, T hücreleri ve NK hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri	CD107a ve CD107b'nin yalnızca aktive edilmiş bazofiller tarafından eksprese edildiği ve yukarı regülasyonunun CD63'e benzer olduğu bulunmuştur. CD13 ve CD164, CD203c ile karşılaştırılabilir bir ifade profiline sahiptir
	CD13	Bazofiller, miyeloid hücreler	
	CD164	Bazofiller, CD34+ progenitör hücreler	
	CD69	Bazofiller, lenfositler, nötrofiller, monositler, eozinofiller	IL-3 ile uyarıldığında aşamalı olarak ifade edilir; ancak IgE aracılı stimülasyona zayıf bir şekilde eksprese edildiği bulunmuştur
	p38 MAPK, STAT5	Çeşitli hücre türleri	Hücre içi moleküllerin bazofilik fosforilasyonu alternatif olarak bazofil aktivasyonunu ölçmek için kullanılabilir

2.5.3. BAT için Çalışmada Kullanılan Antikorlar ve Özellikleri

CD123 Antijeni: CD123 antijeni, diğer adıyla İnterlökin-3 alfa reseptörü (IL-3R α), sitokin reseptör ailesine aittir. Bağlı hematopoetik kök / progenitör hücreler, miyeloid soyun çoğu (CD13+, CD14+, CD33+, CD15low) ve bazı CD19+ hücreleri tarafından yapısal olarak eksprese edilir, CD3+ hücrelerinde yoktur. Dendritik hücreler, monositler, eozinofiller ve bazofiller üzerinde eksprese edilir. (Beckman Coulter. Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024.)

CD63 Antijeni: CD63 antijeni, lizozomal membranla ilişkili glikoprotein 3 (LAMP3) olarak da bilinir ve tetraspanin (TM4SF) ailesinin bir üyesidir. Yaklaşık 20 gen, ana yapısal özellikleri dört transmembran alanı olan tetraspaninleri kodlar. CD63'ün, diğer tetraspaninlerde (CD9, CD81, CD82) olduğu gibi, yakın zamanda VLA-3 ve fosfatidilinositol 4-kinaz, VLA-6, CD11/CD18 ve tirozin kinaz ile kompleksler oluşturduğu bildirilmiştir. CD63 ilk olarak durgun trombosit granüllerinde ve aktif trombositlerdeki yüzey membranında bulunmuştur. CD63 daha sonra bir trombosit açısından yoğun granül glikoproteini olan granülofizine olarak tanımlanmıştır. CD63'ün trombosit formunun molekül ağırlığı 40 ila 55 kDa arasında değişir. CD63'ün melanom hücreleri tarafından eksprese edilen ME491 antijeniyle aynı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca monositler ve makrofajlarda bulunur ve durgun granülositler, T lenfositleri ve B lenfositleri ile zayıf bir şekilde eksprese edilir. Uyarılmamış nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan CD63 antijeni, aktivasyondan sonra nötrofillerin yüzeyinde güçlü bir şekilde eksprese edilir. Çalışmalar CD63'ün granül salımı için bir belirteç olabileceğini göstermiştir. Bu olgu, bazofiller için de bildirilmiştir. (Beckman Coulter. (Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024.)

CD203c Antijeni: CD203c molekülü, oligonükleotidlerin, nükleozid fosfatların ve nikotinamid adenin dinükleotitin (NAD) hidrolizinde görev alan ektonükleotid pirofosfataz / fosfodiesteraz 3 (E-NPP3) enzim ailesinden olan bir tip II transmembran proteindir. Bazofiller ve mast hücreleri, allerjik ve enflamatuvar reaksiyonlarda rol oynayan hematopoietik efektör hücrelerdir. Her iki hücre tipi de yüksek afiniteli IgE reseptörünü yüksek düzeyde eksprese eder. CD203c yalnızca insan periferik kan bazofillerinde eksprese edilir. Ayrıca matür mast hücreleri,

bazofil ve mast hücrelerinin CD34+ kemik iliği progenitörleri tarafından eksprese edilir. Bunlara ek olarak, CD203c antijeni anti-IgE antikorları ve allerjenler tarafından bazofillerin aktivasyonundan sonra yukarı doğru regüle edilir.

HLA-DR Antijeni: İnsan lökosit antijenleri (HLA) olarak da adlandırılan insan majör histokompatibilite kompleksi (MHC), MHC sınıf I, sınıf II ve sınıf III olarak tanımlanan üç molekül grubundan oluşur. MHC sınıf II genomik bölge veya HLA-D bölgesi, HLA-DR, -DQ ve -DP antijenlerini kodlayan genleri içerir. MHC sınıf II molekülleri, α/β heterodimerlerinin kovalent olmayan şekilde ilişkilendirilmesi ile oluşturulur. Hem ağır (α) hem de hafif (β) zincirler hücre membranını kapsar. Molekül ağırlıkları sırasıyla 31-33 kDa ve 26-29 kDa'dır. HLA-DR molekülleri antijen sunan hücrelerde (APC), yani dendritik hücrelerde, B lenfositlerinde, monositlerde, makrofajlarda, langerhans hücrelerinde ve timik epitel hücrelerinde bulunur. Bunlar ayrıca aktif T hücrelerinde eksprese edilir, ancak granülositler, trombositler veya kırmızı kan hücrelerinde eksprese edilmez. Normalde bu molekülleri eksprese etmeyen dingin T hücreleri veya endotel hücreleri, bunları eksprese etmek için indüklenebilir. HLA-DR ayrıca farklı diferansiyasyon aşamalarındaki bazı hematopoetik progenitör hücrelerde eksprese edilir. (Beckman Coulter. (Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024).)

Anti-IgE Antikoru: Yüksek afiniteli IgE reseptörünü (Fc ϵ RI) eksprese eden diğer hücreler, HLA-DR kullanılarak da farklılaştırılabilir. Bireylerde yüksek değişkenlik gösterir. Bazofiller, monositler, dendritik hücrelerin yüzeylerinde eksprese edilir (Beckman Coulter. Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024).

Pürifiye anti-insan IL-3 Antikoru: İnterlökin-3 (IL-3), kemik iliği kültürlerinden megakaryositlerin, nötrofillerin ve makrofajların koloni oluşumunu uyaran mast hücreleri, bazofiller, keratinositler ve astrositler tarafından üretilmekle birlikte öncelikle aktif T hücreleri tarafından üretilen oldukça türe özgü bir pleiotropik faktördür. Bu antikor, doğal veya rekombinant IL-3'ün biyoaktivitesini nötralize edebilir (Beckman Coulter. (Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024)).

2.5.4. Bazofil Aktivasyon Testinin Klinik Uygulamaları

Allerjiyi doğru bir şekilde teşhis etmek için klinik öykü anahtar faktördür. Olası suçlu allerjen ve immünolojik mekanizma akılda tutularak, sIgE ve/veya deri testi kullanılarak IgE veya hücre aracılı reaksiyonun varlığının belgelenmesi tanıyı destekler. İyi yerleşmiş olmasına rağmen, deri testi ve sIgE'nin pratik sınırlamaları vardır; örneğin, deri testi, sağlam cilt ve anti-histamin kesilmesini gerektirir ve hem deri testi hem de sIgE, klinik allerjiyle eşdeğer olmayan duyarlılığı tespit eder. Klinik öykü ve deri ve/veya sIgE testi sonrasında tanı şüpheli çıkarsa, klinik gözetim altında bir provokasyon testi yapılması gerekir (örn. gıda allerjisinde oral gıda yüklemesi, ilaç allerjisinde ilaç provokasyon testi). Bu provokasyon testi deri, mukoza, gastrointestinal, solunum ve kardiyovasküler semptomlar dahil olmak üzere allerjik reaksiyonları tetikleme riski taşıdığından hasta için sıklıkla streslidir (Lieberman ve ark., 2011; Jerry ve ark., 2004). Tüm allerjik hastalık türlerinde, allerjik reaksiyonu in vivo olarak deri testlerinden ve sIgE'den daha iyi temsil edebilecek bir in vitro analiz en yararlısı olacaktır. IgE aracılı allerjide BAT, test tüpünde ani tipte allerjik reaksiyonu potansiyel olarak yeniden üretebilecek şekilde ortaya çıkar.

2.5.5. Venom Allerjisinin Tanısında BAT

BAT, hymenoptera venomu allerjisini teşhis etmede hem yüksek duyarlılık (%85-100) hem de özgüllük (%83-100) bildirmektedir, ancak sırasıyla BAV ve YAV'lar Api m1 ve Ves v5 ana allerjenlerine karşı sIgE testi, çok sayıda şüpheli vakada BAT'ın etkisini azaltmıştır. Yine de BAT, venom allerjisinde benzersiz teşhis sorunlarını çözme en büyük başarıyı elde etmiştir. Örneğin, klinik venom allerjisi öyküsü olan hastaların küçük bir kısmı, saptanamayan sIgE ve negatif cilt testleri bildirmektedir. Bununla birlikte, mevcut kılavuzlar bu hastalarda tanının nasıl takip edileceği konusunda tavsiyede bulunmamakta olup, bu koşullar altında arı sokması provokasyon testlerinin etik olmayan doğası nedeniyle daha da karmaşık hale gelmektedir. BAT'ın bu hastaların yaklaşık %80'ine tanı koymada etkili olduğu kanıtlanmıştır ve bu venom allerjisinin yalnızca deri testleriyle teşhis edilmesinde belirgin bir gelişmedir (Korošec ve ark., 2013). HVA tanısının bir diğer nüansı hem BAV hem de YAV'a karşı çift pozitifliktir; hastaların %60'a kadarı her ikisinde de

sIgE sergiler. VIT’de ilerlemek için sorumlu allerjenin belirlenmesi zorunludur. BAT, diğer teşhis yöntemleriyle karşılaştırıldığında sürekli olarak en düşük düzeyde çift pozitiflik gösterir ve çift pozitifliğin belirgin olduğu durumlarda, BAT sıklıkla baskın allerjeni tanımlayabilir (Sturm ve ark., 2011). Uyarıcı olarak rekombinant allerjenleri kullanarak bazofil reaktivitesinin değerlendirilmesinin, suçlu allerjen kaynağının belirlenmesinde anahtar olabileceğini düşündürmektedir.

2.5.6. Allerjik Hastalığın Bağışıklık Mekanizmalarını Keşfetmek İçin BAT’ı Bir Araç Olarak Kullanmak

BAT, kısmen karmaşık hasta fenotiplerinin korunmasına bağlı olarak klinik ve laboratuvar arasında geçiş yapar, aynı zamanda bu test kullanılarak değerlendirilebilecek çeşitli immünolojik hedeflere de bağlıdır. IgE aracılı bazofil aktivasyonu, IgE'nin FcεRI'ye yüksek afiniteyle bağlandığı duyarlılığı takip eder ve allerjen veya anti-IgE antikorlarının uyarılması, IgE moleküllerinin çapraz bağlanmasıyla, bağışıklık reseptörü tirozin bazlı aktivasyon motifinin (ITAM) fosforilasyonu ile sonuçlandığında meydana gelir. Paralel inhibitör bileşenler aynı zamanda bazofillerin yüzeyindeki immünoresptör tirozin bazlı inhibisyon motifi (ITIM) ile ilişkili reseptörlerin eş zamanlı uyarılmasına bağlı olarak da fosforile edilebilir ve bazofil regülasyonunda önemli bir role sahip olabilir. Antikor aracılı tepkilerde ilgi duyulan inhibitör reseptörlerden biri, IgG'yi bağlayabilen ve potansiyel olarak IgE ile IgG arasında çapraz bağlanmaya izin veren ve IgE aracılı bazofil aktivasyonunu baskılayan CD32B'dir. IgG ve IgE dışındaki diğer antikor izotipleri, hücre dışı alanda allerjene bağlanmak için bloke ederek ve rekabet ederek allerjen-IgE etkileşimine de müdahale edebilir (Strait ve ark., 2006).

BAT'ın allerjik hastalığın mekanizmalarını anlamadaki başarısının anahtarı, bazofiller tarafından ifade edilen yüzey proteinlerini karakterize etme yeteneği ve bunların allerjen stimülasyonuna veya tehdidine yanıtı nasıl modüle ettiğidir. BAT, FcεRI ifadesinin miktarının belirlenmesine ve aynı zamanda diğer Fcγ reseptörlerinin (CD16, CD32, CD64) sabit durumda ve ayrıca aktivasyon veya zorlamaya yanıt olarak ekspresyonuna izin verir (MacGlashan ve Hamilton, 2016).

Benzer şekilde efektör hücrelerin yüzeyindeki reseptöre bağlı antikorları ölçmek mümkündür.

Allerjen stimülasyonuna bazofil yanıtı, reseptörlerine bağlanan allerjene sIgE'nin özellikleri, yani konsantrasyonu, özgüllüğü, klonalitesi ve allerjene afinitesi ile modüle edilebilir ve bu immün modülasyon in vitro olarak incelenebilir (Beyer ve ark., 2003). Allerjik yanıtları ortaya çıkaran peptidlerin ve epitopların daha iyi anlaşılması hem gelişmiş tanısal testler hem de potansiyel yeni tedaviler için anahtardır.

Bazofil aktivasyonu IgE'den bağımsız bir şekilde meydana gelebilir ve allerjene aktivasyon mekanizmasını doğrulamak için BAT yapılabilir.

2.6. Daha İleri Teşhis Testleri

Bazı ülkelerde, HVA şüphesi olan hastaların tanısal incelemesine arı sokması provokasyon testi de dahil edilmektedir. Sistemik bir reaksiyon meydana gelirse, arı sokması provokasyon uyarısı, duyarlılığın klinik açıdan anlamlı olduğunu doğrular; ancak ciddi sistemik reaksiyonlara yol açabilir. Buna bağlı olarak teşhisi kolaylaştıracak ek testler yapılmaya başlanmıştır.

2.6.1. Allerjen Komponent Testi

Allerjenler ve Bileşenler: Protein bileşenli materyallerin tamamı allerji geliştirme potansiyeline sahiptir. Allerjen kaynaklarındaki proteinler (örn. yer fıstığı, polen ve hymenoptera) sıklıkla birkaç farklı allerjenik parça, farklı epitoplar içeren allerjen bileşenleri, yani karşılık gelen IgE antikorları için üç boyutlu bağlanma yerleri olan peptitler içerir. Epitopların allerjik etki gösterip göstermeyeceğini belirleyen genel bir özelliği yoktur. Diğer iki önemli epitop özelliğine dayalı olarak, ısıya dayanıklı (ısıya karşı dayanıklı) ve sindirime dayanıklı (sindirime dayanıklı epitopların aksine, ventrikül denatürasyonuna direnirler) olarak ikiye ayrılırlar. Bir epitop ısınmaya ve sindirime ne kadar dayanıklı olursa, allerjene maruz kalan duyarlı hastada ciddi klinik semptomların ortaya çıkma riski de o kadar yüksek olur. Bileşen çözümlü tanının güçlü yönlerinden biri, bazı durumlarda semptom ve bulgulardan ayırım

yapmanın zor olduğu hastalarda gerçek allerji ile çapraz reaksiyon arasında ayrım yapabilmektedir.

Çapraz Reaktif Karbonhidrat Belirleyicileri: Anti-N-Glikan CCD'ler IgE antikorları, yani ortak glikoproteinlerin epitoplarına karşı olan antikorlardır. Ancak buların varlığı genellikle klinik anlamlılık kazanmaz (Sastre, 2010).

Birçok allerjen, protein ailelerinin sınırlarının ötesinde önemli yapısal homolojileri paylaşabilen glikoproteinlerdir. Kapsamlı apraz reaktiviteye yatkın olduklarından bunlara çapraz reaktif karbonhidrat belirleyicileri veya CCD'ler denir. İki tip CCD farklılaşmıştır: α -galaktoz tipine karşı hassasiyetler ciddi reaksiyonlara neden olabilirken, MUX tipine (mannoz, glikoz ve ksiloz içeren glikoformlar) karşı hassasiyetler sıklıkla klinik olarak önemsizdir. Artan alkol tüketimi olan hastalarda yüksek IgE düzeylerinin, MUX tipi CCD'ye duyarlılıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ağırlıklı olarak akar allerjenlerine duyarlılığı olan 1.025 yetişkinden oluşan bir popölasyonda, CCD duyarlılığının nispeten nadir olduğu ve solunum yolu allerjisi şüphesi olan hastaların tanısı için önemli bir sorun olmadığı gösterilmiştir (Vidal ve ark., 2012). MUX tipi anti-CCD IgE antikorlarının tespiti ticari olarak temin edilebilen bir dizi kit ile mümkündür (Mertens ve Brehler, 2011).

Çift duyarlılaşma sorunu: CCD'lerin dışında, venom allerjisi olan hastalarda çift pozitiflik, büyük ölçüde hyaluronidazlara (Api m2 ve Ves v2), vitellogeninlere (Api m12 ve Ves v6) veya dipeptidil peptidaz 4'e (Api m5 ve Ves v3) yönelik IgE'ye atfedilmiştir (Blank ve ark., 2010). Son alışmalar, protein seviyesinde hyaluronidazlar arasındaki çapraz reaktivitenin sınırlı olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni, önemli derecede özdeşliğe sahip yüzey alanlarının bulunmamasıdır (Skov ve ark., 2006). Hem CCD hem de protein epitoplarına karşı yönlendirilen sIgE mevcut olabileceğinden, CCD'ye sIgE'nin tespiti, çoklu venomların protein epitoplarına karşı duyarlılığın dışlanmasına izin vermez. Tek istisna, kağıt eşekarısı venomlarıdır (Polistinae) immünolojik olarak saptanabilir CCD reaktivitesi göstermemektedir (Sturm ve ark., 2011). Türe özgü CCD içermeyen allerjenlerin kullanımı, BAV ve YAV'de bulunan homolog allerjenlerin protein epitopları nedeniyle çapraz reaktivitenin dışlanmasını kolaylaştırır. Ancak önümüzdeki yıllarda

Hymenoptera venomlarına karşı çoklu duyarlılığın aydınlatılmasına yönelik moleküler IgE teşhisi alanı, daha iyi çözümlere ihtiyaç duyan ek zorluklarla karşılaşacaktır.

2.6.2. Allerjen Komponent Testi (Bileşene Bağlı Tanı: CRD)

Allerjenler, farklı allerjik özellik gösteren parçaların bazıları, başka allerjenlerle ortaktır. Bu nedenle tüm allerjen ekstrelerini test eden sIgE ölçümlerinde ve DPT’de yanıltıcı sonuçlar çıkabilir. Özellikle çoklu allerjen duyarlılığında bu ortak allerjen yapılar nedeniyle çapraz reaksiyonlar, yalancı pozitiflikler görülebilir. Allerjenleri bileşenlerine ayırarak türe özgü veya farklı türlerde ortak olan allerjenler saptanır. Buna; allerjen komponent testi (orijinal ismi ile “Component Resolved-Diagnosis”; CRD) denir (Cengizlier ,2017).

İyi tanımlanmış, uygun şekilde karakterize edilmiş ve saflaştırılmış doğal ve rekombinant allerjenlerin kullanımına dayanan CRD, venom allerjisi tanısında yeni bir yaklaşım oluşturmaktadır (Cifuentes ve ark., 2014; Monsalve ve ark., 2012).

Mikrodizi tekniklerinin kullanıma sunulması allerjik hastalıkların tanısında büyük bir ilerleme olmuştur. Kısaca CRD olarak da bilinen bu teknik, çoklu duyarlılığa sahip hastaların gerçek duyarlılık modelini gösterir, çapraz reaktivite ile duyarlılaşma arasında ayırım yapılmasına yardımcı olur ve allerjinin dışlanmasına yardımcı olur (Antolín ve ark., 2017; Saltabayeva ve ark., 2017).

2.6.3. CRD Tekniği

Immuno Solid-Phase Allergen Chip ISAC® (Thermofisher Diagnostic. Erişim tarihi: 10 Şubat 2024), 112 farklı allerjenik bileşene karşı sIgE antikorlarını eşzamanlı olarak analiz edebilen, çoklu duyarlılığa sahip veya karmaşık hastalar için hassasiyet modelleri sağlayan mikrodizi bazlı bir teşhis çözümüdür.

Aynı zamanda ImmunoCAP Spesifik IgE, 650'den fazla ana allerjen, 90'ın üzerinde allerjen komponenti (komponent) ile atopik ve non-atopik hastaları ayırt etmek için tasarlanmış Phadiatop testlerinden oluşan bir test sistemidir. IgE antikorlarının miktarının ImmunoCAP sIgE sonuçları ile ölçülmesi allerji hastalarında tamamen doğru sonuca ulaşılmasını sağlar. ImmunoCAP sIgE'nin klinik değeri, beklenen test

değerlerini ve ImmunoCAP Spesifik IgE'nin IgE antikorları, insan serumunda ve plazmasında spesifik bir allerjene karşı geliştirilen sensitizasyon sonucu görülür. Dolaşımdaki IgE antikorlarının ölçümü, bir allerjene duyarlılığın nesnel olarak değerlendirmesini sağlar. Genel olarak düşük IgE antikor seviyeleri düşük bir klinik hastalık olasılığına işaret ederken, allerjene karşı yüksek antikor seviyeleri klinik hastalıkla korelasyon halindedir (Immunocap. (Erişim Tarihi: 18 Nisan 2024).

CRD aynı zamanda idiyopatik anafilaksinin tanısında ve çoklu duyarlı hastalarda majör duyarlılık paternlerinin tanımlanmasında da faydalı olabilir. Çoklu duyarlılığı olan hastalarda ImmunoCAP ISAC®'ın yararlı ve ayrıntılı bilgi sağladığı gösterilmiştir (Jambari ve Wangx AM, 2017; Martin-Muñoz ve ark., 2017). CRD, küçük bir numune hacmi (30 ul) kullanarak her testte kullanılan farklı allerjenik yapı kadar sonuç elde edebilir. Bu panel spesifik türleri ve çapraz reaktiviteyle ilgili molekülleri içerir. Çapraz reaktivite bileşenleri sayesinde CRD, 51 allerjenik kaynağın yanı sıra gıdalar (süt, yumurta, balık ve karides, kuruyemişler, baklagiller, buğday, meyveler), polen (yabani otlardan), ağaçlar, şifalı bitkiler, arılar, hayvanlar, küfler, akarlar ve hamam böcekleri, parazitler, lateks ve karbonhidratlar gibi yüzlerce allerjen kaynağı hakkında bilgi sağlar (Hemmer ve ark., 2017).

Moleküler allerjenlerin geniş paneli, bir biyoçipe sabitlenmiş ISAC yöntemi 112 allerjenik bileşenden ve ImmunoCAP 900'den fazla bileşenden oluşur. Yazılım, yorumlamaya yardımcı olacak yönlendirici açıklamalar da dahil olmak üzere raporlar oluşturur. Sadece 30 µl serum veya plazma gereklidir. Yarı niceliksel sonuçlar standardize birimlerinde (ISU) gösterilir.

Düşük arka plan gürültüsü, sağlıklı, atopik olmayan kontroller için boş sonuçlar sağlamanın yanı sıra, atopik dermatitli hastalarda olduğu gibi yüksek total IgE'li hastalar için çok iyi özgüllük sağlar. 0,3 ila 100 ISU arasındaki ölçüm aralığı, IgE antikor seviyeleri hakkında bilgi sağlar. ISU'lar belirli ImmunoCAP birimlerine göre standartlaştırılmıştır.

Duyarlılık, allerjenik bileşene bağlı olarak 0,3 ila 1,0 ISU arasında değişir. Toplam IgE çok yüksek olsa bile herhangi bir etkileşim yoktur. Allerjenik bileşenler üçlüler halinde biriktirilir ve polimer kaplı bir mikroskop lamı üzerinde bir kovalent olarak

sabitlenir. Her mikroskop lamı, 4 farklı numuneden sonuç veren 4 mikrodizi içerir. ImmunoCAPi iki adımlı bir testtir:

1. Hastanın serumundaki IgE antikorları sabit allerjenik bileşenlerle birleştirilir.
2. Allerjenlere bağlanan IgE antikorları, floresan işaretli bir anti-IgE antikoruna aracılığıyla tespit edilir.

CRD beklenmedik duyarlılıkları ortaya çıkarır ve idiyopatik anafilaksisi olan hastalar hakkında daha fazla bilgi sağlar (Seyfarth ve ark., 2017). Bu teknik, riski ve reaksiyonun türünü (asemptomatik, lokal veya sistemik) tahmin etmeye yardımcı olur. Tedavi açısından CRD, spesifik immünoterapiye yanıt vermeyen hastalarda IgE profilinin belirlenmesine yardımcı olur. Bununla birlikte, bu testlerin sınırlamaları da vardır.

Duyarlık testlerinin yorumu, deri testi veya sIgE ölçümü, bireylerin allerjik duyarlanması durumunu gösterir. Test negatif ise, bu allerjenlere duyarlık yoktur. Pozitif ise; öykü ve semptomlarla da ilişkili olması durumunda anlamı vardır. Yoksa pan-allerjen duyarlanmasına bağlı nonspesifik pozitiflik olabilir.

Genel olarak, CRD'nin, klinik olarak anlamlı ve alakasız sIgE sonuçları arasında bir dereceye kadar ayırım yapılmasına ve belirli prognostik sonuçlara sahip duyarlılık modellerinin oluşturulmasına izin vermesi nedeniyle allerjik hastanın yönetimini geliştirebileceği ortaya çıkmaktadır.

2.6.4. Allerjen Komponent Testinin Hymenoptera Aşırı Duyarlılığındaki Faydaları

CRD, bireysel duyarlılık profilleri oluşturma potansiyeline sahiptir ve duyarlılık ile gerçek allerji arasındaki ayırımı iyileştirerek katkıda bulunur. Ayrıca CRD, bireysel risk değerlendirmesine ve muhtemelen kalıcılığın tahmin edilmesine olanak tanır ve VIT için hasta seçimini hızlandırabilir.

ISAC kullanılarak yanlış negatif ve pozitif sonuç alma olasılığı da vardır. Bu, hymenoptera aşırı duyarlılığının tanısında özel bir öneme sahiptir. Her ne kadar rekombinant allerjenler ImmunoCAP'in geleneksel sIgE testiyle de kullanılabilse de

iyi tanımlanmış, uygun şekilde karakterize edilmiş ve saflaştırılmış doğal ve rekombinant allerjenlerin kullanımına dayanan CRD venom allerjisinin tanısında yeni bir yaklaşım oluşturmaktadır (Antolín ve ark., 2017). Son yıllarda CRD, ana allerjenler Api m1, Ves v1, Ves v5 ve Pol d5'in yanı sıra CCD'lere karşı sIgE antikorlarının ölçümüne olanak sağlamıştır. Bu testlerin amacı, özellikle ikili duyarlılığı olan hastalarda, herhangi bir duyarlılığın klinik ilişkisinin belirlenmesine yardımcı olmaktır. (CRD, yerleşik prosedürlerle birlikte kullanıldıkları sürece teşhis spektrumuna değerli bir katkıdır). Ves v5 dışında, Ves v1'e karşı IgE antikorlarının ölçülmesi de tanısal incelemeye her zaman dahil edilmelidir (Seyfarth ve ark., 2017). Bitkilerde ve hymenoptera venomlarında CCD'ler, in vitro allerji tanısı sırasında alakasız pozitif test sonuçlarının yaygın bir nedenidir. Bazı CCD pozitif serumlar, Phadia ImmunoCAP® platformunu kullanırken CCD içermeyen rekombinant allerjenlerle bile spesifik olmayan IgE bağlanması gösterir (Hemmer ve ark., 2017). Daha önce tespit edilemeyen Hymenoptera allerjisinin tanısal boşluğu, rekombinant allerjenlerin üretimi yoluyla azaltılmıştır. Benzer türler arası proteinler ve CDD'ler hakkında bilgi, ilgili duyarlılaşmaları alakasız duyarlılıklardan ayırt etmek için gereklidir (Tomsitz ve ark., 2017).

