

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

DIZERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Martina Vachová

2018

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Doktorský studijní program

Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie

Systemové a lokální alergické reakce po bodnutí hmyzem z hlediska epidemiologického,
diagnostického a terapeutického

Systemic and local allergic insect sting reactions from the epidemiological, diagnostic a
therapeutic point of view

MUDr. Martina Vachová

Školitel: prof. MUDr. Petr Panzner, CSc.

Plzeň 2018

Abstrakt:

Alergie na včelí a vosí jed ohrožuje pacienta závažnou, mnohdy život ohrožující anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem. Správná diagnostika a léčba je tudíž pro pacienta s touto diagnózou zcela zásadní a patří do rukou erudovaného alergologa. Cílem naší práce bylo poskytnout komplexní pohled na tyto nemocné, a to z mnoha různých úhlů pohledů, z pohledu epidemiologického, diagnostického a terapeutického. Nejprve jsme se zaměřili na odhalení prediktorů těžké reakce po bodnutí hmyzem, dále jsme hodnotili přínos aktuálně dostupných laboratorních metod pro diagnostiku alergie na hmyzí jed a sledovali jsme i změny imunologických parametrů v průběhu léčby imunoterapií hmyzím jedem. Všechny tyto dílčí záměry se nám podařilo splnit. Jako prediktory těžké reakce jsme odhalili věk (riziko narůstá s věkem), bodnutí do oblasti hlavy a mužské pohlaví. Rovněž jsme zhodnotili přínos jednotlivých diagnostických metod a navrhli jsme i možný způsob, jakým diagnostiku alergie na hmyzí jed optimalizovat. V průběhu léčby imunoterapií hmyzím jedem jsme zaznamenali statisticky významné změny imunologických parametrů. Z důvodu malého počtu bodnutí hmyzem v průběhu léčby jsme však zatím nemohli ověřit klinickou relevanci těchto změn.

Abstract:

Hymenoptera venom allergy threatens the patients with severe, often life threatening anaphylactic sting reaction. Proper diagnostics and treatment are therefore crucial for the patient with this diagnosis and should be performed by an experienced allergist. We aimed to provide a comprehensive look at these patients, from the epidemiological, diagnostic and therapeutic point of view. Initially, we focused on predictors of severe systemic sting reactions. Then we followed by evaluation of the utility of available laboratory diagnostic methods and by monitoring of immunological parameters during venom immunotherapy. We met all these goals. We detected higher age, sting localization in the head region and male gender as predictors of severe systemic sting reaction. We also evaluated the clinical utility of all diagnostics methods, and we even suggested the possible way, how to optimize the diagnostic procedure in patients with Hymenoptera venom allergy. We noticed significant changes in immunological parameters during venom immunotherapy. Due to a low number of stings during treatment, we have not been able to evaluate the clinical relevance of these changes yet.

Prohlášení autora:

Prohlašuji, že jsem doktorskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby byla tato práce uložena v knihovně Lékařské fakulty UK v Plzni a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svoji publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje tento zdroj informací citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Plzeň,2018

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	6
1 Úvod.....	7
1.1 Etiologie.....	7
1.2 Epidemiologie.....	7
1.3 Klinický obraz.....	8
1.4 Diagnostika alergie na hmyzí jed.....	10
1.4.1 Anamnéza a fyzikální vyšetření.....	10
1.4.2 Indikace a načasování diagnostických testů.....	13
1.4.3 Kožní testy.....	13
1.4.4 Vyšetření specifického IgE k extraktům hmyzích jedů.....	14
1.4.5 Dvojitá pozitivita kožních testů a/nebo specifických IgE k extraktům včelího a vosího jedu.....	15
1.4.6 Molekulární diagnostika.....	16
1.4.7 Test aktivace bazofilů.....	19
1.4.8 Tryptáza.....	20
1.5 Rizikové faktory.....	20
1.6 Léčba alergie na hmyzí jed.....	26
1.6.1 Léčba akutních projevů HVA.....	27
1.6.2 Dlouhodobý “management” pacienta s HVA.....	29
2 Cíl práce.....	42
2.1 Sběr a vyhodnocení epidemiologických dat.....	42
2.2 Diagnostika alergie na jed blanokřídlého hmyzu.....	42
2.3 Léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu pomocí VIT.....	42

3	Popis řešení a výsledky výzkumu.....	44
3.1	Sběr a vyhodnocení epidemiologických dat.....	44
3.1.1	Metodika.....	44
3.1.2	Postup hodnocení.....	44
3.1.3	Výsledky.....	45
3.1.4	Hodnocení a diskuze.....	56
3.2	Diagnostika alergie na jed blanokřídlého hmyzu.....	58
3.2.1	Zhodnocení přínosu laboratorních metod pro diagnostiku alergie na včelí a vosí jed.....	58
3.2.2	Cílený pohled na molekulární diagnostiku s využitím všech dostupných alergenových molekul včelího jedu.....	69
3.3	Léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu pomocí VIT.....	72
3.3.1	Metodika.....	72
3.3.1	Výsledky.....	72
4	Závěr.....	87
5	Seznam použité literatury.....	88
6	Přílohy.....	96
	Příloha 1 Publikace autorky ve vztahu k tématu.....	96
	Příloha 2 Informace pro pacienty a informovaný souhlas pacienta se sledováním laboratorních parametrů v průběhu léčby specifickou imunoterapií hmyzími jedy.....	98
	Příloha 3 Informace pro pacienty a informovaný souhlas pacienta se statistickým zpracováním laboratorního vyšetření u pacientů s alergií na hmyzí jed...	102
7	Poděkování.....	105

Seznam použitých zkratek

ACEI inhibitory enzymu angiotenzin konvertázy (angiotensin converting enzyme inhibitors)

BAT test aktivace bazofilů (basophil activation test)

CCD zkříženě reaktivní karbohydrátové determinanty (cross reactive carbohydrate determinants)

EAACI Evropská akademie alergologie a klinické imunologie (European Academy of Allergy and Clinical Immunology)

EADOAS Evropská multicentrická studie sledující vliv antihypertenzní medikace na tíži anafylaxe a vedlejší účinky během imunoterapie hmyzím jedem (The effect of antihypertensive drugs on severity of anaphylaxis and side effects during insect venom immunotherapy – multicenter study)

HVA alergie na jed blanokřídlého hmyzu (hymenoptera venom allergy)

