



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Oddělení alergologie a klinické imunologie

**Eva Hrabánková**

**Vývoj imunitní odpovědi na alergeny jedu blanokřídlého  
hmyzu u specifické alergenové imunoterapie**

*Development of immune response to the Hymenoptera venom  
allergens during specific allergen immunotherapy*

*Diplomová práce*

Praha, květen 2008

Autor práce: Eva Hrabánková

Studijní program: Všeobecné lékařství

Vedoucí práce: **doc. MUDr. Petr Kučera, Ph.D**

Pracoviště vedoucího práce: **Oddělení alergologie a klinické imunologie**

Datum a rok obhajoby: 5.6.2008

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 28.května 2008

Eva Hrabánková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. MUDr. Petru Kučerovi, Ph.D., svému školiteli, za odborné konzultace v oblasti zvoleného tématu a Mgr. Luďku Šalomovi za cenné rady při statistickém zpracování dat.

# Obsah

ÚVOD	3
<b>1. ETIOLOGIE</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Medicínsky významné druhy <i>Hymenopter</i></b>	<b>4</b>
1.1.1. Včelovití	4
1.1.2. Sršňovití	5
1.1.3. Mravenci	5
<b>1.2. Složky jedu <i>Hymenopter</i></b>	<b>5</b>
1.2.1. Složení jedu včelovitých	5
1.2.2. Složení jedu sršňovitých	6
1.2.3. Složení jedu mravenců	7
<b>1.3. Zkřížená reaktivita a zkřížená senzitivace</b>	<b>7</b>
<b>2. EPIDEMIOLOGICKÁ DATA</b>	<b>8</b>
2.1. Prevalence alergické reakce na jed <i>Hymenopter</i>	8
2.2. Rizikové faktory vzniku alergické reakce	8
2.3. Mortalita po bodnutí <i>Hymenopter</i>	9
<b>3. KLINICKÝ OBRAZ A PATOGENEZE</b>	<b>10</b>
3.1. Alergická reakce po bodnutí <i>Hymenopter</i>	10
3.2. Neobvyklá reakce po bodnutí <i>Hymenopter</i>	11
3.3. Toxická reakce po bodnutí <i>Hymenopter</i>	12
<b>4. DIAGNOSTIKA</b>	<b>13</b>
4.1. Anamnéza	13
4.2. <i>In vivo</i> metody diagnostiky alergie na jed <i>Hymenopter</i>	13
4.2.1. Kožní testy	13
4.2.2. Expoziční testy	15
4.3. <i>In vitro</i> metody diagnostiky alergie na jed <i>Hymenopter</i>	15
4.3.1. Měření jedově specifických IgE protilátek v séru	15
4.3.2. Měření jedově specifických IgG protilátek v séru	16
4.3.3. Funkční <i>in vitro</i> testy	16
4.3.3.1. Test uvolňování histaminu z bazofilů	16
4.3.3.2. Analýza tryptázy	17
4.3.3.3. Analýza cysteinyl leukotrienů	17
4.3.3.4. Test aktivace bazofilů	17
4.3.4. Western blot	18
<b>5. LÉČBA A PREVENCE</b>	<b>19</b>
5.1. Všeobecná preventivní opatření	19
5.2. Léčba anafylaktické reakce	20
5.3. Léčba velké lokální reakce	22
5.4. Specifická alergenová imunoterapie jedem <i>Hymenopter</i>	22
5.4.1. Mechanismus účinku	22
5.4.2. Indikace a kontraindikace	23
5.4.2.1. Indikace	23
5.4.2.2. Kontraindikace	23
5.4.3. Volba alergenu pro imunoterapii	23

5.4.4.	Praktické provedení	24
5.4.5.	Dávkování a léčebné režimy	24
5.4.6.	Nežádoucí účinky	25
5.4.7.	Efektivita a trvání imunoterapie	26
<b>6.</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>27</b>
6.1.	Cíl	27
6.2.	Výzkumný vzorek	27
6.3.	Kožní testy	29
6.4.	Měření jedově specifických protilátek	29
6.5.	Postup při provádění VIT a její průběh	31
6.6.	Statistické hodnocení	31
<b>7.</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>32</b>
<b>8.</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>39</b>
<b>9.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>42</b>
	<b>SOUHRN</b>	<b>43</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>44</b>
	<b>PŘEHLED TABULEK A GRAFŮ</b>	<b>45</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>46</b>

## Úvod

Řád blanokřídlí (*Hymenoptera*) čítá na sto tisíc druhů hmyzu (jen na našem území žije kolem 15 000 druhů)<sup>1</sup>. Někteří jedinci disponují bodavým a jedovým aparátem, který jim primárně slouží k obraně před nepřítelem nebo omráčení kořisti<sup>1, 2, 3</sup>. Bodnutí nebo kousnutí člověka se může manifestovat různým způsobem. Ne příliš častou, ale závažnou nebo dokonce fatální komplikací je systémová alergická reakce. Systémová imunoterapie alergenů příslušného hmyzu („Specific Alergen Immunotherapy“ - SAIT), zkráceně jedová imunoterapie („Venom Immunotherapy“ - VIT), je jedinou kauzální terapií, zabráňující vzniku závažné nebo život ohrožující IgE zprostředkované anafylaktické reakci při následujícím bodnutí příslušným druhem hmyzu<sup>4</sup>. Jejím smyslem je dlouhodobé navození imunologické tolerance (specifické hyposenzibilizace) proti systémově podávaným alergenům<sup>5</sup>. Iniciální pokusy o VIT byly prováděny již ve 20. letech minulého století, přičemž zprvu využívané celotělové extrakty („whole body extracts“ - WBEs) byly, vzhledem ke srovnatelné účinnosti s placebem, nahrazeny v 70. letech extrakty jedovými, jež se užívají pro diagnostiku i terapii dodnes<sup>3</sup>. Mechanismus navození imunologické tolerance prostřednictvím SAIT je komplexní a dosud ne zcela probádaný. Pravděpodobně navozuje tvorbu tzv. „blokujících“ protilátek třídy IgG, redukuje množství efektorových buněk a množství uvolňovaných zánětlivých mediátorů a posunuje imunologickou rovnováhu od Th2 směrem k Th1 cytokinové odpovědi<sup>4</sup>. Vzhledem k možným závažným nežádoucím účinkům, časové a finanční náročnosti, by měla být tato léčba ordinována na základě přísných indikačních kritérií a prováděna pod dohledem zkušeného lékaře s dostupným resuscitačním vybavením<sup>5</sup>.

Hlavním důvodem, který mě vedl k výběru právě tohoto tématu, je osobní zkušenost s alergickou reakcí po bodnutí vosou. Ač to nebyla reakce nijak závažná, zajímalo mě, zda si s sebou do budoucna nenese riziko život ohrožující reakce.

Cílem této diplomové práce je podat výčet dosavadních znalostí, týkajících se problematiky alergie na jed *Hymenopter* a následně některá z těchto dat porovnat s daty, získanými od vzorku pacientů, léčených na Oddělení alergologie a klinické imunologie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV).

# 1 Etiologie

## 1.1 Medicínsky významné druhy Hymenopter

K medicínsky nejvýznamnějším blanokřídlým patří včelovití (*Apidae*), sršňovití (*Vespidae*) a mravenci (*Formicoidea*). Hlavními představiteli včelovitých je včela (*Apis spp.*) a čmelák (*Bombus spp.*). Mezi sršňovité lze zařadit vosu (*Vespula spp.* a *Dolichovespula spp.*), sršeň (*Vespa spp.*) a vosíka (*Polistes spp.*). U mravenců byly alergické reakce popsány hlavně u čeledi *Myrmicidae* (*Solenopsis spp.* a *Pogomyrmex spp.*)<sup>2,3,6</sup>, vzácně pak u čeledi *Formicidae*<sup>7</sup>. Zástupce medicínsky významných druhů blanokřídlého hmyzu, jež se vyskytují v Evropě ukazuje tabulka 1.1-1.

Příčinou alergické reakce je bodnutí žihadlem nebo kousnutí a následné vpravení jedu do organismu. Množství a složení jedu se mezi jednotlivými rody i druhy různí a mění se také v závislosti na stáří hmyzu, ročním období (hlavně u mravenců) a délce časového intervalu od posledního bodnutí. Obecně platí, že čím starší jedinec, tím toxičtější je jeho jed<sup>3,6</sup>.

V Evropě převažují bodnutí vosou a včelou<sup>8</sup>. Rozpoznání viníka může být velmi složité a pomoci mohou některá anamnestická data, získaná od pacienta nebo od zúčastněných osob. K důležitým informacím patří především vzhled hmyzu, ve kterém ročním období k bodnutí došlo, místo události, okolnosti bodnutí nebo zda v ráně zůstalo žihadlo<sup>3</sup>.

Tabulka 1.1-1: Medicínsky významné druhy *Hymenopter*, vyskytující se v Evropě

čeleď	rod	druh
Vespidae (sršňovití)	Vespula	<i>V. vulgaris</i> (vosa obecná) <i>V. germanica</i> (vosa útočná) <i>V. rufa</i> (vosa ryšavá)
	Dolichovespula	<i>D. silvestris</i> (vosa lesní) <i>D. media</i> (vosa prostřední) <i>D. saxonica</i> (vosa saská)
	Vespa	<i>V. crabro</i> (sršeň obecná) <i>V. orientalis</i>
	Polistes	<i>P. gallicus</i> (vosík francouzský) <i>P. nympa</i> <i>P. dominulus</i>
Apidae (včelovití)	Apis	<i>A. mellifera</i> (včela medonosná)
	Bombus	<i>B. terrestris</i> (čmelák zemní) <i>B. lapidarius</i> (čmelák skalní) <i>B. agrorum</i> (čmelák polní) <i>B. silvarum</i> (čmelák lesní)
Myrmicidae	Myrmica	<i>M. rubra</i> (mravenec žahavý) <i>M. rubida</i> (mravenec horský)
Formicidae	Formica	<i>F. rufa</i> (mravenec lesní)

### 1.1.1 Včelovití

Včelovití bodají pouze jsou-li vyprovokováni, např. pokud se hmyz cítí ohrožen nebo pokud se člověk přiblíží do kritické vzdálenosti od hnízda<sup>2,3,9</sup>. Nejznámějším představitelem rodu včel (*Apis*) je domestikovaná včela medonosná (*Apis mellifera*). U včel dochází po bodnutí obvykle k vytržení bodavého ústrojí, evisceraci orgánů dutiny břišní a včela následně hyne. U sršňovitých a čmeláků není tento mechanismus běžný, tzn. že po bodnutí nehynou a mohou bodnout opakovaně<sup>2,3</sup>.

Ke včelímu bodnutí dochází nejčastěji na jaře a zraje léta, zejména během teplých a slunných dní. Včela je hnědě zbarvena se světle naznačenými pruhy na zadečku a celé její tělo



je pokryto chloupky, zatímco čmelák je mohutnější, chlupatější a obvykle má i výraznější zbarvení pruhů<sup>3</sup>.

Bodnutí čmeláka jsou velmi vzácná, ačkoli v současnosti lze zaznamenat nárůst anafylaktických reakcí po jejich bodnutí a to především v Holandsku v souvislosti s užíváním čmeláků při opylování květin a zeleniny ve sklenících<sup>10</sup>.

### 1.1.2 Sršňovití

Sršňovití jsou oproti včelovitým obecně útočnější. Typicky se bodnutí sršňovitých vyskytuje na konci léta a na začátku podzimu, neboť v té době čítá hnízdo nejvyšší počet dospělých jedinců<sup>1,3</sup>. Morfologicky se sršňovití vyznačují tělem bez ochlupení a černo-žlutými pruhy na zadečku, přičemž sršně (*Vespa spp.*) jsou oproti ostatním druhům sršňovitých mohutnější<sup>1</sup>.

Sršňovití si staví hnízda z papírové hmoty, buď volně visící nad zemí nebo do preformovaných dutin v zemi či ve stromech. Hnízda vos a sršní mají kolem plástů různě zbarvený ochranný obal, zatímco hnízdo vosíků ochranný obal nemá a skládá se pouze z jednoho nebo několika obnažených plástů<sup>1,3</sup>. Vosy, zvláště rodu *Vespula*, žijí obvykle v těsném sousedství lidí, bývají agresivnější než ostatní druhy sršňovitých a proto jsou i jejich bodnutí četnější<sup>1,3</sup>. Ostatní druhy sršňovitých bodají převážně v případě ohrožení hnízda, tj. při překročení kritické vzdálenosti od něj<sup>2,3</sup>. Bodnutí vosíků (*Polistes spp.*) a tedy i alergické reakce na jejich jed jsou častější v oblastech s teplejším klimatem, což v Evropě představuje oblast Středomoří<sup>3</sup>.

### 1.1.3 Mravenci

Alergická reakce na složky jedu mravenců se v Evropě vyskytuje vzácně<sup>7,8</sup>. Některým druhům mravenců žihadlo zakrnělo, ale jedová žláza zůstala zachována (čeleď *Formicidae*). Tito mravenci pak vstříkují jed ze zadečku do ranky, kterou předtím způsobili svými kusadly<sup>1,3</sup>. Naopak mravenci čeledi *Myrmicidae* mají bodavý aparát plně vyvinutý, jsou schopni vpravit jed do oběti pomocí žihadla a složení jejich jedu je podobné složení jedu vos nebo včel<sup>3</sup>. Alergické reakce se nejčastěji vyskytují po bodnutí mravence rodu *Solenopsis* (*Solenopsis invicta*, *Solenopsis richteri*), pocházejícího z Jižní Ameriky a importovaného do USA a Austrálie<sup>2</sup>. Jejich bodnutí vede k tvorbě pupence, který následně progreduje do sterilní pustuly a nakonec vede až k lokální nekróze<sup>2,3</sup>. Pokud tento mravenec bodá opakovaně, otáčí se přitom kolem centrální osy a pustuly se formují do tvaru prstence<sup>2</sup>.

## 1.2 Složky jedu Hymenopter

Látky, obsažené v jedu blanokřídlých mohou mít povahu enzymů, proteinů, biogenních aminů či peptidů<sup>3,6</sup>. Některé mohou vystupovat jako alergeny (např. vysokomolekulární proteiny), jiné uplatňují svou biochemickou (např. enzymy) či farmakologickou povahu (např. biogenní aminy) nebo se jedná o kombinaci účinků<sup>3,8</sup>. Některé složky jedu usnadňují jeho šíření tkáněmi (např. biogenní aminy, enzymy), jiné působí cytotoxicky<sup>3</sup>. Tabulka 1.2-1 uvádí přehled hlavních alergenů jedu některých druhů *Hymenopter*<sup>11</sup>.

### 1.2.1 Složení jedu včelovitých

Mezi hlavní alergeny jedu včely patří fosfolipáza A<sub>2</sub>, hyaluronidáza, kyselá fosfatáza<sup>3,6,8</sup>. Méně významnými alergeny je melittin a alergen C<sup>8</sup>. Fosfolipáza, hyaluronidáza a kyselá fosfatáza jsou látky s enzymatickou aktivitou. Hyaluronidáza tvoří 2-3% suché váhy jedu, štěpí kyselinu hyaluronovou a chondroitinsulfát a umožňuje tím šíření ostatních součástí jedu do okolí. Její toxicita je však nevýznamná<sup>3,6</sup>. Fosfolipáza A<sub>2</sub> tvoří 12% suché váhy jedu

a je zodpovědná za narušení buněčných membrán, snižuje povrchové napětí, zvyšuje kontraktilitu hladkého svalstva a zvyšuje permeabilitu kapilár<sup>3</sup>. Kyselá fosfatáza zřejmě není primárně součástí včelího jedu, ale dostává se do něj jako kontaminanta ze střeva nebo tkáně jedového vaku hmyzu, protože není nalézána při zvláště opatrném sběru jedu<sup>3</sup>. Melittin je peptid, který tvoří asi 50% suché váhy jedu, je silně cytotoxický a vzhledem k malé molekulové hmotnosti (2,8 kDa), je za alergenicitu pravděpodobně zodpovědná schopnost tvorby polymerů<sup>3,8</sup>. Dalšími důležitými složkami jedu včel jsou peptidy (např. mastocyty degranulující peptid a apamin) a nízkomolekulární látky neantigenní povahy typu biogenních aminů, kam patří histamin, noradrenalin a dopamin<sup>3,6</sup>. Biogenní aminy způsobují bolest, otok a zarudnutí v místě bodnutí<sup>3</sup>. Mastocyty degranulující peptid (MCD) zvyšuje permeabilitu kapilár a způsobuje masivní uvolnění histaminu z mastocytů; apamin je neurotoxický<sup>3,6</sup>.

Jed čmeláka obsahuje podobné komponenty jako jed včely, ale neobsahuje melittin<sup>3</sup>.

Tabulka 1.2-1: Přehled identifikovaných alergenů u některých druhů *Hymenoptera*

zdroj alergenu	nomenklatura alergenu podle IUIS*	biochemický název alergenu
<i>A. mellifera</i>	Api m 1 Api m 2 Api m 3 Api m 4 Api m 6 Api m 7	Fosfolipáza A2 Hyaluronidáza Kyselá fosfatáza melittin  CUB serinová proteáza
<i>B. terrestris (B. pensylvanicus)</i>	Bom t 1 (Bom p 1) Bom t 4 (Bom p 4)	Fosfolipáza A2 Proteáza
<i>Dolichovespula maculata</i>	Dol m 1 Dol m 2 Dol m 5	Fosfolipáza A1 Hyaluronidáza Antigen 5
<i>Myrmecia pilosula</i>	Myr p 1 Myr p 2 Myr p 3	Pilosulin-3 Pilosulin-4.1
<i>Polistes dominulus</i>	Pol d 1 Pol d 4 Pol d 5	Fosfolipáza A1 Serinová proteáza Antigen 5
<i>Solenopsis invicta</i>	Sol i 1 Sol I 2 Sol i 3 Sol i 4	Fosfolipáza A1/B
<i>Vespa crabro</i>	Vesp c 1 Vesp c 5	Fosfolipáza A1/B Antigen 5
<i>Vespula vulgaris</i>	Ves v 1 Ves v 2 Ves v 5	Fosfolipáza A1/B Hyaluronidáza Antigen 5

\*International Union of Immunological Societies

### 1.2.2 Složení jedu sršňovitých

Složení jedu různých druhů sršňovitých je do značné míry podobné. Hlavními alergeny jsou fosfolipáza A<sub>1</sub>/ B, hyaluronidáza a antigen 5<sup>3,6</sup>. Fosfolipáza a hyaluronidáza jsou enzymy, antigen 5 je bazický protein s neznámou funkcí<sup>3</sup>. Z biogenních aminů je přítomen histamin, serotonin, noradrenalin, adrenalin a dopamin<sup>3,6</sup>. Z peptidů jsou zastoupeny kininy a peptid s podobnou aktivitou jako včelí MCD, tzv. mastoparan<sup>3</sup>.

### 1.2.3 Složení jedu mravenců

Jed mravenců čeledi *Myrmicidae* je podobný jedu včel nebo vos, přičemž množství alergenů v něm, zvláště fosfolipázy A, kolísá v závislosti na ročním období a je nejvyšší na začátku léta<sup>3</sup>. U druhu *Solenopsis* tvoří převážnou část jedu dialkylpiperidiny, které jsou silně cytotoxické a jsou zodpovědné za tvorbu vezikulární léze, která progreduje do lokální nekrózy<sup>2,3</sup>. Hlavní komponentou jedu čeledi *Formicidae* je cytotoxická kyselina mravenčí<sup>3</sup>.