2.6.5. Hymenoptera Venom Allerjisinde CRD

Son yıllarda allerjenlere karşı sIgE antikorları mevcuttur: rApi m1, nApi m4, rVes v1, rVes v5 ve rPol d5. Çoğu BAV ve YAV allerjeni, aralarındaki IgE çapraz reaktivitesinin bir kısmından sorumlu olan CCD'ye sahiptir (Mittermann ve ark., 2010). Bununla birlikte, BAV ve YAV allerjenleri yüksek derecede sekans homolojisi gösterdiğinde çapraz reaktivite ortak protein epitoplarına da dayanabilir (örn. hyaluronidazlar Api m2 ve Ves v2, dipeptidil-peptidazlar Api m5 ve Ves v3). rApi m1 ve rVes v5'e sIgE'nin saptanması, CCD'lere karşı sIgE varlığında venom ekstraktlarına karşı çift pozitif IgE sonuçları olan hastalarda gerçek çift duyarlılık ile çapraz reaktivite arasında ayırım yapmak için en güvenilir tanısal prosedür olarak tanımlanmıştır (Hofmann ve ark., 2011). Bununla birlikte, başlıca BAV allerjeni olan rApi m1'in, düşük tanısal duyarlılığı (%60) nedeniyle BAV allerjisinin saptanmasında sınırlı bir klinik yararlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (Korošec ve ark., 2011). Rutin teşhislerde bulunmayan Api m10'un yakın zamanda arı türleri

venomuna allerjisi olan hastalarda bir başka önemli allerjen olduğu tanımlanmıştır. YAV allerjisi olan kişilerde sIgE'den rVes v5'e kadar 100 hastanın %87'sinde gösterilmiştir (Müller ve ark., 2009) Ves v1'in ek kullanımının, rekombinant YAV allerjenlerine dayanan tanısal testlerin duyarlılığını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Birlikte yaşayan eşek arısı *Polistes dominulus*) ve *Vespula* türlerine karşı duyarlılığın (çoğunlukla Akdeniz bölgesinde), hem *V. vulgaris* hem de *P. dominulus*'un antijen 5'ler (Pol d5/Ves v5) ve fosfolipazlar (Pol d1/Ves v1) için sIgE'nin araştırılmasıyla ayırt edilmesi önerilmiştir. Teşhis amaçlı rekombinant hymenoptera allerjeninin spektrumunun yakın zamanda genişletilmesi beklenebilir.

Klinik uygulamada, arı sokmalarına karşı allerjik reaksiyon öyküsü olmayan hastalara deri prik veya sIgE testi yapılmamalıdır. Reaksiyon öyküsü olmayan pozitif bir testin klinik önemi, pozitif testlerin klinik öykü ile ilişkili olması gereken gıda allerjisi testi ile ilgili soruna benzer. Bu nedenle, klinik hastalık yokluğunda pozitif bir anti-venom IgE testi belirsiz bir öneme sahiptir (Incorvaia ve ark., 2014).

2.6.6. CRD için Allerji Laboratuvarı Testleri

Gen teknolojisiyle üretilen saflaştırılmış (doğal/n) veya rekombinant (r) allerjenler, sIgE teşhisi için kullanılır. ImmunoCAP TM (Phadia/Thermo Fisher Scientific. Erişim Tarihi: 10 Şubat 2024.) veya Immulite (Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA, ABD), kU /l cinsinden IgE seviyelerinin kantitatif sonuçlarını veren Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA: food and drug administration) onaylı enzim bağlantılı immünolojik testlerdir. sIgE'nin güvenilir şekilde saptanması, ilgili tüm allerjen bileşenlerinin yeterli temsiline sahip allerjen reaktiflerinin kullanılmasını gerektirir. Bu, tüm reaktiflerde geçerli olmayabileceğinden, bunların bazıları bu arada rekombinant allerjenlerle (spiking olarak da bilinir) zenginleştirilmiştir (Dfu Phadia. Erişim Tarihi: 28 Ekim 2023). Zenginleştirilmiş rekombinant allerjen bileşenleri içeren reaktiflere yönelik diğer örnekler, fındık karışımı (Cor a1), lateks (Hev b5) veya yaban arısı (Ves v5)'tir.

sIgE'nin bireysel olarak belirlenmesine ek olarak, modern biyoçip teknolojisi kullanılarak, yalnızca çok az miktarda serum (yaklaşık 30 µl) kullanılarak 100'den

fazla allerjen bileşenine yönelik sIgE'nin eş zamanlı olarak belirlenmesi artık mümkündür (örn. ImmunoCAP TM ISAC sIgE 112).

Çok dizili sistemin kullanımı (şu anda polen, akar, venom, hayvan, yiyecek ve diğerlerinden gelen 112 allerjeni içermektedir) çoklu duyarlılığı olan hastalarda ve geçmişi belirsiz, tekrarlayan anafilaksisi olan hastalarda mantıklı görünmektedir (Melioli ve ark., 2011).

2.6.7. ImmunoCAP ve ISAC Ana Allerjen Komponentlerin Klinik Değeri

Bir allerjen kaynağından, tekil allerjen komponentleri üretilebilir. Bu komponentlere karşı geliştirilen hassasiyetler ayrı tekil testlerle ölçülerek hastanın hangi komponente duyarlı olduğu kesin bir moleküler seviyede belirlenir. Bu bilgi, allerjinin rafine olarak teşhisi için önemli bir temel sağlar.

Allerjen komponentleri, yapısal benzerliğe sahip olarak farklı protein aileleri altında gruplanmış proteinlerdir. Kaynaklarda farklı miktarlarda bulunan ve farklı kararlılıklara sahip bu komponentlere karşı geliştirilen hassasiyetin nedeni ortak grup özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bazı allerjen komponentleri spesifik, bazıları çapraz reaktiftir (Immunocap Erişim Tarihi: 18 Nisan 2024). Testlerden gelen sonuçların, allerjiden şüphelenildiğini belirlemek ve rahatsızlık veren allerjeni belirlemek veya test sonuçlarının negatif olduğu allerjenleri elimine etmek için kullanılır.

Sonuçlar, zamanla antikorların IgE seviyelerinin izlenmesinde de yardımcı olabilir. IgE antikorlarının artışı, erken tanı aşamasında saptanabilir, bu da klinik semptomlar gelişmeden önce sensitizasyona işaret eder ve risk altındaki hastaların tanımlanmasına yardımcı olur:

- IgE antikorlarının artışı, klinik semptomlar oluşmadan sensitizasyonu işaret eden erken bir aşamada tespit edilebilir
- Allerjik hastalığın ilerlemesini anlamada yardımcı olur
- Allerjenin yükünü açıklamaya yardımcı olur: Allerjik semptomlara birlikte katkıda bulunan allerjenler hastalığın yönetilebilmesi için uygun tedavinin belirlenmesine olanak sağlar.

- Allerji gidişatı: Ciltte oluşan semptomların solunum semptomlarına dönüşmesini belirleyebilir.
- Şiddetlenme: Hafif semptomların şiddetli semptomlara dönüşmesini belirleyebilir.
- Kroniklik: Yinelenen semptomların kalıcı semptomlara dönüşmesini saptayabilir.

2.7. Hymenoptera Venom Allerjisinin Tedavisi

HVA'sı olan hastalarda çok şiddetli ve hatta ölümcül reaksiyonların yüksek riski nedeniyle, dikkatli bir hasta yönetimi ve uygun terapötik müdahale büyük önem taşımaktadır. Riski en aza indirmeye katkıda bulunabilecek bazı davranış kuralları mevcut olmasına rağmen, arı sokmalarından tamamen kaçınmak zordur. Bu nedenle HVA olan hastalar, oral olarak uygulanan H1-antihistaminik ve kortikosteroidlerin yanı sıra adrenalin otoenjektörünü de içeren kendi kendine uygulama için bir acil durum kiti taşımalıdır. Çoğu hasta idame dozuna ulaşıldıktan sonra korunduğundan acil durum kitinin VIT sırasında ve sonrasında taşınması gerekip gerekmediği hala tartışma konusudur (Goldberg ve Confino-Cohen, 2010).

VIT, hastaları gelecekteki şiddetli arı sokma reaksiyonlarına karşı etkili bir şekilde koruyabilen, HVA'nın hastalığı iyileştirici tek tedavisidir. Erişkinlerde ve tespit edilebilir duyarlılığı olan ve genel cilt semptomlarını aşan sistemik reaksiyonu olan çocuklarda ve ayrıca yaşam kalitesi bozulduysa genel cilt semptomları olan erişkinlerde VIT önerilmektedir. VIT, klinik alanda en etkili tedavilerden biri olmasına rağmen, kapsamlı bir teşhis çalışmasına dayalı olarak doğru venomun seçilmesi, etkili koruma için çok önemli bir ön koşulu temsil eder. Bununla birlikte HVA'da endotip ve fenotip şeklinde sınıflandırmaya olanak tanıyan farklı biyobelirteçler ve tanı stratejileri mevcuttur. Böylece VIT'in doğru uygulanmasını, şiddetli arı sokması reaksiyonları açısından yüksek risk altındaki hastaların belirlenmesini ve tedavi protokollerinin ve sürelerinin ayarlanmasını kolaylaştırırlar.

VIT sırasında tolerans indüksiyonunun ayrıntılı mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Bununla birlikte tedavinin başarısıyla ilişkili olan çeşitli immünolojik değişiklikler iyi tanımlanmıştır. Venoma özgü düzenleyici T hücrelerinin (Treg) ve Th1 hücrelerinin VIT sırasında indüklendiği ve proallerjik

Th2 hücrelerini baskılayabildiği düşünülmektedir. Ayrıca Th2'nin baskılanması, IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi sitokinlerin seviyelerinin azalmasına yol açarak mast hücrelerinin ve bazofillerin duyarsızlaşmasına yol açar (Akdis ve Akdis, 2015). Ayrıca, spesifik IgG4 antikorlarının indüksiyonu, bloke edici antikorların koruyucu bir anti-inflamatuar role sahip olduğu varsayıldığından anlamlı olabilir. Ek olarak, düzenleyici fenotipli B hücrelerinin (Breg) uyarılmasının VIT sırasında önemli bir olay olduğu gösterilmiştir. Breg'ler venoma özgü T hücresi proliferasyonunu baskılayabilir ve Treg'leri uyarabilir (Kessel ve ark., 2011; Lee ve ark., 2014), böylece tolerojenik fenotipe doğru değişimi hızlandırabilir.

VIT, bütün venom ekstraktlarının deri altına enjeksiyonu ile gerçekleştirilir. Önerilen 100 µg'lık idame dozuna farklı protokoller kullanılarak ulaşılabilir. Geleneksel protokollerde idame dozuna birkaç hafta ila ay içinde ulaşılırken, ardışık günlerde günde birkaç enjeksiyonun kullanıldığı rush (hızlı) ve ultra-rush (ultra hızlı) protokollerde idame dozuna sırasıyla birkaç gün veya saat içinde ulaşılır. Cluster (Küme) protokollerinde hastalara 1-2 hafta aralıklarla günde birkaç enjeksiyon yapılır. İdame enjeksiyonları arasındaki aralıklar, klinik koruma kaybı olmaksızın 4 haftadan (ilk yıl), 6 hafta (ikinci yıl) ve 8 haftaya (3-5 yıldan itibaren 5 yıllık tedavi durumunda) kademeli olarak artırılabilir (Bonifazi ve ark., 2005).

Çeşitli çalışmalar çoğu hastada idame dozuna ulaşılır ulaşılmaz klinik korumanın sağlandığını göstermiştir. 100 µg'lık geleneksel idame dozunu alırken hala arı sokmasına tepki veren hastaların çoğu, VIT sırasında artan venom dozajlarıyla korunacaktır. VIT'in, BAV ile tedavi edilen hastaların %77-84'ünde, vespid venomunu alan hastaların %91-96'sında ve karınca venomunu ile tedavi edilen hastaların %97-98'inde gelecekteki sistemik reaksiyonları önlemede etkili olduğu bildirilmektedir. VIT'in BAV'deki düşük etkinliğinin nedenleri hala belirsizdir. Potansiyel açıklamalar, bir bal arısı sokmasıyla verilen çok daha büyük ve tutarlı venom miktarı veya belirli terapötik venom preparatlarında yeterince temsil edilemeyenler de dahil olmak üzere, farklı ana BAV allerjenlerine sahip BAV allerjik hastaların geniş duyarlılık profilleri olabilir (Tankersley ve ark., 2002; Hoffman ve Jacobson, 1984)

VIT 3-5 yıl süreyle uygulanmalıdır, çoğu uzman 5 yıl önermektedir. VIT'in 3 yıl sonra durdurulmasının yalnızca hafif ila orta dereceli reaksiyonları olan hastalar için

mümkün olabileceği ve tedavi sırasında arı sokma testinin yapılamadığı durumlarda yapılmaması gerektiği dikkate alınmalıdır. Minimum 5 yıl süreli VIT, uzun vadeli etkinlik açısından üstündür ve hastaların çoğunu korur. VIT'in kesilmesinden sonra uzun bir takip süresinde (26 yıla kadar) yeniden arı sokmalarının sonuçları üzerine yakın zamanda Martini ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ortalama 10 yıl boyunca tedavi edilen hastalarda nüks riskinin çok düşük olduğunu (%3,4) göstermiştir (Martini ve ark., 2020).

Bazı çalışmalara göre, VIT'in kesilmesinden sonra koruma kaybıyla ilişkili risk faktörleri arasında çok şiddetli başlangıç sistemik reaksiyonlar, VIT sırasındaki sistemik advers olaylar (enjeksiyon veya sokma), 5 yıldan kısa süreli tedavi, bazal serum triptazının yükselmesi ve/veya mastositoz, BAV allerjisi, kardiyovasküler hastalık yer almaktadır. Bununla birlikte, tüm hastaların gelecekteki bir arı sokmasına karşı gelişebilecek sistemik reaksiyon riskini düşürmenin tek yolu idame VIT tedavisine devam etmektir. Mastositozolanlar gibi yüksek riskli hastaların yanı sıra arıcılar gibi gelecekte arı sokması riski yüksek olan hastalarda yaşam boyu tedavi özellikle düşünülmelidir.

VIT yeterliliği, hymenoptera venomuna karşı sIgE'nin varlığını doğrulayan klinik kriterlere ve teşhis testlerine dayanmaktadır. Sistemik reaksiyon, vücudun bir arı sokmasına karşı genelleştirilmiş IgE'ye bağımlı reaksiyonu olarak anlaşılır ve (Mueller, 1966) (Tablo 2.2.) tarafından geliştirilen dört dereceli reaksiyon şiddeti ölçeğine göre sınıflandırılır. HVA immünoterapisi, hayatı tehdit eden HVA semptomları olan hastalar için (HVA-SYS III-IV), sokmalara yüksek derecede maruz kalan kişiler (arı yetiştiricileri) veya ciddi reaksiyon riskini artıran komorbiditeleri olan kişiler için önerilmektedir. VIT, allerjene karşı toleransı sağlamak amacıyla allerjenin artan dozlarının (sulu çözeltiler veya alüminyum hidroksit üzerine adsorbe edilmiş venom ekstraktları) tekrar tekrar uygulanmasını içerir. HVA için yalnızca enjeksiyon immünoterapisi kullanılır. Tedavinin başlangıç aşaması (VIT indüksiyonu), genellikle 1 µg venom dozuyla başlar. Daha sonra allerjenin dozu standart değere (yani 100 µg venom) ulaşmak için kademeli olarak artırılır. İdame dozuna ulaşıldığında hasta klinik tolerans (kısa süreli etkinlik) gösterir. Uzun vadeli

etkililik için tedaviye önümüzdeki 3-5 yıl boyunca devam edilmesi gerekmektedir (Nittner-Marszalska, 2018; Kołaczek ve ark., 2017).

Spesifik immünoterapinin amacı, bir allerji uzmanının kontrolü altında uygulanan allerjenin artan dozlarına maruz kalma yoluyla B lenfositleri tarafından IgE antikorlarının sentezini azaltmaktır. Tedavi sırasında allerjenin konsantrasyonu artmaktadır. Bu artış, Langerhans hücreleri ve makrofajlar tarafından IL-12 üretimini teşvik eder. Bunu takiben IL-12, Th2 tipi sitokinlerin (IL-4, IL-5 ve IL-13) üretimini inhibe eder ve Th1 tipi sitokinlerin (IFN- γ dahil) sentezini uyarır. Bu işlemlerin sonucunda IgE üretimi engellenir. sIgE üretimini güçlü bir şekilde inhibe eden ve spesifik IgG4 seviyesini artıran IL-10'un varlığı da immünoterapi mekanizmasında önemli bir rol oynar. Bunun nedeni, IL-10'un mast hücrelerinin ve eozinofillerin uyarılmasını inhibe etmesi ve T hücresi anerjisinin indüklenmesinden sorumlu olmasıdır (Incorvaia ve ark., 2011; van de Veen ve ark., 2013). Spesifik immünoterapi hem lokal hem de sistemik nitelikte çeşitli yan etki riskini içerir. Tedavi gören hastaların %8-20'sinde sistemik komplikasyonlara rastlanmaktadır. Sistemik komplikasyon, BAV ile yapılan immünoterapi sırasında YAV'a göre 3-6 kat daha sık görülürler ve başlangıç aşamasında idame aşamasına göre daha sık görülürler. Antijene spesifik immünoterapi şu anda arı venomu allerjisinde allerjik hastalıkların tek nedensel tedavisidir. Uygulanan tedavi, allerjik kişide allerjen duyarlılığını azaltarak hastalık semptomlarının ortadan kalkmasını veya şiddetinin azalmasını sağlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, TYL- 2023-12741 numaralı proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş ve Erciyes Üniversitesi Etik Kurulundan 28/09/2022 tarih ve 2022/651 numaralı karar ile onay alınmıştır.

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi İmmünoloji-Allerji polikliniğine başvuran öykü, DPT, sIgE ölçümleri ile güncel klavuzlar doğrultusunda immünoterapi başlanmasına karar verilen arı venom allerjisine çift duyarlılığı olan 10 hasta dahil edilmiştir. Her hastaya çalışma hakkında bilgi verildikten sonra bilgilendirilmiş gönüllü onam formları imzalatılmıştır.

Hastaların kanları heparinli tüpe (BD Vacutainer, BD-Plymouth, PL6 7BP, UK), 3 cc kan örneği bulunacak şekilde alınmıştır. Hasta serumları ise sitratli tüpte 3 cc olacak şekilde alınmıştır.

Hastalardan alınan venöz kan örnekleri pozitif kontrol (PK) (FMLP- N-Formyl-Met-Leu-P-, anti-IgE), negatif kontrol (NK) ve arı venom ekstrakt dilüsyonlarına (0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 10mg/ml) maruz bırakılmıştır. Bazofil yüzeyindeki CD63 ve CD203c ekspresyon düzeyi akım sitometri cihazı ile değerlendirilmiştir. CD203c için MFI değerleri, CD63 için yüzde bazofil aktivasyon oranı kullanılmıştır. Ek olarak serum IgE antikor düzeylerinin ölçümü allerjen komponent test (CRD) olarak bilinen bir test ile ölçümü yapılmıştır. Çalışmada akım sitometrik değerlendirmeler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı Akım Sitometri Laboratuvar'ında yürütülmüştür. CRD testi için hizmet alımı yapılmıştır (Synevo laboratuvarları (Erişim tarihi:18 Şubat 2024)).

3.1. Gereçler

3.1.1. Alet ve Ekipman

Akım Sitometri Cihazı (Beckman Coulter , Dx-Flex Model), Nüve NF 800 Model Santrifüj Cihazı, Heidolph Instruments Vorteks Cihazı (D-91126), +4 soğutucu -2-8°C Buzdolabı (Profilo, BD4306ANFE), Gilson pipet, 1µl ile 10µl arasında, 10µl ile 100µl arasında, 100µl ile 1000µl arasında ayarlanabilir mikro otomatik kalibre standart pipetler, 10-100 ve 1000µl kalibrasyonları yapılmış standart pipet uçları (ISOLAB), 12x75-mm test tüpü (Falcon TM polistiren test tüpleri,), Isolab Mekanik Timer (Zamanlayıcı), Isıtıcı blok (DLAB,HB-120S), Navios sisteminde kaluza kullanılmaktadır.

3.1.2. Deneysel Malzemeler, Kimyasal Kitler ve Solüsyonlar

Sodyum bikarbonat, EDTA, Ca, Mg ve fenol red içermeyen Hank's Balanced, Salt Solution (HBSS) (Sigma), Optilyse C Lysing Solution (BeckmanCoulter, USA), Hücre yıkama işlemlerinde kullanılan solisyonlar İsoflow (BC, 41116015), FMLP sigma, 10MG, PBS (Beckman coulter), ALK Vespula ve Apis immünoterapi solüsyonları, Muhtelif pipet ucu ve plastik sarf malzemeleri, distile su.

3.1.3. Akım Sitometride Kullanılan Antikorlar ve Altyapı

CD63 FITC (B92467), CD123 PE (A32535), HLA-DR ECD (IM3636), CD203c PC7 (A66906), CD45 PC5 (A07785) (BeckmanCoulter, USA).

IL-3 (B259874) (10µg) (BioLegend, USA), Anti-IGE (325502) (0,5mg/mL-100µg) (BioLegend, USA)

Allerjen Komponent Test Kiti (Synevo Genetics Laboratuvarları (534/MRK/Y-3), Türkiye)

3.2. Akım Sitometri ile Test İşlemleri

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı Akım Sitometri Laboratuvarına her gün bir hasta ve kontrol örneği olacak şekilde 3 cc kan örneği ile çalışma başlatıldı.

3.2.1. Solüsyon ve Kimyasalların Hazırlanması

Stem cell lizis çalışma solüsyonu hazırlanması; 1 birim stem cell lizis stok solüsyonu / 9 birim distile su ile karıştırılarak lizis çalışma solüsyonu elde edildi. Eritrositlerin lizisi amacıyla kullanıldı.

HBSS buffer: 100ml HBSS, 0.1gr albümin fraksiyon V, 200µl EDTA (PH:8.0) karışımı ile elde edildi.

Anti-IgE (0,5mg/mL-100µg) (BioLegend, USA): Solüsyon halinde geldi. Her çalışma ve her bir örnek başına 4µl Anti-IGE + 496µl distile su ekleyerek yeni solüsyon oluşturuldu. Buradan pozitif kontrol tüpü olarak kullandığımız tüpe 150µl eklendi.

FMLP (Sigma 10MG): Solüsyon halinde geldi. Her çalışma ve her bir örnek başına 4µl FMLP+ 496µl distile su ekleyerek yeni solüsyon oluşturuldu. Buradan pozitif kontrol tüpü olarak kullandığımız tüpe 150µl eklendi.

IL-3 (10µg) (BioLegend, USA): Solüsyon halinde geldi. Her çalışma ve her bir örnek başına 1µl IL-3+4999µl PBS ekleyerek sulandırılarak yeni solüsyon oluşturuldu. Çalışma için kullanılan bütün tüplere bu solüsyondan 150'şer µl eklendi.

3.3. Akım sitometrinin okuma ve analiz için hazırlanması

Cihaz açma düğmesi ile açılır. Becman coulter Navios yazılımı veya dxFlex yazılımı açıldıktan sonra cihaza bir yıkama tüpü verildi. Lazer ayarlarını kontrol etmek için cihaz boncukları cihaz üzerinden ayarlar seçilerek yapıldı. Analiz bölümünde, elde edilen hücresel veriler ilgili prosedürler kullanılarak sonlandırıldı. Navios yazılım kullanılarak yapılan 18-20.000 hücrenin sayıldığı analizde FL1 350 ve kompanzasyon sıfır olarak seçildi. Canlı nötrofil kapısı "gate" canlı hücreler etrafında oluşturuldu. X ekseninde; 10^1 değeri defektif hücrelerce oluşturulan floresan yoğunluğu 10^3 değeri ise normal hücrelerce oluşturulan floresan yoğunluğu göstermektedir. Histogramlarda bazofil gruplarının (M, M1, M2) sınırları belirlenerek her zirve için analiz detayları ayrı ayrı elde edildi.

3.4. Akım Sitometrik Analiz Uygulamaları

Akım sitometri analiz işlem basamakları özet iş akışı:

Uygun antikor gruplarından analiz paneli oluşturulması, Akım sitometri öncesi hücrelerin antikor ile işaretleme için hazırlanması, işaretleme işlemi sonrası akım sitometride hücrelerin geçirilmesi (okuma işlemi), akım sitometride okuma sonuçlarının her örnek için analizi, hasta ve kontrol datalarının gruplandırılarak karşılaştırılması, veriler arasında istatistiksel bağlantının araştırılması, akım sitometri verileri ile diğer laboratuvar sonuçlarının karşılaştırılması ve anlamlı bağlantıların araştırılması.

Akım Sitometride Bazofil Hücrelerinin Yüzey Ekspresyon Ölçümü

Çalışmaya alınan tüm hastalar ve kontrol periferik kan örneklerinde hücre yüzey ve hücre içi proteinleri olan CD123, CD63, CD203c, HLA-DR spesifik antikor ile işaretleme sonrası akım sitometrik protein ekspresyon ölçümü yapıldı.

Bazofil Eldesi

Heparinli tüpe alınan 100 µl' lik periferik kan örneklerine stem cell liyizing solüsyonu eklendi ve flow tüpüne konuldu ve oda ısısında 15 dakika bekletildi. Hafifçe sallanarak eritrositlerin lizis'i sonrası 2 ml HBSS buffer eklendi ve 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pellet üzerine HBSS buffer eklenerek 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. HBSS buffer ile yıkama işlemi iki kez tekrarlandı ve eritrosit kalıntıları temizlenerek test için hazır hale getirildi.

3.5. Akım Sitometri Örnek Hazırlama İşlem Basamakları

Her hastadan alınan 150 µL kan örneği üzerine 150µL PBS+150µL IL-3 her bir flow tüpüne eklendi. Her bir örnek için 6 flow tüpü kullanıldı ve aşağıdaki gibi isimlendirildi.

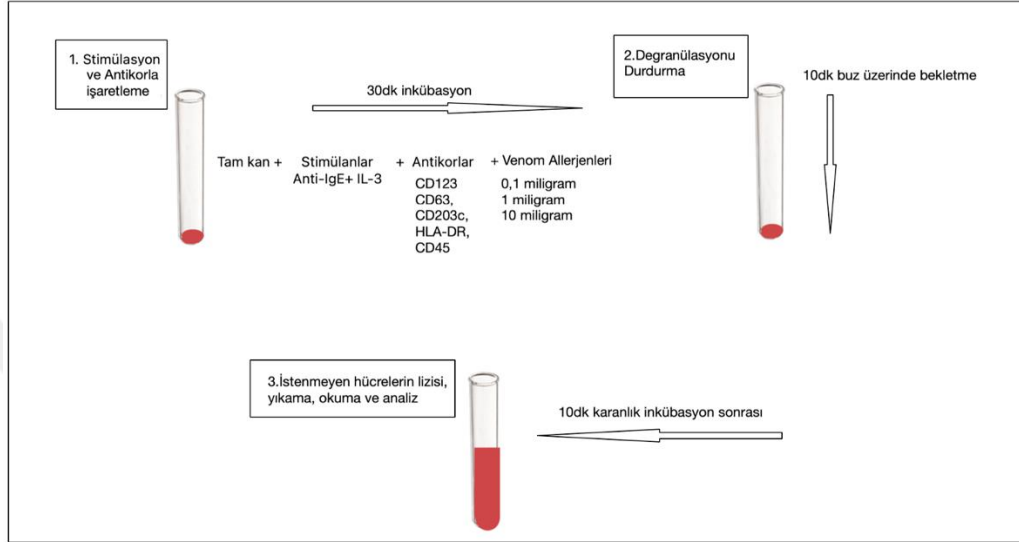
- **Tüp negatif kontrol tüpü;** CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5, markerları 5'er µL, ek olarak aynı tüpe 150 µL PBS+IL3 eklendi.