IgE imunoglobulin E

IgG4 imunoglobulin G4

LLR velké lokální reakce (large local reaction)

MAOI inhibitory monoaminoxidázy (monoamine oxidase inhibitors)

MC žírné buňky (mast cells)

MCAS syndrom aktivovaných mastocytů (mast cell activation syndrom)

MMAS syndrom aktivace monoklonálních žírných buněk (monoclonal mast cell activation syndrom)

SR systémové reakce (systemic reaction)

VIT imunoterapie hmyzím jedem (venom immunotherapy)

WHO Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

1 Úvod

Hmyzí bodnutí je jednou z nejčastějších příčin anafylaxe, která díky své nepředvídatelnosti a akutnímu, mnohdy život ohrožujícímu průběhu, představuje závažný medicínský problém. Diagnostika a léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu vychází z doporučeného postupu Evropské akademie alergologie a klinické imunologie (EAACI). Zatímco pro léčbu alergie na hmyzí jed byl doporučený postup recentně aktualizován [8, 64], pro diagnostiku alergie na hmyzí jed je stále v platnosti postup z roku 2005 [5].

1.1 Etiologie

Nejčastějšími původci alergických reakcí po bodnutí hmyzem jsou v našich geografických podmínkách zástupci čeledi Apidae (včelovití) a Vespidae (sršňovití) (Tabulka 1.1). Z čeledi Apidae se nejčastěji setkáváme s reakcemi po bodnutí včelou medonosnou, alergické reakce po inzultu čmelákem jsou u nás vzácné. Z čeledi Vespidae bývají ve střední Evropě nejčastější reakce po bodnutí vosou či sršní. S alergickými reakcemi na jed mravenců se setkáváme jen zcela vyjíměčně [5].

1.2 Epidemiologie

Většina populace (až 94,5%) je ve svém životě alespoň jedenkrát bodnuta včelou či vosou. Prevalence výskytu velkých lokálních reakcí se v populaci pohybuje v rozmezí od 2,4 do 26,4%, u včelařů dosahuje dokonce až k 38%. Prevalence systémových reakcí po bodnutí je dle evropských epidemiologických studií z posledního desetiletí 0,3 až 8,9%, u dětí do 0,8%. Velmi vysoká je prevalence asymptomatické senzibilizace k hmyzím jedům (přítomná IgE senzibilizace k hmyzím jedům u pacienta s normální klinickou reaktivitou na bodnutí), která se pohybuje od 9,3 do 28,7%. Mortalita je udávána v rozmezí 0,03 - 0,48 úmrtí na 1 000 000 osob ročně [6]. Tato data však mohou být podhodnocena, neboť alergická reakce po bodnutí hmyzem jako příčina úmrtí nebývá mnohdy uváděna.

Tabulka 1.1 - Zjednodušené schéma taxonomie blanokřídlého hmyzu

Řád	Čeleď	Rod	Druh
Hymenoptera (blanokřídlí)	Apidae	Apis (včela)	včela medonosná
		Bombus (čmelák)	čmelák zemní, skalní, lesní
	Vespidae	Vespa (sršeň)	sršeň obecná
		Vespula (vosa)	vosa útočná, obecná
		Dolichovespula (vosa)	vosa prostřední, lesní
		Polistes (vosík)	vosík francouzský
	Myrmicidae	Myrmica (mravenec)	mravenec žahavý

1.3 Klinický obraz

Existuje široké spektrum možných klinických reakcí po bodnutí hmyzem. Normální reakci představuje lokální otok, bolestivost, svědění a zčervenání v okolí místa vpichu, ustupující po několika hodinách. Nejčastějším klinickým projevem alergie na hmyzí jed jsou tzv. velké lokální reakce (LLR) po bodnutí. Tyto reakce jsou definovány jako otok v okolí místa vpichu přesahující 10 cm v průměru, spojený se zarudnutím a svěděním, trvající déle než 24 hodin. Nejzávažnějším klinickým projevem alergie na hmyzí jed jsou systémové reakce, které jsou dle rozsahu a tíže příznaků klasifikovány do 4 stupňů. K dispozici jsou dvě možná klasifikační schémata systémových reakcí, dle H. L. Müllera (Tabulka 1.2) a dle Ringa a Messmera (Tabulka 1.3). Nejlehčí stupeň je dle obou schémat představován generalizovanými kožními symptomy, s narůstajícím rozsahem a tíží příznaků pak narůstá i stupeň reakce [5]. U nás je častěji užívaná klasifikace dle H. L. Müllera.

Zatímco k uvedeným reakcím může dojít i po jediném hmyzím bodnutí, v případě mnohočetného bodnutí (obvykle 50 až několik stovek bodnutí), může dojít k systémové toxické reakci. Rozsah příznaků při této reakci závisí na dávce jedu. Můžeme se setkat s rabdomyolýzou, poškozením myokardu, hepatopatií, akutní renální insuficiencí, poruchami hemokoagulace s krvácením a disseminovanou intravaskulární koagulopatií.

Počet bodnutí, který může navodit smrtelnou reakci, kolísá mezi 200 - 1000, u dětí však může stačit i méně než 50. Zřídka po bodnutí dochází k neobvyklým reakcím, např. sérové nemoci, periferní neuropatii, akutní disseminované encefalomyelitidě a glomerulonefritidě [5]. Příčinná souvislost těchto stavů k bodnutí je však mnohdy zpochybnitelná. Zvláštní klinickou jednotkou, s kterou se můžeme po bodnutí také setkat, je tzv. Kounisův syndrom. Jedná se o akutní koronární syndrom doprovázející alergickou reakci po bodnutí hmyzem, navozený koronárním vazospazmem.