### 1.3 Zkřížená reaktivita a zkřížená senzitivace

Pokud se u jednoho pacienta manifestuje přecitlivělost na jedy různých druhů *Hymenopter*, jedná se buď o zkříženou reaktivitu („cross-reactivity“) nebo o vícečetnou reaktivitu. Podstatou zkřížené reaktivity je strukturální podobnost mezi alergeny z různých zdrojů, kdy se protilátky IgE, původně zvýšené proti jednomu alergenu, vážou na alergen z jiného zdroje a vyvolají alergickou reakci již při prvním setkání s tímto alergenem<sup>12</sup>. U vícečetné reaktivity není mezi alergeny z různých zdrojů dostatečná strukturální podobnost a proti každému z těchto alergenů se vytvářejí specifické IgE protilátky samostatně, po předchozí senzibilizaci. Jelikož je pro vznik zkřížené reaktivity nutná shodnost sekvencí proteinů nejméně 70%<sup>12</sup>, vyskytuje se silná zkřížená reaktivita nejčastěji uvnitř jednotlivých rodů blanokřídlých (tj. např. uvnitř *Vespula spp.*), částečná zkřížená reaktivita je mezi jednotlivými rody (např. mezi *Vespula spp.* a *Dolichovespula spp.*) a vzácně zkříženě reagují jedy sršňovitých a včelovitých<sup>3,8</sup>. Hlavními nositeli zkřížené reaktivity uvnitř čeledi sršňovitých jsou antigen 5, hyaluronidáza a do jisté míry i fosfolipáza A1/B<sup>12</sup>, přičemž vyšší stupeň zkřížené reaktivity je uvnitř podčeledi *Vespinae* (*Vespa spp.*, *Vespula spp.* a *Dolichovespula spp.*). Mezi jedy *Vespinae* a jedy vosíků je pouze omezená zkřížená reaktivita<sup>3</sup>. Zajímavé je, že omezená zkřížená reaktivita je také mezi evropskými a americkými druhy vosíků, zatímco uvnitř amerických (*P. annularis*, *P. fuscatus*, *P. metricus*) nebo evropských druhů (*P. gallicus*, *P. dominulus*, *P. nimphus*) je zkřížená reaktivita značná<sup>13</sup>. Za zkříženou reaktivitu mezi jedy sršňovitých a včelovitých je pravděpodobně zodpovědná hyaluronidáza<sup>3</sup>. Všechny tři hlavní alergeny jedy včelovitých zřejmě vykazují značný stupeň zkřížené reaktivity<sup>3</sup>.

Termín zkřížená senzitivace („cross-sensitization“) se užívá v případě positivity diagnostických testů (specifického sérového IgE či kožních testů), ale bez klinické manifestace alergie<sup>14</sup>. Příkladem reagujících struktur jsou uhlovodíkové postranní řetězce glykoproteinových alergenů, jež jsou společně mnoha druhům rostlin a živočichů vč. blanokřídlých (tzv. CCD - „cross-reactive carbohydrate determinants“)<sup>12</sup>. Protilátky CCD-IgE pak mohou být odpovědné za falešně pozitivní diagnostické testy na alergeny z nepříbuzných zdrojů, ale bez klinické manifestace alergie<sup>3,12,15</sup>.

## 2 Epidemiologická data

### 2.1 Prevalence alergické reakce na jed Hymenopter

Prevalence alergické reakce na bodnutí hmyzem značně kolísá v závislosti na studované oblasti, stupni expozice a věku studované populace i způsobu vedení studie. Systémové alergické reakce postihují 0,35 až 5%<sup>3</sup> a velké lokální reakce 1,5%<sup>3</sup> až 26,4%<sup>16</sup> celkové populace. U dětí je prevalence systémové reakce 0,15-0,3% a velké lokální reakce 19%<sup>17</sup>.

Prevalenci alergie na jed *Hymenopter* lze také hodnotit podle pozitivitu v diagnostických testech. V celkové populaci má pozitivní diagnostické testy (je senzitivizováno jedem *Hymenopter*) 15-25% osob<sup>16</sup>. Senzitivizace jedem je tedy mnohem častější než vlastní alergie.

V jedné studii mělo pozitivitu v kožních testech 42,1% dětí s velkou lokální reakcí a 66,7% dětí se systémovou reakcí. Pozitivitu jedově specifických IgE, hodnocených pomocí RAST, mělo 36,8% dětí s velkou lokální a 77,7% dětí se systémovou reakcí<sup>18</sup>.

U asymptomatických osob (tj. bez předchozí anamnézy alergické reakce na bodnutí) byla pozitivita specifických IgE, měřená pomocí RAST, u 15,1-16,4% osob<sup>16, 18</sup> a pozitivita v kožních testech u 8-17,8% osob<sup>18,19</sup>.

### 2.2 Rizikové faktory vzniku alergické reakce

Riziko rozvoje alergické reakce na jed blanokřídlých je úměrné stupni expozice. Je tedy vyšší u včelařů (prevalence velké lokální reakce 31-38% a systémové reakce 22-43%<sup>9</sup>), zahradníků, zemědělců, dětí (ve více než polovině případů se první systémová reakce objeví u osoby mladší 20 let věku), osob žijících na venkově a u vícečetných bodnutí (vyšší dávka jedu)<sup>3</sup>. Rozdílnost mezi pohlavími s převahou v mužské části populace je opět dána spíše zvýšeným stupněm expozice v této skupině<sup>3,6</sup>. Tendence k rozvoji alergické reakce závisí také na lokalizaci vpichu - riziková jsou zejména bodnutí v oblasti hlavy a krku<sup>3</sup>.

Pravděpodobné rizikové faktory pro rozvoj systémové alergické reakce jsou velký počet žihadel během dosavadního života, anamnéza alergie na *Hymenoptera* v rodině a pozitivita diagnostických testů (kožní testy, sérové specifické IgE)<sup>18</sup>. Výskyt velké lokální reakce po bodnutí nezvyšuje riziko vzniku systémové reakce<sup>9</sup>.

Rizikovým faktorem rozvoje závažné až fatální anafylaxe po bodnutí hmyzem je zvýšená sérová mastocytární tryptáza nebo systémová mastocytóza<sup>20, 21</sup>. Z toho důvodu by měla být u všech pacientů se závažnou anafylaxi vyšetřena bazální hladina sérové tryptázy<sup>17</sup>. Také léčba  $\beta$ -blokátory nebo kardiovaskulární onemocnění byly provázeny zvláště závažnými systémovými reakcemi po bodnutí<sup>17</sup>.

Riziko opakování systémové reakce po dalším bodnutí se pohybuje mezi 20-80%<sup>8</sup> a závisí na tíži předešlé alergické reakce, věku pacienta, druhu bodajícího hmyzu a časovém intervalu od posledního bodnutí<sup>3</sup>. Nižší riziko je u mírnějších stupňů předchozí alergické reakce, osob pod 20 let věku, alergie na vosí jed a po delším časovém intervalu od posledního bodnutí<sup>3</sup>. Uvádí se, že po 10 letech od posledního bodnutí se riziko pohybuje kolem 20-30%<sup>17</sup>.

Pravděpodobné rizikové faktory pro rozvoj velké lokální reakce jsou mužské pohlaví, vyšší počet žihadel během dosavadního života, anamnéza alergie na *Hymenoptera* v rodině, osobní anamnéza atopie a pozitivita diagnostických testů (kožní testy, sérové specifické IgE)<sup>18</sup>.

### **2.3 Mortalita po bodnutí Hymenopter**

Mortalita po bodnutí je udávána 0,03-0,48 osob na 1 000 000 obyvatel za rok<sup>17,22</sup>, což odpovídá přibližně 40 úmrtím za rok v USA, 13 úmrtím za rok ve Francii a 4 úmrtím za rok ve Švýcarsku<sup>8</sup>. Tato data mohou být podhodnocena, protože 23-50% obětí náhlých úmrtí mělo v sérech post mortem pozitivní jedově specifické IgE<sup>9</sup>. Uvádí se, že v 15-60% případů předcházela fatální reakci anafylaktická reakce po bodnutí v minulosti<sup>17</sup>. Celkově se alergie na jed Hymenopter podílí na závažných až letálních anafylaktických reakcích 11-29%<sup>22</sup> (v jedné oblasti Švýcarska činil tento podíl až 58,8%<sup>23</sup>). Vzhledem k častým komorbiditám a závažnějšímu stupni alergické reakce jsou úmrtí častější v dospělosti a ve stáří<sup>3</sup>, přičemž více než polovina obětí měla významnou kardiopulmonální komorbiditu<sup>17</sup>. Asi 5% představují úmrtí po mnohočetném pobodání, kde je nutno brát v úvahu, kromě možné alergické reakce, i toxický efekt jedu<sup>3,6</sup>.

### 3 Klinický obraz a patogeneze

Bodnutí blanokřídlým hmyzem se manifestuje různým způsobem. Normální reakcí u nealergických osob je svědění, otok, zčervenání a bolest v místě bodnutí, přičemž příznaky během několika hodin vymizí<sup>3,6</sup>. Hypersenzitivita na jed hmyzu může být zprostředkována mechanismy imunologickými (imunopatologické reakce závislé nebo nezávislé na IgE protilátkách) nebo neimunologickými (např. reakce toxické)<sup>8,17</sup>. Většinu patologických reakcí po bodnutí tvoří alergické reakce I. typu, tj. zprostředkované protilátkami IgE<sup>3</sup>.

#### 3.1 Alergická reakce po bodnutí Hymenopter

Podle rozsahu lze alergické reakce po bodnutí dělit na velké lokální reakce, tj. reakce v místě bodnutí a celkové (systémové, anafylaktické) reakce, jež se podle závažnosti dělí do 4 stupňů, kdy stupně I a II představují mírnou anafylaxi a stupně III a IV představují závažnou anafylaxi - viz tab.3.1-1. U dětí se častěji vyskytují systémové reakce mírnějšího stupně<sup>24</sup>.

Imunopatologická reakce na hmyzí jed je nejčastěji zprostředkována protilátkami IgE (reakce časného typu)<sup>3</sup>. Při prvním kontaktu s alergenem (v tomto případě obsaženém v hmyzím jedu) dochází k senzibilizaci pacienta. Antigen prezentující buňky zpracují jedové alergeny a předloží je Th prekurzorovým buňkám (Th0). Vlivem enzymatické aktivity včelího jedu (konkrétně fosfolipázy A<sub>2</sub>) je z mastocytů uvolněn preformovaný interleukin 4 (IL-4), který směřuje Th0 buňky v diferenciaci Th2 fenotypu<sup>8,9</sup>. Th2 lymfocyty pak uvolňují další IL-4 a navíc také IL-13, čímž podněcují IgE izotopový přesmyk a následnou produkci IgE třídy protilátek B-lymfocyty<sup>8,9</sup>. Protilátky IgE se váží na vysoce afinitní Fc receptory pro IgE (FcεRI) na povrchu mastocytů a bazofilů. Při dalším setkání s příslušným alergenem dojde, vazbou polyvalentního alergenu na navázané IgE, k přemostění sousedních FcεRI receptorů, jejich agregaci a aktivaci efektorových buněk. Aktivace efektorových buněk vede jednak k degranulaci s uvolněním preformovaných mediátorů (histamin, serotonin, heparin, tryptáza) a jednak k syntéze a sekreci metabolitů kyseliny arachidonové (leukotrieny, prostaglandiny a tromboxany)<sup>25</sup>. Uvolnění preformovaných mediátorů představuje tzv. časnou fázi reakce; sekrece nově syntetizovaných mediátorů pak pozdní fázi reakce. Masivní uvolnění vazoaktivních látek způsobí řadu reakcí s projevy kožními (angioedém, urtika), gastrointestinálními (spazmy střev, průjem, nauzea), respiračními (laryngeální edém, bronchospasmus, zvýšená bronchiální sekrece) či kardiovaskulárními (oběhový kolaps, arytmie, známky ischemie myokardu, hypotenze až šokový stav)<sup>8</sup>. Příznaky se u jednotlivých pacientů vyskytují v různých kombinacích, ale u jednoho pacienta bývá symptomatika konstantní<sup>3</sup>. Nástup reakce po bodnutí je rychlý, obvykle v intervalu 15-30 minut (časná fáze anafylaxe s uvolněním preformovaných mediátorů), ačkoli existují i případy kdy se reakce objevila s odstupem několika hodin po bodnutí (pozdní fáze reakce s uvolněním nově syntetizovaných mediátorů) nebo měla bifazický průběh (kombinace časné a pozdní fáze)<sup>8</sup>. Rychlost nástupu často koreluje se závažností průběhu a v extrémních případech nastává smrt v průběhu několika minut po bodnutí<sup>3,6,8</sup>. Pacient umírá nejčastěji na laryngeální obstrukci, cirkulační šok nebo maligní arytmii<sup>6</sup>.

Velká lokální reakce se vyvíjí během několika minut až hodin a přetrvává několik dnů až týdnů<sup>3</sup>. Její nebezpečí tkví při lokalizaci v oblasti hlavy a krku, kde může způsobit obstrukci horních cest dýchacích. Patogeneze této reakce není zcela jasná. V 50-80% případů byl nalezen IgE zprostředkovaný mechanismus (pozitivita RAST nebo kožních testů), zbytek by mohly tvořit reakce pozdního typu precitlivělosti či kombinace obou typů reakcí<sup>3,17</sup>.

**Tabulka 3.1-1: Klasifikace alergické reakce po bodnutí Hymenopter (podle Muellera)**

<b>rozsah alergické reakce</b>	<b>stupeň</b>	<b>projevy</b>
velká lokální reakce	0	otok v místě bodnutí >10 cm v průměru (u dětí přesahující 2 sousední klouby), trvající déle než 24 hodin
systémová reakce	I	generalizovaná urtika, svědění a úzkost
	II	některý z výše uvedených + 2 a více následujících příznaků: angioedém, svírání na hrudi, nauzea, zvracení, průjem, bolesti břicha a závratě
	III.	některé z výše uvedených + 2 a více následujících příznaků: dyspnoe, sípání, stridor, dysfagie, dysartrie, chrapot, slabost, zmatenost, pocit ohrožení života.
	IV	některý z výše uvedených + 2 a více následujících příznaků: prudké snížení krevního tlaku, kolaps, ztráta vědomí, cyanóza. inkontinence (moči, stolice)

### **3.2 Neobvyklá reakce po bodnutí Hymenopter**

Přibližně 10% imunopatologických reakcí po bodnutí hmyzem tvoří non-IgE zprostředkované reakce. V séru takových pacientů nejsou přítomny protilátky IgE a jejich kožní testy s příslušným jedem jsou negativní<sup>9</sup>.

Časový interval nástupu reakce po bodnutí a její klinický průběh je odlišný od běžné IgE zprostředkované reakce a proto se tyto reakce označují jako neobvyklé (atypické)<sup>3</sup>. Patogeneticky se může jednat o přímou aktivaci mastocytů a bazofilů složkami jedu či složkami komplementu C5a a C3a nebo o hypersenzitivitu imunokomplexového typu, zprostředkovanou protilátkami IgG<sup>3,8</sup>. Kromě toho některé typy reakcí po bodnutí blanokřídlým hmyzem nevznikají na imunologickém podkladě, ačkoli mohou alergickou reakci napodobovat<sup>3</sup>.

Klinicky se neobvyklé reakce projevují příznaky postižení nervového systému (mononeuropatie, polyradikulopatie, epileptické křeče, encefalopatie), sérové nemoci (horečka, artralgie, lymfadenopatie), poškození ledvin (glomerulonefritida), vaskulitidy a vzácně i poruchy krevní srážlivosti<sup>3</sup>. Přehled atypických reakcí po bodnutí blanokřídlých uvádí tabulak 3.2-1.

**Tabulka 3.2-1: Atypické reakce po bodnutí Hymenopter (podle Muellera)**

syndrom sérové nemoci	horečka, artralgie, artritida, lymfadenopatie, exantém, generalizovaná vaskulitida, vaskulitická purpura
poruchy ledvin	glomerulonefritida, nefrotický syndrom
poruchy nervového systému	periferní neuritida, polyradikuloneuritida, epileptické záchvaty, reverzibilní a ireverzibilní poruchy CNS
poruchy krve	trombocytopenie, hemolytická anemie, DIC
srdeční poruchy	angina pectoris, infarkt myokardu a arytmie

### **3.3 Toxická reakce po bodnutí Hymenopter**

Toxická reakce vzniká po mnohočetném pobodání, což představuje dávka 50 a více bodnutí<sup>3</sup>. V tomto případě se uplatňuje přímý farmakologický či cytotoxický efekt složek jedu (např. melittinu, kininů a fosfolipázy), ačkoli nelze vyloučit ani koincidenci těžké imunopatologické reakce<sup>3,6</sup>. Dominuje poškození ledvin (hemolýza a rhabdomyolýza s následnou akutní tubulární nekrozou ledvin), jater (zvýšení transamináz, ikterus až poruchy hemokoagulace s možnou progresí do diseminované intravaskulární koagulopatie) a kůže (hemoragické nekrózy kolem vpichů)<sup>3</sup>.



## 4 Diagnostika

Diagnostické testy slouží k odhalení odpovědného hmyzu, závažnosti alergické reakce, určení patogenetického mechanismu a jsou také základním indikačním kritériem k zahájení specifické alergenové imunoterapie<sup>17</sup>. Rutinní diagnostika IgE zprostředkované alergie na jed blanokřídlých je založena na anamnéze nežádoucí reakce po bodnutí, potvrzené reaktivitou kožních mastocytů nebo průkazem specifických protilátek IgE<sup>3,26</sup>. V případech, kdy není prokázán IgE zprostředkovaný mechanismus, je nutno pro potvrzení klinicky relevantní senzitivace užít nějakou jinou diagnostickou metodu.

### 4.1 Anamnéza

Základ diagnózy je anamnéza. V případě alergie na jed blanokřídlých je zaměřena na identifikaci příslušného hmyzu, zda se jednalo o reakci alergickou nebo nealergickou a jak vysoké je riziko opakování nežádoucí reakce při následujícím bodnutí<sup>3</sup>.

Určení viníka bodnutí se opírá o jeho životní zvyklosti, morfologii a způsob bodnutí hmyzu. Dotazy jsou směřovány na vzhled hmyzu (pacient sám hmyz popíše či identifikuje podle fotografií), zda v ráně zůstalo žihadlo (typické pro včelu), ve kterém ročním období k bodnutí došlo (včela bodá nejčastěji na konci jara a na začátku léta, vosy spíše na konci léta a na začátku podzimu) a kde k bodnutí došlo (bodnutí v blízkosti spadlého ovoce, odpadků a syrového masa jsou charakteristická pro vosu, bodnutí při zahradničení, trhání květin a chození naboso svědčí pro včelu)<sup>3</sup>.

Dalším diagnostickým krokem je odlišení symptomů, svědčících pro alergickou reakci, od těch, které nejsou k alergické reakci vztaženy a vznikají následkem hyperventilace či reakce na bolest u neurastenických osob (např. periorální parestézie, karpopedální spazmy, vazovagální synkopa, palpitace, nauzea, zvracení a závrať) a které jsou klinicky významné pouze v případě současného výskytu symptomů typických pro alergickou reakci<sup>3</sup>.

Riziko opakování nežádoucí reakce po bodnutí se stanovuje z tíže předešlé reakce (viz tabulka 3.1.-1) a ze stupně expozice (tj. pravděpodobnosti opětovného bodnutí). Stupeň expozice lze odhadnout z počtu bodnutí v určitém časovém intervalu, oblasti, ve které pacient žije (město, venkov) a životního stylu (zaměstnání, koníčky). Vyšší riziko mají včelaři a jejich rodiny, zemědělci, děti a lidé žijící na venkově<sup>3</sup>.

### 4.2 In vivo metody diagnostiky alergie na jed Hymenopter

#### 4.2.1 Kožní testy

Kožní testy jedovými extrakty příslušného hmyzu představují metodu první volby v diagnostice IgE zprostředkované alergie<sup>8</sup>. Jak pro diagnostiku, tak pro následnou imunoterapii je vhodné užít purifikované a standardizované alergenové extrakty<sup>27</sup>. Kožní testy by se měly provádět nejdříve za dva týdny od posledního bodnutí testovaného hmyzu a v případě negativity výsledku, spolu s diagnózou relevantní systémové reakce po bodnutí, je možno test opakovat za jeden až dva měsíce<sup>17</sup>. Testovat je možné i během jednoho roku po posledním bodnutí<sup>3</sup>.

Test se provádí metodou „end-point titrace“ s postupně stoupající koncentrací jedu, aplikovaného formou prick testů nebo intradermálně na volární stranu předloktí. Nejnižší koncentrace jedového extraktu, která ještě vyvolá pozitivní kožní reakci se nazývá „end point“ koncentrace<sup>17</sup>. Výsledek testu je pozitivní, pokud se do 15 minut objeví pupen velikosti  $\geq 3\text{mm}$  (u prick-testů) nebo  $\geq 5\text{mm}$  (u intradermálních testů), event. obklopený erytémem<sup>8</sup>.

Při negativitě výsledku testu s nižší koncentrací extraktu se užijí postupně koncentrace desetinásobně vyšší nebo lze alternativně aplikovat všechny koncentrace současně<sup>3</sup>.

Používané koncentrace u prick-testů jsou 0,1µg/ml až 100µg/ml. V případě jejich negativity se užije intradermální test, který má vyšší senzitivitu<sup>17</sup>. Aplikovaný objem u intradermálních testů je obvykle 0,02 ml a koncentrace jedového extraktu se pohybuje od 0,00001µg/ml do 0,001µg/ml<sup>3,8</sup>.