- **Tüp pozitif kontrol FMLP tüpü;** CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5 5'er μ L, ek olarak aynı tüpe 150 μ L PBS+IL3+FMLP eklendi.
- **Tüp pozitif kontrol Anti-IGE tüpü;** CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5 5'er μ L, ek olarak aynı tüpe 150 μ L PBS+IL3+Anti-IGE eklendi.
- **Tüp venom Allerjen tüpü (0.1mg/ml);** CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5 5'er μ L, ek olarak aynı tüpe 150 μ L PBS+IL3+ 150 μ L arı venomu (apis-vespula) eklendi.
- **Tüp ilaç Allerjen tüpü (1mg/ml);** CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5 5'er μ L, ek olarak aynı tüpe 150 μ L PBS+IL3+ 150 μ L arı venomu (apis-vespula) eklendi.
- **Tüp ilaç Allerjen tüpü (10mg/ml);** CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5 5'er μ L, ek olarak aynı tüpe 150 μ L PBS+IL3+ 150 μ L arı venomu (apis-vespula) eklendi.

Her bir örnek sayısı kadar flow tüpünde hazırlandı. Solüsyonun homojen karışabilmesi için hafif vorteksleme işlemi yapıldı ve 30 dk ısıtıcı blokta inkübasyon işlemi uygulandı. Inkübasyonun hemen ardında bütün tüpler 5 dk buza gömüldü. Her bir örnekten alınan 150 μ L kan örneği ve bütün karışımındaki eritrositleri uzaklaştırmak için lizis solüsyonu hazırlandı (her örnek başına 0,5mL stemcell+4,5mL distile su) lising solüsyonundan 2 mL eklendi. Hafif vorteksleme işlemi yapıldı ve elde edilen karışım karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm örneklerle 2 mL hücre yıkama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldı. Aynı işlem üç kez tekrarlandı. Son olarak flow tüpünün üzerine 0,5mL okuma solüsyonu eklendi. Daha sonra hücreler bekletilmeden doğrudan akım sitometrede analiz yapıldı. Analiz, Beckman Coulter, Dx-Flex Model akım sitometre cihazı ve Kaluza yazılımı programı kullanılarak yapıldı. Kullanılan 6 tüpteki örnekler analiz edilirken uygun dedektör ayarları yapıldı ve FL1' de kompanzasyon sıfır olarak seçildi ve okuma bir milyon hücre içerisinden 500 adet bazofil hücresinin sayımı yapıldı. Örnekler cihazda analiz edilirken uygun dedektör ayarları yapıldı ve FL1' de hücrelerin 10^0 bölgesinde olduğu ve herhangi bir floresan ışımının olmadığı ve 10^3 den itibaren

ışımının başladığı görüldü. Her bir örneğin çalışma tüpü kontrol tüpünde ayarlanan şekilde analiz edildi.

Akım sitometrik analiz sonrasında bazofil hücreleri seçilerek sayısı hesaplandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bazofil aktivasyon testi örnek hazırlama işlem basamakları

3.6. Bazofil Hücrelerinin Akım Sitometri ile Tanımlanması

Örneklerde bazofil hücresinin, hücre yüzey ve hücre içi markerların ekspresyon düzeyi ve hücre sayıları hesaplandı.

Çalışmada, CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5, IL-3, Anti-IGE markerları kullanıldı.

Arı Venom Allerjisi Olan Hasta Örneklerinde Bazofil Hücre Sayısının Akım Sitometri ile Hesaplanması

Bu amaçla her bir kan örneğinden bir milyon hücre akım sitometri cihazında saydırıldı.

Bu sayıdaki hücre içerisinde mevcut olan bazofil hücre oranı kapılama yapılarak sayı olarak hesaplandı.

HLA-DR- hücre sayısının hesaplanması; Hasta örneklerinde kapılama yapıp toplam hücre sayısından hücre değerleri verildi. CD45 kapısında lökosit hücreleri

seçilerek (dim) kapılandı. Daha sonra HLA-DR /SS ekranındaki HLA-DR negatif hücre alanı kapılanıp hücre değeri bulunup toplam hücre sayısına göre değeri verildi.

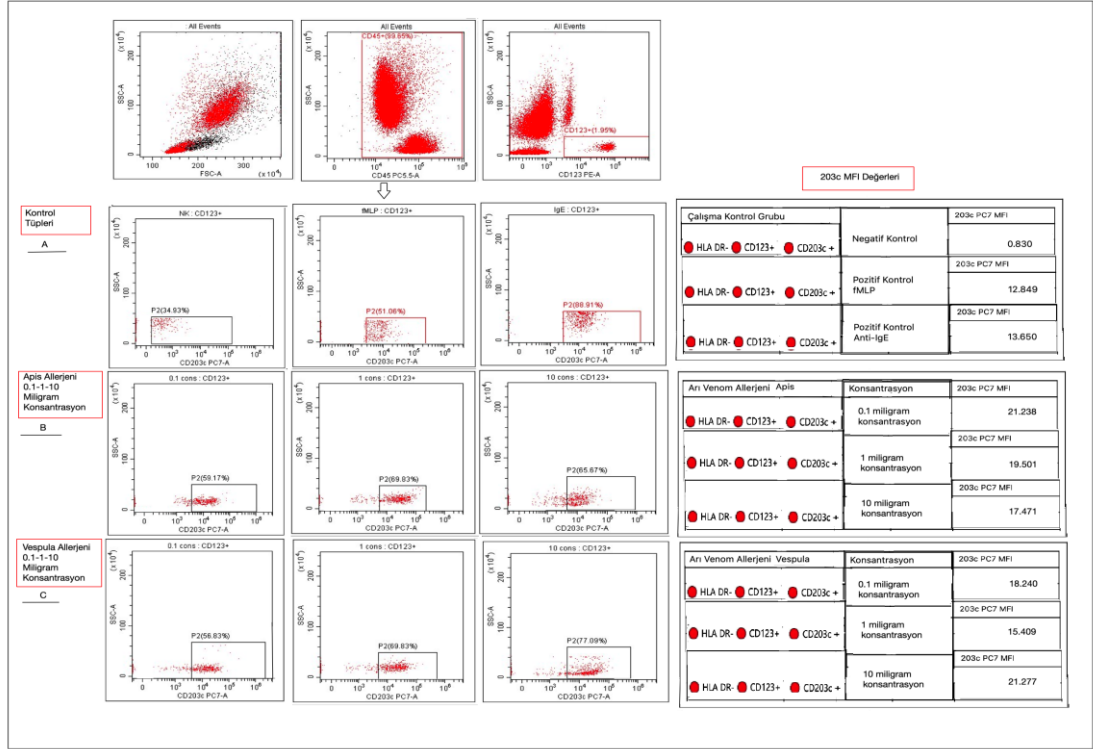
CD123+ hücre sayısının hesaplanması; Hasta örneklerinde kapılama yapıp toplam hücre sayısından CD123 pozitif hücre değeri verildi. CD45 dim kapılanır. Daha sonra HLA-DR /SS ekranındaki HLA-DR negatif hücre alanı kapılanıp CD123/SS grafiğinde, kapılanan HLA-DR negatif kapısı tanımlandı, CD123 pozitif hücrelerin olduğu alan tekrar kapılanıp hücre değeri bulundu ve toplam hücre sayısına göre değeri verildi.

HLA-DR-, CD123+, CD63+ hücre değerleri hesaplamak için; CD45 dim kapılandı. Daha sonra HLA-DR/SS ekranından HLA-DR- hücre alanı kapılanıp CD123/SS ekranında HLA-DR- hücre kapısı tanımlandı ve aynı ekranda CD123+ hücre alanı kapılanıp, CD123+ olarak kapılanan kapı CD63/SS ekranında tanımlanıp CD63+ pozitif olan bölümdeki hücre sayı hesaplandı.

HLA-DR-, CD123+, CD203c+ hücre değerleri hesaplamak için; CD45 dim kapılandı. Daha sonra HLA-DR/SS ekranından HLA-DR- hücre alanı kapılanıp CD123/SS ekranında HLA-DR- hücre kapısı tanımlandı ve aynı ekranda CD123+ hücre alanı kapılanıp, CD123+ olarak kapılanan kapı CD203c/SS ekranında tanımlandı ve CD203c+ pozitif olan bölümdeki hücre sayı hesaplandı.

3.7. Ortalama Floresans Yoğunluğu (Mean Fluorescence İntensity: MFI)

MFI ortalama ile hücre popülasyonunun floresan yoğunluğundaki değişime bakıldı ve floresan yoğunluğuna göre bazofil kapısında geometrik ortalama ile logaritmik histogram eğrileri MFI değerleri elde edildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. CD203c MFI değerlerinin kontrol tüpü ve venom allerjen türlerinde karşılaştırmalı gösterimi.

A: Negatif kontrol (NK) ve Pozitif kontrollerin (PK) (fMLP- Anti- IGE) CD203c MFI değerlerinin gösterimi.

B: Arı venom allerjenlerinden bal arısı allerjen titrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0.1-10 miligram) CD203c MFI değerlerinin gösterimi.

C: Arı venom allerjenlerinden yaban arısı allerjen titrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0.1-1-10 miligram) CD203c MFI değerlerinin gösterimi.

3.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen MFI değerleri hasta ve kontrol tüpündeki total bazofil değerlerinden elde edilen değerler kullanılarak karşılaştırma yapıldı. Örneklerdeki ekspresyon değişimi izlenerek değerlendirilmek üzere raporlandı.

Akım sitometrik analiz sonrasında canlı bazofil kapısı alınarak floresan yoğunluk gösterildi. Bu hücrelerdeki sırasıyla CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5, IL-3, Anti-IGE işaretli antikorların ekspresyon değişimleri

hasta grubundaki kontrol tüpleri ile karşılaştırıldı. Histogram görüntülerinde geometrik ortalama değerleri hesaplanarak MFI değerleri elde edildi.

3.9. Uygulanan BAT Testinin Optimizasyonu

Çalışma Zamanı ile İlgili Optimizasyon

Heparinli tüpe alınan hasta periferik kan örnekleri buzdolabında 2-4 derecede bekletilip ilk 6 saat içinde örneklerin çalışılması planlanarak örnekler arasında bu yönden bir farklılık oluşmamasına dikkat edildi.

Kan Miktarı ve Kimyasallar ile İlgili Optimizasyon

Bu aşamada 2cc kanın çalışma için yeterli olduğu görüldü. Malzeme sarfiyatının azaltılması ve gerektiğinde daha az bir kan örneği ile de deneyin yapılabilirliğini incelemek amacıyla aynı deney 300 µL, 200 µL ve 100 µL kan örnekleri ile denendi. Her ikisinde de deneyin yeterli şekilde çalıştığı gözlemlendi. Bunun üzerine 200 µL kan örneği kullanımı ile deney aşamalarının görsel izleniminin 100 µL kullanımına göre daha kolay olması ve pipetaj hatalarının daha kolay fark edilebilmesi nedeniyle bu değer en uygun değer olarak seçildi. Deneyde kullanılan kimyasalların miktarı kan miktarına göre yeniden düzenlendi.

Kullanılan Stimülan Ajanların Optimizasyonu

fMLP: Stimülasyon için kullanılan ve 5-10mg'lık stok solisyondan 4 µl alınıp 996 µl distile su eklenerek seyreltilen konsantrasyonda hazırlanan fMLP 25 µl, 50 µl ya da 100 µl olarak kullanıldığında sonuçlarda çok belirgin bir fark olmadığı gözlemlendi. Referans araştırmalara uygun olarak deney 200 µl fMLP kullanılarak standardize edildi.

Anti-IgE: Pozitif kontrolde stimülasyon için kullanılan bu markerın 4 µl alınıp 996 µl distile su eklenerek seyreltilen konsantrasyonda hazırlanan Anti- IgE 25 µl, 50 µl ya da 100 µl olarak kullanıldığında sonuçlarda çok belirgin bir fark olmadığı gözlemlendi. Referans araştırmalara uygun olarak deney 200 µl fMLP kullanılarak standardize edildi.

IL-3: Çalışma için gerekli aktivasyon stimülanı olarak kullanılan bu markerın 1 µl 4999 ml PBS eklenerek seyreltilen konsantrasyonda hazırlanan Anti- IgE 25 µl, 50 µl ya da 100 µl olarak kullanıldığında sonuçlarda çok belirgin bir fark olmadığı gözlemlendi. Referans araştırmalara uygun olarak deney 200 µl fMLP kullanılarak standardize edildi.

İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

37°C de inkübasyon süresi 30 ve 60 dakika arasında denendi. Birbirine benzer sonuçların her iki sürede de alınması üzerine ve referans araştırmalardaki optimize sürelerle uyularak deney gerçekleştirildi. En uygun inkübasyon süresinin 30 dk olduğu belirlendi.

Akım Sitometride Analiz Optimizasyonu:

Beckman Coulter Navios ve dxFlex model akım sitometre cihazı ve Kaluza yazılımı programı kullanılarak analiz yapıldı. Uyarılma sonucunda kırmızı lazer yeşil floresan emisyonu (FL1) aktive olan hücreleri gösterebilmektedir. Bu yüzden her bir örneğin analiz edilebilmesi için önce stimülan eklenmeyen tüpteki hücre solüsyonu analiz edildi. Stimülansız tüplerdeki örnekler analiz edilirken uygun dedektör ayarları yapıldı ve FL1' de kompanzasyon sıfır olarak seçildi ve okuma 500,000-1,000,000 hücrenin sayımı ile yapıldı. Aynı örneğe ait stimülan eklenmiş olan tüpün analizinde bir önceki tüpte yapılan dedektör ayarlarının aynısı yapıldı ve bütün örnekler için ayrı ayrı tekrar edildi. Analiz sonrasında canlı bazofil grubu seçilerek floresan yoğunluk histogram olarak gösterildi.

Akım sitometrik bazofil hücresi protein ekspresyon analizde CD63 FITC, CD123 PE, HLA-DR ECD, CD203c PC7, CD45 PC5, IL-3, Anti-IGE antikorlarının optimizasyonu için 50,000, 100,000 ve 500,000 ve 1,000,000 hücre sayılarak analiz yapıldı. Elde edilen verilerin birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Hücre sayısının fazla olmasının hassasiyeti artıracak düşünülerek her örnek için 500-1,000,000 hücre sayıldı. Histogram görüntülerinde geometrik ortalama değerleri MFI değerleri elde edildi. Elde edilen verilerin birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Histogram görüntülerinde uyarılan stimule örneklerde elde edilen floresan yoğunluğun

geometrik ortalamasının uyarılmayan unstimule örneklerde elde edilen floresan yoğunluğun geometrik ortalamasına oranı hesaplanarak MFI değerleri elde edildi.

Bazofil Aktivasyon Testinin Optimizasyonu

Bu çalışma yöntem kısmında belirtilen protokole göre çalışıldı. Kan örnekleri alındığı andan itibaren fazla beklemediği için hücrelerin canlılığı korundu. Testin ilk denemesinde 50 µl kan ve kan oranıyla aynı ölçüde PBS, IL3, FMLP, Anti IgE ve üç ayrı dilüsyonda venom ekstraktı kullanıldı. Fakat akım sitometrik ölçümde kan oranı az olduğu için istenilen bazofil sayısına ulaşılamadı. Daha sonra istenilen sayıya ulaşmak için kan oranı ile diğer kullanılan kimyasal ve solüsyonların miktarı 50'nin katları şeklinde artırılarak optimum miktar saptandı. Bu miktar 200 µl olarak belirlendi.

Pozitif Kontrol Tüpü ve Allerjenlerin Uygulanması ile İlgili Optimizasyon

Pozitif kontrol tüpündeki uyarımı daha net gözlemlemek için de 24 saatten daha fazla bekleyen kan örneklerinde yapılan analizlerde ölü bazofil ekspresyon durumları karşılaştırarak görüntü elde edilebildiğinde kaybın normale göre çok fazla olmadığı tespit edildi. Bu çalışma, uygun test kiti ile çalışılıp akım sitometride analiz edildi ve fMLP ve Anti-IGE stimülanları eklenmiş olan tüplerin karanlıkta belirli saat aralıklarında inkübasyonu sağlandı. Sırasıyla 37°de önce 30 dakika sonra 60 dakika aralıklarla bekletilerek akım sitometride yeni oluşturulan protokolde analiz edildi. Kullanılan venom allerjenleri hastaların tedavi için kullandığı dozlardan sırasıyla 0,1-1-10 ve 100 miligram şeklinde denendi. 1 miligramlık allerjen konsantrasyonunda maksimum uyarıma erişildiği kaydedildi. 10 ve 100 miligramlarda bu yüksek dozların bazofil hücrelerini öldürmeye başladığı görüldü. Özellikle 100 miligramlık dozda ölü ve canlı bazofil hücresi durumu tam ayırt edilemediği için bu dozu çalışmada kullanmaması kararı verildi. BAT testi protokolü açıldı ve mor lazer FL 1-10 kanallarında protokole eklenerek tekrar analiz yapıldı. Bu çalışmada bekletilme süreleri uzadığı için hücrelerin akım sitometriden daha yavaş geçtiği ve daha az hücre sayabildiği görüldü. Bu hücreler ayrı ayrı seçilerek akım sitometrik analizlerde önemli bir etken olan FS-SS ekranında ve uyarım testinin analiz edildiği FL1-10 kanallarındaki yerleşimi FL 1-10 kanalında canlı hücrelerin FS-SS plotunda 10^0 ile 10^1 arasında, ölü hücrelerin 10^{-4} - 10^5 sonrasında olduğu

görüldü. Bu hücreler ayrı ayrı seçilerek akım sitometrik analizlerde önemli bir etken olan FS-SS ekranında ve BAT testlerinin analiz edildiği FL1 kanalında yerleşimi gösterildi.

3.10. Allerjen Komponent Testi Çalışma Protokolü:

Bu çalışma için hizmet alımı gerçekleştirildi. Çalışmamız Synevo Laboratuvarları 8534/MRK/Y-3 firması tarafından çalışıldı. Sonuçların değerlendirilmesi kendi laboratuvarımızda yapıldı.

Allerjen komponent test prrotokolü, Ticari olarak mevcut allerjen komponent kiti temin edilip ve protokole uygun yapıldı. Saflaştırılmış doğal CM ve HE allerjen bileşenlerini içeren kitin içeriğinde: ovomukoid (Gal d1), ovalbumin (Gal d2), konalbumin (Gal d3), lizozim (Gal d4) , serum albümini (Gal d5), a-laktalbümin (Bos d4), b-laktoglobulin A (Bosd 5.0102), b-laktoglobulin B (Bos d5.0101), sığır serumalbumini (Bos d6), IgG sığır (Bos d7), kazein (Bos d8), a-kazein (Bos d8 alfa S1), b-kazein (Bos d8 beta), k-kazein (Bos d8 kappa) ve laktoferrin (Bos d laktofer-rin), bal arısı (apis mellifera) için Api m1, yaban arısı (Vespula) için Ves v1 , Ves v5 bulunur.

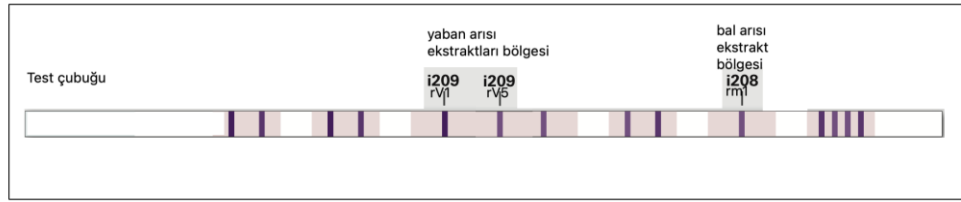
Test prosedürleri kısaca: Yıkama ve inkübasyon adımları dahil toplam test süresini <4 saat alır. Floresan bir lazer tarayıcıyla ölçülür ve sonuçlar, kişiselleştirilmiş bir sonuç raporu oluşturan mikro dizi görüntü analizi (MIA) yazılımı kullanılarak değerlendirilir. Özetle, allerjen mikroyarray immünolojik testi ISAC 112, spesifik bir IgE'nin belirlenmesi için tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilir bir in vitro tanı aracıdır (Martínezve ark.,2014).

Allerjen Komponent Testi Numune Toplama ve Hazırlama

Serum ve plazma (EDTA veya heparin) numuneleri kullanıldı. Standart kan alma teknikleri kullanılarak elde edilen kan örnekleri kullanıldı. Kan alımından test aşamasına kadar numuneler oda sıcaklığında tutuldu. Numuneler 2-8 ° C'de bir haftaya kadar, daha uzun bir süreç sonrası test için -20 ° C'de saklanarak test edildi. Tekraren dondurma ve çözme işlemlerinden kaçınıldı.

Test protokolü işlem akışı:

Çalışmamızda sadece venom allerjenleri kullanıldı. Bal arısı (*apis mellifera*) için Api m1, yaban arısı (*Vespula vulgaris*) için Ves v1, Ves v5 allerjenleri ile çalışmaya devam edildi. Kit içeriğinde bulunan yıkama tamponunda 1 saat yıkanıp, deiyonize su ile durulanıp ve kurutuldu. Her reaksiyon kuyusuna yirmi mikrolitre seyreltilmemiş serum uygulandı. 2 saat oda sıcaklığında nemli bir odada inkübe edilip, durulanıp ve iki kez yıkama tamponunda ve bir kez deiyonize suda yıkandı. 20 mL etiketli anti-insan IgE antikoru (Phadia-VBC Genomics. (Erişim tarihi:10 Şubat 2024) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi, yukarıdaki gibi yıkanıp ve okuması gerçekleşene kadar karanlıkta bekletildi. Farklı IgE reaktivite seviyeleri arasında maksimum dinamik aralık elde etmek için iki lazer güç ayarına sahip bir Scan ArrayGx Tarayıcı kullanıldı. Görüntüler, uygun yazılım programı ile analiz edilecektir. Serum IgE, ISAC standardize birimleri (ISU) olarak nicelendirildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Allerjen test protokol çubuğu ve venom ekstraktlarının pozitiflik bölgesi

Allerjen Komponent Testinde Beklenen Test Değerleri

ImmunoCAP Spesifik IgE 0 ila 100 kUA/l aralığında IgE antikorlarını tespit eder, buradaki A harfi allerjen-spesifik antikorlarını temsil eder. Sonuç kantitatif olarak rapor edilir. Klinik uygulamada, 0.35 kUA / l yaygın olarak cut-off (kesme) değeri olarak kullanılmaktadır. Allerji tanısında ImmunoCAP Spesifik IgE testlerinin klinik performansının değerlendirildiği çok sayıda çalışma yapılmıştır. Klinik performans %84-95 arasında değişen duyarlılık ve %85-94 arasında değişen özgüllük olarak görülmüştür. Duyarlılık ve özgüllük, değişik merkezlerde çok sayıda farklı allerjen için test edilen yüzlerce hasta ile elde edilen araştırma verileri ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan kriterler:

Class 0/ negatif <0.10

Class 0/ çok düşük 0.1-0.34

Class 1/ düşük pozitif 0.35-0.7

Class 2/ orta derece pozitif 0.71-3.5

Class 3/ yüksek pozitif 3.51-17.5

Class 4/ çok yüksek pozitif > 17.50

Allergen Komponent Testinde Ana Allerjenler ve Komponentler

Allerji tanısı, hastanın ayrıntılı bir olgu öyküsü, klinik gözlemler ve IgE testinin sonuçlarına dayanır. IgE antikorlarının varlığını saptamak için ImmunoCAP Allerjenleri veya ImmunoCAP Allerjen Komponentleri kullanmak, şüpheli allerji hastalarının güvenilir tanılarına yardımcı olmak için geniş bir yelpazede ana allerjen veya allerjen alt komponentleri tespit etme imkânı sunar.

IgE antikor düzeylerini bilmek, aşağıdaki konularda rehberlik eder:

- Her hastaya uygun bireysel tedavi yöntemi belirleme
- Hedef allerjene maruz kalınmasının azaltılması
- Toleransın gelişiminin takibi (gıda allerjisi, spesifik immünoterapi)
- Optimize edilmiş bireysel tıbbi tedavi planlarının kolaylaştırılması (zaman ve doz)
- Uygun tavsiyelerde bulunmak

3.11.İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, Q-Q grafikleri ve Shapiro-wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. İkili tekrarlı ölçümler arası karşılaştırmalarda Wilcoxon testi kullanıldı. İki den fazla tekrarlı ölçümler arası karşılaştırmalarda Friedman testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Dun-Bonferroni testi kullanıldı. Verilerin analizi R 4.3.2 (The R Project for

Statistical Computing Erişim Tarihi:18 şubat 2024), yazılımlında gerçekleştirildi.
Anlamlılık dűzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Hasta Grubu

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi İmmünoloji-Allerji polikliniğine başvuran öykü, DPT, sIgE ölçümleri ile güncel klavuzlar doğrultusunda immünoterapi başlanmasına karar verilen arı venom allerjisiine çift duyarlılığı olan 10 hastanın bazofil aktivasyonlarındaki değişim negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (IgE, FMLP) ve üç ayrı dilüsyondaki venom ekstraktındaki (0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml) CD63 yüzde ve CD203c MFI değerleri kullanılarak ölçüldü. Ek olarak allerjen komponent testi (CRD) ile serum IgE düzeyleri ölçüldü. Çalışmaya katılan 10 hastaların sekizi erkek ikisi kadın hastalardan oluştu. Hastaların yaşları 22-75 arasında idi. Hasta öyküleri değerlendirildiğinde anafilaksi şiddetleri bir hasta grade I, beş hasta grade II, bir hasta grade III, üç hasta grade IV'dü.

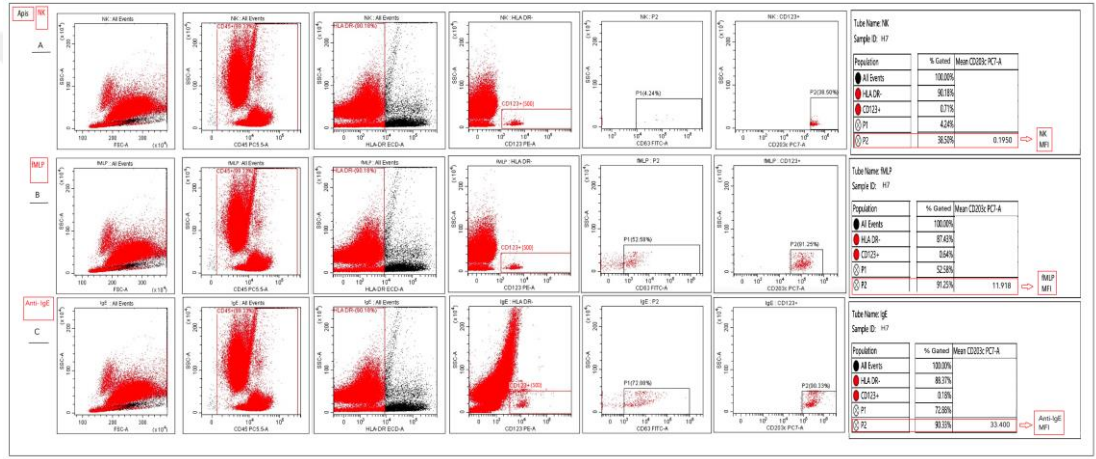
Bu hastaların demografik özellikleri tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların Demografik Özellikleri

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Öykü (Müller Grade)
Hasta 1	E	25	I
Hasta 2	E	58	IV
Hasta 3	E	42	II
Hasta 4	K	22	II
Hasta 5	K	55	IV
Hasta 6	E	32	III
Hasta 7	E	24	II
Hasta 8	E	55	IV
Hasta 9	E	75	II
Hasta 10	E	47	II

4.2. Bazofil Aktivasyon Testinin Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 10 hastanın örneklerinin her birinde akım sitometri ile bir milyon hücre sayımı yapıldı. Kapılamalar yapılarak $CD45^+$, $CD123^+$, $HLA-DR^-$, $CD63^+$ ve $CD203c^+$ hücre sayıları hesaplandı. Örnek teşkil etmesi açısından hem Apis hem de Vespula venom allerjeninin H7 nolu hastanın akım sitometrik kapılama ile negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (IgE, FMLP) ve üç ayrı dilüsyondaki venom ekstraktındaki (0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml) $CD123$, $CD63$ 'ün yüzde değerleri ve $CD203c$ 'nin hem yüzde MFI değerleri ölçüldü. Ölçüm sonuçları şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4'te gösterilmiştir.