Tabulka 1.2 - Klasifikace systémové reakce po bodnutí dle H. L. Müllera

Stupeň	Příznaky
I.	generalizovaná urtikárie, svědění, nevěle nebo úzkost
II.	některý příznak z výše uvedených a nejméně dva z následujících: generalizovaný otok, sevření na hrudi, bolesti břicha, průjem, nauzea a zvracení, závratě
III.	některý příznak z výše uvedených a nejméně 2 z následujících: dysartrie, stridor, dyspnoe, sípání, dysfagie, zmatenost nebo pocit hrozící katastrofy (smrti)
IV.	některý příznak z výše uvedených a nejméně dva z následujících: pokles tlaku, kolaps, inkontinence, bezvědomí, cyanóza, anafylaktický šok

Tabulka 1.3 - Klasifikace systémové reakce po bodnutí dle Ringa a Messmera

Stupeň	Příznaky
I.	generalizované kožní symptomy (flush, generalizovaná kopřivka, angioedém)
II.	mírné plicní, kardiovaskulární a gastrointestinální příznaky
III.	anafylaktický šok, ztráta vědomí
IV.	zástava srdce, apnoe

1.4 Diagnostika alergie na hmyzí jed

Poslední doporučení Evropské akademie alergologie a klinické imunologie (EAACI) týkající se diagnostiky alergie na jed blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera) bylo publikováno v roce 2005 [5]. Přestože došlo v posledních letech v této oblasti k mnoha pokrokům, zůstávají základní pilíře tohoto doporučení stále v platnosti. Jak indikace k provedení diagnostických testů, tak i základní spektrum vyšetřovacích metod zůstávají stejné. Avšak zatímco některé metody se v běžné klinické praxi dostávají do pozadí, jiné jsou díky svému rozvoji a tudíž většímu přínosu upřednostňovány.

1.4.1 Anamnéza a fyzikální vyšetření

Do ordinace alergologa přichází řada pacientů s anamnézou reakce různého charakteru po bodnutí hmyzem. Většinou jsou odesláni k alergologickému vyšetření svými praktickými lékaři po té, co byli pro reakci po bodnutí akutně ošetřeni na pohotovosti nebo přímo v terénu složkami lékařské záchranné služby. Alergologické vyšetření vždy zahájíme podrobným anamnestickým rozhovorem. Hlavním cílem tohoto rozhovoru je zhodnocení charakteru proběhlé klinické reakce po bodnutí. Nejčastější klinickou manifestací alergie na hmyzí jed jsou velké lokální případně systémové reakce po bodnutí. Zatímco jakákoliv proběhlá systémová reakce po bodnutí hmyzem je nadále jasnou indikací k provedení diagnostických testů, velké lokální reakce mezi jednoznačné indikace stále nepatří [5]. Rozlišení mezi lokální a systémovou alergickou reakcí po bodnutí je tudíž zcela zásadní pro další nejenom diagnostický, ale i terapeutický postup. Proběhlou systémovou reakci rovněž klasifikujeme dle rozsahu a tíže celkových příznaků do jednoho ze čtyř stupňů (I - IV) dle H. L. Müllera, což je nezbytné při následném rozhodování o indikaci zahájení specifické imunoterapie [64]. Nedílnou součástí anamnézy je také snaha o identifikaci hmyzu odpovědného za reakci. Bohužel řada pacientů není schopna jednoznačně určit druh hmyzu, kterým byla bodnuta. Pro další diagnostický a léčebný postup je však informace týkající se druhu hmyzu, podobně jako charakter klinické reakce, velmi důležitá. Pro přesnější určení bodajícího hmyzu obvykle vycházíme ze znalostí jeho životních podmínek a chování. Cíleně se pacienta dotazujeme na přítomnost žihadla v místě vpichu (žihadlo zanechává včela), na roční období, ve kterém k příhodě došlo (bodnutí vosou je pravděpodobnější v pozdním létě a na podzim). Zajímá nás také, kde a při jaké činnosti situace nastala (např. bodnutí při chůzi

naboso v trávě je typické spíše pro včelu, zatímco bodnutí v blízkosti spadlého ovoce pro vosu). Pro snadnější rozpoznání můžeme pacientovi předložit obrázek konkrétního hmyzu (Obrázek 1.1 a 1.2).

Fyzikální vyšetření se neliší od běžného základního interního vyšetření, cíleně však pátráme po možných známkách kožní formy mastocytózy, např. urticaria pigmentosa, která se u pacientů s alergií na hmyzí jed může vyskytovat (Obrázek 1.3).



Obrázek 1.1 - Včela medonosná (foto autorky)



Obrázek 1.2 Vosa obecná (foto autorky)



Obrázek 1.3 Urticaria pigmentosa (foto autorky, uvedeno se souhlasem pacienta)

1.4.2 Indikace a načasování diagnostických testů

Dle současně platných doporučení jsou pro diagnostiku alergie na hmyzí jed indikováni pouze pacienti s anamnézou proběhlé systémové reakce po bodnutí a pouze těm z nich, kterým je potvrzena IgE senzibilizace k včelímu a/nebo vosímu jedu je ve většině případů indikována imunoterapie příslušným hmyzím jedem (VIT) [12, 64]. Důvodem, proč nejsou diagnostické testy jednoznačně indikovány i u lokálních reakcí, je pravděpodobně nízké riziko (5 - 15%, dle posledních prací dokonce pouze do 7%) rozvoje následné systémové reakce u těchto pacientů [7, 26]. Tudíž i v případě potvrzení senzibilizace k hmyzímu jedu, která je navíc u pacientů s lokálními reakcemi velmi častá (až u 80% pacientů) (3), nejsou tito pacienti i dle recentně aktualizovaných doporučení indikováni ani k následné VIT [64], ani k vybavení autoinjektorem [8]. Důvodem, proč diagnostické testy neprovádět ani jiným osobám, např. osobám s obavou z rozvoje reakce na základě zpráv v médiích, osobám s rodinnou anamnézou systémové reakce nebo dokonce jako screeningové vyšetření populace, je velmi vysoká prevalence již výše zmiňované asymptomatické senzibilizace k hmyzím jedům v populaci. Ta je u dospělých velmi častá, pohybuje se v rozmezí od 9,3% až do 28,7%. Naštěstí riziko rozvoje systémové reakce u asymptomaticky senzibilizovaného jedince je velmi nízké (5,3%) [63]. Potvrzená senzibilizace k hmyzímu jedu u pacienta bez předchozí anamnézy systémové reakce by tudíž vedla k neopodstatněné stigmatizaci vyšetřovaného jedince a k možným diagnosticko-terapeutickým rozpakům indikujícího lékaře, neboť asymptomatická senzibilizace jednoznačně není indikací k preskripci adrenalinového autoinjektoru ani indikací k imunoterapii [8, 64].

Kromě správné indikace k provedení je důležité i správné načasování diagnostických testů. Dle stávajícího doporučení se testy s ohledem na možnou refrakterní periodu provádějí s odstupem minimálně 2 týdnů od reakce. V případě negativity testů je třeba u pacientů s přesvědčivou anamnézou systémové reakce vyšetření opakovat za 1 - 3 měsíce [5, 8].