Kontraindikace provedení kožních testů shrnuje tabulka 4.2-1<sup>8</sup>. Současně je nutné provést pozitivní kontrolní kožní testy (obv. s kodeinem či histaminem) a negativní kontrolní kožní testy (rozpouštědlo: obv. fyziologický roztok) k vyloučení snížené nebo zvýšené kožní reaktivity<sup>3,8</sup>. Senzitivita testu závisí na koncentraci užitého alergenu. Při koncentraci alergenu 1µg/ml je senzitivita intrakutánních testů 90-100%; při koncentracích nižších senzitivita klesá, zatímco při koncentracích vyšších klesá specifická testu (nespecifické uvolňování mediátorů z kožních mastocytů)<sup>3</sup>.

Falešně negativní výsledky se mohou objevit, pokud není dodržen časový interval refrakterní fáze, je-li testovaný jedový extrakt je vadný, je snížena kožní reaktivita pacienta (např. v důsledku léčby antihistaminiky či neuroleptiky fenothiazinového typu), je užit jed nesprávného hmyzu nebo se nejedná o alergickou reakci časného typu<sup>3</sup>.

Falešně pozitivní výsledky vznikají, pokud došlo k senzibilizaci pacienta při posledním bodnutí, když je testovaný roztok kontaminován dráždivými látkami, pokud jsou v séru pacienta zkříženě reagující IgE protilátky proti uhlovodíkovým determinantám různých hmyzích a rostlinných alergenů nebo pokud je překročena limitující koncentrace pro kožní testování (tj. dochází k toxické reakci na kůži, jejímž podkladem je přímému uvolnění histaminu a jiných biogenních aminů z kožních mastocytů)<sup>3</sup>.

Kožní reaktivita na příslušný alergen nekoreluje s tíží alergické reakce, ačkoli u alergických pacientů je větší podíl pozitivních ve skupině se systémovou reakcí než ve skupině s velkou lokální reakcí<sup>3,18</sup>.

Uvádí se, že 19% osob s pozitivním kožním testem, ale bez anamnesticky zjištěné alergické reakce na bodnutí mělo systémovou reakci při pozdějším bodnutí, což ukazuje na možnou subklinickou senzitivizaci<sup>3</sup>. Podle různých studií 25-84% osob s anamnézou reakce na bodnutí nereagovalo při kožním testování a 0-22% osob s negativními kožními testy vyvinulo následně systémovou reakci<sup>17</sup>.

Systémové alergické reakce se v důsledku kožního testování objevují velmi vzácně a pouze příležitostně lze pozorovat pozdní lokální reakce tuberkulinového typu<sup>3</sup>.

**Tabulka 4.2-1: Kontraindikace pro provedení kožních testů**

Akutní horečnaté onemocnění
Exacerbace alergického onemocnění
Léčba antihistaminiky v období kratším, než je trvání jejich biologické eliminace z organismu
Léčba hydroxyzinem v posledních 4 dnech před testem
Léčba tricyklickými antidepresivy v období 2 týdny před testem
Systémová léčba kortikosteroidy v dávce minimálně 20mg prednizonu denně
Lokální léčba kortikosteroidy v místě testování v období 3 týdnů před testem
Kožní onemocnění znemožňující spolehlivé odečtení testů
Systémová reakce během kožního testování v anamnéze
Těhotenství

## 4.2.2 Expoziční testy

V případech anafylaxe se zapojením jiných patogenetických mechanismů než zprostředkovaných protilátkami IgE, mohou být nejsenzitivnější diagnostickou metodou alergie na jed *Hymenopter* expoziční testy bodnutím příslušným hmyzem<sup>26</sup>. Jelikož u pacientů, neléčených jedovou imunoterapií, existuje během této vyšetřovací metody riziko závažné anafylaxe, není rutinní diagnostika expozičními testy u těchto pacientů doporučena<sup>3, 26</sup>. Hlavní indikací k provedení expozičního testu je zhodnocení účinnosti probíhající jedové imunoterapie nebo monitorování ochranného efektu jedové imunoterapie po jejím skončení<sup>26,28</sup>. Zvláště přínosné jsou expoziční testy u pacientů s vysokým rizikem expozice jako jsou např. včelaři<sup>3</sup>. Jejich nevýhodou je jednak nemožnost zajištění standardizace kvality i kvantity jedu během testu (to platí především pro vosy<sup>3</sup>) a jednak existují případy, kdy pacienti, ačkoli byl jejich expoziční test negativní, vyvinuli při následujícím bodnutí systémovou reakci<sup>3, 28</sup>. Navíc zde existuje určité riziko posílení již snížené senzitivizace nebo opětovná resenzitivizace pacienta a proto patří expoziční test spíše k diagnostickým metodám experimentálním<sup>26</sup>. Další nevýhodou je nutnost observace pacienta na jednotce intenzivní péče během i po skončení testu, což zvyšuje náklady na jeho provedení. Kontraindikací k provedení testu je těhotenství, akutní zánětlivé onemocnění, léčba beta-blokátory a dekompenzované kardiovaskulární či plicní onemocnění<sup>28</sup>.

## 4.3 In vitro metody diagnostiky alergie na jed *Hymenopter*

### 4.3.1 Měření jedově specifických IgE protilátek v séru

Nejčastěji užívanou *in vitro* metodou diagnostiky IgE zprostředkované alergie na jed *Hymenopter*, je určení hladiny jedově specifických IgE protilátek v séru pacienta. Měření je prováděno pomocí RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test) nebo pomocí jiné imunoanalytické metody (např. ELISA, FEIA)<sup>17</sup>. Množství jedově specifických IgE protilátek odpovídá intenzitě radioaktivity a je udáváno buď v mezinárodních jednotkách (kIU/ml) nebo v tzv. RAST třídách (0 až 6)<sup>8</sup>. Senzitivita a specifita RAST je sice ve srovnání s kožními intradermálními testy nižší<sup>29</sup>, a to zvláště u jedu vosího<sup>3</sup>, ale vyšetření může být přínosné v případech, kdy nelze kožní testy provést (kontraindikace, nesouhlas pacienta, není dostupný spolehlivý alergenový extrakt). Interpretace výsledků musí zohlednit jednak faktory, týkající se metodiky a jednak faktory, týkající se pacientova stavu (věk, hodnota celkového IgE, časový interval od posledního bodnutí, komorbidita apod.)<sup>3</sup>.

Zvláště významný je časový interval od posledního bodnutí. Během alergické reakce dochází ke konzumpci cirkulujících alergen specifických IgE a jejich hodnota je nízká nebo dokonce nedetekovatelná<sup>17</sup>. Poté jejich hladina dny až týdny značně stoupá a pak s individuální rychlostí klesá až se mohou nakonec stát jedově specifické IgE negativní<sup>3,17</sup>. Uvádí se, že 6 měsíců po poslední anafylaktické reakci je pozitivních 96% pacientů, alergických na včelu vs. 77% pacientů, alergických na vosu, zatímco po 5ti letech od této reakce je tento podíl pozitivit 77% vs. 33%<sup>3</sup>. Doporučená doba provádění RAST z hlediska potvrzení IgE zprostředkované alergie by tedy neměla přesáhnout 6 měsíců od posledního bodnutí<sup>3</sup>.

Hodnoty jedově specifických IgE jsou nižší u osob nad 50 let věku a osob s velkou lokální reakcí po bodnutí. Naopak vyšší hodnoty jsou u osob pod 20 let věku a osob se systémovou reakcí po bodnutí, ačkoli hladina specifických IgE nekoreluje s tíží alergické reakce<sup>3, 17</sup>.

V závislosti na užití metodě a studované populaci je podíl asymptomatických pozitivit na jedově specifické IgE protilátky 5-30%. Falešně pozitivní výsledky RAST se mohou objevit u pacienta s velmi vysokou hladinou celkového IgE (nespecifická vazba IgE na

nitrocelulózu<sup>8</sup>), u zkřížené reaktivity (s jedy jiných druhů hmyzu nebo s CCD rostlinného původu), při senzibilizaci po posledním bodnutí a při subklinické senzitivizaci (jedno bodnutí je tolerováno, ale vícečetné se manifestuje alergickou reakcí)<sup>3</sup>.

Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny přítomností blokujících IgG protilátek nebo v důsledku příliš krátkého či naopak příliš dlouhého časového intervalu od poslední reakce a nebo v případě systémové mastocytózy, kdy je většina IgE adsorbována na povrchu mastocytů<sup>3</sup>.

#### 4.3.2 Měření jedově specifických IgG protilátek v séru

U pacientů, jež prodělali VIT, nebo u silně exponovaných jedinců (např. včelařů), jsou přítomny vysoké titry jedově specifických IgG protilátek a vůbec nejnápadněji je zvýšena hladina podtřídy IgG4<sup>3,30</sup>. Hladina jedově specifických IgG odráží nedávnou expozici alergenů, podtřída IgG4 pak prolongovanou expozici tomuto alergenů<sup>3, 30</sup>. U včelařů koreluje jejich hladina s počtem bodnutí za rok a délkou včelaření<sup>29</sup>. Jedově specifické IgG se zvyšují po bodnutí a pak rychle klesají (rychleji než jedově specifické IgE). Z toho důvodu se nehodí pro rutinní diagnostiku alergie, ale jsou použitelné pro kontrolu imunoterapie<sup>3</sup>.

Vyšetření jedově specifických IgG se provádí pomocí RIA, ELISA nebo jiné imunoanalýzy a výsledky jsou udávány v µg/ml<sup>3</sup>.

Role jedově specifických IgG není zcela jasná. Vzhledem k tomu, že infuze gamaglobulinů od včelařů přechodně snižuje reaktivitu pacientů, alergických na včelí jed, mohly by jedově specifické IgG protilátky, kompetitivní vazbou na příslušný alergen, sloužit jako alergen neutralizující nebo blokující protilátky<sup>3</sup>. V současnosti je také zvažována jejich role jako anti-idiotypových protilátek (autoprottilátek třídy IgG), které se tvoří během dlouhodobé stimulace jedem proti jedově specifickým protilátkám a způsobují jejich pokles<sup>9</sup>. Autoanti-IgE současně blokují uvolňování histaminu z bazofilů<sup>9</sup>.

Hladina specifických IgG nekoreluje s tíží alergické reakce a jejich přítomnost není asociována s prevencí před nepříznivou reakcí při následujícím bodnutí<sup>3</sup>, ačkoli ve skupině senzitivizovaných včelařů (systémová reakce na bodnutí včelou a pozitivní kožní testy nebo sérové specifické IgE) byly včelí jedově specifické IgG a IgG4 prokazatelně nižší, než ve skupině nesenzitivizovaných včelařů<sup>30</sup>.

#### 4.3.3 Funkční *in vitro* testy

Až na výjimky jsou tyto testy spíše metodami výzkumnými, neboť vyžadují zkušenosti a jsou časově a finančně náročné. Mohou být ovšem přínosné u non-IgE zprostředkovaných mechanismů alergie<sup>8</sup>. Smyslem těchto metod je napodobit *in vitro* kontakt mezi alergenem a efektorovými buňkami, odpovědnými za symptomy alergie<sup>31</sup>. Existují 2 možné přístupy. Jeden je založen na detekci množství mediátoru, uvolněného do tělesných tekutin (krve, nasálních a bronchiálních sekretů, sputa, kožních puchýřů nebo moči) z efektorových buněk, *in vitro* stimulovaných stoupajícími koncentracemi sledovaného alergenů<sup>26</sup>. Druhým přístupem je kvantifikace exprese membránových aktivačních znaků efektorových buněk po *in vitro* kontaktu s alergenem<sup>32</sup>.

##### 4.3.3.1 Test uvolňování histaminu z bazofilů

Během testu uvolňování histaminu z bazofilů („Histamine release test“ - HRT) jsou vzorky krve pacienta vystaveny stoupající koncentraci alergenů (hodnocení indukovaného uvolňování histaminu) a anti-IgE (hodnocení spontánního uvolňování histaminu)<sup>26</sup>. Množství uvolněného histaminu, měřeného v supernatantu, je vyjádřeno jako procento z celkového množství (získaného následnou lýzou bazofilů) po korekci pro spontánní uvolňování<sup>26</sup>. Kvantifikace histaminu se provádí technikou ELISA nebo RIA<sup>8</sup>. *In vitro* expozici periferních bazofilů suspektnímu alergenů je možno provést mimo období kožního testování nebo

přirozené expozice<sup>26</sup>. Pro potřeby jedové alergie je nutno užít koncentrace alergenu nižší než 1µg/ml<sup>3</sup>. U hypersenzitivity na jed *Hymenoptera* byla senzitivita tohoto testu 64% pro alergii na jed včely a 50% pro alergii na jed vosy<sup>26</sup>.

#### 4.3.3.2 Analýza tryptázy

Podobně jako u HRT je také možno měřit, pomocí RIA nebo komerčně dostupné UniCAP-Tryptase fluoroimunoassay, uvolňování tryptázy po *in vitro* expozici bazofilů stoupajícím koncentracím alergenu<sup>26</sup>. Mnohem častěji, než hladina tryptázy po stimulaci bazofilů alergenem *in vitro*, je hodnocena bazální hladina sérová tryptázy.

Tryptáza je neutrální serinová proteáza obsažená v mastocytech a v malém množství také v bazofilech<sup>26</sup>. Existuje ve dvou formách ( $\alpha$ -tryptáza a  $\beta$ -tryptáza), přičemž  $\alpha$ -tryptáza je secernována konstitutivně, zatímco  $\beta$ -tryptáza je skladována v granulech mastocytů a uvolňovaná během jejich degranulace spolu s ostatními preformovanými mediátory<sup>33</sup>. Normální bazální hladina celkové tryptázy je < 13,5µg/l<sup>8</sup>. Jelikož se tryptáza nevyskytuje v jiných buňkách, je její zvýšení v séru nebo tkáňové tekutině známkou degranulace ( $\beta$ -tryptáza) nebo zmnožení mastocytů<sup>26</sup>. V případě degranulace mastocytů zůstávají hladiny  $\beta$ -tryptázy elevované mnohem déle než hladiny histaminu a proto je jí s výhodou užíváno při průkazu proběhlé anafylaxe, dokonce i post mortem<sup>33</sup>. Vyjma anafylaxe byly hladiny  $\beta$ -tryptázy zvýšeny i v některých případech syndromu náhlého úmrtí kojence (SIDS) nebo embolizace plodovou vodou<sup>33</sup>. Degranulace mastocytů a bazofilů může být navozena, kromě imunologických mechanismů (IgE zprostředkovanými, non-IgE zprostředkovanými), také fyzikálními faktory (např. termické či mechanické trauma)<sup>33</sup>. Hodnoty  $\beta$ -tryptázy  $\geq 20\mu\text{g/l}$  svědčí pro anafylaktickou reakci I. typu, hladiny nižší spíše pro neimunologický mechanismus aktivace degranulace<sup>8</sup>.

Hladiny celkové tryptázy nad 20µg/l a poměr celkové tryptázy k  $\beta$ -tryptáze > 20 svědčí pro systémovou mastocytózu. Senzitivita testu je 83% a specificita >98%<sup>33</sup>. Systémová mastocytóza se objevuje asi u 1% pacientů, alergických na jed *Hymenoptera*<sup>21</sup>. Elevovaná bazální hladina sérové tryptázy nebo systémová mastocytóza bývá asociována se závažnou nebo fatální anafylaktickou reakcí po bodnutí *Hymenoptera*<sup>20,21</sup>. Kromě toho je systémová mastocytóza rizikovým faktorem závažných nežádoucích reakcí po podání VIT, snížené efektivity VIT a častějšího selhání VIT. Navíc se u systémové mastocytózy častěji objevuje nedostatek senzitivace v kožních testech nebo RAST<sup>21</sup>.

#### 4.3.3.3 Analýza cysteinyl leukotrienů

Cysteinyl-leukotrieny (CysLT) jsou spolu s histaminem uvolňovány po *in vitro* stimulaci periferních bazofilů alergenem, zvláště pokud jsou bazofily inkubovány společně s IL-3, IL-5 nebo GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)<sup>26</sup>. Měření CysLT je prováděno pomocí CAST (Cellular Antigen Stimulation Test) ELISA<sup>8,26</sup>. Senzitivita testu je 81% pro alergii na jed vosy a 82% pro alergii na jed včely<sup>26</sup>.

#### 4.3.3.4 Test aktivace bazofilů

Test aktivace bazofilů („Basophil activation test“ - BAT) je jednou z novějších metod *in vitro* diagnostiky IgE zprostředkované, ale i non-IgE zprostředkované alergie<sup>34</sup>. Spočívá v kvantifikaci exprese membránových aktivačních znaků bazofilů, stimulovaných suspektním alergenem *in vitro*<sup>31, 32, 35</sup>. Detekce aktivačních znaků je prováděna s využitím monoklonálních protilátek a jejich následná kvantifikace pomocí průtokové cytometrie. Pokud jsou použity purifikované nebo rekombinantní alergeny je možno určit senzibilizaci na jednotlivé složky alergenového extraktu a podle toho pak zvolit příslušnou specifickou alergenovou imunoterapii<sup>35</sup>.

Bazofily rozpoznávají alergen pomocí specifického IgE, navázaného na vysoce afinitní Fc receptor (FcεRI). Po přemostění dvou sousedních IgE dojde nejen k degranulaci bazofilů, ale také ke zvýšené expresi některých jejich membránových znaků (tzv. aktivačních). Nejčastěji detekovanými aktivačními znaky jsou CD63 a CD203c<sup>32</sup>. CD63 je u klidových bazofilů zakotven v membráně cytoplazmatických granulí a je pouze slabě exprimován na povrchu cytoplazmatické membrány. Při degranulaci bazofilů dojde, v důsledku fúze granulí s cytoplazmatickou membránou, ke značnému zvýšení exprese CD63 na povrchu bazofilů<sup>32</sup>. Proto CD63 velmi dobře koreluje s degranulací bazofilů<sup>32, 35</sup>. Zatímco CD63 je slabě exprimován na buněčných membránách i jiných buněk (např. monocytů, makrofágů, trombocytů), CD203c je exprimován výlučně na mastocytech, bazofilech a jejich prekurzorech<sup>32, 36</sup>. Také exprese povrchového CD203c se zvyšuje v souvislosti s aktivací bazofilů, ale toto zvýšení je ve srovnání s nárůstem exprese CD63 méně nápadné<sup>34</sup>.

Vyšetření se provádí ze vzorků plné, heparinizované krve, ke které je po preinkubaci s IL-3 přidán specifický alergen. Jako negativní kontrola (tj. spontánní exprese CD63) je užit ředící roztok a jako pozitivní kontrola (tj. aktivace co možná nejvyššího počtu bazofilů) je prováděna stimulace pomocí monoklonální protilátky anti-IgE nebo nověji pomocí anti-FcεRI<sup>34</sup>. K detekci samotných bazofilů se užívá značená monoklonální protilátka proti lidskému IgE (anti-IgE) nebo proti CD203c (anti-CD203c). K detekci aktivačních znaků bazofilů, tj. k detekci CD63, je užívána značená monoklonální protilátka proti CD63 (anti-CD63). Výsledkem je procento aktivovaných bazofilů, tj. anti-IgE+/CD63+ nebo CD203c+/CD63+<sup>35</sup>.

Postupem času byly vyvíjeny varianty BAT s užitím jiných kombinací aktivačních znaků bazofilů (např. kombinace CRTH2/CD3/CD203c), přesto se detekce CD63 a CD203c jeví současně jako nejvíce spolehlivá metoda<sup>36</sup>.

Senzitivita a specifita BAT s jedním *Hymenopter* je podle některých studií srovnatelná nebo lepší než měření kožní reaktivity či sérových specifických IgE a navíc bylo možno v některých případech odstranit nutnost expozičních testů (např. u některých pacientů s neprůkaznými kožními testy nebo specifickými protilátkami IgE)<sup>34</sup>.

#### 4.3.4 Western blot

Tato metoda je spíše experimentální, neboť rutinní zavedení do praxe by bylo příliš nákladné. Její výhodou je ovšem značná senzitivita, čímž se do jisté míry eliminují falešně negativní výsledky a tedy možnost potenciálně závažné nebo fatální reakce po bodnutí hmyzem. Navíc je možno, díky separaci jedového extraktu na jednotlivé proteiny, zjistit vzorec specifických protilátek proti určitým alergenům u jednotlivého pacienta. Podle jedné studie dosahovala senzitivita Western blotu až 96,6% ve srovnání se senzitivitou kožních testů a jedově specifických IgE, kde dosahovala senzitivita 87% resp. 90%<sup>37</sup>. Tento nárůst senzitivity byl však doprovázen poklesem specifity na 70% u Western blotu vs. 90% a 93% u kožních testů resp. specifického IgE. Možným vysvětlením takového poklesu specifity by mohla být, kromě jiného, subklinická senzitivace pacienta<sup>37</sup>.