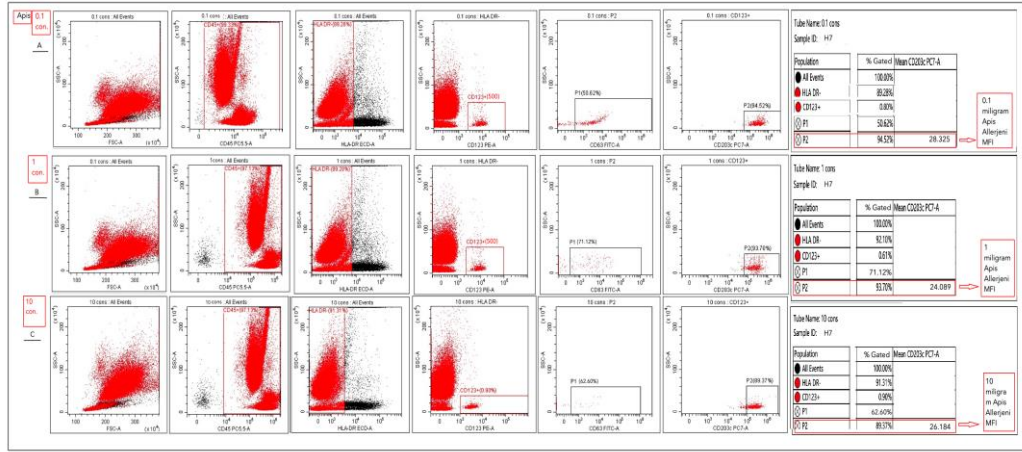
Şekil 4.1. Bazofil aktivasyon testinde bal arısı venom allerjeninin H7 hasta örneğinde negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (FMLP-anti-IgE) ile $CD123$, $CD63$ yüzde ve $CD203c$ hem yüzde hem de MFI değerlerinin ve yüzde değerlerinin akım sitometri ile gösterimi.

BAV allerjeninin negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) (FMLP, anti-IgE) tüpündeki bazofil hücrelerinin akım sitometri ile analizi ve kapılama stratejisi gösterildi.

A: NK tüpü; $CD45$ Dim bölgesi, B: $CD123^+$ hücre bölgesi C: $HLA-DR^-$ hücre bölgesi, D: $CD123^+/CD63^+$ bazofil hücre sayısı, E: $CD123^+/CD203c^+$ bazofil hücre sayısı.

B: FMLP tüpü; $CD45$ Dim bölgesi, B: $CD123^+$ hücre bölgesi C: $HLA-DR^-$ hücre bölgesi, D: $CD123^+/CD63^+$ bazofil hücre sayısı, E: $CD123^+/CD203c^+$ bazofil hücre sayısı.

C: Anti-IGE tüpü; $CD45$ Dim bölgesi, B: $CD123^+$ hücre bölgesi C: $HLA-DR^-$ hücre bölgesi, D: $CD123^+/CD63^+$ bazofil hücre sayısı, E: $CD123^+/CD203c^+$ bazofil hücre sayısı.



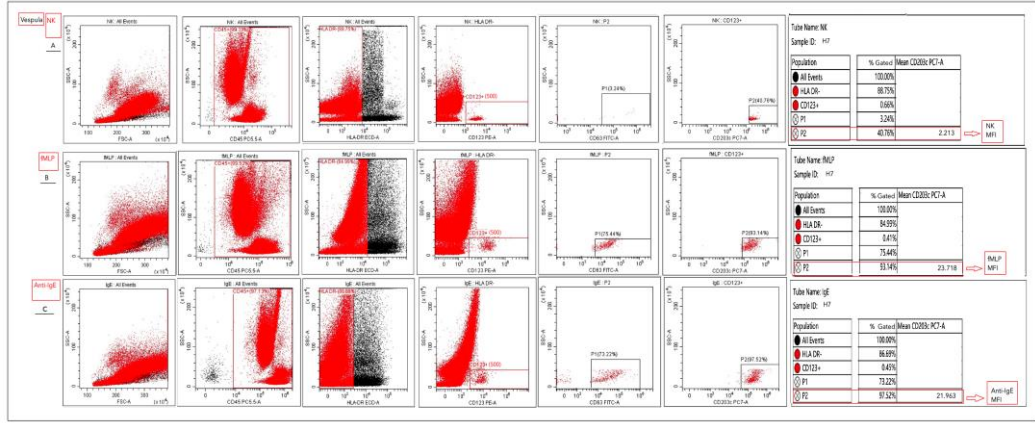
Şekil 4.2. Bazofil aktivasyon testinde arı venom titreleri ile bal arısı allerjeninin H7 hasta örneğinde CD63 yüzde ve CD203c hem yüzde hem de MFI değerlerinin akım sitometri ile gösterimi.

Arı venom tüpündeki bal arısı allerjeninin (0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml) bazofil hücrelerinin akım sitometri ile analizi ve kapılama stratejisi gösterildi.

A: 0.1 miligram konsantrasyon tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁻ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.

B: 1 miligram konsantrasyon tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁻ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.

C: 10 miligram konsantrasyon tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁻ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.



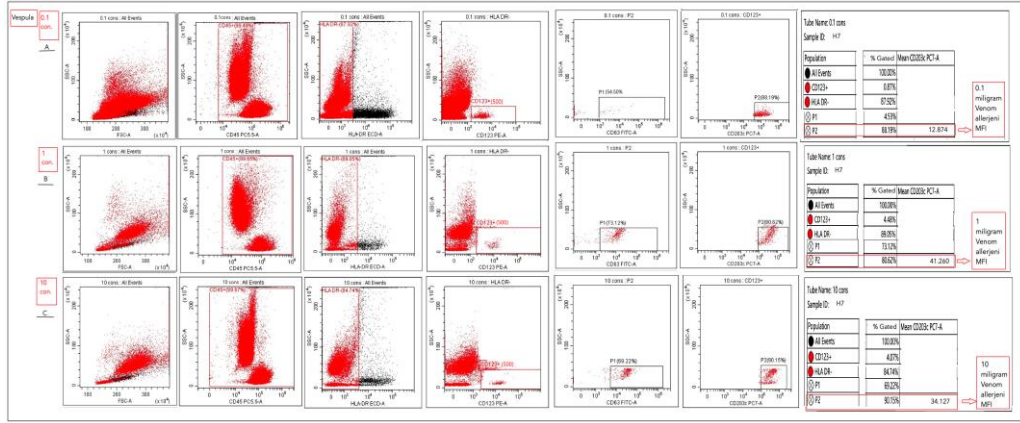
Şekil 4.3. Bazofil aktivasyon testinde yaban arısı venom allerjeninin H7 hasta örneğinde negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (fMLP-anti-IgE) ile CD123, CD63 yüzde ve CD203c hem yüzde hem de MFI değerlerinin ve yüzde değerlerinin akım sitometri ile gösterimi.

YAV allerjeninin negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) (fMLP, anti-IgE) tüpündeki bazofil hücrelerinin akım sitometri ile analizi ve kapılama stratejisi gösterildi.

A: NK tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁻ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.

B: fMLP tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁻ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.

C: Anti-IGE tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁻ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.



Şekil 4.4. Bazofil aktivasyon testinde arı venom titreleri ile yabancı arısı allerjeninin H7 hasta örneğinde CD63 yüzde ve CD203c hem yüzde hem de MFI değerlerinin akım sitometri ile gösterimi.

Arı venom tüpündeki yabancı arısı allerjeninin (0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml) bazofil hücrelerinin akım sitometri ile analizi ve kapılama stratejisi gösterildi.

A: 0.1 miligram konsantrasyon tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁺ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.

B: 1 miligram konsantrasyon tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁺ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.

C: 10 miligram konsantrasyon tüpü; CD45 Dim bölgesi, B: CD123⁺ hücre bölgesi C: HLA-DR⁺ hücre bölgesi, D: CD123⁺/ CD63⁺ bazofil hücre sayısı, E: CD123⁺/ CD203c⁺ bazofil hücre sayısı.

4.3. Arı Venom Allerjen Komponent Test Analiz Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 10 hastanın örneklerinin her birinde bal arısı (apis mellifera) için Api m1, yabancı arısı (Vespula vulgaris) için Ves v1, Ves v5 allerjenlerinin farklı IgE reaktivite seviyeleri arasında maksimum dinamik aralık elde etmek için lazer güç ayarına sahip bir Scan ArrayGx tarayıcı ile analiz yapıldı Görüntüler, uygun yazılım programı ile analiz edildi. Serum IgE, ISAC standardize birimleri (ISU) olarak nicelendirildi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.2’te verilmiştir.

Tablo 4.2. Hasta grubunun arı venom allerjen komponent test sonuçları

Allerji Türü				
H1	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	0.95 ↑	kU/L	<0.35
H2	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	0.17	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
H3	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
H4	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35

Tablo 4.2. Hasta grubunun arı venom allerjen komponent test sonuçları (**Devamı**)

	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	0.46 ↑	kU/L	<0.35
H5	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
H6	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	0.25	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
H7	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	0.68 ↑	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	5.55 ↑	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	1.71 ↑	kU/L	<0.35
H8	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	2.03 ↑	kU/L	<0.35

Tablo 4.2. Hasta grubunun arı venom allerjen komponent test sonuçları (**Devamı**)

	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
H9	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	22.0 	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	 1.43	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	<0.10(0.9)	kU/L	<0.35
H10	Uygulanan Test	Sonuç	Birim	Referans Aralık
	Sp IgE İ209 rVes v1 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ209 rVes v5 Yaban Arısı	<0.10	kU/L	<0.35
	Sp IgE İ208 rApi m1 Bal Arısı	 3.62	kU/L	<0.35

(NOT: Class 0/ negatif <0.10, Class 0/ çok düşük 0.1-0.34, Class 1/ düşük pozitif 0.35-0.7, Class 2/ orta derece pozitif 0.71-3.5, Class 3/ yüksek pozitif 3.51-17.5, Class 4/ çok yüksek pozitif>17.50)

4.4. Allerjen Komponent Testinde Analiz Sonuçlarında Beklenen Test Değerleri

Spesifik IgE 0 ila 100 kUA/l aralığında IgE antikorlarını tespit eder, buradaki A harfi allerjen-spesifik antikorlarını temsil eder. Sonuç kantitatif olarak rapor edildi. Klinik uygulamada, 0.35kUA/L yaygın olarak cut-off değeri olarak kullanıldı. Allerji tanısında ImmunoCAP Spesifik IgE testlerinin klinik performansının değerlendirildiği çok sayıda çalışma yapılmıştır. Klinik performans %84-95 arasında değişen duyarlılık ve %85-94 arasında değişen özgüllük olarak görülmüştür.

Duyarlılık ve özgüllük, değişik merkezlerde çok sayıda farklı allerjen için test edilen yüzlerce hasta ile elde edilen araştırma verileri ile belirlenmiştir (Çalışmamızda kullanılan kriterler: Class 0/ negatif <0.10, Class 0/ çok düşük 0.1-0.34, Class 1/ düşük pozitif 0.35-0.7, Class 2/ orta derece pozitif 0.71-3.5, Class 3/ yüksek pozitif 3.51-17.5, Class 4/ çok yüksek pozitif >17.50)

Tablo 4.3. Hasta Grubunun Deri Prik, sIgE, Allerjen Komponent Test ve Bazofil Aktivasyon Test Sonuçlarının Birlikte Gösterimi

No	sIgE		Deri Prik		Allerjen komponent test sonucuna göre Venom Allerji türü	Bazofil aktivasyon testi CD63%* değerleri		Bazofil Aktivasyon testi CD63% sonucuna göre Venom Allerji Türü
	sIgE Api	sIgE Ves	Prik Api	Prik Ves		BAV CD63%	YAV CD63%	
H1	+++ (10,2)	++ (4,5)	6*6	2*3	BAV (rApi m1) (0.95kU/L) +	%79.37	%47.58	BAV ve YAV +
H2	++ (1,11)	++ (0,74)	5*5	4*4	BAV ve YAV-	%88.28	%61.74	BAV ve YAV +
H3	++ (0,88)	+++ (6,74)	6*5	3*3	BAV ve YAV-	%86.46	%63.29	BAV ve YAV +
H4	+++	0	5*3	4*2	BAV (rApi m1) (0.46kU/L) +	%86.80	%55.73	BAV ve YAV +
H5	++	-	8*8	5*5	BAV ve YAV-	%68.15	%34.11	BAV +, YAV-
H6	+(0,54)	+++++ (74,6)	3*3	4*4	YAV (rVes v1) (0.25kU/L) +	%58.10	%81.58	BAV ve YAV +
H7	+++ (13,1)	+++ (7,79)	4*4	5*4	YAV (rVes v1, rVes v5) (0.68kU/L; 5.55kU/L) +, BAV (rApi m1) (1.71kU/L) +	%71.12	%73.12	BAV ve YAV +
H8	+++ (10,4)	-	3*3	4*4	YAV (rVes v1) (2.03kU/L) +	%72.18	%88.45	BAV ve YAV +
H9	yok	yok	10*5	4*3	YAV (rVes v1) (22.0kU/L), (rVes v5 1.43kU/L) +	%48.98	%93.87	BAV ve YAV +
H10	++++ (21,3)	yok	3*5	10*7	BAV (rApi m1) (3.62kU/L) +	%58.98	%78.38	BAV ve YAV +

(NOT: CD63%* Çalışmaya dahil edilen 10 hastanın CD63% seviyelerinin 1ml/mg arı venom konsantrasyonlarındaki pozitiflik oranını göstermektedir. 5 hasta BAV'a karşı daha yüksek pozitif iken 4 hasta YAV'a karşı daha yüksek pozitif, 1 hastada BAV ve YAV'a karşı yaklaşık eşit pozitiflik gösterdi. 1 hastada da sadece bal arısına karşı pozitifliği. BAV: Bal arısı venomu, YAV: Yaban arısı venomu)

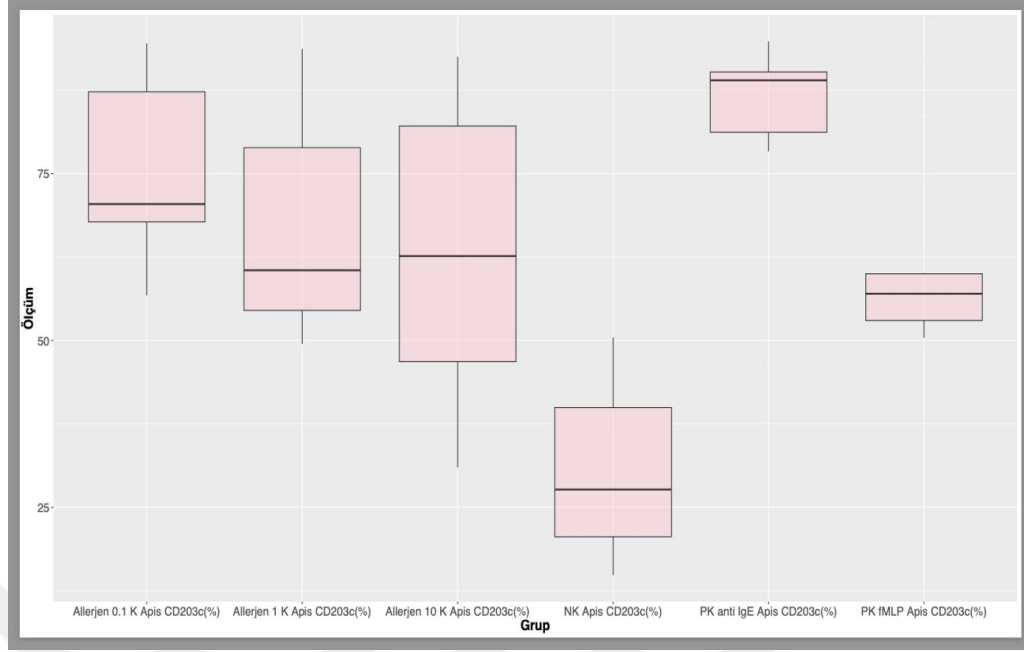
4.5. Bazofil Aktivasyon Testi İstatistiksel Analiz Sonuçlarından Elde Edilen Bulgular

Akım sitometrideki ölçüm sonuçlarında verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, Q-Q grafikleri ve Shapiro-wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. İkili tekrarlı ölçümler arası karşılaştırmalarda Wilcoxon testi kullanıldı. İki den fazla tekrarlı ölçümler arası karşılaştırmalarda Friedman testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Dun-Bonferroni testi kullanıldı. Verilerin analizi R 4.3.2 (The R Project for Statistical Computing. (Erişim Tarihi:18 Şubat 2024) yazılımında gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi. Test sonucuna Apis mellifera ve Vespula vulgaris allerjenlerine göre negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel olarak tablo 4.4 ve 4.5’te ve şekil 4.5, 4.6 ve 4.7’ de gösterilmiştir.

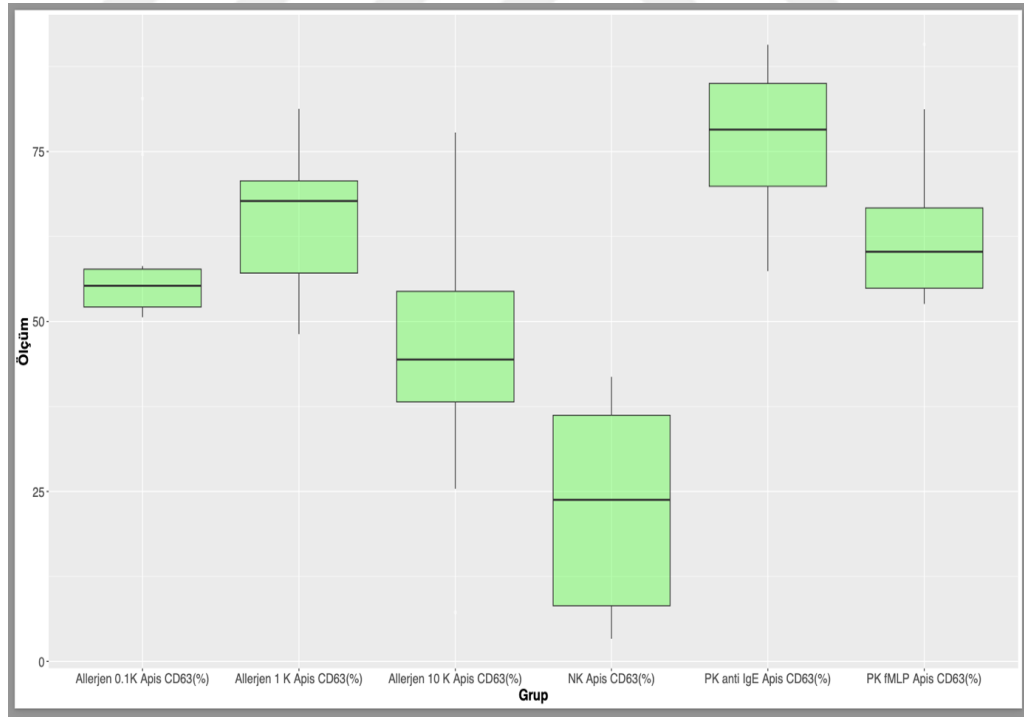
Tablo 4.4. Hasta grubunda bal arısı allerjisinde negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel sonuçları

Değişkenler	Ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek)	p
NK Apis CD63%	23.8(6.1-38.4)	<0.001
PK fMLP Apis CD63%	60.3(53.7-70.5)	
PK anti IgE Apis CD63%	78.2(68.5-87.5)	
Allergen 0.1K Apis CD63%	55.3(51.7-62.3)	
Allergen 1K Apis CD63%	67.7(54.8-71.4)	
Allergen 10K Apis CD63%	44.4(34.2-58.3)	
NK Apis CD203c%	27.7(19.9-41.0)	<0.001
PK fMLP Apis CD203c%	57.0(52.0-66.0)	
PK anti IgE Apis CD203c%	89.0(79.3-90.6)	
Allergen 0.1K Apis CD203c%	70.5(65.8-91.0)	
Allergen 1K Apis CD203c%	60.5(53.1-83.0)	
Allergen 10K Apis CD203c%	62.7(42.8-85.2)	
NK Apis CD203c MFI	0.7(0.5-1.6)	<0.001
PK fMLP Apis CD203c MFI	10.7(4.9-12.4)	
PK anti IgE Apis CD203c MFI	11.8(7.7-26.8)	
Allergen 0.1K Apis CD203c MFI	11.5(9.5-23.0)	
Allergen 1K Apis CD203c MFI	12.9(9.4-19.7)	
Allergen 10K Apis CD203c MFI	11.7(5.6-21.5)	

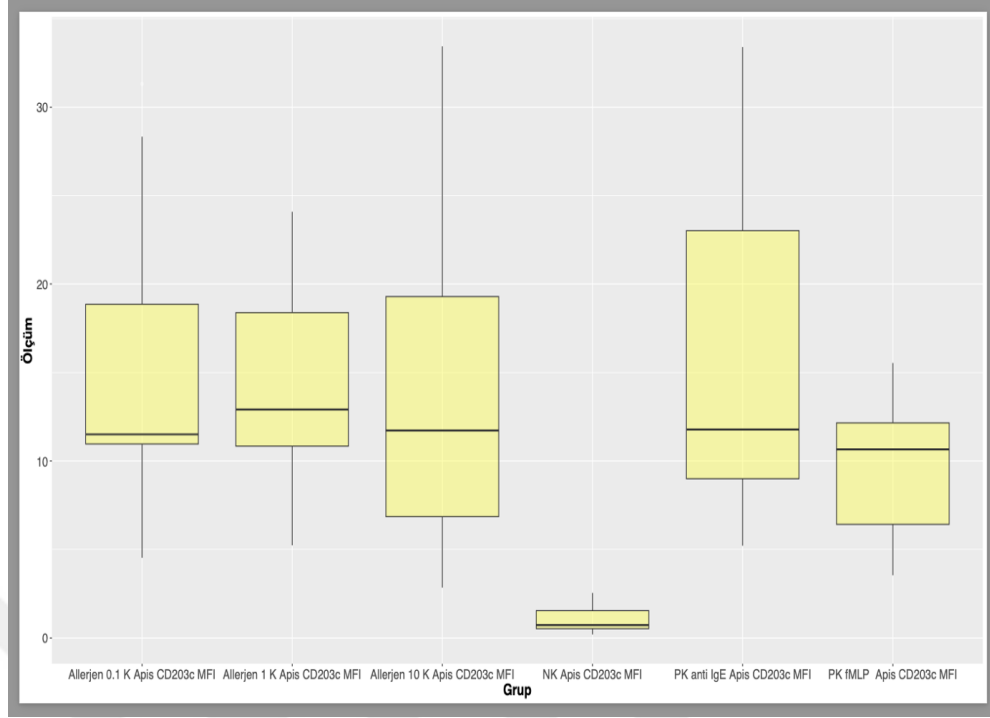
* Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.5. Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda bal arısı allerjeninin CD203c% değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği



Şekil 4.6. Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda bal arısı allerjeninin CD63% değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği



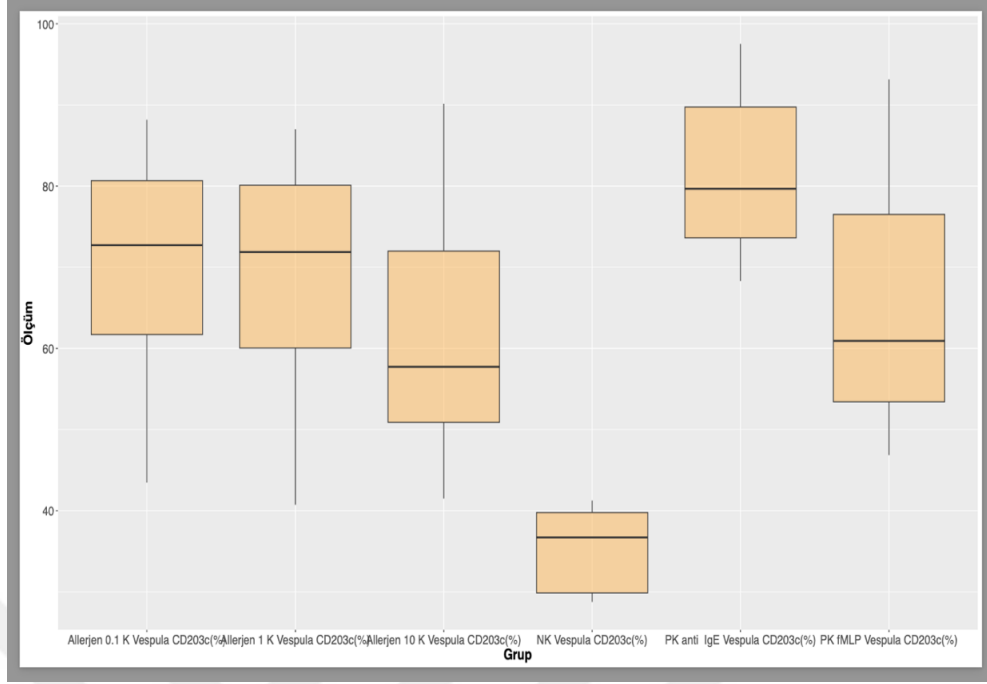
Şekil 4.7. Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda bal arısı allerjeninin CD203c MFI değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği

Yaban arısı allerjeninin istatistiksel boxplot dağılım grafikleri şekil 4.8, 4.9 ve 4.10'de verilmiştir.