1.4.3 Kožní testy

Kožní testy jsou stále diagnostickým testem první volby. Jsou rychlé, jednoduché a finančně nenáročné. K jejich provedení se používají komerčně dostupné čisté standardizované extrakty hmyzích jedů. Testy se provádějí „stupňovitě“, což znamená postupnou testaci

s jedy ve vzestupné koncentraci do dosažení pozitivního výsledku testů či do dosažení doporučené maximální koncentrace testu. Testace se obvykle zahajuje prick testy s extrakty včelího a vosího jedu o koncentraci 100 µg/ml (u rizikových pacientů lze testaci zahájit koncentrací 10 µg/ml), v případě negativity se pokračuje testací s jedy o koncentraci 300 µg/ml (Soluprick SQ, ALK – Abello). V případě negativity prick testů se doplňují intradermální testy, které se opět provádějí „stupňovitě“ do dosažení pozitivního výsledku. Intradermální testace je obvykle zahajována s jedy (0,02 ml) o koncentraci 0,001 µg/ml, v případě negativity pokračujeme s testací 0,01, 0,1 a 1 µg/ml. Pokud jsou testy i v této koncentraci negativní, dále již netestujeme a testaci ukončujeme. Vyšší koncentrace jedů se k intradermální testaci nedoporučují pro možnost vyvolání falešně pozitivní reakce. K intradermálním testům se používají jiné preparáty než k prick testům. Jedná se o extrakty hmyzích jedů ředěné albuminem bez obsahu glycerolu. Tyto preparáty (Pharmalgen, ALK-Abello; Venomil, Bencard Allergie; Venomenhal, HAL Allergy) nejsou v ČR bohužel registrovány a jejich použití tak podléhá hlášení Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv. Kožní testy (včetně intradermálních) jsou považovány za bezpečné, dokonce byla doložena i bezpečnost simultánního testování všech koncentrací hmyzích jedů současně [40, 57]. Přesto simultánní testování zatím není i přes deklarovanou bezpečnost obecně doporučeným postupem, standartním postupem zůstává testování „stupňovité“. Přestože je doplnění intradermálních testů součástí doporučení EAACI [5], je jejich provádění v ČR neprávem opomíjeno. Hlavním důvodem je pravděpodobně aktuálně horší dostupnost preparátů určených k jejich provedení a nutnost následného hlášení jejich použití jakožto neregistrovaného léčivého přípravku.

1.4.4 Vyšetření specifického IgE k extraktům hmyzích jedů

Původní laboratorní metodou užívanou k detekci specifických IgE protilátek byl RAST (Radio Allergo Sorbent Test). V současnosti se však běžněji užívá řada neradioaktivních metod z něj odvozených. Pro diagnostiku alergie na hmyzí jed jsou nyní nejčastěji užívané systémy ImmunoCAP (Phadia AB, ThermoFisher Scientific) a Immulite (Siemens Healthcare). Tyto systémy se mezi sebou liší v metodice stanovení (stanovení IgE protilátek

k alergenům na pevné fázi v případě systému ImmunoCAP, případně v tekuté fázi v případě systému Immulite), nicméně senzitivita stanovení specifických IgE protilátek oběma systémy je vysoká, blíží se senzitivě intradermálních testů [53, 66, 68]. Stejně jako v případě kožních testů se vyšetřují obvykle specifické IgE protilátky k včelímu i vosímu jedu současně. Důvodem, proč vyšetřujeme současně senzibilizaci k včelímu i vosímu jedu, je fakt, že údaje od pacientů stran druhu hmyzu nelze považovat za zcela validní. Řada z nich totiž není schopna správně identifikovat hmyz, kterým byla bodnuta a údaje jsou tudíž nespolehlivé. Provedení testů s vosím jedem je vzhledem k velmi vysoké podobnosti vosího a sršního jedu (cca 95% sekvenční homologie) ve většině případů plně dostačující i u pacientů s anamnézou alergické reakce po bodnutí sršní. Obohacení extraktu vosího jedu o jeho hlavní složku Antigen 5 v roce 2012 je příčinou aktuálně velmi vysoké senzitivity stanovení IgE protilátek k extraktu vosího jedu systémem ImmunoCAP, s vzestupem senzitivity z původních 83,4% až na současných 96,8% [68]. Mezinárodně uznávanou hranicí pro pozitivitu (cut-off) je při použití obou zmíněných systémů hladina 0,35 kU/L. Výsledky vyšetření však musí být vždy hodnoceny v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a s přihlédnutím k hladině celkového IgE. Bylo publikováno, že vyšší hladina celkového IgE (> 250 kU/l) pravděpodobně predisponuje pacienty s alergií na hmyzí jed k lehčímu průběhu alergické reakce po bodnutí [58]. Dle posledních prací mohou být u pacientů s nízkou hladinou celkového IgE klinicky relevantní dokonce hodnoty již mezi 0,1 - 0,35 kU/l [30].

1.4.5 Dvojitá pozitivita kožních testů a/nebo specifických IgE k extraktům včelího a vosího jedu

Kožní testy společně se stanovením specifických IgE protilátek k extraktům hmyzích jedů představují standardní, dlouhodobě zavedené nástroje užívané k potvrzení alergie na hmyzí jed. Jedná se sice o metody s dobrou senzitivitou, nicméně zásadním problémem, s kterým se při provedení těchto testů setkáváme až u 30 - 60% pacientů, je přítomnost dvojitá pozitivita výsledků těchto testů současně s vosím i včelím jedem [42]. Tato dvojitá pozitivita výsledků však obvykle neodráží skutečnou alergii pacienta na oba jedy. Příčinou dvojitá pozitivita může být skutečná „pravá“ senzibilizace pacienta k druhově specifickým složkám včelího a vosího jedu, nicméně mnohem častější příčinou je zkřížená reaktivita mezi jedy. Jednou z možných

příčin zkřížené reaktivity je tzv. bílkovinou indukovaná neboli protein specifická zkřížená reaktivita, která je dána senzibilizací pacienta k vysoce homologním alergenovým složkám obsaženým jak ve včelím, tak i ve vosím jedu (Hyaluronidáza, Dipeptidylpeptidáza, Vitellogenin). Druhou, mnohem častější, příčinou zkřížené reaktivity je senzibilizace pacienta k CCD (zkříženě reaktivní karbohydrátové determinanty), které jsou vázané na řadu včelích i vosích alergenů [19, 54]. Velmi často přítomná dvojitá pozitivita výsledků „standardních testů“ vedla k rozvoji dalších diagnostických metod. Do praxe se tak postupně dostaly test aktivace bazofilů a molekulární diagnostika. Cílem těchto metod je v případě dvojité positivity „standardních testů“ rozlišit mezi zkříženou reaktivitou a skutečnou dvojitou senzibilizací pacienta k oběma jedům. Tyto metody by však měly být jednoznačně doplněny i u pacientů se suspektní anamnézou a negativitou „standardních testů“.