## 5 Léčba a prevence

Současná strategie léčby alergických onemocnění zahrnuje eliminaci alergenu, farmakoterapii, specifickou alergenovou imunoterapii a edukaci pacienta<sup>38</sup>. Kausální terapií alergických chorob (tj. průběh modifikující) je eliminace alergenu a specifická imunoterapie příslušným alergenem; farmakoterapie je považována za léčbu symptomatickou<sup>38</sup>. Eliminace alergenu stojí na prvním místě, dokonce i když nelze dosáhnout úplného odstranění alergenu<sup>38</sup>. V rámci alergie na jed *Hymenoptera* představují tento krok všeobecná preventivní opatření, zabraňující dalšímu bodnutí. U pacientů se závažnou reakcí na jed *Hymenoptera* je proto jedová imunoterapie dalším kausálním postupem zabraňující opakování anafylaxe. Bohužel, ani tato léčba nemá absolutní účinnost, je časově i finančně nákladná a není bez vedlejších účinků.

### 5.1 Všeobecná preventivní opatření

Nejjednodušším krokem k zabránění opakování nežádoucí reakce po bodnutí *Hymenoptera* je eliminovat riziko náhodného bodnutí. V této souvislosti je třeba se zmínit o aktivitách, které představují zvýšené riziko bodnutí, zvláště během sezónního výskytu hmyzu (viz tab. 5.1-1).

Vzhledem k tomu, že k bodnutí dochází nejčastěji při podráždění hmyzu nebo při překročení kritické vzdálenosti od hnízda, je velmi nebezpečné zdržovat se v blízkosti hnízda nebo s ním dokonce manipulovat<sup>3, 6, 39</sup>. Další doporučení se týkají vhodného oblékání (co možná nejméně odhalených částí těla, barva oblečení nepřitahující hmyz, nošení uzavřené obuvi), používání ochranných pomůcek při rizikových aktivitách (gumové rukavice, repelenty), nepožívání rizikových potravin ve venkovním prostředí (např. ovoce, slazené nápoje), vyřazení kosmetiky přitahující hmyz (hlavně parfémované přípravky), pravidelného uklízení (vč. pečlivého uzavírání odpadků) a omezení dýchání ústy<sup>3,6,39</sup>.

Pacient, alergický na jed *Hymenoptera*, by měl vždy u sebe nosit pohotovostní balíček s přesným návodem k použití, zvláště v období sezónního výskytu hmyzu<sup>3, 40</sup>. Jeho součástí je adrenalin (obv. ve formě autoinjektoru), perorální nebo rektální kortikosteroid (Prednison forte, Medrol, Rectodelt), perorální antihistaminikum (Dithiaden tbl., Zyrtec gtt.), inhalační  $\beta_2$ -mimetikum (Ventolin, Berotec aerosol), škrtidlo, event. dezinfekce, jehla injekční stříkačka a návod k použití<sup>40</sup>. Preskripce adrenalinu je indikována u všech pacientů se závažnou anafylaxií, tj. u pacientů s respiračními nebo kardiovaskulárními poruchami při předchozí reakci (stupeň III až IV dle Muellerovy klasifikace); u mírnějších stupňů není obvykle preskripce doporučena<sup>3, 41</sup>. S výhodou je užíván adrenalin ve formě autoinjektoru s fixní dávkou v předplněné injekční stříkačce (Anapen 0,3mg či Epipen 0,3mg pro dospělé a Anapen junior 0,15mg či Epipen junior 0,15mg pro děti), neboť ve srovnání s klasickou ampulí adrenalinu, injekční jehlou a stříkačkou šetří čas, potřebný k jeho aplikaci, a eliminuje riziko kolísání aktuálně podané dávky adrenalinu<sup>41</sup>.

Jestliže již k bodnutí došlo a v ráně zůstalo žihadlo, je nutné ho co nejdříve odstranit, aby se snížila dávka jedu vpravená do organismu<sup>3</sup>.

Pacienti s kardiovaskulárním onemocněním, zvláště pokud jsou léčeni  $\beta$ -blokátory nebo inhibitory ACE, mají zvýšené riziko závažné nebo obtížně terapeuticky zvládnutelné anafylaxe. Pokud je u takových pacientů diagnostikována alergie na jed *Hymenoptera*, měli by být, pokud možno, převedeni na farmaka s odlišným mechanismem účinku.<sup>3,39</sup>

**Tabulka 5.1-1: Aktivity, které představují zvýšené riziko náhodného bodnutí**

Pojídání a popíjení venku Chození naboso Zahradničení Česání a sběr ovoce Provozování venkovních sportů Neodborná manipulace s hnízdem
---

## 5.2 Léčba anafylaktické reakce

Anafylaxe je definována jako závažná, život ohrožující generalizovaná nebo systémová hypersenzitivní reakce.<sup>41</sup>

WAO („World Allergy Organisation“) doporučila užívat pro anafylaxi navozenou imunologickými mechanismy termín alergická anafylaxe. V případě, že je do patogeneze anafylaxe zapojen neimunologický mechanismus, měl by být užíván termín nealergická anafylaxe<sup>41</sup>.

Pro adekvátní zvládnutí anafylaktické reakce je nezbytné včasné rozpoznání jejích symptomů a okamžité zahájení léčby, neboť bez léčby může reakce rychle progredovat do závažnějších stupňů nebo přímo skončit fatálně.

Neexistuje žádný diagnostický test, specifický pro anafylaxi - diagnóza je založena na náhlém vzniku typických symptomů<sup>8</sup>. Diagnostikovat anafylaxi může být obtížné v případě jejího prvního výskytu, zvláště, pokud se taková reakce objeví mimo zdravotnické zařízení. Proto byla stanovena klinická kritéria, usnadňující diagnózu anafylaxe jak lékařům, tak laikům (viz. tabulka 5.2-1)<sup>41</sup>. Diferenciálně diagnosticky nutno vyloučit vazovagální synkopu, hypoglykémii, infarkt myokardu, srdeční arytmií, epileptický záchvat, aspiraci cizího tělesa, panickou ataku aj.<sup>8, 40, 41</sup>

**Tabulka 5.2-1: Klinická kritéria pro diagnózu anafylaxe**

Diagnóza anafylaxe je velmi pravděpodobná, pokud je splněno jakékoli z následujících 3 kritérií: 1. Akutní začátek onemocnění (minuty až několik hodin) s postižením kůže, sliznice či obou (např. generalizovaná kopřivka, pruritus či zčervenání, otok rtů-jazyka-uvuly). A nejméně jeden z následujících příznaků: a/ respirační porucha (např. dyspnoe, bronchospasmus, stridor, hypoxie) b/ kardiovaskulární porucha (např. hypotenze, kolaps) 2. Dva a více z následujících, jež se objeví rychle (minuty až několik hodin) po expozici pravděpodobnému alergenu: a/ postižení kůže nebo sliznice (např. generalizovaná urtika, svědění, zčervenání, otok) b/ respirační porucha (např. dyspnoe, bronchospasmus, stridor, hypoxie) c/ kardiovaskulární porucha (např. hypotenze, kolaps) d/ perzistující symptomy postižení gastrointestinálního traktu (např. záchvaty abdominální bolesti, zvracení) 3. Hypotenze, jež se objeví rychle (minuty až několik hodin) po expozici známému alergenu
--

Laboratorní vyšetření (kožní testy, sérové specifické IgE) jsou prováděna s odstupem několika týdnů od odeznění akutní reakce a slouží obvykle k potvrzení diagnózy<sup>8,40</sup>. V akutním stádiu může být přínosné vyšetření sérové hladiny  $\beta$ -tryptázy (její hladina koreluje s tíží reakce) nebo vyšetření metabolitů histaminu v moči (např. N-metylhistamin či N-metylimidazolová kyselina - NIMA<sup>21</sup>)<sup>8</sup>.

Léčba anafylaxe s kládá z předlékařské první pomoci, lékařské ambulanti péče a nemocniční péče.



První pomoc (laická, předlékařská) spočívá v co nejrychlejší podání léků z pohotovostního balíčku, udržení vitálních funkcí (event. zahájení kardiopulmonální resuscitace) a přerušení působení kauzálního agens (zaškrtnit končetinu nad místem bodnutí, odstranit žihadlo, chladit místo vpichu)<sup>40</sup>. V případě závažné anafylaxe je podání adrenalinu závazné - preferenčně i.m. do m. vastus lateralis (lepší biologická dostupnost, méně nežádoucích účinků a dlouhodobější efekt než při i.v. podání)<sup>41</sup>. Alternativně lze dávku adrenalinu rozdělit, část podat do okolí místa bodnutí hmyzem a část do m. vastus lateralis<sup>40</sup>. Ostatní léky, podávané během epizody anafylaxe jsou považovány za adjuvans<sup>41</sup>.

Lékařská ambulantní péče navazuje na předlékařskou první pomoc a zahrnuje aplikaci farmak, podání kyslíku (5-10l/min - maskou bez zpětného vdechování), zajištění žilního vstupu (při neúspěchu možný intraoseální vstup), udržení vitálních funkcí a pravidelné monitorování stavu<sup>40</sup>. Začíná rychlým posouzením vitálních funkcí (event. se zahájením kardiopulmonální resuscitace)<sup>39</sup>. Dávka adrenalinu (1mg/ml) se u dospělých pohybuje od 0,3 do 0,5mg i.m. (maximální jednotlivá dávka je 1mg i.m.)<sup>8</sup>. U dětí pod 10kg tělesné hmotnosti (těl.hm.) je dávka adrenalinu (1mg/ml) 0,01mg/kg těl.hm., u dětí s těl.hm. 10-30kg je dávka 0,15mg a u dětí nad 30kg těl.hm. 0,3mg; maximální jednotlivá dávka u dětí je 0,5mg (10µg/kg těl.hm.)<sup>41</sup>. V případě neúspěchu lze dávku každých 5-15min opakovat až do zlepšení klinického stavu<sup>39</sup>. U pacientů, nereagujících na adrenalin, podaný i.m., je nutno podat adrenalin (1mg/ml) i.v. v dávce 1mg na 500ml infuze (např. fyziologický roztok; 5% glukóza), rychlostí 0,25-2,5ml/min u dospělých a 0,1µg/kg/min u dětí<sup>8, 41</sup> nebo zředěný adrenalin (0,1mg/ml) i.v. (pomalu frakcionovaně) v dávce 0,3-0,5mg u dospělých a 0,01mg/kg u dětí<sup>42</sup>. Tam, kde je přítomna laryngeální nebo bronchiální obstrukce, lze podat adrenalin inhalačně nebulizátorem<sup>41</sup>.

V případě hypotenze nebo kolapsu je nutné podat adrenalin (viz výše), kyslík (5-10l/min), krystaloidy či koloidy rychle i.v./i.o. (dospělí 1000-2000ml; děti 20-30ml/kg v první hodině<sup>40</sup>), antihistaminika i.v./i.o./i.m. (clemastin 1mg/ml: u dospělých 1-2mg, u dětí 0,0125-0,025 mg/kg) a kortikosteroidy i.v./i.o. (metylprednizolon - u dospělých 80mg, u dětí 2mg/kg)<sup>42</sup>. Pokud nedojde k úpravě stavu nebo stav progreduje, opakovat dávky adrenalinu i.m., opakovat objemovou výzvu a event. zahájit inotropní podporu (adrenalin či dopamin i.v.) nejlépe za invazivního monitorování krevního tlaku<sup>41</sup>.

V případě mírné až středně závažné bronchiální obstrukce podat kyslík (5-10l/min), inhalačně β2-mimetika (Ventolin, Berotec aerosol) v dávce 2 vdechy, i opakovaně nebo alternativně nebulizací<sup>40</sup>. Pokud nastane těžká bronchiální obstrukce, podat nebulizátorem adrenalin (1mg/ml) a event. kortikosteroidy i.v. (Prednisolon 50mg nebo Metylprednisolon 40mg) a zajistit vstup do cévního řečiště<sup>41</sup>.

V případě laryngeální obstrukce podat kyslík a inhalačně adrenalin, v těžších případech nutná intubace, tracheotomie nebo koniotomie<sup>39</sup>.

Izolovaná urtika nebo angioedém nejsou indikací k podání adrenalinu. Jsou podávána antihistaminika p.o./parenterálně, v případě závažnějších symptomů možno podat i kortikosteroidy p.o./parenterálně a pokud symptomy přes veškerá opatření progredují do závažnějších stupňů alergické reakce, nutno podat adrenalin i.m.<sup>41</sup>.

U nauzey a zvracení je podáván glukagon 0,1mg/kg i.v. (platí pouze pro dospělé pacienty, léčené β-blokátory)<sup>39</sup>.

Stavy provázené selháním dechu a oběhu vyžadují transport v doprovodu lékaře na jednotku intenzivní péče nebo oddělení ARO nejbližší nemocnice. Také stavy, úspěšně ambulantně zvládnuté, nutno hospitalizovat na standardním oddělení po dobu nejméně 24 hod za účelem observace (riziko pozdní fáze anafylaktické reakce)<sup>40</sup>.

Před propuštěním z nemocnice by měla být provedena edukace pacienta (event. i jeho zákonných zástupců), týkající se eliminace rizikových faktorů, rychlého rozpoznání symptomů anafylaxe a správného postupu během poskytování první pomoci (správné užití

adrenalinového autoinjektoru). Do tohoto procesu by měl být zapojen také praktický lékař a u dětí je žádoucí i edukace učitelů ve škole. Dále by měl být pacient vybaven pohotovostním balíčkem a co nejdříve by měla být zajištěna návštěva u alergologa k upřesnění diagnózy, odhadu rizika další anafylaxe a event. zvážení specifické imunoterapie<sup>41</sup>.

### 5.3 Léčba velké lokální reakce

Léčba velké lokální reakce spočívá v aplikaci chladu a event. podávání antihistaminik (p.o.) či steroidů (topických nebo p.o.); úlevu přináší i elevace postižené končetiny<sup>3</sup>. Pokud je otok lokalizován v obličejí nebo dutině ústní, je nutno pacienta sledovat a v případě dušnosti postupovat jako u laryngeálního edému (adrenalin inhalačně a i.m., event. intubace, koniotomie či tracheotomie).

### 5.4 Specifická alergenová imunoterapie jedem Hymenopter

Specifická imunoterapie jedem *Hymenopter* („venom immunotherapy“ - VIT) je kauzálním léčebně-preventivním postupem, který zabraňuje u pacientů s IgE zprostředkovaným mechanismem alergie opakování systémové alergické reakce po následujícím bodnutí<sup>4</sup>. Spočívá v postupném subkutánním podávání narůstajících dávek příslušného jedového extraktu, což vede ke klinickému zmírnění nebo vymizení symptomů u alergického subjektu při další expozici tomuto alergenu<sup>8</sup>.

#### 5.4.1 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku VIT není dosud zcela objasněn. Již v iniciální fázi VIT dochází ke krátkodobému potlačení imunitní odpovědi na alergeny. Vysvětlením může být přímý, supresivní efekt IL-10 na efektorové buňky (mastocyty, bazofily), které po *in vitro* stimulaci alergenem uvolňují nižší množství mediátorů anafylaxe (histamin nebo sulfidoleukotrieny)<sup>39</sup>. Kromě toho navozuje zvýšená tvorba IL-10 alergen specifickou anergii T-buněk<sup>3,39</sup>. Anergické T-buňky neprodukují cytokiny, které jsou zodpovědné za infiltraci, přežití a aktivitu efektorových buněk<sup>39</sup>.

Dlouhodobý účinek VIT je zřejmě navozen posunem rovnováhy od Th2 směrem k Th1 cytokinové produkci, tj. posunem od syntézy IL-4 a IL-5 (stimulace B buněk k produkci alergen specifického IgE) k syntéze IFN- $\gamma$  (stimulace B buněk k produkci alergen specifického IgG)<sup>8</sup>. Bylo zjištěno, že regulace sekrece alergen specifického IgE a IgG v odpovědi na včelí PLA<sub>2</sub> je řízena poměrem IL4/IFN- $\gamma$ <sup>8,9</sup>. Nízké dávky PLA<sub>2</sub> vedou k uvolňování IL-10 z antigen prezentujících buněk, zatímco vysoké dávky vedou k uvolňování IL-12, který je silným induktorem odpovědi Th1. Proto jsou narůstající dávky PLA<sub>2</sub> doprovázeny poklesem poměru produkce IL4/IFN- $\gamma$ <sup>9</sup>, což by mohlo vysvětlit pokles poměru alergen specifického IgE/IgG, navozeného specifickou imunoterapií<sup>8</sup>.

Jedově specifické IgE protilátky během VIT iniciálně stoupají, tento nárůst dosahuje maxima během 1-3 měsíců a poté nastává pomalý pokles někdy až k neměřitelným hodnotám. Podobný vývoj mají i kožní testy, ale obvykle zůstávají déle pozitivní. Pokles jedově specifických protilátek IgE je doprovázen nárůstem jedově specifických protilátek IgG<sup>3</sup>. Nárůst alergen specifických IgG protilátek během VIT (hlavně podtřídy IgG1a IgG4) je spojován s tvorbou IgG blokujících protilátek (kompetitivní inhibice vazby buněčně navázaného IgE na alergen) a IgG antiidiotypových protilátek (autoprotilátky reagující s alergen specifickým IgE)<sup>3,8</sup>.

Jiným možným mechanismem navození dlouhodobé imunologické tolerance je tvorba tzv. CD4<sup>+</sup> T regulačních (Treg) 1 buněk (Tr1 buněk), které vznikají chronickou aktivací

CD4+ T buněk v přítomnosti IL-10<sup>39</sup>. Posledním předpokládaným mechanismem účinku VIT je tvorba CD8+ T buněk, inhibujících produkci alergen specifických protilátek IgE<sup>3,39</sup>.

## 5.4.2 Indikace a kontraindikace

Při výběru pacientů, vyžadujících VIT, je třeba zvážit následující faktory: riziko při reexpozici (pravděpodobnost rozvoje systémové reakce při následujícím bodnutí), průkaz IgE zprostředkované alergie a psychický stav pacienta<sup>3</sup>. U dětí jsou indikace i kontraindikace subkutánní specifické alergenové terapie stejné jako u dospělých<sup>5</sup>.

### 5.4.2.1 Indikace

Indikace k SAIT by měla být stanovena zkušeným lékařem, v optimálním případě se specializací v oboru alergologie (nebo s ekvivalentní kompetencí); u dětí raději pediatrem, pokud možno alergologem<sup>5</sup>.

VIT je indikována u dětí i dospělých s anamnézou závažné systémové reakce na bodnutí (kardiovaskulární nebo respirační symptomy) a potvrzeného IgE zprostředkovaného mechanismu alergie (pozitivní kožní testy nebo jedově specifické sérové IgE protilátky)<sup>5,39</sup>. V případě mírnějších stupňů systémové reakce třeba zvážit další faktory: riziko expozice (tj. pravděpodobnost opakování bodnutí), druh hmyzu, komorbidity (kardiovaskulární onemocnění, systémová mastocytóza), dostupnost zdravotnické péče a vliv alergie na kvalitu života<sup>5,39</sup>.

VIT není doporučena u velkých lokálních reakcí<sup>5,39</sup>.

VIT není indikována u atypických reakcí a hypersenzitivních reakcí s non IgE zprostředkovaným mechanismem.<sup>5,39</sup>

Před zahájením VIT třeba zvážit náhradu  $\beta$ -blokátorů a inhibitorů ACE za jiné léky a v případě nemožnosti jejich vysazení (např. u onemocnění koronárních tepen nebo těžké ventrikulární arytmie), zvážit dlouhodobou nebo celoživotní VIT s pečlivým monitorováním krevního tlaku a EKG, zvláště v průběhu iniciační fáze VIT. Celoživotní nebo dlouhodobá léčba je také doporučena u pacientů s vysokým rizikem závažné anafylaxe při reexpozici (staří pacienti, závažné systémové reakce, systémová mastocytóza)<sup>5</sup>.