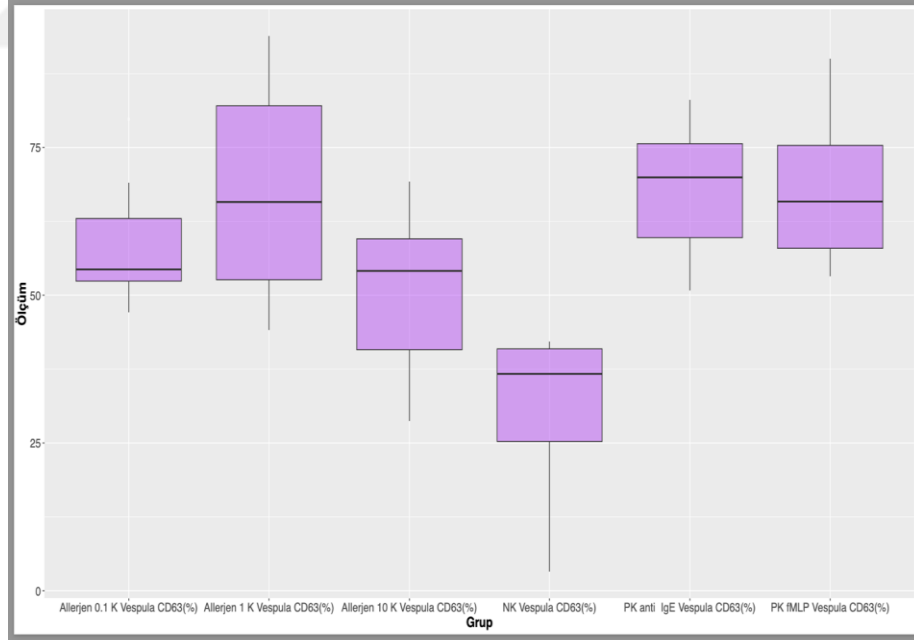
Tablo 4.5. Hasta grubunda yaban arısı allerjeninin kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, fMLP), venom konsatrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel sonuçları

Değişkenler	Ortanca (1.çeyre-3.çeyrek)	p
NK Vespula CD63%	36.7(19.1-41.6)	<0.001
PK fMLP Vespula CD63%	65.9(56.6-77.1)	
PK anti IgE Vespula CD63%	69.9(57.5-77.4)	
Allergen 0.1K Vespula CD63%	54.4(51.1-66.6)	
Allergen 1K Vespula CD63%	65.8(50.6-84.7)	
Allergen 10K Vespula CD63%	54.1(37.9-61.4)	
NK Vespula CD203c%	36.7(29.1-40.1)	<0.001
PK fMLP Vespula CD203c%	60.9(50.8-81.4)	
PK anti IgE Vespula CD203c%	79.7(71.8-90.1)	
Allergen 0.1K Vespula CD203c%	72.7(59.6-82.0)	
Allergen 1K Vespula CD203c%	71.9(58.3-80.9)	
Allergen 10K Vespula CD203c%	57.7(50.1-77.1)	
NK Vespula CD203c MFI	0.8(0.4-2.1)	<0.001
PK fMLP Vespula CD203c MFI	11.3(6.2-15.9)	
PK anti IgE Vespula CD203c MFI	11.4(7.6-15.1)	
Allergen 0.1K Vespula C203c MFI	11.8(9.4-14.2)	
Allergen 1K Vespula CD203c MFI	14.8(11.1-16.7)	
Allergen 10K Vespula CD203c MFI	13.6(5.7-19.5)	

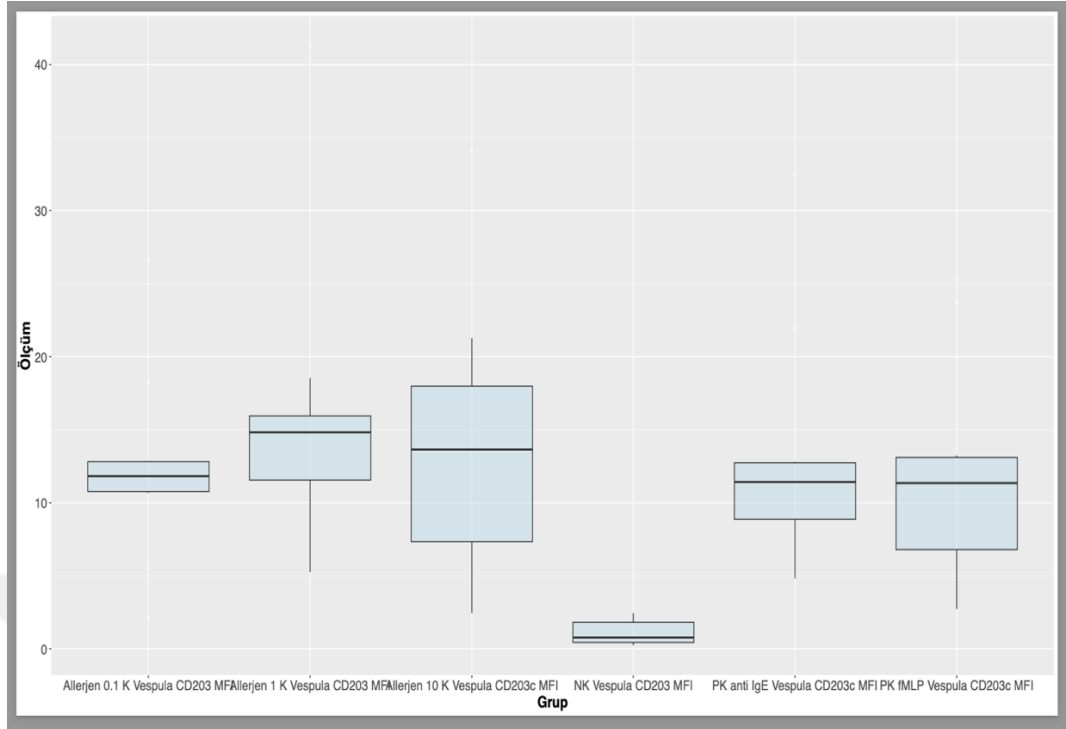
* Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. p<0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.8. Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda yabancı arısı allerjeninin CD203c % değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği



Şekil 4.9. Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda yabancı arısı allerjeninin CD63% değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği



Şekil 4.10. Hasta grubunda Negatif kontrol ve Pozitif kontrol (fMLP-Anti-IgE) ile uyarılan hastalarda 0,1, 1 ve 10 konsantrasyonlarda yaban arısı allerjeninin CD203c MFI değerinin istatistiksel olarak boxplot analiz dağılım grafiği

Tekrarlı ölçümlerin karşılaştırma sonuçlarına göre hem bal hem de yaban allerjenlerinin ayrı ayrı negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI anlamlı bir fark bulunmuştur. (n=10 ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) $p<0001$).

Ek olarak test sonucuna bal ve yaban arısı allerjenlerinin birbiri ile karşılaştırmasına göre negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel olarak Tablo 4.6'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Hasta grubunda bal ve yaban arısı allerjeninin birbiri ile karşılaştırmasına göre negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsatrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel sonuçları

Değişkenler	Ortanca (1.çeyre-3.çeyrek)	p
NK Apis CD63%	23.8(6.1-38.4)	0.169
NK Vespula CD63%	36.7(19.1-41.6)	
PK fMLP Apis CD63%	60.3(53.7-70.5)	0.646
PK fMLP Vespula CD63%	65.9(56.6-77.1)	
PK anti IgE Apis CD63%	78.2(68.5-87.5)	0.086
PK anti IgE Vespula CD63%	69.9(57.5-77.4)	
Allerjen 0.1K Apis CD63%	55.3(51.7-62.3)	0.959
Allerjen 0.1K Vespula CD63%	54.4(51.1-66.6)	
Allerjen 1K Apis CD63%	67.7(54.8-71.4)	0.721
Allerjen 1K Vespula CD63%	65.8(50.6-84.7)	
Allerjen 10K Apis CD63%	44.4(34.2-58.3)	0.285
Allerjen 10K Vespula CD63%	54.1(37.9-61.4)	
NK Apis CD203c%	27.7(19.9-41.0)	0.169
NK Vespula CD203c%	36.7(29.1-40.1)	
PK fMLP Apis CD203c%	57.0(52.0-66.0)	0.139
PK fMLP Vespula CD203c%	60.9(50.8-81.4)	
PK anti IgE Apis CD203c%	89.0(79.3-90.6)	0.508
PK anti IgE Vespula CD203c%	79.7(71.8-90.1)	
Allerjen 0.1K Apis CD203c%	70.5(65.8-91.0)	0.646
Allerjen 0.1K Vespula CD203c%	72.7(59.6-82.0)	
Allerjen 1K Apis CD203c%	60.5(53.1-83.0)	0.508
Allerjen 1K Vespula CD203c%	71.9(58.3-80.9)	
Allerjen 10K Apis CD203c%	62.7(42.8-85.2)	0.575
Allerjen 10K Vespula CD203c%	57.7(50.1-77.1)	

Tablo 4.6. Hasta grubunda bal ve yaban arısı allerjeninin birbiri ile karşılaştırmasına göre negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsatrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerindeki değişim istatistiksel sonuçları **(Devamı)**

NK Apis CD203c MFI	0.7(0.5-1.6)	0.959
NK Vespula CD203c MFI	0.8(0.4-2.1)	
PK fMLP Apis CD203c MFI	10.7(4.9-12.4)	0.285
PK fMLP Vespula CD203c MFI	11.3(6.2-15.9)	
PK anti IgE Apis CD203c MFI	11.8(7.7-26.8)	0.508
PK anti IgE Vespula CD203c MFI	11.4(7.6-15.1)	
Allergen 0.1K Apis CD203c MFI	11.5(9.5-23.0)	0.333
Allergen 0.1K Vespula CD203c MFI	11.8(9.4-14.2)	
Allergen 1K Apis CD203c MFI	12.9(9.4-19.7)	0.508
Allergen 1K Vespula CD203c MFI	14.8(11.1-16.7)	
Allergen 10K Apis CD203c MFI	11.7(5.6-21.5)	0.878
Allergen 10K Vespula CD203c MFI	13.6(5.7-19.5)	

* Veriler ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

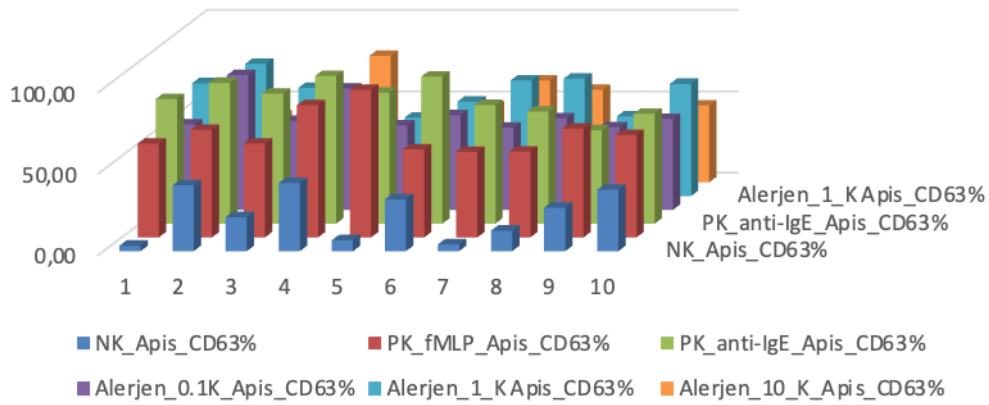
Tekrarlı ölçümlerin karşılaştırma sonuçlarına göre hem bal hem de yaban arısı allerjenlerinin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsatrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63, CD203c yüzde ve CD203c MFI değerlerinin birbiri ile karşılaştırılmasıyla anlamlı bir farklılıklar bulunamamıştır. (n=10 ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) $p < 0.0001$).

Bazofil aktivasyon test sonuçlarının hastalardaki CD203c MFI değişim değerleri Tablo 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10 'da ve Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.7. Bazofil aktivasyon testi sonucu hasta grubunda bal arısı allerjeninin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD63 % değerlerindeki değişimleri

Hasta No	CD63 % Apis NK	CD63 % Apis PK (fMLP)	CD63 % Apis PK (anti-IgE)	CD63 % Apis 0,1	CD63 % Apis 1	CD63 % Apis 10
Hasta 1	%3.34	%57.55	%76.6	%52.56	%79.37	%17.22
Hasta 2	%40.4	%66,1	%86.50	%82.80	%88.28	%52.13
Hasta 3	%20.87	%57.61	%79.84	%74.73	%86.46	%42.30
Hasta 4	%41.86	%81.21	%90.7	%79.58	%86.80	%77.8
Hasta 5	%6.72	%90.77	%80.54	%71.99	%68.15	%45.4
Hasta 6	%31.82	%54.02	%90.33	%58.15	%58.10	%46.52
Hasta 7	%4.24	%52.58	%72.88	%50.62	%71.12	%62.60
Hasta 8	%12.60	%52.69	%68.89	%56.33	%72.18	%56.86
Hasta 9	%26.67	%50.79	%66.91	%57.41	%48.98	%47.18
Hasta 10	%37.67	%62.91	%67.41	%55.79	%58.98	%47.18
Ortalama	%31.56	%66,39	%77.99	%78.87	%75.35	%48.43

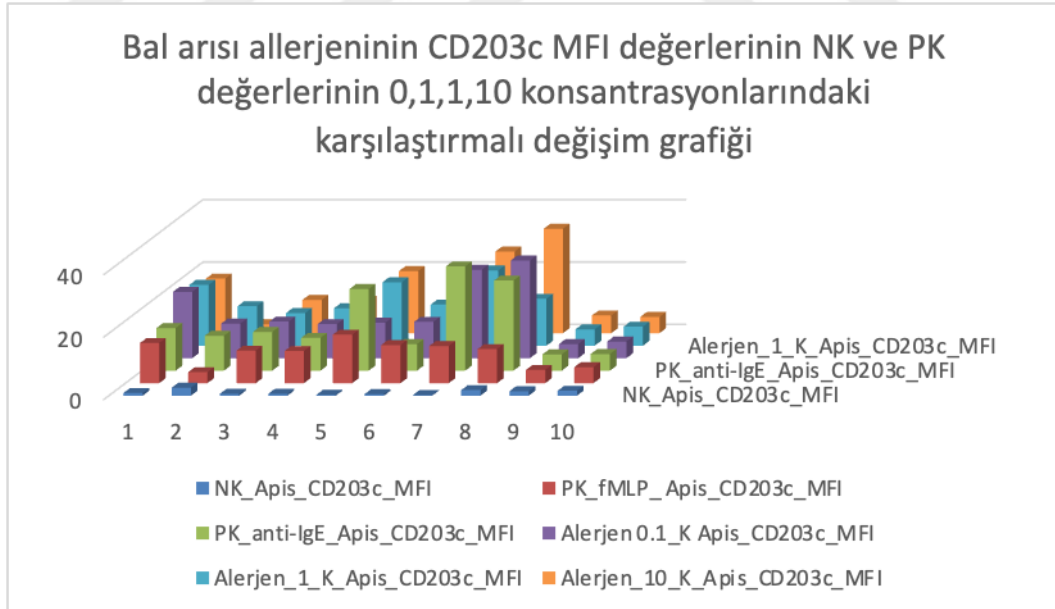
Bal arısı allerjeninin CD63% değerlerinin NK,PK, 0.1, 1, 10 konsantrasyonlarındaki karşılaştırmalı değişim grafiği



Şekil 4.11. Hasta grubunda CD63% değerlerinin bal arısı allerjeninin NK ve PK değerlerinin 0,1,1,10 konsantrasyonlarındaki değerlere göre karşılaştırmalı değişim grafiği

Tablo 4.8. Bazofil aktivasyon testi sonucu hasta grubunda bal arısı allerjeninin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD203c hücrelerin MFI değerlerindeki değişimleri

Hasta No	CD203c MFI Apis NK	CD203c MFI Apis PK (fMLP)	CD203c MFI Apis PK (anti- IgE)	CD203c MFI Apis 0,1	CD203c MFI Apis 1	CD203c MFI Apis 10
Hasta 1	0,830	12,849	13,650	21,238	19,501	17,471
Hasta 2	2,541	3,539	11,17	11,08	12,656	2,846
Hasta 3	0,599	10,388	12,4	11,721	10,435	10,665
Hasta 4	0,584	10,318	10,499	10,919	12,025	10,378
Hasta 5	0,279	15,339	26,135	11,356	20,320	19,90
Hasta 6	0,507	12,229	8,498	11,653	13,163	12,793
Hasta 7	0,195	11,918	33,400	28,325	24,089	26,184
Hasta 8	1,769	10,922	28,874	31,307	15,038	33,437
Hasta 9	1,424	4,234	5,210	4,530	5,230	5,678
Hasta 10	1,580	5,124	5,350	5,320	6,110	5,218
Ortalama	0,7	10,7	11,8	11,5	12,9	11,7

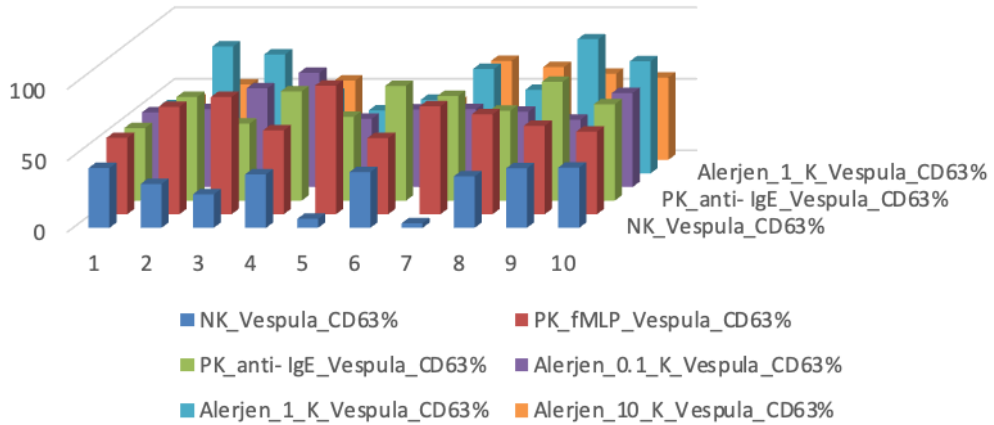


Şekil 4.12. Hasta grubunda CD203c MFI değerlerinin bal arısı allerjeninin PK ve NK değerlerinin 0,1,1,10 konsantrasyonlarındaki değerlere göre karşılaştırmalı değişim grafiği

Tablo 4.9. Bazofil aktivasyon testi sonucu hasta grubunda yaban arısı allerjeninin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), %CD63 değerlerindeki değişimleri

Hasta No	CD63% Vespula NK	CD63% Vespula PK (fMLP)	CD63% Vespula PK (anti- IgE)	CD63% Vespula 0,1	CD63% Vespula 1	CD63% Vespula 10
Hasta1	%41.83	%53.4	%50.80	%52.30	%47.58	%42.11
Hasta2	%30.72	%75.11	%72.48	%54.55	%61.74	%42.81
Hasta3	%23.43	%81.97	%53.83	%59.04	%63.29	%70.53
Hasta4	%37.38	%58.63	%76.45	%64.80	%55.73	%55.42
Hasta5	%36.29	%90.03	%58.68	%37.65	%34.11	%38.72
Hasta6	%39.01	%53.21	%80.28	%74.26	%81.58	%50.34
Hasta7	%3.24	%75.44	%73.22	%54.50	%73.12	%69.22
Hasta8	%36.01	%69.85	%72.96	%82.65	%88.45	%74.91
Hasta9	%41.57	%61.87	%83.06	%77.12	%93.87	%60.20
Hasta10	%42.17	%57.71	%67.41	%65.79	%78.38	%57.5
Ortalama	%30.16	%67.72	%68.91	%63.26	%71.78	%56.23

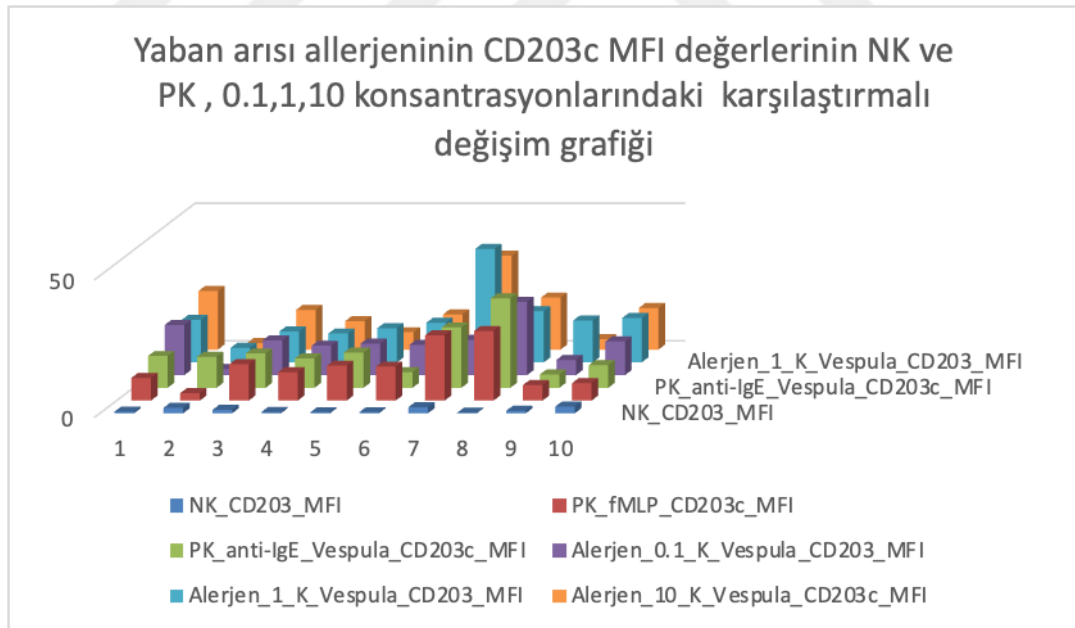
Yaban arısı allerjeninin CD63% değerlerinin NK,PK, 0.1, 1, 10 konsantrasyonlarındaki karşılaştırmalı değişim grafiği



Şekil 4.13. Hasta grubunda CD63% değerlerinin yaban arısı allerjeninin PK ve NK değerlerinin 0,1,1,10 konsantrasyonlarındaki değerlere göre karşılaştırmalı değişim grafiği

Tablo 4.10. Bazofil aktivasyon testi sonucu hasta grubunda yaban arısı allerjeninin negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) (anti-IgE, FMLP), venom konsantrasyonu (K0.1, K1, K10), CD203c hücrelerin MFI değerlerindeki değişimleri

Hasta No	CD203c MFI Vespula NK	CD203c MFI Vespula PK (fMLP)	CD203c MFI Vespula PK (anti-IgE)	CD203c MFI Vespula 0,1	CD203c MFI Vespula 1	CD203c MFI Vespula 10
Hasta 1	0,614	8,222	11,584	18,240	15,409	21,277
Hasta 2	2,012	2,732	11,262	2,173	5,261	2,455
Hasta 3	1,259	13,237	12,517	12,655	11,263	14,470
Hasta 4	0,474	10,339	10,737	10,680	10,448	10,380
Hasta 5	0,414	12,706	12,807	11,440	12,450	6,320
Hasta 6	0,428	12,356	5,732	11,024	14,404	12,824
Hasta 7	2,213	23,718	21,963	12,874	41,260	34,127
Hasta 8	0,236	25,275	32,553	26,645	18,551	18,929
Hasta 9	0,935	5,657	4,839	5,540	15,249	3,861
Hasta 10	2,450	6,324	8,250	12,210	16,130	15,158
Ortalama	0,8	11,3	11,4	11,8	14,8	13,6



Şekil 4.14. Hasta grubunda CD203c MFI değerlerinin yaban arısı allerjeninin NK ve PK değerlerinin 0,1,1,10 konsantrasyonlarındaki değerlere göre karşılaştırmalı değişim grafiği

Çalışma hastalarımızın CD63, CD203 değerlerinin ekspresyonunun farklı dilüsyonlarındaki yüzde ekspresyonu ve bu ekspresyonların bal ve yaban arısı allerjenlerindeki çift pozitiflik değişimi incelenmiştir. Yapılan bazofil aktivasyon testi incelendiğinde çalışılan 3 farklı dilüsyonda da pozitiflik görülmüştür (negatif kontrole göre değerlendirildiğinde, %15'lik artış pozitif olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$)).

Çalışma hastalarımızda hem bal hemde yaban arısı allerjenlerindeki CD203c ekspresyonunun farklı ilaç dilüsyonlarındaki MFI değerleri negatif kontrole göre değerlendirildiğinde, yapılan bazofil aktivasyon testi ile çift pozitiflik durumunun çalışmaya dahil edilen tüm hastalarda pozitiflik görülmüştür (negatif kontrole göre değerlendirildiğinde, %15'lik artış pozitif olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$)).

Çalışma hastalarımızın allerjen komponent testi sonuçları ile Sp IgE i209 rVes v1 yaban arısı, Sp IgE i209 rVes v5 yaban arısı ve IgE i209 rApi m1 bal arısı allerjenlerinin serumdaki düzeylerinin hasta bazlı değerlendirilmesinde hastadan hastaya göre farklılık gösteren pozitif durumlarına rastlanmıştır. Sp IgE i209 rVes v1 Sp IgE i209 rVes v5 yaban arısı, IgE i209 rApi m1 bal arısı birlikte kıyaslandığında bu alt grup allerjenlerine hastaların daha yatkın olduğu görülmüştür (negatif kontrole göre değerlendirildiğinde, >0,35'lik artış pozitif olarak kabul edilmiştir) ($p<0.345$)).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda BAV ve YAV ile çifte pozitiflik saptan hastalarda BAT ve CRD testleri ile, gerçekten her iki arı venomuna ayrı ayrı gerçek pozitiflik mi var yoksa birine var ama diğerine karşı pozitiflik ortak antijenik determinantlarından dolayı mı gelişmiş bu durumları tespit etmeye çalıştık. BAT testi ile hastaların CD63% değerleri göz önünde bulundurulduğunda 9'unda çifte pozitiflik görülürken bir venom türünün diğerine göre daha fazla pozitif olduğu, 1 hastada da sadece bal arısına pozitiflik olduğu saptandı. Hastaların 5'inin bal arısına 4'ünün ise yaban arısına karşı daha fazla pozitiflik gösterdiği saptandı. 1 hastada ise iki venom karşı yaklaşık eşit pozitiflik yüzdesi bulundu. CRD testinde hastaların 6'sında tek bir venom türüne, 1'inde ise her iki venom türüne pozitiflik saptandı. Hiç pozitiflik saptanmayan 3 hastamız vardı. Hastaların 3'ünde rApi m1 venomunda pozitiflik varken rVes v1 ve v5'e karşı pozitiflik saptanmadı. Hastaların 2'sinde rVes v1'e karşı, 1'inde ise hem rVes v1 hem de rVes v5 venomuna karşı pozitiflik varken rApi m1 'e karşı pozitiflik saptanmadı, 1'inde hem rVes v1 ve v5 hem de rApi m1'e pozitiflik saptandı. Bu sonuçlar, gerçek çifte pozitiflik mi yoksa çapraz reaktiviteden dolayı çifte pozitiflik mi, bunu ayırmada CRD'nin oldukça etkili bir tanı metodu olduğu gösterildi. BAT ise çifte pozitifliğin ayırımında CRD'ye göre daha zayıf kaldı fakat CRD ile pozitiflik saptanmayanlarda BAT'da pozitiflik saptandığı için her iki testin birbirinin tamamlayıcısı olabileceği gösterilmiş oldu.

Deri prik testi ve/veya sIgE ölçümü ile saptanan BAV ve YAV çift duyarlılığı hastanın öyküsündeki arı türü de net olarak bilinmiyorsa önemli bir klinik probleme yol açabilmektedir. Bu durum hastanın hangi venomu karşı duyarlı olduğunun belirlenmesini zorlaştırabilmektedir (Sturm ve ark., 2004; Ebo ve ark., 2007). Fakat hastanın öyküsünde arı türü net olarak belirlenebiliyorsa (Örneğin arıcılık yapan birinin bal arısı ile sokulması ve hastanın bunu net olarak ifade etmesi), DPT ve sIgE

ölçümlerinde her iki duyarlılıkta saptansa bile öyküsü ile uyumlu olan arı venomu ile VIT yapılabilmektedir. Fakat öykünün net olmadığı ve çifte duyarlılığın gösterildiği durumlarda BAT ve CRD yöntemleri tanıya katkı sağlayabilir ve hastanın doğru arı venomu ile VIT yapılmasına katkıda bulunabilir.

Ayrıca arı sokması sonrası sistemik reaksiyon öyküsü olan, fakat DPT ve sIgE pozitifliği saptanmayan olgularda arı venom konsantrasyonları ile in-vitro BAT yapılması tanının konulmasına ya da ekarte edilmesine yardımcı olabilir. Son dönemlerde çapraz reaksiyon sonucu oluşan sIgE sonuçlarındaki çift duyarlılık durumlarında CRD de uygulanmaya başlanmıştır. Bu test ile çift pozitiflik saptanan vakalarda arı venom allerjeninin hangi türüne veya konsantrasyonuna duyarlılık olduğunu kantitatif ölçüm yapılarak tespit edilebilmektedir. Bu test BAT testi ile uygulandığında BAT'ı destekler sonuçlar verebilme ve tanı konulmasında yardımcı olabilme özelliğine sahiptir. Bu olgularda arı venomuna karşı in-vitro ortamda BAT ve CRD uygulaması, arılarla doğal provokasyon yapılması gereksinimini de ortadan kaldıracaktır. Diğer yandan zaten arılarla doğal provokasyon etik nedenler ve olası anafilaksi riski nedeniyle birçok allerji biriminde rutinde kullanılamamaktadır.

Çalışmamızda DPT ve sIgE sonuçları ile değerlendirilerek arı venom çift duyarlılığı (hem bal arısı hem de yaban arısına karşı çift pozitiflik) saptanan hastalarda öncelikle BAT ile bazofil hücre aktivasyon durumunu ölçerek tanısal uygulamalarda kullanılabilecek bir test paneli geliştirdik.