1.4.6 Molekulární diagnostika

Molekulární diagnostika je pro vyšetření alergie na jed Hymenopter dostupná již od roku 2010. Výhodou metody je možnost stanovení IgE protilátek nikoli k celému extraktu hmyzího jedu, ale přímo proti konkrétním alergenovým molekulám obsaženým ve včelím a vosím jedu. Rozvoj molekulární diagnostiky umožnila především stále se zlepšující znalost složení obou hmyzích jedů a možnost syntézy alergenových molekul v rekombinantní neglykosylované formě. Během posledních několika let se postupně rozšířila nabídka dostupných alergenových molekul ke komerčnímu využití, což umožňuje stanovení IgE protilátek k nejvýznamnějším vosím i včelím alergenům. Molekulární diagnostika tak jednoznačně přispívá ke zlepšení diagnostiky alergie na jed Hymenopter a stala se její nedílnou součástí.

Molekulární diagnostika alergie na včelí jed

V současné době je detailně popsáno 12 včelích alergenových molekul (Tabulka 1.4). Druhově specifické molekuly (obsažené pouze ve včelím jedu) jsou Phospholipáza A2 (Api m 1), Kyselá fosfatáza (Api m 3), Mellitin (Api m 4) a Icarapin (Api m 10). Další molekuly, které nejsou druhově specifické, neboť vykazují vysokou homologii svých peptidových sekvencí s podobnými alergeny vosího jedu, se označují jako homologní neboli

potenciálně zkříženě reagující. Senzibilizace k těmto molekulám může způsobit již zmíněnou protein specifickou zkříženou reaktivitu mezi včelím a vosím jedom. Mezi tyto alergeny patří Hyaluronidáza (Api m 2), Dipeptidylpeptidáza (Api m 5) a Vitellogenin (Api m 12) [54].

Za nejvýznamnější zkříženě reagující molekulu byla dlouho považována Hyaluronidáza, nicméně poslední práce ukázaly, že většina IgE proti Hyaluronidáze je namířena k připojeným CCD, nikoli k peptidovým sekvencím, tudíž bílkovinou indukovaná zkřížená reaktivita se zdá být v případě Hyaluronidázy vzácná [51]. Hyaluronidáza je navíc ve vosím jedu pouze vedlejším alergenem, je k ní senzibilizováno pouze 10 - 15% pacientů alergických na vosí jed, tudíž se Hyaluronidáza nyní považuje za relevantní včelí nikoli vosí alergen [31].

Tabulka 1.4 - Alergenové molekuly včelího jedu

Api m 1	Phospholipase A2
Api m 2	Hyaluronidase
Api m 3	Acid phosphatase
Api m 4	Mellitin
Api m 5	Dipeptidylpeptidase IV
Api m 6	Cysteine-rich trypsin inhibitor
Api m 7	CUB serine protease
Api m 8	Carboxylesterase
Api m 9	Carboxylpeptidase
Api m 10	Icarapin
Api m 11	Major royal jelly protein
Api m 12	Vitellogenin

druhově specifické
potenciálně zkříženě reagující

První molekulou uvedenou na trh byla druhově specifická rekombinantní Phospholipáza A2 (rApi m 1). Bohužel řada prací následně potvrdila, že senzitivita stavovení IgE protilátek k rApi m 1 není optimální, pohybuje se v rozmezí od 57 do 82% [28, 35, 53, 61], tudíž vyšetření IgE protilátek k rApi m 1 není pro potvrzení alergie na včelí jed dostačující. V roce 2014 byla publikována práce, která poprvé hodnotila senzitivitu stanovení IgE protilátek nejenom k rApi m 1, ale konečně i k širšímu panelu včelích alergenových molekul za použití experimentálního ImmunoCAP testu [33]. Tato práce identifikovala další hlavní včelí alergenové molekuly (ke kterým je senzibilizováno více než 50% pacientů), které byly postupně uvedeny na trh. Mezi tyto alergeny patří kromě Phospholipázy A2 (rApi m 1) i již

zmiňovaná Hyaluronidáza (rApi m 2), Kyselá fosfatáza (rApi m 3), Dipeptidylpeptidáza (rApi m 5) a Icarapin (rApi m 10). V současné době již můžeme vyšetřit IgE protilátky ke všem těmto molekulám rutinně pomocí systému ImmunoCAP (ImmunoCAP IgE panel), vhodnou alternativou je i stanovení IgE protilátek systémem Immulite, kde je ale paleta rutinně nabízených vyšetření omezena na rApi m 1 a rApi m 2 (Immulite IgE panel). Otázka, které molekuly a který detekční systém používat pro diagnostiku alergie na včelí jed ve skutečné reálné praxi, je nyní nepochybně nejožehavějším a nejdiskutovanějším tématem v oblasti alergie na jed Hymenopter. V rychlém sledu se objevují práce, diskutující tuto problematiku z mnoha různých pohledů [3, 52, 53, 65] a další práce na toto téma lze jistě očekávat.