### 5.4.2.2 Kontraindikace

Absolutní kontraindikací je<sup>5,39</sup>:

1. závažné imunologické onemocnění, závažné kardiovaskulární onemocnění (s výjimkou těžké alergie na jed *Hymenoptera*), malignita, chronická infekce
2. závažné astma s perzistujícím snížením plicních funkcí (FEV<sub>1</sub>) pod 70% náležité hodnoty, navzdory adekvátní farmakoterapii
3. nedostatek compliance a závažné psychické poruchy u pacienta

Relativní kontraindikací je<sup>5,39</sup>:

1. těhotenství (teratogenní riziko nebylo prokázáno, ale existuje určité riziko anafylaxe během úvodní fáze VIT a z toho rezultující poškození plodu) - není doporučeno zahajovat VIT během těhotenství nebo v případě jeho plánování; nekomplikovanou udržovací VIT není třeba v případě otěhotnění přerušovat, ale v případě se objeví sebemenších komplikací, nutno VIT ukončit
2. těžký atopický ekzém

## 5.4.3 Volba alergenu pro imunoterapii

Dříve užívané celotělové hmyzí extrakty mají ve srovnání s placebem stejnou účinnost a navíc existuje určité riziko vzniku alergické reakce na proteiny jež jsou sice součástí hmyzího těla, ale nejsou součástí jeho jedu<sup>3,6</sup>. Volba jedu pro imunoterapii se řídí anamnézou

a výsledkem diagnostických testů. V případě vícečetné positivity diagnostických testů, je pacient léčen jedem hmyzu, který je zodpovědný za klinickou manifestaci. Pokud se vyskytne vícečetná pozitivita diagnostických testů a identifikace odpovědného hmyzu není jednoznačná, pak je nutné odlišit vícečetnou senzitivitu (imunoterapie několika jedy) a zkříženou reaktivitu (imunoterapie jedem, na který byl pacient primárně senzibilizován)<sup>3,8</sup>.

U neprofesionálně exponovaných osob, alergických na jed čmeláka, lze použít pro imunoterapii jed včely, vzhledem ke značné zkřížené reaktivitě; u značně exponovaných pacientů (např. zahradníci) je nutno užít jedu čmeláka. Podobně lze také užít jed vosa (*Vespula spp.*) pro VIT u pacientů, alergických na jed sršně (*Vespa spp.*). Jed vosíků (*Polistes spp.*) je pro VIT užíván pouze, pokud je vyloučena zkřížená reaktivita s jedem vosa (*Vespula spp.*)<sup>39</sup>.

Extrakty alergenů pro alergenovou imunoterapii by měly být purifikované a standardizované<sup>5,8</sup>. Kromě přirozených jedových extraktů jsou dispozici i preparáty modifikované (fyzikálně, chemicky či kombinace obou postupů), sestavené za účelem snížení nežádoucích účinků při zachování stejného protektivního efektu<sup>3</sup>. Modifikace způsobí např. pomalejší uvolňování alergenu z podkožního depa či redukuje alergenicitu preparátu<sup>3,43</sup>.

U depotního preparátu včelího jedu (adsorbce na hydroxid hlinitý) byla, oproti přirozenému preparátu, prokázána srovnatelná účinnost a lepší bezpečnost během udržovací fáze imunoterapie. Navíc byla během VIT s depotními preparáty zaznamenána i silnější IgG protilátková odpověď<sup>44</sup>.

Slibnou perspektivou budoucnosti je získání všech alergenů jedu *Hymenopter* v rekombinantní formě. Pak bude možno zjistit u pacienta profil specifických IgE protilátek proti jednotlivým alergenům a podle toho také sestavit vhodnou imunoterapii<sup>3,43,45</sup>. Tím bude také eliminováno potenciální riziko terapií navozené senzitivace na nové alergeny<sup>4</sup>. Dalším krokem je snaha o zvýšení bezpečnosti VIT s rekombinantními alergeny, tj. potlačení alergenicity při zachování imunogenicity. Toho by mohlo být dosaženo bodovou mutací prostorově uspořádaných B buněčných epitopů, expresí B buněčných epitopů v lineární formě nebo expresí či syntézou peptidových fragmentů alergenu (lineární sekvence 10-15 aminokyselin, obsahující epitopy, rozpoznávané specifickými T lymfocyty alergických pacientů)<sup>45</sup>.

#### 5.4.4 Praktické provedení

Před zahájením VIT by měl být pacient poučen o principu VIT, její efektivitě i trvání a zároveň by měl být informován o alternativních postupech. U dětí musí být zvolen jazyk, úměrný vývojovému stádiu dítěte. Nezbytné je také získání informovaného souhlasu (u dětí od zákonného zástupce). Při provádění VIT by měl být přítomen lékař, odpovědný za léčbu, a nejméně jedna další osoba pro případ závažné nežádoucí reakce. Z toho důvodu musí být dostupné i resuscitační vybavení. Před aplikací každé dávky VIT je nutno posoudit stav pacienta. Monitorování stavu pak pokračuje i během aplikace a nejméně 30 min po aplikaci každé injekce. Vlastní injekce je podávána hluboko subkutánně na vnější stranu paže, pomalu (1ml/60s), za opakovaných aspirací. Pokud jsou indikovány dva nebo maximálně tři různé alergenové extrakty, měly by být injikovány s odstupem alespoň 30 minut. Před propuštěním musí být pacient poučen jak postupovat v případě výskytu alergických symptomů<sup>5,8</sup>.

#### 5.4.5 Dávkování a léčebné režimy

Úvodní fáze VIT je charakterizována podáváním vzestupných dávek alergenu až k dosažení dávky udržovací. Toho lze docílit několika léčebnými režimy, sestavenými za účelem minimalizace nežádoucích účinků, maximalizace ochranného efektu a optimalizace pohodlí pacienta<sup>3,8,46</sup>.

1. konvenční režim (dávka jedu se zvyšuje po 1 až 2 týdnech, léčba je vedena ambulantně a dosažení udržovací dávky trvá několik týdnů až měsíců)
2. cluster režim (během jednoho ambulantního sezení, prováděného 1 až 2krát týdně, je aplikováno několik vzestupných dávek jedu)
3. rush režim (léčba je prováděna u hospitalizovaných pacientů a spočívá v podávání několika vzestupných dávek několik po sobě jdoucích dnů; variantou je ultra-rush režim, kde je udržovací dávky dosaženo dokonce během několika hodin)

Volba schématu je vysoce individuální, není zcela fixní a závisí mj. na odezvě pacienta, volbě alergenového extraktu, riziku expozice či dostupnosti ambulantní péče. Dávkovací schéma i množství injikovaného alergenu je stejné jak u dospělých, tak u dětí<sup>5</sup>.

Konvenční a rush režim zřejmě navozují toleranci alergenu odlišným způsobem. Oba jsou spojeny s posunem produkce cytokinů od Th2 směrem k Th1 typu, ale konvenční režim vyžaduje k tomuto posunu mnohem delší čas a navíc během iniciální fáze vykazuje v odpovědi na alergen přechodnou T buněčnou proliferaci, zatímco rush režim vyvolá rychlou T buněčnou anergii<sup>39</sup>. Rychlé režimy jsou proto výhodné zejména tam, kde je potřeba rychlého dosažení udržovací dávky (např. u vysoce exponovaných osob) nebo tam, kde nelze konvenčním režimem dosáhnout udržovací dávky. Na druhou stranu jsou tyto režimy častěji zatíženy nežádoucími alergickými reakcemi<sup>3,5,39</sup>.

Doporučená udržovací dávka 100 $\mu$ g jedu je podávána během prvního roku léčby v 4týdenní intervalu, ve druhém roce může být interval prodloužen na 6 týdnů a po 5ti letech léčby na 8 týdnů. V případě selhání léčby (systémová reakce po bodnutí příslušným hmyzem) nebo u vysoce exponovaných osob (včelaři a jejich rodiny) se udržovací dávka jedu zvyšuje na 200 $\mu$ g<sup>39</sup>.

Další modifikace dávky (vynechání dávky, opakování předešlé dávky či redukce dávky) se řídí podle pacientova klinického stavu během posledních 3 dnů před injekcí, časového intervalu od poslední injekce a reakce na poslední injekci<sup>5</sup>.

#### 5.4.6 Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky, které se během podávání VIT mohou vyskytnout, se dělí na lokální a systémové.

Velká lokální reakce v místě aplikace injekce je poměrně běžná a obvykle dobře tolerovaná<sup>5</sup>. Okamžité lokální reakce (do 30 min) jsou považované za alergické reakce časného typu a představují zvýšené riziko anafylaxe (nutná observace pacienta minimálně 30 min)<sup>5,8</sup>. Pozdní velké lokální reakce nepředstavují zvýšené riziko anafylaxe, ale často pacienta obtěžují<sup>8</sup>. Po podání depotních preparátů (adsorbovaných na aluminium hydroxid) se mohou objevit podkožní granulomy, které po určité době obvykle spontánně regredují<sup>5,8</sup>.

Systémové alergické reakce zahrnují symptomy poškození orgánů, vzdálených od místa injekce, přičemž tíže reakce koreluje s rychlostí nástupu symptomů<sup>5</sup>. Riziko vzniku systémové alergické reakce je vyšší při aplikaci včelího jedu, během iniciální fáze imunoterapie, a to zejména při užití rychlých režimů, u pacientů se závažnějším stupněm systémové reakce po bodnutí hmyzem<sup>3,39,47</sup> a u dospělých pacientů<sup>3,39</sup>. Také systémová mastocytóza představuje zvýšené riziko systémové alergické reakce během VIT<sup>21</sup>. U depotních preparátů (adsorpce na aluminium hydroxid) se mohou systémové nežádoucí reakce objevit se zpožděním<sup>8,44</sup>. Léčba systémové alergické reakce po aplikaci injekce VIT se vcelku neliší od léčby anafylaktické reakce po bodnutí. Bylo prokázáno, že četnost a tíže velkých lokálních reakcí a mírných systémových reakcí (např. urtika, angioedém) po podání VIT může být snížena premedikací pacienta antihistaminiky, aniž by se tím snížila účinnost VIT nebo byly maskovány závažnější systémové alergické symptomy, jež by jinak vedly k modifikaci dávky VIT<sup>48</sup>. Navíc by mohla premedikace antihistaminiky zvyšovat efektivitu VIT<sup>39</sup>. Možnou

cestou k redukci nežádoucích reakcí po imunoterapii včelím jedem, je profylaktické podávání gamaglobulinů od včelařů (pasivní imunoterapie)<sup>3</sup>. Dalšími přístupy ke zvýšení bezpečnosti VIT je užití chemicky modifikovaného alergenu, rekombinantního alergenu, s event. upravenými variabilními B buněčnými epitopy (bodovou mutací či expresí v lineární formě) nebo užití fragmentů alergenu (rekombinantních nebo synteticky připravených) se zachovalými T buněčnými epitopy, ale zničenými variabilními B buněčnými epitopy<sup>39</sup>. Dlouhodobé nežádoucí účinky nebyly u VIT zaznamenány<sup>3</sup>.

#### **5.4.7 Efektivita a trvání imunoterapie**

U dětí a dospělých s mírnou systémovou reakcí je doporučená doba trvání VIT 3 až 5 let; u závažnějších stupňů 5 let i více<sup>8</sup>. U pacientů s vysokým rizikem závažné systémové reakce při následujícím bodnutí by měla být zvážena doživotní imunoterapie<sup>3</sup>. Frekvence systémových reakcí po řízeném expozičním testu u pacientů, léčených pomocí VIT, byla 0-22% oproti 28-40% u neléčených dospělých a 9,2% u neléčených dětí<sup>28</sup>. Tyto reakce byly obvykle mírnějšího stupně než před zahájením imunoterapie, což ukazuje alespoň částečný úspěch VIT<sup>39</sup>.

Riziko relapsu po ukončené VIT je vyšší u dospělých, alergie na včelí jed, u těžkých systémových alergických reakcí před zahájením VIT, při výskytu systémové reakce během VIT (po bodnutí nebo po injekci) a u pacientů s elevovanou bazální hladinou sérové tryptázy nebo se systémovou mastocytózou. Prediktivní hodnota rutinně užívaných diagnostických testů (měření jedově specifického IgE nebo kožních testů) je omezená<sup>39</sup>.

## 6 Materiál a metodika

### 6.1 Cíl

Cílem výzkumu bylo analyzovat vzorek pacientů, alergických na jed *Hymenopter* a léčených na Oddělení alergologie a klinické imunologie FNKV a následně porovnat některé takto získané informace s daty dostupnými v literatuře. Oblastí zájmu byly následující otázky:

- 1/ zda je určité pohlaví rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí
- 2/ zda je určitý věk rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí
- 3/ zda je určitý druh hmyzu rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí
- 4/ zda je stupeň reaktivity v kožních prick testech (SPTs) rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí
- 5/ zda je výška positivity jedově specifických IgE rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí
- 6/ zda je zvýšená bazální hladina sérové tryptázy rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí
- 7/ zda je VIT provázána statisticky významným poklesem jedově specifického IgE
- 8/ zda je VIT provázána statisticky významným nárůstem jedově specifického IgG4
- 9/ zda je VIT provázána poklesem závažnosti klinické manifestace po bodnutí

### 6.2 Výzkumný vzorek

Vzorek zahrnoval 422 subjektů s anamnézou systémové alergické reakce po bodnutí *Hymenopter*, léčených prostřednictvím specifické alergenové imunoterapie jedem (dále jen VIT) na Oddělení alergologie a klinické imunologie FNKV. Léčba probíhala přibližně od roku 1988 do září roku 2007. IgE zprostředkovaná alergie na jed byla potvrzena kožními testy a nebo měřením specifických sérových protilátek IgE. Podíl žen ve studované populaci byl 59%. Průměrný věk pacientů byl  $47,36 \pm 17,38$  let (u žen:  $49,25 \pm 17,01$  let; u mužů  $44,95 \pm 17,61$  let). 182 osob (43,1 %) vyvinulo systémovou alergickou reakci pouze po bodnutí vosou, 181 (42,9 %) pouze po bodnutí včelou a 6 (1,4 %) pouze po bodnutí sršně. 51 osob mělo přecitlivělost na dva jedy a to 44 (10,4 %) na jed vosy a včely a 7 (1,7 %) na jed vosy a sršně. Dvě osoby (0,5 %) měly alergickou reakci po bodnutí včely, vosy i sršně (viz tabulka 6.2-1 a graf 6-1). Tabulka 6.2-2 rozděluje pacienty podle alergie na jednotlivé druhy *Hymenopter*, tj. podle počtu pozorovaných alergií. Z tabulky vyplývá, že zastoupení alergie na jed vosy je přibližně stejné jako zastoupení alergie na včelu (49,3% vs. 47,6%), zatímco podíl alergie na jed sršně je významně nižší (pouze 3,1%). Významné rozdíly nebyly pozorovány ani v podílu alergií mezi jednotlivými pohlavími, tj. alergie na jednotlivá *Hymenoptera* měla u obou pohlaví přibližně stejnou distribuci (viz tabulka 6.2-3). Vyšší podíl alergie na jed sršně u mužského pohlaví (3,6% vs. 2,8% u žen) by mohl být způsoben nízkým zastoupením této alergie ve sledované populaci (pouze 15 osob).

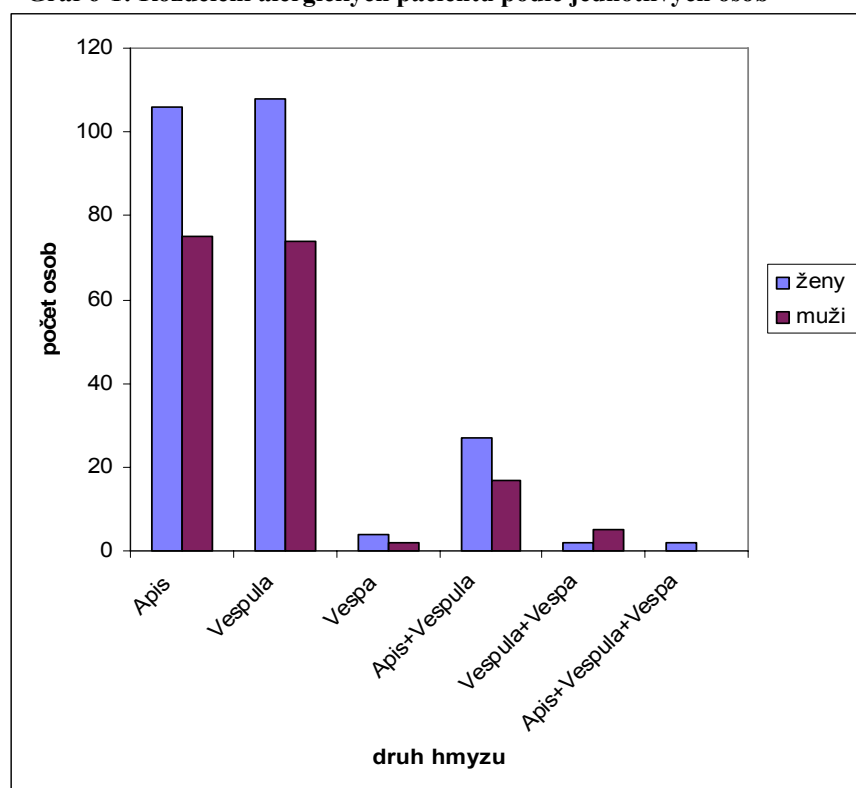
Při srovnávání kožních testů a měření jedově specifického IgE bylo zjištěno, že senzitivita kožních testů byla ve srovnání se senzitivitou měření jedově specifického IgE (bráno RAST třída  $\geq 1$ ) poněkud nižší: 89,9 % vs. 84,3% (viz tabulka 6.2-2). Důvodem může být fakt, že se jedná o kožní prick testy a ne intradermální testy, které mají obecně vyšší specifitu. Vyšší specifita kožních testů, pozorovaná u alergie na jed sršně, by mohla být dána malým počtem měření (kožní testy byly provedeny u 3 subjektů, zatímco měření specifického IgE bylo provedeno u 13 subjektů).

Tabulka 6.2-1: Rozdělení alergických pacientů podle jednotlivých osob

	<b>počet osob (podíl)</b>	<i>Apis</i> : počet osob (podíl)	<i>Vespula</i> : počet osob (podíl)	<i>Vespa</i> : počet osob (podíl)	<i>Apis</i> + <i>Vespula</i> : počet osob (podíl)	<i>Vespula</i> + <i>Vespa</i> : počet osob (podíl)	<i>Apis</i> + <i>Vespula</i> + <i>Vespa</i> : počet osob (podíl)
ženy	<b>249</b>	106	108	4	27	2	2
	<b>(0,590)</b>	(0,251)	(0,256)	(0,009)	(0,064)	(0,005)	(0,005)
muži	<b>173</b>	75	74	2	17	5	0
	<b>(0,410)</b>	(0,178)	(0,175)	(0,005)	(0,040)	(0,012)	(0)
<b>celkem</b>	<b>422</b>	<b>181</b>	<b>182</b>	<b>6</b>	<b>44</b>	<b>7</b>	<b>2</b>
	<b>(1)</b>	<b>(0,429)</b>	<b>(0,431)</b>	<b>(0,014)</b>	<b>(0,104)</b>	<b>(0,017)</b>	<b>(0,005)</b>

*Apis* = včela      *Vespa* = sršeň      *Vespula* = vos

Graf 6-1: Rozdělení alergických pacientů podle jednotlivých osob



Tabulka 6.2-2: Rozdělení pacientů podle alergie na jednotlivé druhy Hymenoptera

druh hmyzu	<b>počet osob (podíl)</b>	SPTs - počet vyšetřených (podíl)	SPTs - počet pozitivních (podíl)	sIgE - počet vyšetřených (podíl)	sIgE - počet pozitivních (podíl)
<i>Apis</i>	<b>227</b>	153	132	209	193
	<b>(0,476)</b>	(0,321)	(0,277)	(0,438)	(0,405)
<i>Vespula</i>	<b>235</b>	150	123	202	179
	<b>(0,493)</b>	(0,314)	(0,258)	(0,423)	(0,375)
<i>Vespa</i>	<b>15</b>	3	3	13	9
	<b>(0,031)</b>	(0,006)	(0,006)	(0,027)	(0,019)
<b>celkem</b>	<b>477</b>	<b>306</b>	<b>258</b>	<b>424</b>	<b>381</b>
	<b>(1,0)</b>	<b>(0,642)</b>	<b>(0,541)</b>	<b>(0,889)</b>	<b>(0,799)</b>

*Apis* = včela      *Vespa* = sršeň      *Vespula* = vos

SPTs (skin prick tests) = kožní prick testy

sIgE = jedově specifické protilátky IgE



**Tabulka 6.2-3: Rozdělení pacientů podle pohlaví a alergie na jednotlivé druhy *Hymenoptera***

	<i>ženy - počet osob (podíl)</i>	<i>muži - počet osob (podíl)</i>
Apis	135 (0,479)	92 (0,472)
Vespula	139 (0,493)	96 (0,492)
Vespa	8 (0,028)	7 (0,036)
<b>celkem - počet osob (podíl)</b>	<b>282 (1)</b>	<b>195 (1)</b>

*Apis* = včela

*Vespa* = sršeň

*Vespula* = vos

### 6.3 Kožní testy

Kožní reaktivita byla před započítáním VIT testována pomocí kožních prick testů („skin prick tests“ - SPTs) u 306 (64,2 %) ze 477 alergických subjektů (viz tabulka 6.2-2). Tyto testy byly pozitivní u 258 z těchto subjektů (54,1%).