Ek bir test olan CRD ile de serum IgE durumlarının kantitatif ölçümünü yaptık. BAT ile bu test panelinin optimizasyonu için çift pozitif tanısı olan hastalardan alınan kan örneğinde (bazofil) oluşan uyarım düzeylerini kontrol tüplerine eklediğimiz anti-IgE ve fMLP ajanları ile arı venom titrelerinin 0.1-1-10mg/ml'lik konsantrasyonlarında aktivasyon durumlarını karşılaştırdık. CRD ile ise oluşan serum IgE durumlarının arı venom allerjenlerinde kullanılan allerjen dozlarındaki pozitiflik durumunu kantitatif olarak karşılaştırdık.

Çalışmamızda arı venom çift duyarlılığı (hem bal arısı hem de yaban arısına karşı pozitiflik) tespit edilip VIT başlaması karar verilen 10 hasta örneği kullanıldı. Bu hastalara üç farklı konsantrasyonda (0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml) uygulanan BAT

ile CD63 ekspresyonunda üç konsantrasyonda negatif kontrole oranla ortalama %70.2 artış gösterildi.

Tüm hastalarda tüm konsantrasyonlarında CD63 pozitifliği saptandı. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, hasta öyküsüyle uyumsuz sIgE ve DPT sonuçları içeren vakalarda BAT'ın tanı ve tedavi yönetimine katkıda bulunacak önemli bir in-vitro test olduğu gösterilmiştir. Ayrıca uygulanan CRD dahil edilen her bir hastada farklı arı venom allerjenlerine karşı farklı venom türü dozlarında pozitiflik saptandı. Sadece bir hastada iki arı venom allerjenlerinin tüm dozlarına karşı duyarlılık geliştiğini gözledik. Bu durumun sebebi çalışmada kullanılan allerjen kısıtlılığına bağlı olarak çok bilinen majör komponentlerin kullanımı ve minör komponentlere bakılamaması olarak açıklanabilir.

Arı venom çifte pozitifliği sokan arı türü bilinmediği durumlarda önemli bir klinik problemdir. Bu çifte pozitiflik gerçekten her iki arı türünün majör allerjenlerine karşı gelişmiş gerçek bir pozitiflik olabileceği gibi, bir arı türünün majör allerjenine karşı duyarlılık gelişmiş fakat CCD ortak antijenitesi nedeniyle de çifte pozitiflik saptanmış olabilir. Bir çalışmada HVA'sı olan hastaların %72'sinde CCD sIgE tespit edilmiştir. HVA'sı olan hastaların %59'a kadarının birden fazla venoma karşı pozitif sonuçlar ortaya çıkardığını göstermektedir. Kochuyt AM ve ark. (2005), Yarısından fazlası CCD'lere karşı sIgE antikorları göstermektedir. Bir diğer çalışmada 37 hastada (%56,1) gerçek çift duyarlılığı ve BAV ve YAV'a karşı çift pozitifliği olan 66 katılımcının 29'unda çapraz reaktiviteyi ortaya çıkardı. Çapraz reaktivitesi olan olgularda anti-CCD IgE antikorlarının seviyelerinin, BAV ve YAV'a karşı gerçek çift duyarlılığı olan hastalarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Renato Erzen ve ark. (2009), anti-CCD'ler, IgE antikorlarının aktivitesini ortaya çıkarmış ve bunların hymenoptera venom durumunda klinik olarak ilgisiz olduğunu ileri sürmüştür. Monosensitize HVA'sı olan katılımcılarda bal ve yaban arısı allerjisi için BAT, CCD'ye karşı IgE antikorları olan hastaların %67'sinde her iki venom allerjeni için de pozitif bulunmuştur. Deglikosile edilmiş venom kullanıldığında, BAT yalnızca bir arı venomu ile pozitif olduğunu bulmuşlardır. Ancak diğer çalışmalar CCD'nin klinik önemini vurgulamıştır. Anti-CCD antikorlarının klinik açıdan ilgisizliğinin halen

tartışılmakta olduğu unutulmamalıdır. CCD'lerin bazı kişilerde klinik semptomlara neden olduğu göz ardı edilemez. Mertens ve ark. (2010), Bu sonuçlar, CCD'lere karşı IgE antikorlarının in vitro testlerde sıklıkla çift pozitifliğe neden olduğunu doğrulamaktadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre bal ve yaban arısı allerjenine karşı yaptığımız BAT testinde pozitiflik oranı %98'lere kadar pozitif bulundu. CRD serum IgE düzeylerine karşı pozitiflik durumu bal arısı ve yaban arısına karşı allerji durumu %30'larda her ikisine pozitiflik %10 ve hiç pozitiflik saptanmayan %30'larda bulundu. Çalışmamızda Ani-CCD komponent yöntemi ile ölçüm yapılmadı ama CRD ile saptanan ölçümlerde tek bir arı türünün majör allerjenine karşı pozitiflik saptanması bu çifte pozitifliğin çapraz reaktiviteye neden olan CCD duyarlılığından ya da hyalüronidaz gibi ortak antijenik detarminatlarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Bal arısına allerjisi olan hastalarda rApi m1 ve rApi m10 kombinasyonu ile %86,8 pozitiflik oranı gösterilmiştir. Köhler J ve ark. (2014), Bal arısı allerjisinin tanısında tek bileşenlerin kullanılması önceki çalışmalarda da daha düşük pozitiflik göstermiştir. BAV allerjisinde rApi m1 veya rApi m10 için hassasiyet sırasıyla %72,2 ve %61,8 olduğunu bulmuştur. Frick ve ark. (2016), Bir diğer çalışmada, rApi m2 (hyalüronidaz) ve rApi m5 (dipeptidil peptidaz IV) ile yüksek IgE pozitifliği oranı görülmüştür; ancak rApi m2 veya rApi m5 ile yaban arısı ham venomu arasında anlamlı korelasyonlar bulunmuştur. Jin C ve ark. (2010), Daha önceki birkaç rapor da rApi m2 ve rApi m5'in yaban arısı venomuyla çapraz reaktivitesini ortaya konmuştur. Çapraz reaktivitenin bu bileşenlerin yapısal homolojisinden kaynaklanabileceğini belirtilmiştir. Çalışmamızda sadece BAV için rApi m1 ve YAV için rVes v1 ve rVes v5 serum IgE düzeylerine bakıldı, hastalar arasında anlamlı bir korelasyon bulunmazken, rVes v1 ve rVes v5 kombinasyonu arasında anlamlı bir korelasyon tespit edildi. Öte yandan bu molekül, rApi m1 gibi yalnızca BAV'da bulunur. Bu durum, BAV allerjeni rApi m1'e karşı YAV allerjenleri rVes v1 ve rVes v5 kombinasyonunun arı venom allerjisinin teşhisinde ve bu allerjenlerin tanısında duyarlı olabileceğini göstermektedir. Bazı hymenoptera arı venomuna tepki veren hastalarda hem BAV hem de YAV'a karşı çift pozitiflik olduğunu göstermiştir. Bu durum daha önce de belirtildiği gibi; her iki türünün majör allerjenlerine karşı duyarlanmaya bağlı olabileceği, hyalüronidaz gibi gerçek çapraz reaktiviteye bağlı

olabilir ya da klinik olarak alakasız olan çapraz reaktif CCD'lere bağlı olabilir. Çalışmamızda CCD ya da hyaluronidaz gibi her iki arı türü için ortak komponentler çalışılmadı. Bu nedenle bu hastalıklardaki bu ortak antijenik detarminatlara duyarlılık oranlarını veremiyoruz. Fakat bal arısı için spesifik majör allerjen komponent olan Api m1 ve yaban arısı için majör komponent allerjen olan Ves v1 ve v5 çalışıldı. Bu allerjen komponentleri arı türüne özgüdür ve çapraz reaksiyon vermez. Bu nedenle CRD ölçümü ile bu spesfik majör komponentlere karşı saptadığımız tekli pozitiflik deri ve/veya sIgE ile saptanan çifte pozitifliğin CCD ya da diğer ortak antijenik detarminantlara karşı pozitiflik olduğunu dolaylı yolla göstermektedir.

BAT ile şiddetli arı allerjisi olan hastalarda önemli ölçüde yüksek bazofil reaktivitesini bulmuştur. İlginç bir şekilde, bu bazofil reaktivitesi, deneysel bir allerjen mücadelesindeki klinik semptomlarla önemli ölçüde ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Nopp A ve ark. (2006), Öte yandan serumdaki arı spesifik allerjenine özgü IgE düzeylerinin ciddiyeti ve düzeyi arasında bir korelasyon gösterilememiştir. Venom allerjisi olan hastaların %30'unda düşük veya saptanamayan serum IgE göstermiştir Korosec P ve ark. (2009), çalışmasında Phadia ImmunoCAP sonuçlarının aksine BAT %100 hassasiyet göstermiştir. Sturm GJ ve ark. (2004) yaptığı çalışmada Sistemik allerjik reaksiyonları (Muller derece II-IV) olan hastalarda bildirilen duyarlılık ve özgüllük, BAT'ta %60-80 olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda BAT testinin etkinliğinin Hymenoptera venomuna karşı şiddetli anafilaksi (Muller derece III-IV reaksiyonu) geçiren hastalarda bildirilen duyarlılık ve özgüllük %95-100 arasındaydı ve sonuçlar bu çalışmayla karşılaştırılabilir nitelikteydi.

Nopp A ve ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada venom aşırı duyarlılığı olan hastalarda CD203c ve CD63'ün benzer kinetiğe sahip olduğu bulunmuştur. Maksimum ekspresyon, allerjen uyarımından 20 dakika sonra tespit edilmiştir. Ayrıca, stimülasyondan önce 10 dakika süreyle 300 pM IL-3 eklenmesinin, CD63 ekspresyonunu optimize ettiği ancak aslında doza bağlı bir şekilde antijen stimülasyonuna yönelik CD203c ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. Ayrıca ne CD63 ne de CD203c ekspresyonunun, antihistamin desloratidin'in önceden in vivo

alımından etkilenmediği gösterilmiştir. Çalışmamızda allerjenle uyarımdan 30 dk sonra maksimum hem CD63 hem de CD203c ekspresyonu ve aktivasyonu gösterdiği gözlenmiştir CD63 ve CD203c, bazofil aktivasyonu ve degranülasyonunun farklı yollarını temsil etse de her ikisinin de bazofil aktivasyon testi için kabul edilebilir belirteçler olduğu doğrulanmıştır. Başka bir çalışmada ise Ebo DG ve ark. (2009), Tüm hastalara BAT uygulanmış ve test sonuçlarında bu hastaların 38'inde suçlu arı venomu tespit edilmiştir. Benzer şekilde bir başka çalışmada, arı venom allerjisi öyküsü olan ancak sIgE ve DPT'si negatif olan 47 hastayı incelenmiştir. Bu hastaların 37'sinde BAT'lar ve intradermal cilt testi uygulanmış ve intradermal testle karşılaştırıldığında BAT için tanısal duyarlılığın önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (%76'ya karşı %46). Bizim çalışmamızda ise BAT uygulaması ile CD63%'si 10 hastanın 9'unda hem bal hemde yaban arısı venomuna karşı çift pozitif. 1 hastada ise sadece bal arısına karşı pozitif. 5 hastada bal arısına karşı daha fazla pozitif çıkarken 4 hasta da yaban arısına karşı daha fazla pozitif görüldüğü saptandı. 1 hastada ise iki arı venomuna karşı yaklaşık eşit pozitiflik yüzdesi bulundu. (BAV CD63% 71.12, YAV CD63% 73.12). Bu sonuçlar ile iki venom arasındaki pozitifliğin CD63% değerlerinin ayrı ayrı belirlenebileceği önemli tanı testi olabileceğini göstermektedir.

Korosec ve ark. (2009) rVes v5 ve rVes v3'ün kullanılmasının, ilgili sIgE tespitine kıyasla BAT'ın hem duyarlılığını hem de özgüllüğünü güçlü bir şekilde arttırdığına dikkat edilmelidir. rVes v5, geleneksel venom ekstraktında yüksek oranda eksprese edilmesine rağmen, bazı hastalar rVes v5'e karşı sIgE pozitif, YAV ekstraktı negatif sonuç vermiştir. Bu paradoksal kanıt, farklı ticari ekstraktların rVes v5'i farklı şekilde eksprese edebileceği hipotezine yol açmaktadır. Farklı yaban arısı türlerinden ekstraktlar karıştırılır ve dolayısıyla üreticiye ve kullanılan spesifik lota bağlı olarak çok farklı BAT aktivasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir. Stoevesandt J ve ark. (2018), CCD'ye karşı IgE antikorları, daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi, öncelikle BAV ve YAV'a karşı çift duyarlılığa sahip bireylerde bulmuşlardır. Bu durumlarda, BAV ve YAV'a karşı en az bir duyarlılığın yanlış pozitif olabileceği varsayılabilir. Bizim çalışmamızda 10 arı venom allerjisi olan hasta kullanıldı. BAT sonuçlarımızda 5 hasta bal arısına, 4 hasta yaban arısına karşı pozitif çıktı. 1 hastada ise iki venom karşı yaklaşık eşit pozitiflik yüzdesi bulundu. (BAV CD63% 71.12,

YAV CD63% 73.12). CRD sonuçlarımızda 3 hasta rApi m1 (%30), 2 hasta rVes v1 (%20) 1 hasta hem rVes v1 hem de rVes v5 (%10), 1 hastada da hepsi pozitif (%10) olduğu bulundu. Bir başka ifade ile 3 hastada sadece BAV, 3 hastada da sadece YAV pozitiflik gösterilerek bunlardaki gerçek pozitiflik ortaya konmuş oldu. Çifte pozitifliğin çapraz reaktiviteden kaynaklandığı gösterilmiş oldu. 1 hastada her iki venoma karşı CRD ile pozitiflik saptanması da gerçek çifte pozitifliği göstermiş oldu. 3 hastada ise CRD testi ile pozitiflik saptanmadı. Fakat bu hastaların BAT'ında CD63% pozitifliklerine göre bal arısına karşı daha fazla pozitiflik saptandı. Bu durum BAT'ın kullanımının CRD ile birlikte tamamlayıcı bir test olarak yararlı olabileceğini göstermektedir.

Hemmer W ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, hastalarının hiçbirinde, Phadia ImmunoCAP ile YAV'a karşı pozitif IgE çapraz reaktivite göstermesine rağmen yaban arısı sokması öyküsü olmadığının ancak BAT, YAV için bazofillerin düşük aktivasyonunu göstermiştir. Bu durum, arı allerjisi tanısında önemli bir konu olan tek pozitifliği yalancı çift pozitiflikten ayırmada faydalı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, venom allerjisinin tanısında negatif DPT ve sIgE sonuçları olduğunda veya çift pozitiflik durumlarında BAT'ın dahil edilmesi ve bu bulgunun daha sonraki çalışmalarda araştırılması gerektiğini belirtmiştir. Çalışmamızda BAT testinde hem BAV hem de YAV allerjenlerine karşı hastalarımızda pozitiflik olduğunu bulduk. Bu pozitifliklerin CD63% oranları arı venom türüne göre de değişiklik gösterdi (5 hasta BAV karşı 4 hasta ise YAV karşı daha fazla pozitiflik gösterdi). 1 hastada ise iki venom karşı yaklaşık eşit pozitiflik yüzdesi bulundu. (BAV CD63% değeri %71.12, YAV CD63% değeri %73.12). CRD testinde ise 3 hasta rApi m1'e pozitif çıkmışken 2 hasta rVes v1 ve 1 hastanın hem rVes v1 hem de rVes v5 e karşı pozitif, 1 hastada da hem rVes v1 ve v5 hem de rApi m1'e pozitif çıktığını bulduk. Bu yüzden BAV ve YAV'a karşı, çoğunlukla yalnızca CCD çapraz reaktivitesine ve nadiren gerçek bir çift duyarlılığa dayanan belirgin çift duyarlılık durumunda, suçlu arının belirlenmesi gerektiğinin önemini anlamış olduk. Bu çalışmaya benzer sonuçlar olarak tek bir arı venom türüne karşı pozitifliği iki venom türüne karşı çift pozitiflikten ayırmada faydalı olabileceğini düşündürdü. Böylelikle hem BAT hem de CRD'nin birbiriyle korelasyon gösterdiğini bulmuş olduk. BAT gibi önemli in vitro testlerin yapılması bu tür allerji türlerinde sIgE seviyelerine bakılması CCD bazlı yanlış

polisensitizasyonla ayırıcı tanıyı kolaylaştıracaktır. Ayrıca CRD test HVA'da IgE duyarlılıklarını tespit etmede daha duyarlı olabilir. Bu da tek bileşenlerle yapılan testlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu varsayım, merkezimizde daha fazla sayıda hastanın test edildiği bir takip çalışmasında doğrulanması yapılabileceği düşünülmektedir.

Balzer L ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, DPT ve venom sIgE'de olduğu gibi, BAT'ın güvenilir sonuçlar sağlama yeteneği, bütün venom ekstraktlarında CCD'nin varlığı nedeniyle engellendiğini düşünmektedirler. BAT'ın geçmişte yalnızca bir sokmaya tepki gösteren çift duyarlı hastaların veya moleküler bazlı allerji teşhisinin belirsiz olduğu hastaların araştırılmasında yardımcı olduğu öne sürülmüştür. Özellikle CCD içermeyen türe özgü allerjenleri (Ves v1 ve Ves v5) kullanan BAT'ın, YAV allerjisinin tespitinde tanısal kesinliği arttırdığı gösterilmiştir. Ancak Ves v2 ve Api m2 veya Ves v3 ve Api m5 gibi çapraz reaktif allerjenlere karşı duyarlılık durumunda, birincil ve çapraz reaktif duyarlılıklar arasında herhangi bir ayrımın mümkün olup olmadığı açık değildir. BAT tam olarak standardize edilmediğinden farklı çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılması zordur. Yanlış pozitif BAT sonuçlarına yüksek venom konsantrasyonları neden olabileceği ve değerlendirilen bazofillerin mutlak sayısının 150'den az olması durumunda veya diğer tanısal testlerde olduğu gibi, sokma olayı ile tanısal inceleme arasında uzun bir süre olması durumunda yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda hem BAT ile ayrımın yukarıdaki nedenler ile çok mümkün olmadığı fakat CRD'nin arı venom allerjen türünün belirlenmesi ve birden fazla arı venomuna allerjisi olan hastalarda çift pozitiflik durumunun belirlenmesine yüksek oranda duyarlı olduğunu belirledik. Fakat CRD negatif saptanan hatalarda tek bir arı türüne karşı BAT pozitifliğinin görülebilmesi bu iki testin çift pozitiflik saptanan hastalarda birbirini tamamlayıcı testler olduğunu düşündürmektedir. BAV ve YAV'a sIgE'den in vitro testlerin çok daha yüksek duyarlılığı, CRD gerçekleştirilerek elde edilebileceğini ve bu yenilikçi yöntemin, günümüzde allerjide giderek daha iyi bir teşhis aracı haline geliyor olması şaşırtıcı değildir. CRD sayesinde tek allerjenik proteine karşı serum IgE belirlenebileceği gibi CRD kullanılarak, tüm ekstraktlara çift pozitif sonuç veren hastalarda birincil duyarlılık ve çapraz reaktivite ayırt edilebileceğini düşünmekteyiz.

Hofmann, S.C ve ark. (2011) ve Müller UR ve ark. (2009) çalışmalarında BAV'a karşı allerjiye yönelik teşhis testlerinin %94-95 duyarlılığına ulaşmak için, mevcut allerjen bileşenlerinin altısının tümüne (Api m1- 5 ve Api m10) bakılıp hastaların %74'ünde birden fazla arı venom allerjeninin olduğu da tespit edilmiştir. YAV allerjisinde kombinasyon sayesinde %98'e varan duyarlılık gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada Renato Erzen ve ark. (2009), çapraz reaktivitesi olan katılımcılardaki anti-CCD IgE antikorlarının seviyelerinin, BAV ve YAV'a karşı gerçek çift duyarlılığı olan hastalarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (yaklaşık %60 oranında çift duyarlılık). Çalışmamızda bu verilerle uyumlu şekilde 3 hastada CRD testi ile negatif çıkan arı venom allerjenlerinin çapraz reaksiyondan sorumlu ortak allerjenlere veya bakılmayan minör allerjenlere bağlı olabileceği düşünüldü. Ayrıca çifte duyarlılığı olan ve farklı venoma karşı çapraz reaksiyonu olan hastalarda CRD testleri faydalı olmaktadır. Bu sonuçlar, CCD'lere karşı IgE antikorlarının in vitro testlerde sıklıkla çift pozitifliğe neden olduğunu doğrulamaktadır. BAV ve YAV'a karşı gerçek çifte duyarlılık ile çapraz reaksiyon arasındaki ayrım hâlâ bir sorun olmaya devam ediyor ve suçlunun belirlenmesini zorlaştırıyor. Şu anda, çift hassasiyet ile çapraz reaktivite arasında ayrım yapmak için inhibisyon testi yerine CRD kullanılmaktadır. CCD içermeyen venom allerjenleri için gelişmiş CRD araçlarının kullanılması, duyarlılık profillerinin ayrıntılı karakterizasyonuna ve klinik semptomlara neden olan venomun tanımlanmasına olanak sağlayacağını düşünmekteyiz. CRD'de venomların tek allerjenlerine karşı serum IgE belirlenir. Böylece, CRD yalnızca bir hastanın tüm venomlara karşı serum IgE'ye sahip olup olmadığı hakkında bilgi vermekle kalmaz, aynı zamanda hasta için tam olarak hangi allerjenlerin ilgili olduğu hakkında da bilgi sağlar.

Mertens ve ark. (2010) Hymenoptera venom aşırı duyarlılığı olan 62 hastada DPT, venom ve CCD'ye özgü IgE ölçümleri ve hem doğal venom hem de CCD'den yoksun venom için BAT'lar gerçekleştirilmiştir. Deri testinde yalnızca bir venoma pozitif olan ancak CCD'ye karşı IgE bulunan hastalarda, BAT her iki doğal venom için de pozitiflik saptanmış ancak hastaların %67'sinde yalnızca CCD'den yoksun deri testi venomunda pozitiflik bulunmuştur. Tersine, deri testinde yalnızca bir venomu pozitif çıkan ancak CCD'ye karşı IgE bulunmayan hastalarda BAT yalnızca hem doğal hem de CCD'den yoksun formlarda deri testi venomuna karşı pozitiflik saptamıştır.

Yazarlar böylece CCD'lerin aslında biyolojik aktiviteye sahip olduğu, ancak deri testlerinin yalnızca bir venom için pozitif çıkması nedeniyle muhtemelen klinik olarak ilgisiz oldukları sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda hem BAT hem de CRD testlerini birlikte uyguladık. Böylelikle iki testteki sonuca göre pozitif olan allerjen tanısında daha kesin bilgiler alabileceğimizi gördük BAT'da bu durum %95'lerde iken CRD'de allerjen türüne göre farklılık gösterdi. Fakat BAT'ın çifte pozitiflikte gerçek pozitifliği belirlemede yeterli olmadığı görüldü. Diğer yandan CRD ile de gerçek pozitiflik tespit edilebildi. BAT'ın duyarlılığını artıran başka rekombinant allerjenlerin üretilmesi ve doğrulanması bu testin daha da geliştirilmesine yol açabilir. Standart testlerin negatif olduğu hastaların araştırılmasına yönelik ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Aranda A ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada katılımcıların %3,5'inin en az bir rekombinant allerjene karşı 0,35 kU/l'nin üzerinde (ve 0,1 kU/l için %4,3) duyarlılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Hofmann SC ve ark. (2011), rApi m1 ve rVes v5'e sIgE'nin saptanması, CCD'lere karşı sIgE varlığında venom ekstraktlarına karşı çift pozitif IgE sonuçları olan hastalarda gerçek çift duyarlılık ile çapraz reaktivite arasında ayırım yapmak için en güvenilir tanısal prosedür olarak tanımlandığını bildirmiştir. Diğer bir çalışmada Korošec P ve ark. (2011), BAV allerjeni olan rApi m1'in, düşük tanısal duyarlılığı (%60) nedeniyle BAV allerjisinin saptanmasında sınırlı bir klinik yararlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. Benzer başka bir çalışmada Müller UR ve ark. (2009), YAV allerjisi olan kişilerde sIgE'den rVes v5'e allerji 100 hastanın %87'sinde gösterilmiştir. Diğer çalışmalarda Köhler ve ark., 2014; Hofmann ve ark. 2011, BAV'a karşı allerjiye yönelik teşhis testlerinin %94-95 duyarlılığına ulaşmak için, mevcut allerjen bileşenlerinin altısının tümü (Api m1- 5 ve Api m10) belirlenmesi gerektiği düşünüldü, hastaların %74'ünde birden fazla arı venom allerjeninin olduğu da tespit edilmiştir. YAV allerjisinde kombinasyon sayesinde %98'e varan duyarlılık gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda, YAV ekstraktının duyarlılığı, rVes v1 ve rVes v5'in birlikte alındığında duyarlılığı bal arısı rApi m1'e göre düşük olduğu görüldü. Bu bulgular, CRD'nin gerçek duyarlılığı tespit etmek ve çapraz reaktivite sorununu azaltmak için geçerli bir araç olduğu hipotezini desteklemektedir. HVA'nın teşhisindeki gelişmelere rağmen, sorularımızı ve şüphelerimizi yanıtlamak için hâlâ

yeni test yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, halihazırda bilinen tanı yöntemlerinin daha da geliştirilmesine ihtiyacımız var. CRD kullanılarak yeni moleküllerin tanıtılmasının yanı sıra mevcut tanısal zorlukların çözülmesine yardımcı olabilecek yeni tanı yöntemlerinin kullanımına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu testlerden birisi de BAT testi olarak düşünülebilir. HVA allerjisinde doğru allerjeni belirleme ve doğru VIT uyulamak açısından BAT ve CRD birlikte kullanılabilir. Ayrıca BAT kullanımı VIT yapılan hastalarda tedavi izleminde de ek fayda sağlayabilir.