Molekulární diagnostika alergie na vosí jed

Doposud bylo detailně charakterizováno celkem 5 vosích alergenů [54]. Druhově specifickými alergeny jsou Phospholipáza A 1 (Ves v 1) a Antigen 5 (Ves v 5). Homologními resp. potenciálně zkříženě reagujícími alergeny jsou Hyaluronidáza (Ves v 2), Dipeptidylpeptidáza (Ves v 3) a Vitellogenin (Ves v 6) (Tabulka 1.5). Od roku 2010 jsou komerčně dostupné oba druhově specifické alergeny rVes v 1 i rVes v 5 pro systém ImmunoCAP, navíc je od roku 2014 k dispozici rVes v 5 také pro systém Immulite. Senzitivita stanovení IgE protilátek k dostupným alergenům systémem ImmunoCAP byla již mnohokrát v minulých letech publikována, k rVes v 5 se pohybuje v rozmezí 85 - 90%, k rVes v 1 mezi 39 - 79% a ke kombinaci obou molekul rVes v 1 + rVes v 5 v rozmezí 92 - 100% [17, 28, 36, 62, 66, 68]. Dvě recentní práce z roku 2016 v souladu s předchozími pracemi opět potvrdily vysokou senzitivitu stanovení IgE protilátek k rVes v 5 systémem ImmunoCAP (87 resp 82%), ale nově i systémem Immulite (92 resp 93%). Navíc potvrdily i excelentní senzitivitu pro kombinaci vyšetření IgE protilátek k rVes v 1 + rVes v 5 systémem ImmunoCAP (98%) nebo při použití kombinace obou systémů rVes v 5 Immulite + rVes v 1 ImmunoCAP (97%) [52, 53]. V běžné klinické praxi bychom tedy měli aktuálně dostupným společným vyšetřením IgE protilátek k rVes v 5 + rVes v 1, bez ohledu na použitý systém, prakticky všechny pacienty s alergií na vosí jed zachytit.

Tabulka 1.5 - Alergenové molekuly vosího jedu

Ves v 1	Phospholipase A1
Ves v 2	Hyaluronidase
Ves v 3	Dipeptidylpeptidase IV
Ves v 5	Antigen 5
Ves v 6	Vitellogenin

druhově specifické
potenciálně zkříženě reagující

Kromě stanovení IgE protilátek k dostupným alergenovým molekulám včelího a vosího jedu by u pacienta s dvojí pozitivitou „standardních testů“ měly být vyšetřeny také protilátky proti CCD (bromelain, MUXF3). Výsledky tohoto vyšetření je třeba vždy hodnotit v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a výsledky ostatních vyšetření. Dvojí pozitivita testů s hmyzími jedy způsobená senzibilizací pacienta k CCD je považována za klinicky nerelevantní, nicméně potvrzená senzibilizace k CCD v žádném případě nevylučuje i možnou současnou klinicky relevantní senzibilizaci k hmyzím alergenům bílkovinné povahy [54, 60]. Proto je vyšetření IgE protilátek k CCD pouze pomocným vyšetřením, které musí být vždy hodnoceno společně s provedenou kompletní molekulární diagnostikou.

1.4.7 Test aktivace bazofilů (BAT)

Do spektra diagnostických metod alergie na jed Hymenopter patří i test aktivace bazofilů. Obecně jsou možné dva způsoby hodnocení aktivace bazofilů, reaktivita a senzitivita bazofilů. Reaktivita bazofilů spočívá v měření počtu bazofilů, které reagují na aktivaci daným stimulem, v našem případě hmyzím jedem v jedné koncentraci, která se pro použitý alergen jeví jako optimální. Senzitivita bazofilů se rovná koncentraci, při které odpovídá 50% všech reagujících bazofilů. Senzitivita bývá obvykle vyjadřována jako tzv. „CD-sens“, což je převrácená hodnota zjištěné koncentrace násobená 100 [29]. Ačkoliv test aktivace bazofilů není obvykle vyšetřením první volby, místo v diagnostice alergie na hmyzí jed mu stále právem náleží. I přes veškeré kontroverze metody (technická náročnost provedení, nutnost bezprostředního stanovení z čerstvé krve, chybění standardizace), stále existují indikace k jeho provedení. U pacientů s dvojí pozitivitou výsledků „standardních testů“ přispívá k rozlišení mezi alergií na včelí a vosí jed, a to zejména v případech, které nepomohla rozřešit ani molekulární diagnostika [15, 29, 60]. BAT by měl být doplněn

rozhodně také u pacientů s anamnézou systémové reakce a negativitou ostatních testů, s cílem potvrdit IgE senzibilizaci k hmyzímu jedu [34, 37]. Jako velmi nadějnou, vysoce specifickou metodou se jeví i provedení testu aktivace bazofilů s rekombinantními alergeny, které však zatím nejsou běžně dostupné [4]. O bazofil aktivčním testu se také diskutuje jako o vhodném potencionálním nástroji k monitoraci imunoterapie, neboť pokles aktivace bazofilů v průběhu léčby je pravděpodobně asociován s navozením tolerance k hmyzímu jedu [20].

1.4.8 Tryptáza

V souvislosti s diagnostikou alergie na jed Hymenopter nelze opominout vyšetření tryptázy. Stanovení bazální hladiny tryptázy by mělo být součástí vyšetření všech pacientů po anafylaktické reakci po bodnutí hmyzem. Zvýšená bazální hladina tryptázy je totiž významným rizikovým faktorem pro opakování obzvláště těžkých celkových reakcí po bodnutí. Zjištěná vyšší hladina tryptázy nad 11,4 µg/l tedy znamená, že máme před sebou velmi rizikového pacienta a je také indikací k vyšetření pacienta na možnou přítomnost mastocytózy. Diagnostika tohoto onemocnění již náleží hematologům, ke kterým tyto pacienty odesíláme [10].

1.5 Rizikové faktory

Bohužel zatím stále není k dispozici žádný parametr, který by předem umožnil předpovědět, kdo bude reagovat alergicky na bodnutí hmyzem. Nicméně v souvislosti s alergií na hmyzí jed se diskutují některé pravděpodobné rizikové faktory, které jednak mohou zvyšovat samotné riziko bodnutí anebo přímo ovlivňují tíži alergické reakce po bodnutí [5].

Mezi faktory zvyšující riziko bodnutí patří zejména aktivity spojené s vyšší expozicí hmyzu, což se týká některých povolání či zájmových aktivit, např. zahradníků, zemědělců, lesních dělníků, včelařů a jejich rodinných příslušníků (Tabulka 1.6). Jakákoliv činnost spojená s vyšším rizikem opakovaného bodnutí zvyšuje i riziko vzniku senzibilizace k hmyzímu jedu u predisponovaného jedince. Senzibilizace k hmyzímu jedu je sice nezbytnou, ale nikoli

jedinou podmínkou pro rozvoj alergické reakce po dalším bodnutí. Bohužel, proč někteří senzibilizovaní jedinci tolerují hmyzí bodnutí a jiní ne, není zatím jednoznačně objasněno. Prevalence tzv. asymptomatické senzibilizace (přítomná senzibilizace u jedince bez anamnézy alergické reakce po bodnutí) je v populaci poměrně velmi vysoká, pohybuje se v rozmezí od 9,3% až do 28,7%. V současné době však není považována za signifikantní rizikový faktor pro rozvoj následné systémové alergické reakce po bodnutí, neboť toto riziko je u asymptomaticky senzibilizovaného jedince velmi nízké (5,3%) [63].