V minulosti užívaný alergenový extrakt, udávaný v jednotkách PNU („protein nitrogen unit“), byl později nahrazen alergenovým extraktem standardizovaným. Tyto dva systémy bylo nutno sjednotit, aby bylo dosaženo alespoň zčásti porovnatelných výsledků. Proto byla sestavena stupnice reaktivity v SPTs (1 až 4), kde byly k jednotlivým koncentracím nestandardizovaného alergenu, přiřazeny koncentrace alergenu standardizovaného (viz tabulka 6.3-1).

Aplikované koncentrace standardizovaného alergenu byly 0,1-300 $\mu$ g/ml a aplikované koncentrace nestandardizovaného, v minulosti užívaného alergenového extraktu, byly 0,5-500PNU. Během kožního testování byly aplikovány všechny koncentrace testovaného alergenu současně a nejnižší koncentrace, která ještě vyvolala pozitivní reakci, odpovídala end point koncentraci. U pacientů, alergických na jed sršně, byl ke kožnímu testování užit alergen vosy, vzhledem k předpokládané zkřížené reaktivitě mezi oběma alergeny a absencí komerčně dostupného alergenu sršně.

**Tabulka 6.3-1: Srovnávací stupnice reaktivity pro SPTs**

<i>Stupeň reaktivity SPTs</i>	1	2	3	4
SPTs v $\mu$ g/ml	0,1	1	10	100 - 300
SPTs v PNU	0,5	5	50	500

### 6.4 Měření jedově specifických protilátek

Před zahájením VIT a v jejím průběhu byly u některých pacientů zaznamenávány změny jedově specifických protilátek třídy IgE a IgG4. Tyto změny shrnuje tabulka 6.4-1, graf 6-2 a graf 6-3. K detekci jedově specifických protilátek byla užitá technika FEIA - fluorescenční enzymová imunoanalýza (Pharmacia CAP systém Phadiatop<sup>®</sup>). Hladiny jedově specifických IgE protilátek byly vyjádřeny v kU/l a výsledek byl negativní, pokud naměřená hodnota dosahovala pod 0,35kU/l (RAST třída 0). Hodnoty mezi 0,35-0,7 kU/l (RAST třída 1) odpovídají tzv. „šedé zóně“, tj. hraničním hodnotám. Hodnoty nad 0,7kU/l (tj.  $\geq$  RAST třída 2) jsou již považovány za skutečně pozitivní. Hodnoty jedově specifických IgG4 byly vyjádřeny v ( $\mu$ g/ml). Jednotlivá měření probíhala u konkrétního pacienta v přibližně ročních intervalech a to pro oba typy protilátek.

**Tabulka 6.4-1: Dynamika titrů jedově specifických protilátek ve sledované populaci**

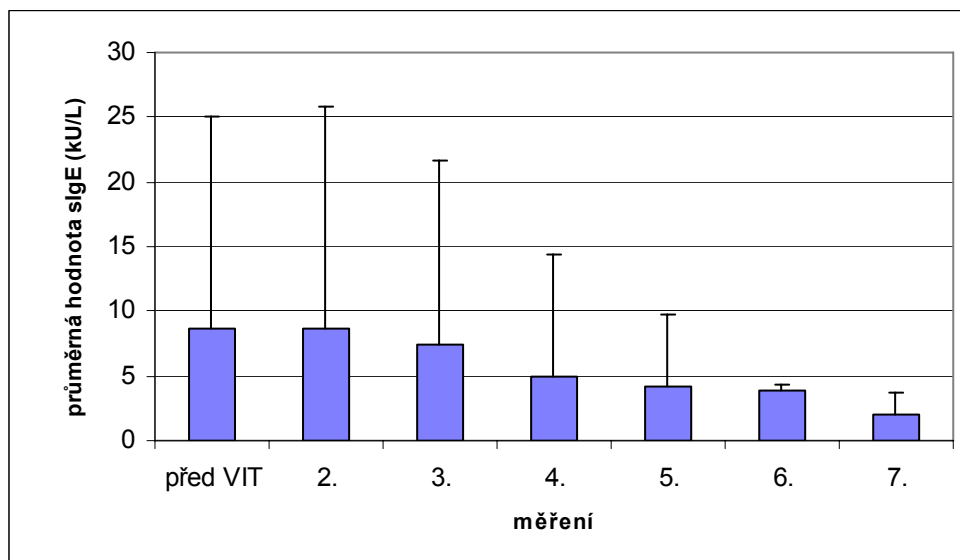
jedově specifické protilátky	před VIT (průměr ±SD)	2.měření (průměr ±SD)	3.měření (průměr ±SD)	4.měření (průměr ±SD)	5.měření (průměr ±SD)	6.měření (průměr ±SD*)	7.měření (průměr ±SD)
sIgE (kU/l)	8,68 ±16,41	8,73 ±17,13	7,46 ±14,18	4,91 ±9,53	4,10 ±5,64	3,92 ±0,46	2,06 ±1,69
počet měření (sIgE)	424	242	161	101	25	3	4
sIgG4 (µg/ml)	33,07 ±63,38	79,30 ±93,91	101,41 ±103,63	126,26 ±103,80	48,66 ±84,79	18	
počet měření (sIgG4)	167	149	101	81	11	1	0

sIgE, sIgG4 = jedově specifické protilátky

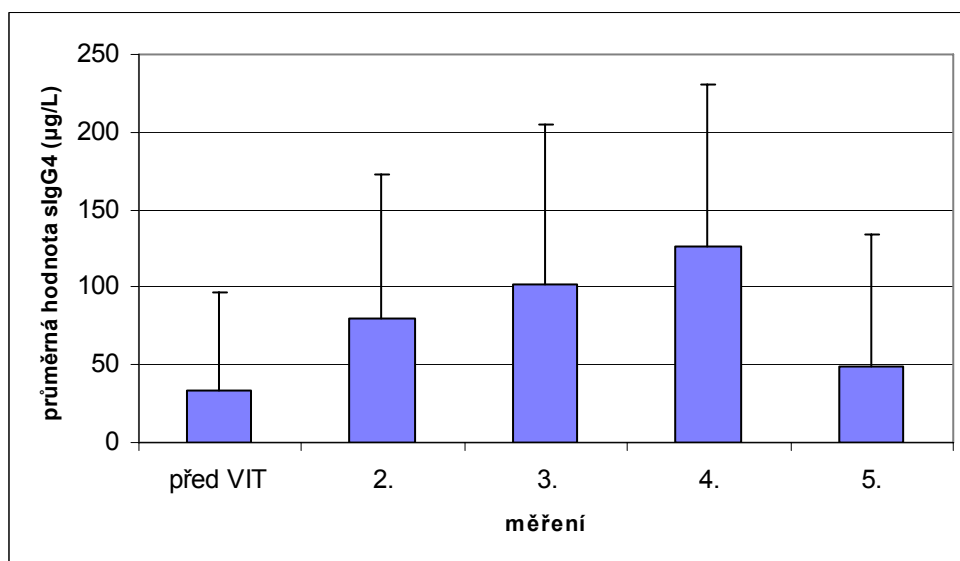
\* platí pouze pro sIgE

SD = směrodatná odchylka

**Graf 6-2: Dynamika jedově specifického IgE ve sledované populaci**



**Graf 6-3: Dynamika jedově specifického IgG4 ve sledované populaci**



### **6.5 Postup při provádění VIT a její průběh**

Pacienti podstoupili VIT s preparáty Alutard SQ, Albey, ALK, DHS a Sevapharma. V případě alergie na jed sršně (*Vespa spp.*) byl k VIT užit alergen vosy (*Vespula spp.*) a to ze stejného důvodu jako u kožních testů. V případě klinické manifestace alergie na jed vosy i včely byly užity oba tyto alergeny (*Vespula spp.*, *Apis spp.*). V průběhu iniciační fáze byly užity různé léčebné režimy a většina pacientů dosáhla udržovací dávky 100 $\mu$ g jedu.. Během podávání VIT se u jedné ženy objevil erytém obličeje. Riziko výskytu SR během VIT je tedy ve sledované populaci 0,21%.

### **6.6 Statistické hodnocení**

Pro porovnávání středních hodnot byl užit párový t-test. Pro porovnávání neparametrických dat byl užit chi test ( $\chi^2$ ). Hladina pravděpodobnosti (p-hodnota) < 0,05 byla považována za statisticky významnou. Statistické analýzy byly provedeny v programu Microsoft Excel Windows XP 2000.

## 7 Výsledky

### 1/ zda je určité pohlaví rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí

Při analýze závislosti četnosti jednotlivých stupňů systémových reakcí (SR) na pohlaví bylo zřejmé, že ženské a mužské pohlaví se liší v podílu závažných SR (viz tabulka 7-1). Závažná systémová reakce (stupeň III-IV) se objevila u 74,8% žen a u 73,6% mužů. Rozdíl ovšem nebyl statisticky významný ( $p=0,776$ ) a ženské pohlaví není rizikovým faktorem závažné SR po bodnutí.

Tabulka 7-1: Závislost stupně SR v na pohlaví

stupeň SR / pohlaví	I počet osob (podíl)	II počet osob (podíl)	III počet osob (podíl)	IV počet osob (podíl)	celkem počet osob (podíl)
ženy	27 (0,105)	38 (0,147)	115 (0,446)	78 (0,302)	258 (1,0)
muži	22 (0,124)	25 (0,140)	78 (0,438)	53 (0,298)	178 (1,0)
<b>celkem</b>	<b>49</b> <b>(0,112)</b>	<b>63</b> <b>(0,144)</b>	<b>193</b> <b>(0,443)</b>	<b>131</b> <b>(0,300)</b>	<b>436</b> <b>(1,0)</b>

### 2/ zda je určitý věk rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí

Aby bylo možno analyzovat četnost jednotlivých stupňů systémové reakce (SR) na základě věku, byly subjekty rozděleny do 3 věkových kategorií (viz tabulka 7-2). Analýza jednotlivých stupňů SR ukázala, že s rostoucím věkem se zvyšuje podíl závažných systémových reakcí.

Nejmladší skupina pacientů (< 20 let věku) vykazovala celkově nejnižší podíl systémových reakcí stupně IV (9,5%) a zároveň nejvyšší podíl systémových reakcí stupně I (14,3%). Byl zde ovšem také vysoký podíl systémových reakcí stupně III (57,1%), což v konečném důsledku vedlo k celkovému podílu závažných systémových reakcí (stupeň III-IV) 66,6%. Ve skupině pacientů nad 40 let věku činil tento podíl (SR stupně III-IV) 76,6%. Podíl reakcí stupně I byl v této skupině nejnižší (pouze 9,3%).

Rozdíly mezi věkovými skupinami ve sledované populaci nebyly statisticky významné ( $p=0,600$ ), dokonce ani mezi nejmladší a nejstarší věkovou skupinou ( $p=0,312$ ). Testy ovšem nelze považovat za dostatečně spolehlivé, vzhledem k malému počtu subjektů ve skupině pod 20 let věku (21 vs. 226 a 107 subjektů v ostatních věkových skupinách). Nicméně, ani mezi prostřední a nejstarší věkovou skupinou nebyl statisticky významný rozdíl ( $p=0,865$ ).

Tabulka 7-2: Distribuce závažnosti SR podle věku

věková kategorie / stupeň SR před VIT	<20 let - počet osob (podíl)	20-40 let - počet osob (podíl)	>40 let - počet osob (podíl)
I	3 (0,143)	12 (0,112)	21 (0,093)
II	4 (0,190)	14 (0,131)	32 (0,142)
III	12 (0,571)	54 (0,505)	93 (0,412)
IV	2 (0,095)	27 (0,252)	80 (0,354)
<b>celkem (podíl)</b>	<b>21</b> <b>(1)</b>	<b>107</b> <b>(1)</b>	<b>226</b> <b>(1)</b>

### 3/ zda je určitý druh hmyzu rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí

Distribuci závažnosti systémových reakcí (SR) před zahájením VIT v závislosti na druhu hmyzu shrnuje tabulka 7-3. Nejvyšší podíl závažných systémových reakcí vykazovala alergie na bodnutí sršní (83,4% reakcí po bodnutí sršní bylo stupně III-IV). Podíl závažných SR (stupně III-IV) byl nižší u včely než u vosy (72% u včely vs. 76,2% u vosy). Tento rozdíl však nedosahoval statistické významnosti ( $p=0,325$ ). Ani v souhrnu (vosa, včela, sršeň) neměl druh hmyzu v tomto souboru pacientů výrazný vliv na závažnost systémové reakce po bodnutí ( $p=0,472$ ). Nicméně, ani tento test nelze považovat za dostatečně spolehlivý, vzhledem k malému počtu pacientů, alergických na jed sršně (pouze 12 subjektů).

**Tabulka 7-3: Distribuce závažnosti SR podle jednotlivých druhů Hymenoptera**

druh hmyzu / stupeň SR	<i>Apis</i> - počet osob (podíl)	<i>Vespula</i> - počet osob (podíl)	<i>Vespa</i> - počet osob (podíl)
I	26 (0,119)	22 (0,107)	1 (0,083)
II	35 (0,161)	27 (0,131)	1 (0,083)
III	96 (0,440)	95 (0,461)	2 (0,167)
IV	61 (0,280)	62 (0,301)	8 (0,667)
<b>celkem - počet osob (podíl)</b>	<b>218 (1)</b>	<b>206 (1)</b>	<b>12 (1)</b>

*Apis* = včela

*Vespa* = sršeň

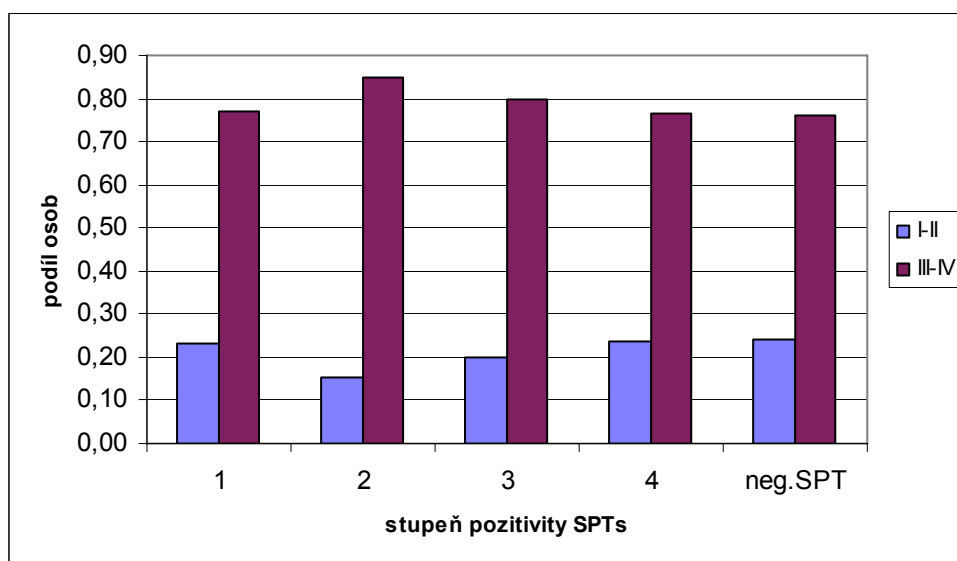
*Vespula* = vosa

### 4/ zda je stupeň reaktivity v kožních prick testech (SPTs) rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí

Analýza závislosti stupně klinické manifestace po bodnutí na stupni reaktivity v kožních prick testech (SPTs) byla provedena u 290 ze 477 subjektů. Reaktivita subjektů byla v případě pozitivního výsledku SPTs rozdělena do 4 stupňů (stupeň 1-4; viz tabulka 7-4 a graf 7-1). Stupeň reaktivity 1 odpovídal nejvyšší reaktivitě v kožních testech, tj. pacient reagoval při nejnižší koncentraci testovaného alergenu. Naopak stupeň reaktivity 4 odpovídal nejnižší reaktivitě v kožních testech. Negativní výsledek SPTs je v grafu 7-1 označen jako neg.SPT a v tabulce 7-4 jako negativní SPTs. Při analýze závislosti stupně reaktivity v kožních testech na stupni klinické závažnosti systémové reakce (SR) bylo zjištěno, že stupeň pozitivity v SPTs významně nekoreluje se závažností SR po bodnutí ( $p=0,858$  pro kategorie SR I-II a III-IV), (viz tabulka 2-4 a graf 2-1), tj. se stoupajícím stupněm závažnosti SR není tendence ke kožní reakci při nižších end-point koncentracích a vysoký stupeň reaktivity v kožních prick testech (stupeň 1) není ve studované populaci asociován se závažnou SR po bodnutí (stupeň III-IV).

Dále z analýzy vyplývá, že s rostoucí koncentrací testovaného alergenu stoupá podíl reagujících osob (tj. více než polovina vyšetřených subjektů reagovala až při vysoké koncentraci testovaného alergenu - stupeň pozitivity SPTs 4). To nepřekvapuje, vzhledem k tomu, že se zvyšující se koncentrací testovaného alergenu obecně stoupá senzitivita kožního testu.

**Graf 7-1: Závažnost SR v závislosti na stupni pozitivity v kožních prick testech**



**Tabulka 7-4: Závažnost SR v závislosti na stupni reaktivity v SPTs**

stupeň SR / stupeň reaktivity SPTs	I - počet osob (podíl)	II - počet osob (podíl)	III - počet osob (podíl)	IV - počet osob (podíl)	celkem - počet osob (podíl)
1	3 (0,23)	0 (0)	6 (0,46)	4 (0,31)	<b>13 (1)</b>
2	2 (0,06)	3 (0,09)	19 (0,58)	9 (0,27)	<b>33 (1)</b>
3	3 (0,07)	6 (0,13)	27 (0,60)	9 (0,20)	<b>45 (1)</b>
4	14 (0,09)	22 (0,14)	63 (0,41)	54 (0,35)	<b>153 (1)</b>
negativní SPTs	2 (0,04)	9 (0,20)	14 (0,30)	21 (0,46)	<b>46 (1)</b>

### **5/ zda je výška pozitivity jedově specifických IgE rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí**

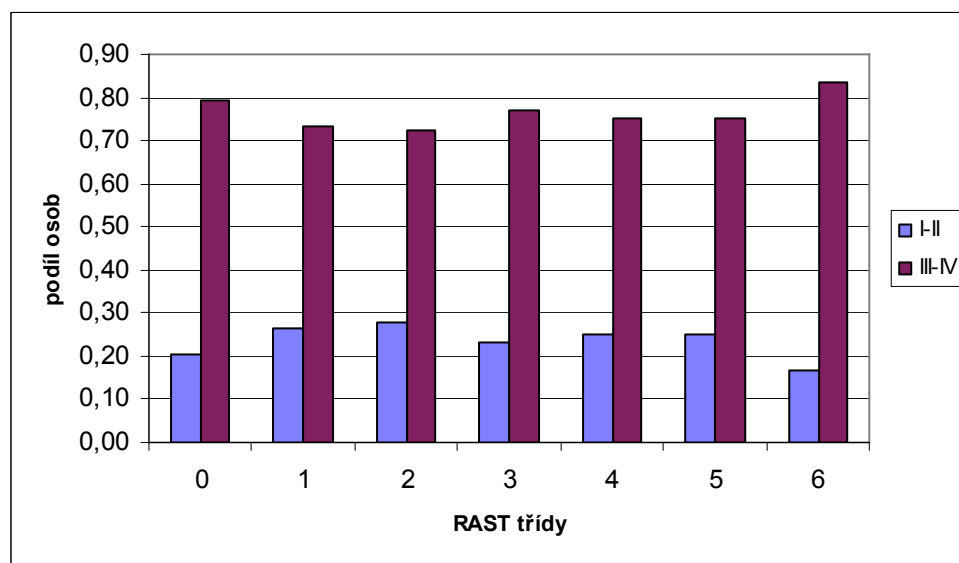
Analýza závislosti stupně klinické manifestace po bodnutí na hodnotě jedově specifických protilátek IgE byla provedena u 391 ze 477 subjektů. Hodnoty jedově specifických protilátek IgE byly rozděleny do tzv. RAST tříd (0-6). Podíl závažných systémových reakcí (stupeň III-IV) mírně stoupal s narůstající hodnotou RAST třídy (79,5% u RAST třídy 0 vs. 83,3% u RAST třídy 6), nicméně rozdíly mezi třídami nebyly statisticky významné ( $p=0,964$ ) a to ani mezi 0. a 6. RAST třídou ( $p=0,826$ ). Dále bylo zjištěno, že více než 60% subjektů mělo jedově specifické IgE v hodnotách RAST třídy 2 až 3 (tj. v hodnotách nízkých a středně vysokých). Také v těchto 2 třídách významně nekoreloval stupeň klinické reaktivity s hodnotou RAST třídy ( $p=0,419$ ) (viz tabulka 7-5 a graf 7-2).