Tüm yukarıdaki çıkarımlar sonucunda çifte pozitifliklerde CRD ve BAT birlikte kullanımının çalışmaya aldığımız hastaların özellikleri temelinde önemini spesifik olarak tartışmak istedik.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H1 nolu hastanın; sIgE api (+++) ve sIgE ves (++), Prik api 6*6 ve ves 2*3 bulundu. BAT sonucunun ise hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine karşı pozitiflik durumu görüldü. Ancak bu hastanın BAT testinde CD63% pozitiflik yüzdesi ile bal arısı venomuna karşı daha yüksek pozitifliklik gösterdi. CRD'nin rApi m1 bal arısına karşı pozitif çıktıği görüldü. Bu hastanın sonuçları değerlendirildiğinde; BAT her iki arı venomuna karşı pozitiflik saptandığı için hangi arı venomuna karşı gerçek pozitiflik olduğu kesin olarak ayırt edilemiyor. Diğer yandan bal arı venomu ile BAT'da daha yüksek pozitiflik saptanması gerçek allerjenin bal arısı venomu olabileceğini destekliyor gibi gözükmektedir. Fakat CRD testi ile bal arısı majör allerjenine pozitiflik saptanırken, vespula majör allerjenlerine karşı pozitiflik saptanmıyor. Bu durumda, çifte pozitiflikte gerçek ve çapraz reaksiyona bağlı pozitiflikleri ayırmada CRD testinin çok önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. CRD testinin yapılamadığı durumlarda da sIgE'nin, DPT'de çapı fazla olanın ve BAT ile yüksek oranda pozitiflik saptanan arı venom türünün hepsinin birlikte değerlendirilerek gerçek pozitif olarak değerlendirmeye almak mantıklı bir yaklaşım gibi gözükmektedir. Yaban arısı allerjenine CRD testinde pozitiflik saptanmaması nedeniyle çifte pozitifliğin yaban arısı allerjeninin majör değil çapraz reaksiyon veren ortak antijenik determinatlarından dolayı geliştiğini düşündük.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H2 nolu hastanın; sIgE api (++) ve sIgE ves (++) , Prik api 5*5 ve ves 4*4 bulundu. Hastanın öyküsü bal arısı sokması ile uyumluydu. BAT sonucunda hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine karşı pozitiflik durumu görüldü. Ancak hastanın BAT testinde CD63% pozitiflik yüzdesi ile bal arısı venomuna karşı daha yüksek pozitiflik gösterildi CRD testinde hem bal hem de yaban arısı majör komponentlerine karşı pozitiflik saptanmadı. Bu sonuca göre hastanın bal arısının başka bir minör komponente karşı allerjisi olabileceği düşünöldü

Çalışmaya dahil ettiğimiz H3 nolu hastanın; sIgE api (++) ve sIgE ves (+++), Prik api 6*5 ve ves 3*3 bulundu. BAT sonucunda hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine karşı pozitiflik saptandı. Ancak bu hastanın BAT testinde CD63% pozitiflik yüzdesi bal arısı venomuna karşı daha yüksek saptandı. (BAV CD63% değeri %84.46 iken YAV CD63% değeri %59.04 olarak bulundu). CRD testinde hem bal hem de yaban arısı majör komponentlerine karşı pozitiflik saptanmadı. Bu durum hastanın minör komponentlere allerjisi olabileceği düşünöldü.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H4 nolu hastanın; sIgE api (+++) ve sIgE ves (0), Prik api 5*3 ve ves 4*2 bulundu. BAT ile hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine karşı pozitiflik saptandı. Ancak bu hastanın BAT testinde CD63% pozitiflik yüzdesi bal arısı venomuna karşı daha yüksek pozitifliklik gösterdi. CRD'de rApi m1 ile pozitiflik saptanırken, yaban arısı majör komponentlerine pozitiflik saptanmadı. Bu durum her iki arı venomu için ortak detarmianatlar içeren minör allerjenlere de duyarlılığın olduğunu göstermiş oldu.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H5 nolu hastanın; sIgE api (++) ve sIgE ves (-), Prik api 8*8 ve ves 5*5 bulundu. BAT sonucunun ise CD63% pozitiflik yüzdesi bal arısı venomuna karşı daha yüksek pozitifliklik saptandı. Yaban arısı allerjenlerine karşı ise negatif olduğu göröldü. Hastanın CRD testleri ise negatif bulundu. Bu sonuçlar, arı venom allerjik reaksiyonunun bal arısının minör allerjenlerine karşı gelişmiş olabileceğini ve çifte pozitifliğin ortak antijenik determinata sahip moleküllere bağlı olabileceğini düşöndürmektedir. Burada CRD testi negatifti. Bu durumda göstermektedir ki, CRD ve BAT pozitifliği birbirinin tamamlayıcısı olarak birlikte kullanılabilirler.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H6 nolu hastanın; sIgE api (+) ve sIgE ves (+5), Prik api 3*3 ve ves 4*4 bulundu. BAT sonucunda hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine karşı pozitiflik saptandı. BAT testinde CD63% pozitiflik yüzdesi yaban arısı venomuna karşı daha yüksek pozitiflik saptandı. CRD testinde rVes v1 pozitif saptandı. İlk hastada da belirtildiği gibi CRD testinin yapılamadığı durumlarda; sIgE'nin, DPT'de çapı fazla olanın ve BAT ile yüksek oranda pozitiflik saptanan arı venom türünün hepsinin birlikte değerlendirilmesi gerçek pozitifliği saptamada faydalı olabilir.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H7 nolu hastanın; sIgE api (+++) ve sIgE ves (+++), Prik api 4*4 ve ves 5*4 bulundu. BAT sonucunun ise CD63% pozitiflik yüzdesinin hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine yaklaşık eşit pozitiflik yüzdesi bulundu. (BAV CD63% değeri %71.12, YAV CD63% değeri %73.12). CRD'de ise her iki allerjen türüne karşıda pozitiflik saptandı. Bu durumda mevcut çifte pozitifliğin her iki arı venomunun major allerjenlerine karşı gerçek çifte pozitiflik olduğu gösterilmiş oldu.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H8 nolu hastanın; sIgE api (+++) ve sIgE ves (-), Prik api 3*3 ve ves 4*4 bulundu. BAT sonucunda hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine karşı pozitiflik saptandı. BAT testinde CD63% pozitiflik yüzdesi yaban arısı venomuna karşı daha yüksek saptandı. CRD testinde rVes v1'e karşı pozitiflik bulundu. Bu sonuçlar, gerçek pozitifliğin yaban arısı venomuna karşı olduğunu göstermiş oldu. Bu ayırimda CRD'lerin önemi bir kez daha gösterildi.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H9 nolu hastanın; sIgE api ve sIgE ves testleri mevcut değildi, Prik api 10*5 ve ves 4*3 bulundu. BAT sonucunda hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine karşı pozitiflik saptandı. BAT testinde CD63% pozitiflik yüzdesi yaban arısı venomuna karşı daha yüksek saptandı. CRD testinde yaban arısı rVes v1 ve rVes v5'e karşı pozitiflik saptandı. Öyküsü de yaban arısı sokması ile uyumlu olduğu için öykü ve CRD test sonucu ile gerçek pozitiflik saptanmış oldu.

Çalışmaya dahil ettiğimiz H10 nolu hastanın; sIgE api (+4) saptandı fakat sIgE ves çalışılmamıştı. Prik api 3*5 ve ves 10*7 bulundu. BAT sonucunda hem bal hem de yaban arısı allerjenlerine karşı pozitiflik durumu görüldü. BAT testinde CD63% pozitiflik yüzdesi yaban arısı venomuna karşı daha yüksek pozitiflik saptandı.

CRD’de bal arısına rApi ml’e karşı pozitiflik bulundu. Bu sonuçlar, hastanın öyküsündeki arı sokmasının bal arısı ile uyumlu olması ve CRD’de bal arısı majör allerjeninin pozitif saptanıp yaban arısı majör allerjenlerinin negatif saptanması gerçek pozitifliğin bal arısına karşı olduğu gösterilmiş oldu.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz bu tür çift pozitiflik saptanan arı venom allerjen duyarlılığı olan hasta grubunda neden olan allerjen türünü doğrulamak için hem akım sitometrik BAT hem de CRD testlerinin birlikte kullanımının, erken tanıyı ve çift pozitiflik durumunun netleştirilmesini kolaylaştırmada birbirlerini tamamlayacak etkili in-vitro testler olduğu gösterilmiş oldu. Çift pozitiflik saptanan hastalarda CRD ile allerjik reaksiyondan sorumlu gerçek arı türü daha net olarak saptanabilmektedir. Fakat diğer yandan da CRD negatif saptanan hastalarda BAT pozitiflikleri saptanabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda çift pozitiflik saptanan hastalarda VIT kararı verilmeden önce CRD ve/veya BAT testlerinin uygulanması allerjiden sorumlu gerçek arı türünü belirleme ve etkin VIT uygulama açısından oldukça önemli olduğu gösterilmiştir. Testlerinin rutin analizi bu hastalarının erken saptanmasına, erken tanı ve tedavi olanaklarına erişimine katkıda bulunabilir. Böylelikle, daha fazla vaka ve geniş hasta spektrumu ile bu tip hastalıkların erken teşhisini yaygınlaştırabilir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar dikkate alındığında bu iki testin birlikte kullanılmasının arı venom allerjisinde kesin etkenin belirlenmesinde oldukça faydalı olduğu görülmektedir.

6. SONUÇLAR

1. Arı venom allerjisi öyküsü olup DPT ve/veya sIgE ölçümlerinde çifte pozitiflik saptanan hastalarda arı venomları ile in-vitro ortamda yapılan BAT ile de arı venomlarına karşı pozitiflikler saptandı. Fakat çifte pozitifliği olan bu hastalarda arı venom türlerini ayırt etmede başarılı bulunmadı. Diğer yandan pozitiflik yüzdesi yüksek olanların gerçek arı venom türünü belirlemede yol gösterici olabileceğini gösteren sonuçlar elde edildi.
2. Çifte pozitifliği olup majör venom allerjenlerine yönelik yapılan CRD testinde negatiflik saptanan hastalarda BAT testinin sorumlu venom allerjenin tespit etmede faydalı olabileceği gösterildi.
3. CRD testinin çifte pozitifliği olan hastalarda gerçek venom allerjen duyarlılığını tespit etmede BAT'dan daha etkili olduğu gösterildi. Bu nedenle çifte pozitiflikte bu pozitifliğin gerçekten her iki arı türünün majör allerjenlerine karşı duyarlılığının olduğunu yoksa ortak antijenik determinantlara karşı duyarlılığa bağlı bir çapraz reaktivitemi olduğunu göstermede oldukça faydalı ve ilk tercih edilmesi gereken test olduğu ortaya konulmuş oldu.
4. Ayrıca BAT ve CRD birlikte kullanımının çifte pozitifliği olan hastalarda reaksiyondan sorumlu gerçek arı venomunu tespit etmede birbirlerini tamamlayıcı etkileri olduğu gösterildi.
5. CRD yapılırken tek bir epitopa (determinanta) yönelik rekombinant üretilen proteinler kullanılırken, BAT yaparken arı VIT ekstraktları kullanıldı. Bu nedenle CRD gerçek suçlu arı venom türünü belirlemede daha başarılı olmuştur. BAT'da ise arı VIT'de kullanılan ekstraktların içerisinde ortak antijenik determinatlar ve minör allerjenler de olduğu için çifte pozitifliği ayırmada yetersiz kaldığı görülmüştür. Eğer BAT'da da CRD kullanılan tek bir majör, minör ya da CCD gibi ortak antijenik determinatlara yönelik rekombinant allerjenler kullanılırsa BAT'ın da tıpkı CRD'de olduğu gibi

allerjik reaksiyondan sorumlu gerçek arı venomunu tespit etmede oldukça başarılı bir yöntem olabileceği düşünölebilir.



7. KAYNAKLAR

- Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*, 2001; 56(6):478-490.
- Aalberse RC, Koshte V, Clemens JGJ. Immunoglobulin E Antibodies That Crossreact with Vegetable Foods, Pollen, and Hymenoptera Venom. *J. Allergy Clin. Immunol*, 1981; 68, 356-364.
- Abd El-Wahed AA, Khalifa SAM, Sheikh BY, Farag MA, Saeed A, Larik FA, Koca-Caliskan U, AlAjmi MF, Hassan M, Wahabi HA, Hegazy MF, Algethami AF, Buttner S, El-Seedi HR. Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. *Stud Nat Prod Chem*, 2019; 60, 459-484.
- Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*, 2015; 8(1):17-29.
- Altmann F. The Role of Protein Glycosylation in Allergy *Int Arch Allergy Immunol*, 2007; 142, 99-115.
- Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling HJ, Valovirta E. Standards for Practical Allergen- Specific Immunotherapy. *Allergy*, 2006; 61: 1-3.
- Alvarez-Twose I, Gonzalez-de-Olano D, Sanchez-Munoz L, Matito A, Jara-Acevedo M, Teodosio C. Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012; 157(3):275-280.
- Antolín DB, Ruiz-León E, Boni T, Alfaya-Arias M, Alvarez-Mon J, Barbarroka-Escuderi J, González-de-Olano D, Moreno-Aguilar C, Rodríguez-Rodríguez M, Sánchez-González MJ, Sánchez-Morillas L, Vega-Castro A. Component resolved diagnosis in hymenoptera allergy, *Allergol. Immunophatol*, 2017; 46,253-262.

- Antonicelli L, Bilo MB, Bonifazi F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2002; 2(4):341-6.
- Api m 8 Allergen Details. Erişim: [http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=73]. Erişim Tarihi: 23 Eylöl 2022.
- Aranda A, Mayorga C, Ariza A, et al. In vitro evaluation of IgE-mediated hypersensitivity reactions to quinolones. *Allergy*, 2011; 66(2):247-254.
- Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, Tenen DG, Austen KF, Akashi K. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102:18105-18110.
- Arock M, Schneider E, Boissan M, Tricottet V, Dy M. Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *Journal of leukocyte biology*, 2002; 71:557- 564.
- Baker TW, Forester JP, Johnson ML, Sikora JM, Stolfi A, Stahl MC. Stinging insect identification: Are the allergy specialists any better than their patients? *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2016a; 116(5):431-444.
- Baker TW, Forester JP, Johnson ML, Stolfi A, Stahl MC. The HIT study: Hymenoptera Identification Test-how accurate are people at identifying stinging insects? *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2014b; 113(3):267-70.
- Balzer L, Pennino D, Blank S, Seismann H, Darsow U, Schnedler M, McIntyre M, Ollert MW, Durham SR, Spillner E, Ring J, Cifuenteset L. Basophil activation test using recombinant allergens: Highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. *PLOS ONE*, 2014; 9:e108619.
- Bazon ML, Perez-Riverol A, Dos Santos-Pinto JRA, Fernandes LGR, Lasa AM, Justo-Jacomini DL, Palma MS, Zolner R de L Broghetto-Braga MR. Heterologous Expression, Purification and Immunoreactivity of the Antigen 5 from *Polybia paulista* Wasp Venom. *Toxins Basel*, 2017; 9(9):41-49.
- Beckman Coulter. Erişim: [https://www.beckman.com.tr/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cdHLA-DR]. Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024.

- Beckman C. Erişim: [<https://www.beckman.com.tr/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd203c>]. Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024.
- Beckman C. Erişim: [<https://www.biolegend.com/fr-fr/products/purified-anti-human-il-3-antibody-924>]. Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024.
- Beckman C. Erişim: [<https://www.biolegend.com/fr-fr/products/purified-anti-human-il-3-antibody-924>]. Erişim Tarihi: 26 Nisan 2024.
- Beckmancoulter C. Erişim: [<https://www.beckman.com.tr/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd123>]. Erişim Tarihi: 16 Kasım 2023.
- Beckmancoulter C. Erişim: [<https://www.beckman.com.tr/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd63>]. Erişim Tarihi: 16 Kasım 2023.
- Beyer K, Ellman-Grunther L, Jarvinen KM, Wood RA, Hourihane J, Sampson HA. Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts. *J Allergy Clin Immunol*, 2003;112(1):202-217.
- Bilo MB, Bonifazi F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008a; 8(4):330-337.
- Bilo MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. *Clin Exp Allergy*, 2009b; 39(10):1467-1476.
- Bilo MB, Pravettoni V, Bignardi D, Bonadonna P, Mauro M, Novembre E, Quercia O, Cilia M, Cortellini G, Costantino MT, Cremonte L, Rodi Lizzini F, Macchia L, Marengo F, Murzilli F, Patella V, Reccardini F, Ricciardi L, Ridolo E, Romano A, Savi E, Schiavino D, Severino M, Pastorello EA. Hymenoptera Venom Allergy: Management of Children and Adults in Clinical Practice. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2019; 29: 180-205.
- Blank S, Bantleon FI, McIntyre M, Ollert M, Spillner E. The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity. *Clin Exp Allergy*, 2012; 42(6):976-985.

- Blank S, Bilo MB, Ollert M. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: Important steps towards precision medicine. *Clin Exp Allergy*, 2018a: 48(4):354-364.
- Blank S, Etzold S, Darsow U, Schiener M, Eberlein B, Russkamp D, Wolf S, Graessel A, Biedermann T, Ollert M, Schimdt-Weber CB. Component-resolved evaluation of the content of major allergens in therapeutic extracts for specific immunotherapy of honeybee venom allergy. *Hum Vaccin Immunother*, 2017b: 13(10):2482-2489.
- Blank S, Haemmerle S, Jaeger T, Russkamp D, Ring J, Schmidt-Weber CB, Ollert M. Prevalence of Hymenoptera venom allergy and sensitization in the population-representative German KORA cohort. *Allergo J Int*, 2019c: <https://doi.org/10.1007/s40629-018-0089-4>.
- Blank S, Seismann H, Bockisch B, Braren I, Cifuentes L, McIntyre M. Identification, recombinant expression, and characterization of the 100kDa high molecular weight hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3. *J Immunol*, 2010d; (3)184:5403-5413.
- Blank S, Bazon ML, Grosch J, Schmidt-Weber CB, Brochetto-Braga MR, Bilo MB, Jakob T. Antigen 5 Allergens of Hymenoptera Venoms and Their Role in Diagnosis and Therapy of Venom Allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep*, 2020e: 20, 58-66
- Blank S, Michel Y, Seismann H, Plum M, Greunke K, Grunwald T, Bredehorst R, Ollert M, Braren I, Spillner E. Evaluation of Different Glycoforms of Honeybee Venom Major Allergen Phospholipase A2 (Api m 1) Produced in Insect Cells. *Protein Pept Lett*, 2011f: 18, 415-422.
- Blank S, Seismann H, McIntyre M, Ollert M, Wolf S, Bantleon FI, Spillner E. Vitellogenins Are New High Molecular Weight Components and Allergens (Api m 12 and Ves v 6) of Apis Mellifera and Vespula Vulgaris Venom. *PLoS ONE*, 2013: 8, e62009.
- Bonifazi F, Jutel M, Bilo BM, Birnbaum J, Muller U. Hypersensitivity EIGoIV. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy*, 2005: 60(12):1459-1470.

- Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton MJ, Arshad SH, Bahna SL, Beck LA, Byrd-Bredbenner C, Camargo-Jr CA, Eichenfiweld L, Furuta GT, Hanifin JM, Jones C, Kraft M, Levy BD, Lieberman P, Luccioli S, McCall KM, Schneider LC, Simon RA, Simons FER, Teach SJ, Yawn BP, Schwaninger JM. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *J. Allergy Clin Immunol*, 2010;126: 1105-1118.
- Brehler R, Grundmann S, Stöcker B. Cross-Reacting Carbohydrate Determinants and Hymenoptera Venom Allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2013; 13: 360-364.
- Brown LR, Lauterwein J, Wüthrich K. High-Resolution 1H-NMR Studies of Self-Aggregation of Melittin in Aqueous Solution. *Biochim Biophys Acta BBA Protein Struct*, 1980; 622:231-244.
- Budge GE, Hodgetts J, Jones EP, Ostoja-Starzewski JC, Hall J, Tomkies V, Semmence N, Brown M, Wakefield M, Stainton K. The invasion, provenance and diversity of *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae) in Great Britain. *PloS One*, 2017; 12(9):e0185172.
- Burzyn'ska M, Piasecka-kwiatkowska D. A Review of Honeybee Venom Allergens and Allergenicity. *Int J Mol Sci*, 2021; 22, 8371.
- Cengizlier R. Bileşene bağlı tanı component resolved diagnosis=CRD., *Klinik Tıp Pediatri Dergisi*, 2017; 9, 12-25.
- Cezmi AA, Mubeccel A. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 127: 18-27.
- Chen J, Guan SM, Sun W, Fu H. Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom. *Neurosci Bull*, 2016; 32: 265-272.
- Cifuentes L, Vosseler S, Blank S, Seismann H, Pennino D, Darsow U, Bredehorst R, Ring J, Mempel M, Spillner E, Ollert MW. Identification of hymenoptera venom-allergic patients with negative specific IgE to venom extract by using recombinant allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2014; 133: 909-920.
- Dfu Phadia. Erişim: [[http:// http://www.dfu.phadia.com/](http://www.dfu.phadia.com/)]. Erişim Tarihi: 28 Ekim 2023.

- Eberlein B, Leon Suarez I, Darsow U, Rueff F, Behrendt H, Ring J. A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clin Exp Allergy*, 2010; 40(3):411-418.
- Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008a;74(4):201-210.
- Ebo DG, Dombrecht EJ, Bridts CH, Aerts NE, de Clerck LS, Stevens WJ. Combined analysis of intracellular signalling and immunophenotype of human peripheral blood basophils by flow cytometry: a proof of concept. *Clin Exp Allergy*, 2007b; 37(11):1668-1675.
- Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. *Clin Exp Allergy*, 2004c; 34:137-144.
- Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Hymenoptera venom allergy: Taking the sting out of difficult cases. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2007d; 17(6):357-360.
- Eggel A, Baravalle G, Hobi G, Kim B, Buschor P, Forrer P, Shin JS, Vogel M, Stadler BM, Dahinden CA, Jardetzky TS. Accelerated dissociation of IgE-FcεRI complexes by disruptive inhibitors actively desensitizes allergic effector cells. *J Allergy Clin Immunol*, 2014; 133(6):1709-19 e8.
- Erban T, Shcherbachenko E, Talacko P, Harant K. The Unique Protein Composition of Honey Revealed by Comprehensive Proteomic Analysis: Allergens, Venom-like Proteins, Antibacterial Properties, Royal Jelly Proteins, Serine Proteases, and Their Inhibitors. *J Nat Prod*, 2019; 82:1217-1226.
- Erzen R, Korosec P, Silar M, Music E, Kosnik M. Carbohydrate Epitopes as a Cause of Cross-Reactivity in Patients Allergic to Hymenoptera Venom. *Wien Klin Wochenschr*, 2009; 121, 349-352.
- Fehr D, Micaletto S, Moehr T, Schmid-Grendelmeier P. Risk Factors for Severe Systemic Sting Reactions in Wasp (*Vespula* Spp.) and Honeybee (*Apis Mellifera*) Venom Allergic Patients. *Clin Transl Allergy*, 2019; 9: 54-59.

- Ferreira RS Jr, Sciani JM, Marques-Porto R, Lourenço A Jr, de Orsi R, Barraviera B, Pimenta DC. Africanized Honey Bee (*Apis Mellifera*) Venom Profiling: Seasonal Variation of Melittin and Phospholipase A2 Levels. *Toxicon*, 2010; 56:355-362.
- Foetisch K, Westphal S, Lauer I, Retzek M, Altmann F, Kolarich D, Scheurer S, Vieths S. Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111:889-896.
- Frick M, Fischer J, Helbling A, Ruëff F, Wieczorek D, Ollert M, Pfeützner W, Müller S, Huss-Marp J, Dorn B, Biedermann T, Lidholm J, Ruecker G, Bantleon F, Miehe M, Spillner E, Jakob T. 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.
- Frick M, Muller S, Bantleon F, Huss-Marp J, Lidholm J, Spillner E, Jakob T. rApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket venom. *Allergy*, 2015; 70(12):1665-1658.
- Glaumann S, Nopp A, Johansson SG, Rudengren M, Borres MP, Nilsson C. Basophil allergen threshold sensitivity, CD-sens, IgE- sensitization and DBPCFC in peanut-sensitized children. *Allergy*, 2012; 67(2):242-247.
- Goldberg A, Confino-Cohen R. Bee venom immunotherapy- how early is it effective? *Allergy*, 2010a; 65(3):391-5.; Goldberg A, Confino-Cohen R. Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 1997b; 100(2):182-184.
- Golden DBK, Demain J, Freeman T, Graft D, Tankersley M, Tracy J, Blessing-Moore J, Bernstein D, Dinakar C, Greenhawt M, Khan D, Lang D, Nicklas R, Oppenheimer J, Portnoy J, Randolph C, Schuller D, Wallace D. Stinging insect hypersensitivity: A practice parameter update 2016. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2017; 118(1):28-54.
- Golden DBK. Anaphylaxis to Insect Stings. *Immunol. Allergy Clin N Am*, 2015; 35, 287-302.

- Gonzalez-de-Olano D, Alvarez-Twose I, Vega A, Orfao A, Escribano L. Venom immunotherapy in patients with mastocytosis and hymenoptera venom anaphylaxis. *Immunotherapy*, 2011; 3(5):637-651. doi: 10.2217/ imt.11.44.
- Griseri T, McKenzie BS, Schiering C, Powrie F. Dysregulated hematopoietic stem and progenitor cell activity promotes interleukin-23-driven chronic intestinal inflammation. *Immunity*, 2012; 37:1116-1129.
- Grunwald T, Bockisch B, Spillner E, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW. Molecular Cloning and Expression in Insect Cells of Honeybee Venom Allergen Acid Phosphatase (Api m 3). *J Allergy Clin Immunol*, 2006; 117, 848-854.
- Hamilton RG, Kleine-Tebbe J. Molecular Allergy Diagnostics: Analytical Features That Support Clinical Decisions. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015;15:556.
- Hayward A, Takahashi T, Bendena WG, Tobe SS, Hui JHL. Comparative Genomic and Phylogenetic Analysis of Vitellogenin and Other Large Lipid Transfer Proteins in Metazoans. *FEBS Lett*, 2010; 584, 1273-1278.
- Hemmer W, Altmann F, Holzweber F, Gruber C, Wantke F, Wohrl S. ImmunoCAP cellulose displays cross-reactive carbohydrate determinant (CCD) epitopes and can cause false-positive test results in patients with high anti-CCD IgE antibody levels, *J Allergy Clin Immunol*, 2017: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.028>.
- 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(6):1045-1052.
- Hemmer W, Hawranek T, Lang R, Ollert M, Spillner E, et al. Detection of IgE to recombinant Api m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 128:247-248.
- Hoffman DR, Jacobson RS. Allergens in hymenoptera venom XII: how much protein is in a sting. *Ann Allergy*, 1984; 52(4):276-278.
- Hoffman DR. Hymenoptera Venom Allergens. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2006; 30, 109-128.

- Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, Rouzaire P, Ebo DG, Sabato V, Sanz ML, Pecaric-Petkovic T, Patil SU, Hausmann OV, Shreffler WG, Korosec P, Knol EF. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, 2015;70(11): 1393-1405.
- Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S, Blank S, Huss-Marp J, Spillner E, Blank S, Bokanovic D, Aberer V. Detection of IgE to recombinant Api m 1 and r Ves v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy. Reply. *J Allergy Clin Immunol*, 2011;128:248-260.
- Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S, Huss-Marp J, Jakob T. Added Value of IgE Detection to RApi m 1 and RVes v 5 in Patients with Hymenoptera Venom Allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2011: 127, 265-267.
- Holzweber F, Svehla E, Fellner W, Dalik T, Stubler S, Hemmer W, Altmann F. Inhibition of IgE binding to cross-reactive carbohydrate determinants enhances diagnostic selectivity. *Allergy*, 2013;68:1269-1277.
- Hossen MS, Shapla UM, Gan SH, Khalil MI. Impact of Bee Venom Enzymes on Diseases and Immune Responses. *Molecules*, 2016: 22: 25-37.
- Huss-Marp J, Gutermuth J, Schäffner I, Darsow U, Pfab F, Brockow K, Ring J, Behrendt H, Jakob T, Ahlgrim C. Vergleich molekularer und extrakt-basierter IgE-Diagnostik mittels Multiplex und Single-plex-Test. *Allergo J Int*, 2015: 24:46-53.
- Immunocap. Erişim: [[www.immunocap-spesifik IgE-pdf](http://www.immunocap-spesifik-IgE-pdf)]. Erişim Tarihi:18 Nisan 2024.
- Incorvaia C, Mauro M, Pravettoni V, Pucci S. Hypersensitivity to Hymenoptera Venom: Advances in Diagnosis and Implications for Treatment. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov*, 2011: 5, 128-135.
- Incorvaia C, Mauro M, Ridolo E, Makri E, Montagni M, Ciprandi G. A Pitfall to Avoid When Using an Allergen Microarray: The Incidental Detection of IgE to Unexpected Allergens. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2014: 879-882.
- Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, 2007: 26:726-740.

- Jakob T, Kohler J, Blank S, Magnusson U, Huss-Marp J, Spillner E, Lidholm J. Comparable IgE reactivity to natural and recombinant Api m 1 in cross-reactive carbohydrate determinant-negative patients with bee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2012; 130(1):276-278.
- Jakob T, Müller U, Helbling A, Spillner E. Component Resolved Diagnostics for Hymenoptera Venom Allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2017; 17: 363-372.
- Jakob T, Rafei-Shamsabadi D, Spillner E, Muller S. Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. *Allergo J Int*, 2017; 26 (3):93-105.
- Jamhari NN, Wang MA. Protein microarray based IgE immunoassay for allergy diagnosis. *Methods Mol Biol*, 2017; 1592:129-137.
- James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, Jakobson MR, Kimber L, Till SJ, Durham SR. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 127(2):509-16 e1-5.
- Jennings A, Duggan E, Perry IJ, Hourihane JO. Epidemiology of allergic reactions to hymenoptera stings in Irish school children. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010; 21:1166-1170.
- Jerry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol*, 2004;114(5):1164-1178.
- Jin C, Focke M, Léonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2010;125(1):184-190.
- Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol*, 2008;121:185-190.
- Kepley CL, Cambier JC, Morel PA, Lujan D, Ortega E, Wilson BS, Oliver JM. Negative regulation of FcεRI signaling by FcγRII costimulation in human blood basophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 106(2):337-348.

- Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, Toubi E. Human CD19(+) CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev*, 2012; 11(9):670-677.
- Khalil A, Elesawy BH, Ali TM, Ahmed OM. Bee Venom: From Venom to Drug. *Molecules*, 2021; 26: 4941-4957.
- King TP, Alagon AC, Kuan J, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Immunochemical studies of yellow jacket venom proteins. *Mol Immunol*, 1983; 20(3):297-308.
- Kochuyt AM, van Hoeyveld EM, Stevens EAM. Prevalence and Clinical Relevance of Specific Immunoglobulin E to Pollen Caused by Sting-Induced Specific Immunoglobulin E to Cross-Reacting Carbohydrate Determinants in Hymenoptera Venoms. *Clin Exp Allergy*, 2005; 35: 441-447.
- Köhler J, Blank S, Müller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2014;133(5):1383-1389.
- Kołaczek A, Skorupa D, Antczak-Marczak M, Kuna P, Kupczyk M. Safety and Efficacy of Venom Immunotherapy: A Real Life Study *Adv Dermatol Allergol*, 2017; 2: 159-167.
- Korosec P, Erzen R, Silar M, Bajrovic N, Kopac P, Kosnik M. Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. *Clin Exp Allergy*, 2009; 39(11):1730-1737.
- Korosec P, Silar M, Erzen R, Celesnik N, Bajrovic N, Zidarn M, Kosnik M. Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of Hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*, 2013;161(4):363-368.
- Korosec P, Silar M, Music E, Kosnik, M. Carbohydrate Epitopes as a Cause of Cross-Reactivity in Patients Allergic to Hymenoptera Venom. *Wien Klin Wochenschr*, 2009; 121: 349-352.
- Korosec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Erzen R, Zidarn M, Kosmik M. Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybeevenom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2011;128(3):671-683.

- Korosec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Silar M, Zidarn M, Kosnik M. High Sensitivity of CAP-FEIA R_{Ves} v5 and R_{Ves} v 1 for Diagnosis of Vespula Venom Allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2012;129: 1406-1408.
- Kosnik M, Korosec P, Silar M, Music E, Erzen R. Wasp venom is appropriate for immunotherapy of patients with allergic reaction to the European hornet sting. *Croat Med J*, 2002; 43(1):25-37.
- Krishna MT, Ewan PW, Diwakar L, Durham SR, Frew AJ, Leech SC, Nasser SM. Diagnosis and management of hymenoptera venom allergy: British society for allergy and clinical immunology (BSACI) guidelines. *Clin Exp Allergy*, 2011; 41:1201-1220.
- Lee KM, Stott RT, Zhao G, SooHoo J, Xiong W, Lian MM, Fitzgerald L, Shi S, Akrawi E, Lei J, Deng S, Yeh H, Merkmann JM, Kim JI. TGF-beta-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol*, 2014; 44(6):1728-1736.
- Leimgruber A, Lantin JP, 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. Correlation with history and skin tests. *Allergy*, 1993;48:415-420.
- Lieberman JA, Cox AL, Vitale M, Sampson HA. Outcomes of office-based, open food challenges in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 128(5):1120-1129.
- Ludman SW, Boyle RJ. Stinging insect allergy: current perspectives on venom immunotherapy. *J Asthma Allergy*, 2015; 8:75-86.
- MacGlashan D Jr, Hamilton RG. Parameters determining the efficacy of CD32 to inhibit activation of FcεRI in human basophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2016;137(4):1256-8 e1-11.
- MacGlashan DW Jr. Basophil activation testing. *J Allergy Clin Immunol*, 2013;132(4):777-787.
- Mari A, Iacovacci P, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Di Felice G, Pini C. Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 103:1005-1011.

- Mari A. IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002;129:286-295
- Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Müller U, Schirmer T. Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom. *Structure*, 2000; 8, 1025-1035.
- Martini M, Corsi A, Agolini S, Marchionni A, Antonicelli L, Bilo MB. High long-term efficacy of venom immunotherapy after discontinuation. *Allergy*, 2020; 74:1793-1806.
- Martini M, Diaz-Perales A, Cannabal J, Quirce S. Anaphylaxis to hidden potato allergens in a peach and egg allergic boy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2017; 49: 45-48.
- Mastalerz L, Setkowicz M, Sanak M, Szczeklik A. Hypersensitivity to aspirin: Common eicosanoid alterations in urticaria and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113(4):771-775.
- Matysiak J, Klupczynska A, Kokot ZJ. Importance of Hyaluronidases in Contemporary Medicine *Now Lek*, 2013; 82, 156-162.
- Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, Maggi E, Mussap M, Passalacqua G, Rossi ER, Vacca A, Canonica GW. Italian Board for ISAC (IBI). The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem*, 2011; 44(12):1005-11.
- Mertens M, Amler S, Moerschbacher BM, Brehler R. Cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the results of the basophil activation test in hymenoptera-venom allergy. *Clin Exp Allergy*, 2010; 40(9):1333-1345.
- Mertens M, Amler S, Moerschbacher BM, Brehler R. Cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the results of the basophil activation test in hymenoptera-venom allergy. *Clin Exp Allergy*, 2010; 40(9):1333-1345.
- Mertens M, Brehler R. Suitability of different glycoproteins and test systems for detecting cross-reactive carbohydrate determinant-specific IgE in hymenoptera venom-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011;156(1):43-50.

- Metcalfe DD, Pawankar R, Ackerman SJ, Akin C, Clayton F, Falcone FH, Gleich GJ, İrani AM, Jhansson MH, Kion AD, Leiferman KM, Levi-Schaffer F, Nilsson G, Okayama N, Purissin C, Schroeder JT, Schwartz LB, Simon HU, Walls AF, Triggiani M. Biomarkers of the involvement of mast cells, basophils and eosinophils in asthma and allergic diseases. *World Allergy Org J*, 2016; 9: 7-15.
- Michel Y, McIntyre M, Ginglinger H, Ollert M, Cifuentes L, Blank S, Spillner E. The Putative Serine Protease Inhibitor Api m 6 from *Apis Mellifera* Venom: Recombinant and Structural Evaluation. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 2012; 22: 476-484.
- Mittermann I, Zidarn M, Silar M, Markovic-Housley Z, Aberer W, Korosec P, Kosnik M, Valenta R. Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 125 (6):1300-1307.
- Mobs C, Muller J, Rudzio A, Pickert J, Blank S, Jakob T, Spillner E, Pfützner W. Decline of Ves v 5-specific blocking capacity in wasp venom-allergic patients after stopping allergen immunotherapy. *Allergy*, 2015; 70(6):715-729.
- Monsalve RI, Vega A, Marques L, Miranda A, Fernández J, Soriano V, Cruz S, Dominguez-Noche C, Sanchez-Morillas L, Armisen-Gil M, Guspi R, Barber D. Component-resolved diagnosis of vespine venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization. *Allergy*, 2012;67:528-536.
- Mukai K, Gaudenzio N, Gupta S, Vivanco N, Bendall SC, Maecker HT, Chinthrajah RS, Tsai M, Nadeau KC, Galli SJ. Assessing basophil activation by using flow cytometry and mass cytometry in blood stored 24 hours before analysis. *J Allergy Clin Immunol*, 2017;139(3):889-899.
- Mukai K, Matsuoka K, Taya C, Suzuki H, Yokozeki H, Nishioka K, Hirokawa K, Etori M, Yamashita M, Kubota T, Minegishi Y, Yonekawa H, Karasuyama H. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity*, 2005; 23:191-202.

- Muller S, Rafei-Shamsabadi D, Jakob T. Tricky cases in in- vitro diagnostics of Hymenoptera venom allergy. *Hautarzt*, 2014;65:780-790.
- Muller S, Rafei-Shamsabadi D, Jakob T. Tricky cases in in-vitro diagnostics of hymenoptera venom allergy. *Hautarzt*, 2014: 65(9):780-1, 4-90.
- Muller U, Schmid-Grendelmeier P, Hausmann O, Helbling A. IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. *Allergy*, 2012: 67(8):1069-1073.
- Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy*, 2009: 64(4):543-548.
- Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy*, 2009: 64(4):543-548.
- Muller UR. Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005: 5:343-347.
- Nittner-Marszalska M, Kopec A, Biegus M, Kosinska M, Obojski A, Pawlowicz R, Gillert-Smutnicka M, Panaszek B. Non-ST Segment Elevation Myocardial Infarction after Multiple Bee Stings. A Case of “Delayed” Kounis II Syndrome. *Int J Cardiol*, 2013: 166, e62-e65.
- Nittner-Marszalska M, Liebhart J, Liebhart E, Dor A, Dobek R, Obojski A, Medrala W. Prevalence of Hymenoptera Venom Allergy and Its Immunological Markers Current in Adults in Poland. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*, 2004: 10, CR324-CR329.
- Nittner-Marszalska, M. Venom Immunotherapy. *Alergol Pol Pol J Allergol*, 2018; 5: 85-93.
- Nopp A, Johansson SG, Ankerst J, Bylin G, Cardell LO, Grönneberg R, Irander G, Palmeqvist M, Oman H. Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy*, 2006; 61(3):298-302.

- Novembre E, Cianferoni A, Bernardini R, Veltroni M, Ingargiola A, Lombardi E, Vierucci A. Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin Exp Allergy*, 1998; 28:834-838.
- Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015; 15(5):527-535.
- Patil SU, Calatroni A, Schneider M, Steinbrecher J, Smith N, Washburn C. Data-driven programmatic approach to analysis of basophil activation tests. *Cytometry B Clin Cytom*, 2017;3:13-25.
- Patil SU, Shreffler WG. Immunology in the clinic review series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clin Exp Immunol*, 2012;167(1):59-66.
- Peiren N, de Graaf DC, Brunain M, Bridts CH, Ebo DG, Stevens WJ, Jacobs FJ. Molecular Cloning and Expression of Icarapin, a Novel IgE-Binding Bee Venom Protein. *FEBS Lett*, 2006; 580, 4895-4899.
- Pfaar O, Bachert C, Bufe A, Buhl R, Ebner C, Eng P, Friedrichs F, Fuchs T, Hamelmann E, Hartwig-Bade D, Hering T, Hüttegger I, Jung K, Klimek L, Kopp MV, Merk H, Rabe U, Saloga J, Schmid-Grendelmeier P, Scheuster A, Schwerk N, Sitter H, Umpfenbach U, Wedi B, Wöhrl S, Worm M, Kleine-Tebbe J, Kaul S, Schwalfenberg A. Guideline on Allergen-Specific Immunotherapy in IgE-Mediated Allergic Diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (ÖGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck. *Allergo J Int*, 2014; 23: 28-67.

Phadia/Thermo Fisher Scientific. Erişim: [https://www.thermofisher.com/phadia/wo/en/our-solutions/phadia-laboratory-systems.html]. Erişim Tarihi: 10 Şubat 2024

- Phadia-VBC Genomics. Erişim: [<https://www.lisavienna.at/news/detail/phadia-invests-in-vbc-genomics>]. Erişim Tarihi: 10 şubat 2024
- Przybilla B, Rueff F, Walker A, Rawer HC, Aberer W, Bauer CP, Berdel D, Biedermann T, Brockow K, Forster J, Fuchs Th, Hamelman E, Jakob T, Jarisch R, Merk H, Muller U, Ott H, Sitter W, Urbanek R, Wedi B. Diagnosis and therapy of bee and wasp venom allergy. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ADA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder und Jugendmedizin (DGKJ) in Zusammenarbeit mit der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI) und der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI). *Allergo J*, 2011; 20:318-339.
- Pumphrey RS. Fatal anaphylaxis in the UK, 1992-2001. *Novartis Found Symp*, 2004; 257:116-128.
- Quercia O, Cova V, Martini M, Cortellini G, Murzilli F, Bignardi D, Cilia M, Scarpa A, Beatrice-Bilo M. CAP-Inhibition, Molecular Diagnostics, and Total IgE in the Evaluation of *Polistes* and *Vespula* Double Sensitization. *Int Arch Allergy Immunol*, 2018; 177(4):365-369.
- Rajan TV. The Gell-Coombs Classification of Hypersensitivity Reactions: A Re-Interpretation. *TRENDS Immunol*, 2003; 24, 376-379.
- Reisman RE. Unusual reactions to insect stings. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005;5(4):355-358.
- Renato Erzen, Korosec P, Silar M, Music E, Kosnik M. Carbohydrate Epitopes as a Cause of Cross-Reactivity in Patients Allergic to Hymenoptera Venom. *Wien Klin Wochenschr*, 2009; 121: 349-352.
- Ring J, Beyer K, Biedermann T, Bircher A, Duda D, Fischer J, Fuchs T, Gieler U, Jakop T, Klimek L, Lange L, Merk HF, Niggemann B, Pfaar O, Przybilla B, Rueff F, Rietschel E, Schnadt S, Seifert R, Sitter H, Varga EM, Worm M, Brockow K. Guideline for acute therapy and management of anaphylaxis. *Allergo J Int*, 2014; 23:96-112.

- Rothwell TL, Dineen JK. Cellular reactions in guinea-pigs following primary and challenge infection with *Trichostrongylus colubriformis* with special reference to the roles played by eosinophils and basophils in rejection of the parasite. *Immunology*, 1972; 22:733-745.
- Ruiz-Leon B, Navas A, Serrano P, Espinazo M, Labrador-Horrillo M, Monsalve RI, Jurado A, Moreno-Aguilar C. Successful adaptation of beevenom immunotherapy for a monosensitized patient to Api m 10. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 2020; 30(4):296-308.
- Saltabayeva U, Gariv V, Morenko M, Rosenson R, Ispayeva Z, Gatauova M, Zulus L, Kraulov A, Gstader F, Valenta R. Greater real-life diagnostic efficacy of allergen molecule-based diagnosis for prescription of immunotherapy in an area with multiple pollen exposure. *Int Arch Allergy Immunol*, 2017; 173: 93-98.
- Santos AF, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool. *Clin Transl Allergy*, 2016; 6(1):10-19.
- Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy*, 2010; 40:1442-1460.
- Schiener M, Eberlein B, Moreno-Aguilar C, Pietsch G, Serrano P, McIntyre M, Schwarze L, Russkamp D, Bidermann T, Spillner E, Darsow U, Ollert M, Schmidt-Weber CB, Blank S. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy- relevant Hymenoptera species in diagnostics. *Allergy*, 2017; 72(1):98-108.
- Schmitzova J, Klaudiny J, Albert S, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, Judova J, Simuth J. A Family of Major Royal Jelly Proteins of the Honeybee *Apis Mellifera* L *Cell Mol Life Sci*, 1998; 54:1020-1030.
- Schroeder JT. Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Advances in immunology*, 2009; 101:123-161.
- Seismann H, Blank S, Braren I, Greunke K, Cifuentes L, Grunwald T, Bredehorst R, Ollert M, Spillner E. Dissecting cross-reactivity in Hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. *Mol Immunol*, 2010; 47(4):799-808.
- Severino MG, Campi P, Macchia D, Manfredi M, Turillazzi S, Spadolini I, Bilo MB, Bonifazi F. European *Polistes* venom allergy. *Allergy*, 2006; 61(7):860-893.

- Seyfarth F, Miguel D, Schliemann S, Hipler UC. Diagnostic precision of component-resolved vs. extract-based in vitro diagnosis of hymenoptera venom allergy: effects on clinical management. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2017; 15: 507-515.
- Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*, 2017; 140(6):1485-1498.
- Simons FER. Anaphylaxis *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 125: S161-S181.
- Skov LK, Seppala U, Coen JJ, Crickmore N, King TP, Monsalve R, Kastrup JS, Spangfort FD, Gajhede M. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Angstrom resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr*, 2006; 62: 595-604.
- Smoley BA. Oropharyngeal hymenoptera stings: a special concern for airway obstruction. *Mil Med*, 2002; 167(2):161-173.
- Stoevesandt J, Hosp C, Kerstan A, Trautmann A, Sensitization to Hymenoptera venom marker allergens: Prevalence, predisposing factors, and clinical implications, *Clin Exp Allergy*, 2018; 48:1735-1743.
- Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIB cross-linking. *J Clin Invest*, 2006;116(3):833-841.
- Strohmeier B, Aberer W, Bokanovic D, Komericki P, Sturm GJ. Simultaneous intradermal testing with hymenoptera venoms is safe and more efficient than sequential testing. *Allergy*, 2013; 68(4): 542-554.
- Sturm GJ, Arzt-Gradwohl L, Varga EM. Medical Algorithms: Diagnosis and Treatment of Hymenoptera Venom Allergy. *Allergy*, 2019; 74, 2016-2023.
- Sturm GJ, Böhm E, Trummer M, Weiglhofer I, Heinemann A, Aberer W. The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy*, 2004; 10:1110-1107.
- Sturm GJ, Hemmer W, Hawranek T, Lang R, Ollert M, Spillner E, Blank S, Bokanovic T, Aberer W. Detection of IgE to recombinant Api m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2011;128:247-258.

- Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, Hemmer W, Sturm EM, Griesbacher A, Heinemann A, Vollmann J, Altmann F, Crailsheim K, Focke M, Aberer W. Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One*, 2011; 6:e20842.
- Sturm GJ, Kranzelbinder B, Sturm EM, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy*, 2009; 64(9): 1319-1326.
- Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, Mosbech H, Bilo MB, Akdis CA, Antolin-Amerigo D, Cichocka-Jarosz E, Gawlik R, Jakob T, Kosnik m, Lange L, Mingomataj E, Mitsias DI, Ollert M, Oude Elberink JNG, Pfaar O, Pitsios C, Pravettoni V, Rueff F, Sin BA, Agache I, Angier E, Arasi S, Calderon MA, Fernandez-Rivas V, Halken S, Jutel M, Lau S, Pajno GB, van Ree R, Ryan D, Spranger O, Van Wijk RG, Dhimi S, Zaman H, Sheikh A, Muraro A. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: Hymenoptera Venom Allergy. *Allergy*, 2018; 73:744-764.
- Synevo laboratuvarları. Erişim: [www.synevo.com.tr] Erişim tarihi: 18 Şubat 2024
- Tan JW, Campbell DE. Insect allergy in children. *J Paediatr Child Health*, 2013; 49:E381-7.
- Tankersley MS, Walker RL, Butler WK, Hagan LL, Napoli DC, Freeman TM. Safety and efficacy of an imported fire ant rash immunotherapy protocol with and without prophylactic treatment. *J Allergy Clin Immunol*, 2002;109 (3):556-562.
- The R Project for Statistical Computing. Erişim: [<https://www.r-project.org>] Erişim Tarihi:18 Şubat 2024
- ThermoFisher Diagnostic. Erişim: [<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-culture/cell-culture-plastics.html>]. Erişim tarihi: 10 Şubat 2024
- Thien FCK, Leung R, Baldo BA, Weinbr JA, Plomley R, Czarny D. Asthma and Anaphylaxis Induced by Royal. Jelly *Clin Exp Allergy*, 1996; 26, 216-222.
- Togias AG, Naclerio RM, Warner J, Proud D, Kagey-Sobotka A, Nimmagadda I, Norman PS, Linchinstein LM. Demonstration of inhibition of mediator release from human mast cells by azatadine base. in vivo and in vitro evaluation. *JAMA*, 1986; 255(2):225-229.

- Tomsitz D, Brockow K. Component resolved diagnosis in Hymenoptera anaphylaxis,. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2017;17 (6)38:44-55.
- Vachova M, Panzner P, Kopac P, Bidovec Stojkovic U, Korosec P. Routine clinical utility of honeybee venom allergen components. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2018: 6(6):2121-3 e1.
- Valent P, Akin C, Escribano L, Fodinger M, Hartmann K, Brockow K, Castells M, Sperr WR, Kluin-Nelemans HC, Hamdy NAT, Lortholary O, Robyn J, van Doormaal J, Sotlar K, Hauswirth AW, Arock M, Hermine O, Hellmann A, Triggiani M, Nidoszytko M, Schwzrtz LB, Orfao A, Horny HP, Metcalfe DD. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest*, 2007: 37(6):435-453.
- van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, Rückert B, Akdis CA, Akdis M. IgG4 Production Is Confined to Human IL-10-Producing Regulatory B Cells That Suppress Antigen-Specific Immune Responses. *J Allergy Clin Immunol*, 2013; 131: 1204-1212.
- van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen A, Arnved J, Ipsen H. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol*, 1999: 163(5):2944-2952
- van Vaerenbergh M, DeSmet L, Rafei Shamsabadi, D, Blank S, Spillner E, Ebo DG, Devreese B, Jakob T, de Graaf DC. IgE Recognition of Chimeric Isoforms of the Honeybee (*Apis Mellifera*) Venom Allergen Api m 10 Evaluated by Protein Array Technology. *Mol Immunol*, 2015: 63, 449-455.
- Venom Serine Carboxypeptidase Precursor *Apis Mellifera* (Honeybee). Erişim: [<https://www.uniprot.org/uniprot/C9WMM5>]. Erişim Tarihi: 24 Ocak 2024.
- Verweij MM, Sabato V, Nullens S, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ, Ebo DG. STAT5 in human basophils: IL-3 is required for its FcεRI-mediated phosphorylation. *Cytometry B Clin Cytom*, 2012;82(2):101-116.

- Vidal C, Armisen M, Monsalve R, Gonzalez-Vidal T, Lojo S, Lopez-Freire S, Mendez P, Rodriguez V, Romero L, Galan A, Gonzales-Quintela A. Anaphylaxis to *Vespa velutina nigrithorax*: pattern of sensitization for an emerging problem in Western countries. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2020; 22(3):228-235.
- Vidal C, Sanmartin C, Armisen M, Rodriguez V, Linneberg A, Gonzales-Quintela A. Minor interference of cross-reactive carbohydrates with the diagnosis of respiratory allergy in standard clinical conditions. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012;157(2):176-185.
- Vos B, Köhler J, Müller S, Stretz E, Rüeff F, Jakob T. Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to *Vespula* venom. *J Allergy Clin Immunol*, 2013;131:1225-1227.
- Wachinger M, Saermark T, Erfle V. Influence of Amphipathic Peptides on the HIV-1 Production in Persistently Infected T Lymphoma Cells. *FEBS Lett*, 1992; 309, 235-241.
- Winningham KM, Fitch CD, Schmidt M, Hoffman DR. Hymenoptera Venom Protease Allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 114, 928-933.
- Wolf GL, Arenson RL, Cross AP. A prospective trial of ionic vs nonionic contrast agents in routine clinical practice: Comparison of adverse effects. *AJR Am J Roentgenol*, 1989; 152(5):939- 944.
- Worm M, Eckermann O, Dölle S, Aberer W, Beyer K, Hawranek T, Hompes S, Köhli A, Mahler V, Nemat K, Niggemann B, Pföhler C, Rabe U, Reissig A, Rietschel E, Scherer K, Treudler R, Rueff F. Triggers and treatment of anaphylaxis. *Dtsch Arztebl Int*, 2014; 111:367-375.
- Worm M, Francuzik W, Renaudin JM, Bilo MB, Cardona V, Scherer Hofmeier KS, Köhli A, Bauer A, Christoff G, Cichocka-Jarosz E, Hawranek T, Hourihane JO, Lange L, Mahler V, Muraro A, Papadopoulos NG, Pföhler C, Poziomkowska-Gesicka I, Rueff F, Spindler T, Treudler R, Fernandez-Rivas M, Dölle S. Factors increasing the risk for a severe reaction in anaphylaxis: An analysis of data from The European Anaphylaxis Registry. *Allergy*, 2018; 73(6):1322-1330.

Yokoi H, Yoshitake H, Matsumoto Y, Kawada M, Takato Y, Shinagawa K, Sakurai H, Saito K. Involvement of cross-reactive carbohydrate determinants-specific IgE in pollen allergy testing. *Asia Pac Allergy*, 2017; 7: 29-36.



EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)					
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Deri prik testi ve/veya spesifik IgE ölçümleri ile bal arısı ve yaban arısı pozitifliği saptanan hastalarda bazofil aktivasyon testi ve allerjen komponent testlerinin karşılaştırılması			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU					
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU			
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ			
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11			
	FAKS	0 352 437 52 85			
	E-POSTA	serifeserim@erciyes.edu.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. İnu Yılmaz			
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Göğüs Hastalıkları - Alerji - İmmünoloji			
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları AD, Kayseri			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözetimsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
İlaç dışı klinik araştırma		☒			
Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans Tezi				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Deri prik testi ve/veya spesifik IgE ölçümleri ile bal arısı ve yaban arısı pozitifliği saptanan hastalarda bazofil aktivasyon testi ve allerjen komponent testlerinin karşılaştırılması			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU					
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe	İngilizce
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe	İngilizce
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe	İngilizce
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe	İngilizce
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklı			
	SİGORTA				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU				
	İLAN				
	YILLIK BİLDİRİM				
	SONUÇ RAPORU				
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2022/651	Tarih : 28/06/2022			
	Yukarıda bilgileri verilen prospektif başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlişki	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU	Mikrobiyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ x	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Doç. Dr. Mehmet DOLANBAY	Kadın Hast. ve Doğum	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Prof. Dr. Zuhai HAMURCU	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ x	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Prof. Dr. Hüseyin Sinan TOPÇUOĞLU	Endonti	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Prof. Dr. Adnan BAYRAM	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Prof. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Doç. Dr. Hakan İMAOĞLU	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Doç. Dr. Oktay BOZKURT	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Doç. Dr. Duygu Gülmez Sevim	Göz Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☒ x	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Dr Öğr.Üyesi Kemal Erdem BAŞARAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Dr Öğr.Üyesi Gözde E. ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ x	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Uzm. Dr. Uğur AYDEMİR	Genel Cerrahi	Bünyan Dev. Hst	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Av. Haluk Korkusuz	Avukat	Kayseri Barosu	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	
Servap KOÇER	Sivil Üye	Serbest	E ☐ K ☒ x	E ☐ H ☒ x	E ☒ x H ☐	

* Toplantıda Bulunan

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

Deri Prik Testi ve Spesifik IgE Ölçümleri ile hem Bal hem de Yaban Arısı Pozitifliği Olan Hastalarda BAT ve Allerjen Komponent Testlerinin Karşılaştırması

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 2	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.koroilac.com İnternet Kaynağı	% 2
2	alerjitesti.com.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Bülent Ecevit Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
4	link.springer.com İnternet Kaynağı	% 1
5	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Marta Burzyńska, Dorota Piasecka-Kwiatkowska. "A Review of Honeybee Venom Allergens and Allergenicity", International Journal of Molecular Sciences, 2021 Yayın	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Esra ÖZSOY
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti (TC)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet
Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Bölümü	2019
Lise	Şehit Nuh Kürşat Temizyürek Anadolu Lisesi	2014

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2020-Halen	Boğazlıyan Devlet Hastanesi	Hemşire

Yabancı Dil : İngilizce

Katıldığı Seminer / Kongreler ve Sertifikalar

- Nuh Naci Yazgan Ulusal Sağlık Bilimleri Kongresi (3-4 Mayıs 2024)

Posterler

- Deri Prik Testi ve Spesifik IgE Ölçümleri ile hem Bal hem de Yaban Arısı Pozitifliği Olan Hastalarda Bazofil Aktivasyon Testi ve Allerjen Komponent Testlerinin Karşılaştırması. Esra Özsoy, Sevil Şimşek, Tuğba Rıhtım, Mustafa Yavuz Köker, İnsu Yılmaz. Nuh Naci Yazgan Ulusal Sağlık Bilimleri Kongresi, 3-4 Mayıs 2024, Kayseri