Tabulka 1.6 - Aktivity spojené s vyšší expozicí hmyzímu bodnutí

Včelaři a jejich rodinní příslušníci
Povolání: zemědělci, farmáři, zahradníci, hasiči
Venkovní aktivity: piknik, tenis, fotbal, jízda na kole
Blízkost úlů a vosích hnízd v blízkosti obydlí

Opakované bodnutí hmyzem zvyšuje nejenom riziko rozvoje senzibilizace k hmyzímu jedu u doposud nesenzibilizovaného jedince, ale představuje i významné riziko pro pacienty, kteří již mají v anamnéze systémovou alergickou reakci po předchozím bodnutí. Faktorem, který hraje v tomto aspektu pravděpodobně roli je časový interval mezi bodnutími. S prodlužujícím se intervalem mezi bodnutími sice riziko opakování systémové reakce trvale klesá, ale i po 10 letech zůstává mezi 20 - 30%. Na druhé straně, velmi časté bodnutí pravděpodobně navozuje toleranci k hmyzímu jedu. Včelaři, kteří byli bodnuti více než 200 krát za rok, neměli žádnou reakci po bodnutí. Naproti tomu 45% včelařů, kteří byli bodnuti méně než 25krát za rok, systémovou alergickou reakci prodělali [5].

Mezi faktory ovlivňující tíži alergické reakce po bodnutí se řadí věk pacienta, již zmiňovaná předchozí systémová reakce po bodnutí v anamnéze, stavy spojené se zvýšenou bazální hladinou tryptázy, diskutuje se také lokalizace bodnutí, druh hmyzu, vliv přidružených komorbidit a medikace. U dětí je 60% systémových reakcí mírných, omezených pouze na kožní projevy. Naproti tomu u dospělých je 70% systémových reakcí spojeno s kardiovaskulární či respirační symptomatologií. Vyšší věk je tedy rizikovým faktorem pro závažnější průběh systémové reakce po bodnutí. Zejména u starších pacientů vidáme obzvláště závažné mnohdy téměř fatální systémové reakce, které jsou u dětí a mladých

dospělých naštěstí méně časté [5]. Také prognóza opakování systémové reakce je příznivější u dětí. U dospělých je riziko recidivy systémové reakce po dalším bodnutí 20 - 70%. Přičemž platí přímá úměra, čím závažnější byla předchozí reakce, tím je větší riziko jejího opakování. Děti s anamnézou systémové reakce omezené pouze na kožní symptomatologii (kterých je většina) mají méně než 10% riziko opakování systémové reakce, nicméně u dětí se závažnějšími projevy zůstává riziko recidivy 40% po 10 letech a 30% po 20 letech [8, 26]. Předchozí systémová reakce po bodnutí je tedy jistě faktorem ovlivňujícím charakter reakce po případném dalším bodnutí, ovšem s určitými specifiky v dětském a dospělém věku. Naproti tomu často diskutované velké lokální reakce po bodnutí v anamnéze za rizikový faktor pro rozvoj následné systémové reakce považovány nejsou, neboť toto riziko se dle posledních prací pohybuje pod 10% [64].

Dalším rizikovým faktorem pro závažný průběh systémové reakce po bodnutí jsou stavy spojené se zvýšenou bazální hladinou tryptázy. Tyto stavy byly popsány poměrně nedávno a detailní charakteristika všech klinických jednotek, které se sem řadí, přesahuje rámec tohoto sdělení. Nicméně s ohledem na možnou asociaci těchto stavů s HVA nelze doposud známé základní rysy této problematiky opominout. Tryptáza se nachází v granulích žírných buněk (mastocyty, mast cells, MC). K uvolnění tryptázy dochází při degranulaci po aktivaci těchto buněk. Aktivace žírných buněk může být spuštěna IgE i non-IgE mechanismy a patří mezi důležité mechanismy nezbytné pro přežití. Klinické příznaky aktivace žírných buněk zahrnují široké spektrum projevů, od lokalizovaných až po systémové příznaky s postižením více orgánových systémů (kůže: urtikárie, angioedém, flush, pruritus; gastrointestinální trakt: nauzea, zvracení, průjem; kardiovaskulární: hypotenzivní synkopa či presynkopa, tachykardie; respirační: bronchospasmus, rýma). Teprve nedávno byly popsány stavy s poruchou aktivace žírných buněk, které vznikají na podkladě jejich abnormálního nahromadění a/nebo aktivace. Pokud dochází opakovaně ke klinickým projevům aktivace MC, s dokumentovaným trvalým nebo přechodným nárůstem mediátorů (tryptázy) žírných buněk během symptomatické periody (ve srovnání s bazální hladinou), reagující na léčbu cílenou na mediátory žírných buněk, pak hovoříme o tzv. syndromu aktivace žírných buněk (mast cell activation syndrom, MCAS) [1]. Recentně byl tento syndrom rozdělen do 3 forem – primární, sekundární a idiopatický (Tabulka 1.7).

Tabulka 1.7 - Klasifikace syndromu aktivace mastocytů (MCAS)

Primární (klonální) MCAS	Klonální onemocnění MC, mutace c-KIT. Zahrnuje 2 podjednotky - mastocytóza a MMAS (monoklonální MC activation syndrom).
Sekundární MCAS	Není přítomna c-KIT mutace. Přítomno onemocnění, které aktivaci MC způsobuje (alergie, zánětlivá onemocnění, autoimunity).
Idiopatický MCAS	Není nalezena ani klonalita MC ani jiná choroba vedoucí k jejich aktivaci.

Mastocytóza je onemocnění charakterizované abnormální proliferací a akumulací žírných buněk vzniklých z klonálního prekursoru nesoucího mutaci c-KIT genu (nejčastěji D816V). Patologické infiltráty tvořené těmito abnormálními mastocyty se nejčastěji nacházejí v kostní dřeni a v kůži. Proto je diagnóza založena na vyšetření kůže a biopsii kostní dřene. Dle WHO existuje 7 kategorií mastocytózy (Tabulka 1.8). Nejčastější formou je indolentní systémová mastocytóza (okolo 90% pacientů) [11].