V souhrnu lze tedy tvrdit, že stupeň pozitivity jedově specifických protilátek IgE významně nekoreloval ve studované populaci se závažností klinické manifestace po bodnutí; ani vysoká pozitivita jedově specifického IgE nebyla asociována s rizikem závažné systémové reakce (stupeň III-IV).

**Tabulka 7-5: Závažnost SR v závislosti na RAST třídě jedově specifických protilátek IgE**

stupeň SR / RAST třída protilátek IgE před VIT	I - počet osob (podíl)	II - počet osob (podíl)	III - počet osob (podíl)	IV - počet osob (podíl)	celkem-počet osob (podíl)
třída 0 (< 0,35 kU/l)	5 (0,128)	3 (0,077)	16 (0,410)	15 (0,385)	<b>39 (1)</b>
třída 1 (0,35-0,7 kU/l)	6 (0,133)	6 (0,133)	19 (0,422)	14 (0,311)	<b>45 (1)</b>
třída 2 (0,71-3,5 kU/l)	14 (0,099)	25 (0,177)	55 (0,390)	47 (0,333)	<b>141 (1)</b>
třída 3 (3,6- 17 kU/l)	14 (0,130)	11 (0,102)	52 (0,481)	31 (0,287)	<b>108 (1)</b>
třída 4 (17,1-50 kU/l)	3 (0,063)	9 (0,188)	23 (0,479)	13 (0,271)	<b>48 (1)</b>
třída 5 (50,1-100 kU/l)	0 (0)	1 (0,250)	3 (0,750)	0 (0)	<b>4 (1)</b>
třída 6 (>100 kU/l)	0 (0)	1 (0,167)	3 (0,500)	2 (0,333)	<b>6 (1)</b>

**Graf 7-2: Závažnost SR v závislosti na RAST třídě protilátek IgE**



### 6/ zda je zvýšená bazální hladina sérové tryptázy rizikovým faktorem pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí

U některých pacientů byla stanovena hodnota bazální sérové tryptázy. Z tabulky 7-6 vyplývá, že ve skupině pacientů s elevovanou hladinou bazální tryptázy  $\geq 13,5 \mu\text{g/l}$  byl výrazně vyšší podíl závažných systémových reakcí (stupeň III-IV) než ve skupině s normálními hladinami: 100% ve skupině s elevovanou bazální tryptázou (90% tvořily přímo reakce stupně IV) vs. 70% ve skupině s normálními hodnotami bazální tryptázy. Tento rozdíl dosahoval statistické významnosti ( $p=0,048$ ). Tryptáza byla ovšem vyšetřena pouze u 68 ze 422 subjektů, což představuje méně než 1/6 studované populace. V důsledku toho nelze zajistit spolehlivost provedeného testu. K adekvátnímu posouzení závislosti stupně SR na tomto faktoru by bylo nutné vyšetřit sérovou tryptázu u vyššího počtu subjektů.

**Tabulka 7-6: Závažnost SR v závislosti na bazální hladině sérové tryptázy**

<i>stupeň SR před VIT/ hladina bT</i>	<i>I - počet osob (podíl)</i>	<i>II - počet osob (podíl)</i>	<i>III - počet osob (podíl)</i>	<i>IV - počet osob (podíl)</i>	<b><i>celkem - počet osob (podíl)</i></b>
bT < 13,5µg/l	7 (0,121)	10 (0,172)	19 (0,328)	22 (0,379)	<b>58 (1)</b>
bT ≥ 13,5µg/l	0 (0)	0 (0)	1 (0,100)	9 (0,900)	<b>10 (1)</b>

bT = bazální hladina sérové tryptázy

**7/ zda je VIT provázena statisticky významným poklesem jedově specifického IgE**

**8/ zda je VIT provázena statisticky významným nárůstem jedově specifického IgG4**

Během VIT došlo ve studované populaci ke statisticky významnému poklesu průměrné hodnoty jedově specifických IgE i vzestupu průměrné hodnoty jedově specifických IgG4 (viz tabulka 6.4-1 a grafy 6-2 a 6-3).

U jedově specifických protilátek IgE měly jejich průměrné hodnoty během všech měření klesající trend. Mezi měřeními před VIT, 2. a 3. měřeními nebyla statisticky významná změna dynamiky titru. Ta nastala až mezi 3. a 4. měřeními ( $p=0,041$ ). K dalšímu významnému poklesu došlo mezi 4. a 7. měřeními ( $p=0,021$ ).

U průměrné hodnoty jedově specifického IgG4 byl mezi měřeními před VIT a 2. měřeními značný nárůst ( $p<0,05$ ). Poté růst pokračoval, ale mezi 3. a 4. měřeními nebyl statisticky významný ( $p=0,055$ ). Mezi 4. a 5. měřeními byl znatelný pokles, který byl statisticky významný ( $p=0,007$ ).

**9/ zda je VIT provázena poklesem závažnosti klinické manifestace po bodnutí**

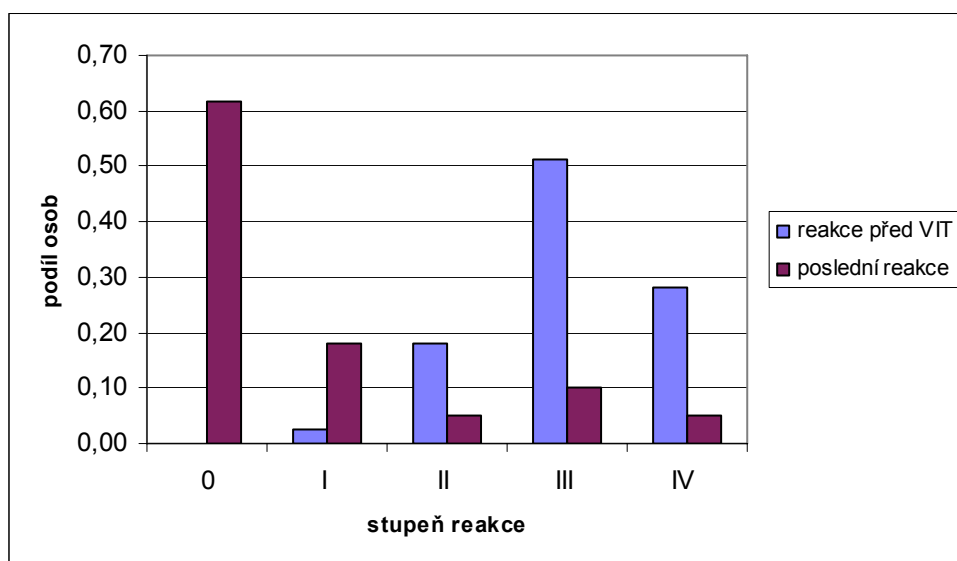
Během nebo po skončení VIT bylo několik pacientů reexponováno bodnutí příslušným hmyzem (viz tabulka 7-7 a graf 7-3). Z těchto 39 pacientů mělo 8 (20,5 %) před léčbou mírnou alergickou reakci (stupeň I-II) a 31 (79,5%) závažnou alergickou reakci (stupeň III-IV). Při následujícím bodnutí mělo 9 (23,1%) z nich mírnou alergickou reakci (stupeň I-II), 6 (15,4 %) z nich závažnou alergickou reakci (stupeň III-IV) a 31 (61,5%) z nich reakci stupně 0 (velká lokální reakce). Během VIT došlo tedy ve sledované populaci ke statisticky významnému poklesu klinické závažnosti reakce po bodnutí ( $p<0,05$ ).

**Tabulka 7-7: Distribuce závažnosti reakcí u pacientů reexponovaných během nebo po skončení VIT**

<i>stupeň reakce (0-IV)</i>	<i>0 - počet osob (podíl)</i>	<i>I - počet osob (podíl)</i>	<i>II - počet osob (podíl)</i>	<i>III - počet osob (podíl)</i>	<i>IV - počet osob (podíl)</i>	<b><i>celkem - počet osob (podíl)</i></b>
reakce před VIT	0 (0)	1 (0,026)	7 (0,179)	20 (0,513)	11 (0,282)	<b>39 (1)</b>
poslední reakce	24 (0,615)	7 (0,179)	2 (0,051)	4 (0,103)	2 (0,051)	



**Graf 7-3: Distribuce závažnosti reakcí u pacientů reexponovaných během nebo po skončení VIT**



Při podrobnější analýze skupin subjektů s určitým stupněm klinické reaktivity (viz tabulka 7-8) bylo zjištěno, že podíl výsledných reakcí stupně 0 (velkých lokálních reakcí) se zvyšuje s klesajícím stupněm SR před VIT (36,4% ve skupině pacientů s původním stupněm reaktivity IV vs. 100% ve skupině s původním stupněm reaktivity I). Současně se také snižuje podíl subjektů, u nichž nedošlo k žádné změně nebo zhoršení reaktivity (18,2% ve skupině s původně IV. stupněm reaktivity vs. 0% ve skupině s původně I. stupněm reaktivity) a zvyšuje se podíl subjektů, u nichž došlo k poklesu reaktivity alespoň o jeden stupeň (81,8% ve skupině s původně IV. stupněm reaktivity vs. 100% ve skupině s původně I. stupněm reaktivity). Přesto rozdíly mezi skupinami nedosahovaly statistické významnosti ( $p=0,418$ ). Celkově se snížila reaktivita nejméně o 1 stupeň u 33 (84,6%) ze 39 sledovaných subjektů, což ukazuje alespoň částečný efekt VIT u některých z těchto pacientů. Naopak, u 1 subjektu (2,6%) s reakcí stupně II před léčbou došlo ke zhoršení klinické manifestace po bodnutí na stupeň III.

**Tabulka 7-8: Podrobná analýza změny klinické reaktivity během VIT**

<i>reakce před VIT / poslední reakce</i>	<i>IV - počet osob (podíl)</i>	<i>III - počet osob (podíl)</i>	<i>II - počet osob (podíl)</i>	<i>I - počet osob (podíl)</i>
IV	2 (0,182)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
III	0 (0)	3 (0,150)	1 (0,143)	0 (0)
II	1 (0,091)	1 (0,050)	0 (0)	0 (0)
I	4 (0,364)	2 (0,100)	1 (0,143)	0 (0)
0	4 (0,364)	14 (0,700)	5 (0,714)	1 (1)
<b>celkem - počet osob (podíl)</b>	<b>11 (1)</b>	<b>20 (1)</b>	<b>7 (1)</b>	<b>1 (1)</b>

Kromě pacientů reexponovaných bodnutí během nebo po skončení VIT, zahrnovala studovaná populace i 16 pacientů, kteří byli reexponováni ještě před zahájením imunoterapie (viz tabulka 7-9). 13 (81,3%) z nich mělo při prvním zaznamenaném bodnutí závažnou

alergickou reakci (stupeň III-IV) a 3 (18,8%) mírnou alergickou reakci (stupeň I-II). Při druhém zaznamenaném bodnutí došlo k poklesu podílu závažných SR na 50%, podíl mírných SR se nezměnil (18,8%), ale stoupl podíl nesystémových (velkých lokálních) reakcí - z 0% na 31,3%. Rozdíly v četnosti jednotlivých stupňů SR při prvním a druhém zaznamenaném bodnutí dosahovaly i zde statistické významnosti ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka 7-9: Distribuce závažnosti reakcí u pacientů, reexponovaných bodnutí před zahájením VIT**

<i>stupeň reakce (0-IV)</i>	<i>0 - počet osob (podíl)</i>	<i>I - počet osob (podíl)</i>	<i>II - počet osob (podíl)</i>	<i>III - počet osob (podíl)</i>	<i>IV - počet osob (podíl)</i>	<b><i>celkem - počet osob (podíl)</i></b>
reakce před VIT	0 (0)	1 (0,063)	2 (0,125)	8 (0,500)	5 (0,313)	<b>16</b>
poslední reakce	5 (0,313)	1 (0,063)	2 (0,125)	4 (0,250)	4 (0,250)	<b>(1)</b>

Porovnáním podílů jednotlivých stupňů klinické manifestace při poslední reakci bylo zjištěno, že vyšší podíl reakcí stupně 0 se vyskytuje u pacientů léčených prostřednictvím VIT, než u pacientů bez specifické imunoterapie (61,5% u léčených vs. 31,3% u neléčených) a naopak vyšší podíl závažných SR přetrvává u neléčených pacientů (50% u neléčených vs. 15,4% u léčených) (viz tabulka 7-7 a 7-9). Tento rozdíl dosahoval statistické významnosti ( $p = 0,025$ ).

## 8 Diskuze

Analýza rizikových faktorů ukázala, že pohlaví, věk nad 40 let, alergie na včelí jed a stupeň pozitivita rutinně používaných diagnostických testů nejsou ve studované populaci významně asociovány s vyšším podílem závažných systémových reakcí po bodnutí (stupeň III-IV). Naopak, elevovaná bazální hladina sérové tryptázy byla shledána jako rizikový faktor rozvoje závažné systémové reakce po bodnutí.

Ačkoli byl podíl závažných SR vyšší u žen (74,8%) než u mužů (73,6%), nebyl tento rozdíl statisticky významný a pohlaví není rizikovým faktorem závažné SR po bodnutí (stupeň III-IV). Bohužel, tento náleznelze podpořit nálezy jiných autorů. Ti se spíše zabývají rizikovými faktory vzniku systémové reakce, než podílem jednotlivých stupňů SR v závislosti na pohlaví<sup>3,17,18</sup>. Zajímavý je fakt početní převahy žen ve studované populaci (59%), protože obvykle tomu bývá naopak (převažují muži). Důvod není zcela jasný, ale příčinou by mohl být způsob života těchto žen, tj. vyšší expozice oproti mužům.

Posouzení četnosti jednotlivých stupňů SR na základě věku ukázalo, že s rostoucím věkem se zvyšuje podíl závažných SR. Přesto nebyly rozdíly mezi věkovými skupinami statisticky významné, dokonce ani mezi nejmladší a nejstarší věkovou skupinou. Nejmladší věková skupina vykazovala nejnižší podíl systémových reakcí stupně IV (9,5%) a zároveň nejvyšší podíl systémových reakcí stupně I (14,3%). Nicméně, vysoký podíl SR stupně III v této skupině (57,1%) vedl k 66,6% podílu závažných SR (stupeň III-IV). Ve skupině pacientů nad 40 let věku činil podíl závažných SR 76,6%, zatímco podíl reakcí stupně I byl v této skupině nejnižší (pouze 9,3%). Tato data zhruba odpovídají nálezům jiných autorů, kde je uváděn podíl závažných SR u dospělých kolem 70%<sup>17</sup>. Vzhledem k malému počtu subjektů ve skupině pod 20 let věku (21 vs. 226 a 107 subjektů v ostatních věkových skupinách), nelze provedené testy na posouzení četnosti jednotlivých stupňů SR považovat za zcela spolehlivé. Dále je nutno vzít v úvahu, že pacienti s reaktivitou stupně I-II budou méně ochotně vyhledávat lékařskou péči a podstupovat imunoterapii, než pacienti s reakcí stupně III-IV. Tento fakt by mohl mít vliv na celkový podíl osob se systémovou reakcí stupně I-II ve studované populaci a nepřímou tak i na počet osob s těmito stupni reakce ve skupině pacientů pod 20 let věku. Navíc je známo, že osoby s mírnou SR mají i bez léčby dobrou prognózu: riziko při náhodné reexpozici u dětí bylo 18,6%<sup>24</sup> a u dospělých 14-30%<sup>3</sup>. Neprůkaznost závislosti rozvoje závažné systémové reakce po bodnutí *Hymenoptera* na věku v tomto souboru pacientů tedy ještě neznamena, že tomu tak ve skutečnosti není.

Alergie na bodnutí sršní vykazovala nejvyšší podíl závažných systémových reakcí (83,4% reakcí bylo stupně III-IV). Druhé místo v podílu závažných SR zaujala alergická reakce po bodnutí vosou (76,2%) a nejnižší podíl závažných SR byl nalezen u alergie na jed včely (72%). Rozdíly však nedosahovaly statistické významnosti a druh hmyzu tedy nemá výrazný vliv na závažnost systémové reakce po bodnutí. Nicméně ani tento test nelze považovat za dostatečně spolehlivý, vzhledem k malému počtu pacientů alergických na jed sršně (pouze 12 subjektů). Vysoký podíl závažných systémových reakcí u alergie na bodnutí sršní by mohl být způsoben právě malým zastoupením takto alergických pacientů v přítomném vzorku subjektů. Na druhou stranu je možné, že vysoký podíl těchto reakcí způsobila velká dávka jedu, obdržená během bodnutí sršní. Je totiž známo, že riziko vzniku alergické reakce je závislé, mimo jiné, i na dávce jedu, vpravené během bodnutí. Je tedy otázkou, nezávisí-li rozvoj určitého stupně alergické reakce na dávce jedu, resp. alergenu, vpraveného během bodnutí. Jeden zdroj uvádí, že riziko vzniku závažných SR je asi 3krát vyšší u sršního bodnutí než u bodnutí vosou či včelou<sup>17</sup>. Co se týče ostatních druhů hmyzu, bývá riziko SR vyšší u včely než u vosy a to pravděpodobně v důsledku vyššího a konstantnějšího množství alerenu, vpravovaného během bodnutí včelou<sup>3,17</sup>.

Stupeň reaktivity v kožních prick testech a stupeň positivity jedově specifického IgE významně nekorelovaly se závažností SR po bodnutí, tj. ani vysoký stupeň reaktivity v kožních prick testech (stupeň 1), ani vysoký stupeň positivity jedově specifických protilátek IgE nebyl ve studované populaci asociován se závažnou SR po bodnutí (stupeň III-IV).

V literatuře se uvádí, že ačkoli jsou hodnoty sIgE vyšší a častěji pozitivní ve skupině pacientů se systémovou reakcí, než ve skupině pacientů s velkou lokální reakcí, hodnoty sIgE nekorelují se stupněm klinické závažnosti SR po bodnutí<sup>3</sup>. Podobně také u kožních testů není vyšší stupeň klinické reaktivity po bodnutí asociován s pozitivní kožní reakcí při nižších end-point koncentracích<sup>3</sup>. Důvodem je zřejmě možnost zapojení dalších faktorů, které mohou výrazně zasáhnout do kožní reaktivity nebo hladin specifických IgE.

Bylo prokázáno, že elevovaná hladina bazální sérové tryptázy  $\geq 13,5 \mu\text{g/l}$ , je ve studované populaci asociována s vyšším podílem závažných SR po bodnutí. Podíl závažných SR (stupeň III-IV) byl v této skupině pacientů výrazně vyšší než ve skupině pacientů s normálními hladinami (100% vs. 70%). V důsledku nízkého počtu zahrnutých osob (pouze 68 ze 422) nelze zajistit dostatečnou spolehlivost provedeného testu, nicméně asociace elevované bazální tryptázy s vysokým podílem závažných SR po bodnutí *Hymenopter*, je uváděna také v dalších literárních zdrojích<sup>17,20,21</sup>.

Během VIT došlo ve studované populaci ke statisticky významnému poklesu jedově specifických protilátek IgE. Za předpokladu, že jednotlivá měření probíhala v přibližně ročních intervalech, je možno usuzovat, že dostatečný protektivní efekt imunoterapie lze očekávat nejdříve po třech letech, neboť mezi 3. a 4. rokem došlo k prvnímu statisticky významnému poklesu průměrné hodnoty jedově specifických protilátek IgE ve studované populaci. To je také minimální doporučená doba trvání imunoterapie<sup>3,8,39</sup>. Následující meziroční změny sIgE nedosahovaly statistické významnosti, avšak mezi 4. a 7. rokem byl již v průměrných hodnotách statisticky významný rozdíl. Je známo, že specifické IgE během VIT iniciálně stoupají, dosahují maxima po 3 měsících a poté pomalu klesají, přičemž po roce VIT dosahují zhruba stejné hodnoty jako před léčbou. Následně mohou dospět až k neměřitelným hodnotám<sup>3</sup>. Podobný trend byl pozorován i v tomto souboru pacientů, kde se průměrné hodnoty sIgE při měření před VIT a při 1. měření příliš nelišily ( $8,68 \pm 16,41 \text{ kU/l}$  vs.  $8,73 \pm 17,13 \text{ kU/l}$ ) a teprve poté výrazněji klesaly s maximální rychlostí mezi 3. a 4. měřením. Otázkou zůstává, zda je klesající trend jedově specifických IgE způsoben pouze účinkem VIT, tj. poklesem produkce sIgE na základě pravidelného podávání příslušného alergenu. Podíl pacientů, pozitivních na jedově specifické protilátky IgE, klesá totiž i bez léčby a to s rostoucím časovým intervalem od posledního bodnutí<sup>3</sup>. Navíc, z hodnoty sIgE nelze určit klinickou reaktivitu pacienta, neboť, jak bylo výše uvedeno, hodnota sIgE nekoreluje se stupně klinické manifestace po bodnutí.

Současně byla VIT ve studované populaci provázena statisticky významným nárůstem jedově specifického IgG4 a to již mezi 1. (před VIT) a 2. měřením. Pokles rychlosti nárůstu sIgG4 po 3. měření (tedy přibližně po 3. roce VIT) by mohl signalizovat zahájení tvorby anti-idiotypových protilátek (anti-IgG4) třídy IgG<sup>8</sup>, jejímž důsledkem by mohl být následný statisticky významný pokles sIgG4 mezi 4. a 5. rokem VIT. Ten by ovšem mohl být způsoben i malým počtem osob, jež podstoupily 5. vyšetření sIgG4 (pouze 11 osob).

Dynamika titru jedově specifických IgG4 odráží chronickou expozici příslušnému alergenu, tj. pravidelné podávání jedového extraktu během imunoterapie<sup>3,30</sup>. Jejich hladina nekoreluje s protektivním účinkem VIT, tzn. ani vysoká hladina nezaručuje kompletní ochranu před SR po následujícím bodnutí<sup>3</sup>. Přesto je úspěšná imunoterapie provázena poklesem poměru sIgE/sIgG4<sup>8</sup>.

VIT byla ve studované populaci provázena statisticky významným poklesem klinické závažnosti reakce po bodnutí. Podíl závažných systémových reakcí stupně III-IV poklesl ze 79,5% po bodnutí před léčbou na 15,4 % po posledním bodnutí. Zároveň došlo k nárůstu

podílu mírných systémových reakcí (stupeň I-II) a reakcí nesystémových (tj. reakcí stupně 0 nebo-li velkých lokálních reakcí) ze 20,5 %, resp. 0% před léčbou na 23,1%, resp. 61,5% při posledním bodnutí. U 84,6% subjektů se snížila reaktivita nejméně o 1 stupeň, což naznačuje alespoň částečný efekt VIT u některých z těchto pacientů. Naopak zhoršení klinické reaktivity ze stupně II na stupeň III bylo zaznamenáno u jedné osoby (2,6%). Bylo naznačeno, že účinnost VIT (pokles klinické závažnosti při následujícím bodnutí) závisí na stupni klinické reaktivity před zahájením VIT, tj. s klesajícím stupněm SR před VIT stoupá podíl osob, u nichž došlo k poklesu reaktivity alespoň o 1 stupeň, klesá podíl osob, u nichž nedošlo k žádné změně reaktivity a zvyšuje podíl osob, u nichž se nerozvinula systémová reakce po posledním bodnutí. Efektivita imunoterapie byla ve srovnání s kontrolní neléčenou skupinou pacientů významně vyšší v podílu nesystémových reakcí (61,5% u léčených vs. 31,3% u neléčených). Současně byl u léčených pacientů nalezen významně nižší podíl závažných systémových reakcí stupně III-IV: 15,4 % vs. 50% u neléčených pacientů.

Srovnat výsledky úspěšnosti imunoterapie, dosažené v tomto souboru pacientů, s výsledky jiných studií je relativně obtížné, neboť efektivita imunoterapie se různí v závislosti na délce trvání imunoterapie, věku pacienta, druhu hmyzu, na který byl pacient alergický, tíži reakce před léčbou a dalších faktorech (např. komorbiditách, vedlejších reakcích při VIT, stupni expozice, časovém intervalu od ukončení imunoterapie, kvalitě podávaného alergenu apod.). Po 1-3 letech od ukončení 3leté imunoterapie je podíl relapsů systémových reakcí až 7%, zatímco po 7 letech činí tento podíl až 20% (bez uvedení délky trvání předchozí imunoterapie). Riziko relapsů se snižuje s rostoucí délkou trvání imunoterapie (minimální doporučená doba trvání jsou 3 roky), klesajícím stupněm klinické reaktivity před léčbou, s klesajícím věkem pacienta, dále pak u alergie na jed vosy (vs. včely) a u pacientů bez systémových reakcí během podávání imunoterapie<sup>39</sup>. Úspěšnost imunoterapie zjištěná v tomto souboru pacientů (pouze 61,5% nesystémových reakcí) je nízká pravděpodobně v důsledku posuzování všech pacientů, bez ohledu na dobu trvání imunoterapie. Na druhou stranu je nutné si uvědomit, že alergie na jed *Hymenoptera* je zřejmě sama sebe limitující proces, neboť pravděpodobnost opakování SR u neléčeného pacienta je při následujícím bodnutí 20-80%<sup>8</sup>. Tento fakt byl v přítomné studii potvrzen statisticky významným poklesem klinické závažnosti při posledním bodnutí u pacientů, neléčených specifickou imunoterapií. Avšak i přesto byla lepší efektivita VIT v tomto souboru pacientů jasně potvrzena.

## 9 Závěr

V přítomném vzorku pacientů bylo sledováno, zda má pohlaví, věk, druh hmyzu, výška positivity v diagnostických testech a bazální hladina sérové tryptázy vliv na riziko vzniku závažné systémové reakce po bodnutí *Hymenopter* (stupeň reakce III-IV podle Muellerovy klasifikace). Bylo zjištěno, že pohlaví, věk, druh hmyzu a výška positivity v diagnostických testech neměly vliv na rozvoj závažné systémové reakce po bodnutí před zahájením VIT. Zvýšená bazální hladina sérové tryptázy  $\geq 13,5\mu\text{g}$  byla shledána jako rizikový faktor pro vznik závažné systémové reakce po bodnutí.

Kromě výše uvedených rizikových faktorů bylo sledováno, zda v této populaci došlo během VIT ke změnám průměrných hodnot hladin protilátek, specifických k příslušnému alergenu, ve smyslu jejich poklesu nebo vzestupu, a zda byly tyto změny statisticky významné. Bylo potvrzeno, že během VIT došlo ke statisticky významnému poklesu průměrné hodnoty jedově specifického IgE a taktéž ke statisticky významnému vzestupu jedově specifického IgG4.

Posledním bodem analýzy byla otázka, zda došlo ve studované populaci k poklesu závažnosti klinické manifestace po bodnutí. V tomto směru byla účinnost imunoterapie potvrzena, ačkoli podíl nesystémových reakcí při posledním bodnutí byl pouze 61,5%. K lepšímu posouzení účinnosti imunoterapie by bylo třeba vytrždit pacienty, jež podstoupili adekvátní VIT, tj. trvající 3 -5 let.

## Souhrn

Systémové alergické reakce po bodnutí *Hymenopter* postihují pouze malou část celkové populace, nicméně některé z nich mohou být život ohrožující nebo dokonce fatální. Systémová imunoterapie alergenem příslušného hmyzu se ukázala jako dostatečně účinná k zabránění opakování IgE-zprostředkované systémové alergické reakce při následujícím bodnutí. Jejím smyslem je navození imunologické tolerance proti podávanému alergenu (nebo alergenům) a proto je považována za léčbu kauzální. Oproti symptomatické (farmakologické) léčbě mění přirozený průběh choroby. Na druhou stranu s sebou tato léčba nese riziko systémové alergické reakce a proto musí být kladena do rukou zkušeného lékaře a prováděna na oddělení s dostupným resuscitačním vybavením. První část diplomové práce je věnována teoretickým znalostem, týkajícím se problematiky alergie na jed *Hymenopter*, tj. taxonomii příčinného hmyzu, epidemiologickým aspektům, klinickému obrazu, diagnostice, terapii a preventivním opatřením. Ve druhé části jsou pak shrnuty výsledky výzkumu na konkrétním vzorku pacientů, jež podstoupili imunoterapii jedem příslušného hmyzu na Oddělení alergologie a klinické imunologie ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady. Nedílnou součástí je i porovnání výsledků, dosažených na tomto souboru pacientů, s poznatky z jiných studií.

## Summary

Systemic allergenic reactions to *Hymenoptera* stings affect only small part of general population; however some of those can be life-threatening or even fatal. It was shown, that allergen specific immunotherapy with allergen of appropriate insect is effective sufficiently to prevent from reoccurring IgE mediated systemic allergic reaction to following sting. The aim of allergen-specific immunotherapy is to induce immunological tolerance to the administered allergen (or allergens) and therefore it is considered as causal treatment. In the contrary to the symptomatic (pharmacological) treatment the allergen-specific immunotherapy affects natural course of allergic disease. On the other hand, this treatment is not without risk of systemic allergic reactions and therefore must be put in hands of experienced physician and carried out in the department with available rescue equipment. The first part of diploma thesis is directed to theoretical knowledge about *Hymenoptera* venom allergy, namely about taxonomy of causal insect, epidemiological aspects, clinical feature, diagnosis, treatment and preventive measures. In the second part of diploma thesis are then summarized results of the research on the particular sample of patients, who undergone allergen-specific immunotherapy with appropriate venom in the Department of Allergology and Clinical Immunology of University Hospital Královské Vinohrady. Integral part of diploma thesis is also the comparison between results obtained from this sample of patients with findings from other researches.



## Přehled tabulek a grafů

- Tabulka 1.1-1: Medicínsky významné druhy *Hymenopter*, vyskytující se v Evropě
- Tabulka 1.2-1: Přehled identifikovaných alergenů u některých druhů *Hymenopter*
- Tabulka 3.1-1: Klasifikace alergické reakce po bodnutí *Hymenopter* (podle Muellera)
- Tabulka 3.2-1: Atypické reakce po bodnutí *Hymenopter* (podle Muellera)
- Tabulka 4.2-1: Kontraindikace pro provedení kožních testů
- Tabulka 5.1-1: Aktivity, které představují zvýšené riziko náhodného bodnutí
- Tabulka 5.2-1: Klinická kritéria pro diagnózu anafylaxe
- Tabulka 6.2-1: Rozdělení alergických pacientů podle jednotlivých osob
- Tabulka 6.2-2: Rozdělení pacientů podle alergie na jednotlivé druhy *Hymenopter*
- Tabulka 6.2-3: Rozdělení pacientů podle pohlaví a alergie na jednotlivé druhy *Hymenopter*
- Tabulka 6.3-1: Srovnávací stupnice reaktivity pro SPTs
- Tabulka 6.4-1: Dynamika titrů jedově specifických protilátek ve sledované populaci
- Tabulka 7-1: Závislost stupně SR v na pohlaví
- Tabulka 7-2: Distribuce závažnosti SR podle věku
- Tabulka 7-3: Distribuce závažnosti SR podle jednotlivých druhů *Hymenopter*
- Tabulka 7-4: Závažnost SR v závislosti na stupni reaktivity v SPTs
- Tabulka 7-5: Závažnost SR v závislosti na RAST třídě jedově specifických protilátek IgE
- Tabulka 7-6: Závažnost SR v závislosti na bazální hladině sérové tryptázy
- Tabulka 7-7: Distribuce závažnosti reakcí u pacientů reexponovaných během nebo po skončení VIT
- Tabulka 7-8: Podrobná analýza změny klinické reaktivity během VIT
- Tabulka 7-9: Distribuce závažnosti reakcí u pacientů, reexponovaných bodnutí před zahájením VIT
- Graf 6-1: Rozdělení alergických pacientů podle jednotlivých osob
- Graf 6-2: Dynamika jedově specifického IgE ve sledované populaci
- Graf 6-3: Dynamika jedově specifického IgG4 ve sledované populaci
- Graf 7-1: Závažnost SR v závislosti na stupni positivity v kožních prick testech
- Graf 7-2: Závažnost SR v závislosti na RAST třídě protilátek IgE
- Graf 7-3: Distribuce závažnosti reakcí u pacientů reexponovaných během nebo po skončení VIT

## Seznam použité literatury

- <sup>1</sup> Zahradník J. Blanokřídli. Praha, Artia, 1987
- <sup>2</sup> Steen CHJ, Janniger CK, Schutzer SE, Schwarz RA. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. *International Journal of Dermatology* 2004
- <sup>3</sup> Mueller UR. Insect sting allergy: clinical picture, diagnosis and treatment. Stuttgart/New York: Gustav Fischer Verlag, 1990.
- <sup>4</sup> Van Hage-Hamsten M, Valenta R. Specific immunotherapy - the induction of new IgE-specificities? *Allergy* 2002; **57**: 375-378
- <sup>5</sup> Alvarez-Cuesta E, Bosquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling H-J, Valovirta E. Subcutaneous immunotherapy. *Allergy* 2006; **62** (s82): 5-13
- <sup>6</sup> Reisman RE. Insect Allergy in Middleton EJr. *Allergy : Principles and Practice, Volume II*. St. Luis, USA: C.V. Mosby Company, 1988
- <sup>7</sup> Villalta D, Corraza D, Martelli P, Cappelletti P. A rare case of anaphylactic reaction due to a red wood ant (*Formica rufa*) sting in north-eastern Italy. *Posters: Hypersensitivity. Allergy* 2002; **57**, s73: 119-124.
- <sup>8</sup> Špičák V, Panzner P. *Alergologie*. Praha, Galén, 2004
- <sup>9</sup> Annala I. Bee venom allergy. *Clin Exp Allergy* 2000; **30**:1682-1687
- <sup>10</sup> De Jong NW, De Groot H, Vermeulen AM. Allergy to bumblebee venom. III. Immunotherapy follow-up study (safety and efficacy) in patients with occupational bumblebee-venom anaphylaxis. *Allergy* 1999; **54**: 980-984
- <sup>11</sup> <http://www.allergen.org/List.htm>
- <sup>12</sup> Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004; **59**: 243-267
- <sup>13</sup> Severino MG, Campi P, D. Macchia, Manfredi M, Turillazzi S, Spadolini I, Bilò MB, Bonifazi F. European *Polistes* venom allergy. *Allergy* 2006; **61**: 860-863.
- <sup>14</sup> Fuchs M, Potravinové alergie - zkřížená alergie. *Alergie* 2003; **2**.
- <sup>15</sup> Mahler V, Fuchs T, Gutgesell C, Schuler G, Kraft D, Valenta R. Natural rubber latex, bee and wasp venom share IgE epitopes. *Posters: Hypersensitivity. Allergy* 2002; **57**, s73: 119-124.
- <sup>16</sup> Fernandez J, Blanca M, Soriano V, Sanchez J, Juarez C. Epidemiological study of prevalence allergic reactions to Hymenoptera in rural population in the Mediterranean area. *Clin Exp Allergy* 1999; **29**: 1069-1074.
- <sup>17</sup> Bilò BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JNG & the EAACI Interest Group on Insect venom Hypersensitivity. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2005; **60**: 1339-1349.
- <sup>18</sup> Canitez Y, Sapan N. Epidemiology of Hymenoptera venom allergy in Turkish children aged 6-15 years; allergic reactions and related risk factors; evaluation of venom intradermal test and venom-specific IgE results. *Posters: Hypersensitivity. Allergy* 2002; **57**, s73: 119-124.
- <sup>19</sup> Dobek R. Comparison of the prevalence of clinical symptoms and its immunological markers in the adult population of Wrocław, Poland. *Posters: Hypersensitivity. Allergy* 2002; **57**, s73: 119-124.
- <sup>20</sup> Haeberli G, Brönnimann M, Hunziker T, Müller U. Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**: 1210-1220.

- 
- <sup>21</sup> Dubios AEJ. Mastocytosis and Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; **4**: 291-295
- <sup>22</sup> Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Flabbee J, Beaudouin E, Kanny G. Epidemiology of life-threatening anaphylaxis: a review. *Allergy* 2005; **60**: 443-451
- <sup>23</sup> Helbling A, Hurni T, Mueller UR, Pichler WJ. Incidence anaphylaxe with circulatory symptoms: a study over a 3-year period comprising 940 000 inhabitants Swiss Canton Bern. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**: 285-290.
- <sup>24</sup> Ruëff F. Special aspects of immunotherapy in children. *JDDG* 2006; **2**: 143-151.
- <sup>25</sup> Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie*. Praha, Triton, 2002.
- <sup>26</sup> Demoly P, Lebel B, Arnoux B. Alergen induced mediator release tests. *Allergy* 2003; **58**: 553-558.
- <sup>27</sup> Vyjádření výboru ČSAKI. Specifická alergenová imunoterapie. *Alergie* 2002; **4**.
- <sup>28</sup> Kučera P, Cvačková M, Pahl J. Expoziční test jedem blanokřídlého hmyzu-metodika. *Alergie* 2002; **1**: 23-26.
- <sup>29</sup> Smorawska E, Iwaszkiewicz J, Kowalski ML. Skin tests and serum-specific IgE antibody in patients with venom allergy who identified the stinging insect. Posters: Hypersensitivity. *Allergy* 2002; **57**, s73: 119-124.
- <sup>30</sup> García-Robaina JC, De La Torre-Morín F, Vazquez-Moncholi C, Fierro J, Bonnet-Moreno C. The natural history of *Apis*-specific IgG and IgG4 in beekeepers. *Clin Exp Allergy* 1997; **27**: 418-423.
- <sup>31</sup> Boumiza R, Debart A-L, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clinical and Molecular Allergy* 2005; **3**: 9.
- <sup>32</sup> Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerc LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004; **34**: 332-339
- <sup>33</sup> Payne V, Kam PCA. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anesthesia* 2004; **59**: 695-703.
- <sup>34</sup> Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, De Clerc LS, Stevens WJ. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; **61**: 1028-1039.
- <sup>35</sup> Honzová S, Havranová M. Test aktivace bazofilů, jeho přínos pro klinickou praxi. *Alergie*. 2003; **5**: 292-297.
- <sup>36</sup> Havranová M, Šetinová I, Honzová S. Měření aktivace bazofilů - CD63 nebo CD203c? *Alergie* 2006; **1**: 8-12.
- <sup>37</sup> Zollner TM, Spengler K, Podda M, Ergezinger K, Kaufmann R, Boehncke W-H. The Western blot is a highly sensitive and efficient technique in diagnosis allergy to wasp venom. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**: 1754-1761.
- <sup>38</sup> Alvarez-Cuesta E, Bosquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling H-J, Valovirta E. Standards for practical allergen specific immunotherapy. *Allergy* 2006; **62** (s82): 1-3
- <sup>39</sup> Bonifazi F, Jutel M, Bilò BM, Birnbaum J, Mueller U & EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practise. *Allergy* 2005; **60**: 1459-1470.
- <sup>40</sup> Petru V. Návrh doporučeného postupu - diagnóza a léčba anafylaktických reakcí. *Alergie* 2002; **4**:
- <sup>41</sup> Muraro A, Roberts G, Clark A, Eigenmann PA, Halken S, Lack G, Moneret-Vautrin A, Niggemann F, Rancé F. The management of anaphylaxis in childhood: position paper of European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy* 2007; **62**: 857-871.
- <sup>42</sup> Alvarez-Cuesta E, Bosquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling H-J, Valovirta E. Noninjective immunotherapy. *Allergy* 2006; **62** (s82): 14-20

- 
- <sup>43</sup> Alvarez-Cuesta E, Bosquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling H-J, Valovirta E. Allergen products. *Allergy* 2006; **62** (s82): 3-5
- <sup>44</sup> Mueller UR. Venom immunotherapy: aqueous vs. Aluminium hydroxid adsorbed extracts. *Allergy* 2001; **59**: 577-578.
- <sup>45</sup> Müller UR. Recombinant Hymenoptera venom allergens. *Allergy* 2002; **57**: 570-576.
- <sup>46</sup> Hanzlíková J, Haschová M, Panzer P, Malkusová I, Gutová V. Alergenová oimunoterapie u pacientů s přecitlivělostí na jed Hymenopter. *Alergie* 2002; s3.
- <sup>47</sup> Birnbaum J, Ramadour M, Magnan A, Vervloet D. Hymenoptera ultra-rush venom immunotherapy (210 min): a safety study and risk factors. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**: 58-64.
- <sup>48</sup> Reimers A, Hari Y, Mueller U. Reduction of side-effects from ultrarush immunotherapy with honeybee venom by pretreatment with fexofenadin: a double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy* 2000; **55**: 484-488.