Tabulka 1.8 - Klasifikace mastocytóz dle WHO

Kožní mastocytóza
Indolentní systémová mastocytóza
Doutnající systémová mastocytóza
Mastocytóza asociovaná s hematologickou neoplazií
Agresivní systémová mastocytóza
Mastocytární leukémie
Mastocytární sarkom

Kožní mastocytóza se nejčastěji vyskytuje u dětí, infiltráty patologických MC se omezují pouze na kůži, chybí orgánové postižení stejně tak i postižení kostní dřene. Jelikož 90% mastocytóz vzniklých v dětském věku plně regreduje do adolescence, není invazivní vyšetřování (biopsie kostní dřene) indikováno. Vyjimku tvoří pacienti s abnormálním

krevním obrazem, hepatosplenomegalií či persistující zvýšenou bazální hladinou tryptázy nad 20 ng/ml, která v průběhu času neklesá. Zhruba 10% kožních mastocytóz vzniklých v dětském věku může přejít do systémové mastocytózy s přítomností infiltrátů v kostní dřeni. Zatímco kožní mastocytóza je obvyklá v dětském věku, systémová mastocytóza je běžnější u dospělých. Při systémové mastocytóze bývá postižen alespoň 1 vnitřní orgán (kostní dřeň, gastrointestinální trakt, uzliny, slezina), postižení kůže může, ale nemusí být přítomno. Pro stanovení diagnózy systémové mastocytózy musí být splněno 1 velké a 1 malé nebo 3 malá kritéria (Tabulka 1.9).

Tabulka 1.9 - Diagnostická kritéria pro systémovou mastocytózu

Velká kritéria	Malá kritéria
Multifokální agregáty ≥ 15 MC v bioptickém vzorku (kostní dřeň)	<ul style="list-style-type: none"> - Aberantní morfologie MC (vřetenovitý tvar, hypogranularita, aberantní jádro) - Aberantní exprese CD25 a/nebo CD2 na MC - Přítomnost 816 KIT mutace (potvrzení klonality) - Bazální hladina tryptázy > 20 ng/ml

Pokud nejsou splněna všechna diagnostická kritéria pro mastocytózu, ale jsou přítomny znaky klonality (přítomnost KIT mutace nebo CD 25+ MC v kostní dřeni), pak se stav označuje jako tzv. MMAS (monoclonal mast cell activation syndrom) [1, 11]. Diagnostika těchto stavů spadá do kompetence hematologa a zahrnuje vyšetření kostní dřene.

Prevalence anafylaxe je u pacientů s mastocytózou (resp. klonálním MCAS) výrazně vyšší než u běžné populace, pohybuje se u nich v rozmezí od 22 do 49%. Nejčastějším spouštěčem anafylaxe bývá právě hmyzí bodnutí (u 62% pacientů vosí bodnutí). Na druhou stranu frekvence mastocytózy se u pacientů s alergií na hmyzí jed pohybuje od 1 do 7,9%. Asociace mezi HVA a mastocytózou byla popsána nejprve u pacientů s kožní formou mastocytózy (urticaria pigmentosa), ale poslední výzkumy ukazují, že HVA je mnohem častější u pacientů s mastocytózou bez kožního postižení. Riziko anafylaxe je signifikantně vyšší u pacientů s indolentní systémovou mastocytózou než u závažnějších forem. Specifikem anafylaxe u pacientů s mastocytózou je její velmi vážný průběh s těžkou kardiovaskulární symptomatologií, obvykle bez doprovodných kožních projevů charakteru pruritu, urtikárie

či angioedémů (dle posledních studií bylo bezvědomí přítomno u 72% pacientů s mastocytózou, nezřídka byly také popsány fatální reakce po bodnutí). Mastocytóza (resp. klonální MCAS) je tedy nepochybně významným rizikovým faktorem pro závažný průběh anafylaktické reakce po bodnutí hmyzem a měli bychom po ní u pacientů s HVA cíleně pátrat. Jako indikátory svědčící pro mastocytózu byly kromě těžkého průběhu anafylaxe bez doprovodných kožních projevů identifikovány také mužské pohlaví a vyšší bazální hladina tryptázy. Vyšetření bazální hladiny tryptázy by proto mělo být již rutinní součástí alergologického vyšetření všech pacientů s anamnézou systémové reakce po hmyzím bodnutí.

Vyšší hladina tryptázy je přítomna u 5 až 19% pacientů s HVA ($> 11,4$ ng/ml), nicméně ne všichni tito pacienti mají mastocytózu. Prevalence klonálního onemocnění MC (mastocytóza a MMAS) se u pacientů s HVA pohybuje mezi 1 až 7,9%. Příčinou zvýšené hladiny může být i tzv. familiární hypertryptazemie, způsobená autozomálně dominantně dědičnou genetickou poruchou (duplikace či triplikace genu pro tryptázu). I samotná zvýšená hladina bazální hladiny tryptázy, bez průkazu mastocytózy, je u pacientů s alergií na hmyzí jed spojena s rizikem těžké anafylaxe po bodnutí. Až 25% pacientů s anamnézou anafylaxe s poruchou vědomí či srdeční zástavou mělo vyšší bazální hladinou tryptázy [13]. Na druhé straně bohužel někdy i normální bazální hladina tryptázy ($< 11,4$ ng/ml) nevyklučuje přítomnost mastocytózy [11]. U vysoce suspektních pacientů s indikátory poukazujícími na přítomnost mastocytózy (viz výše) se doporučuje, i při normální hladině bazální tryptázy, pátrat po mastocytóze. Jednoznačná doporučení pro tyto případy však zatím chybějí a v běžné reálné praxi zůstávají tyto případy v převážné většině nediodagnostikovány. Přestože v problematice mastocytárních onemocnění zůstává stále řada nezodpovězených otázek, tak vzhledem k zřejmé asociaci s HVA musí mít alergolog tyto stavy na mysli, cíleně po nich pátrat (vyšetřit bazální hladinu tryptázy, pátrat po kožních formách mastocytózy) a v indikovaných případech pak úzce spolupracovat s hematologem.

Dalším diskutovaným rizikovým faktorem je lokalizace bodnutí. Tradičně se za rizikový faktor považuje bodnutí do oblasti hlavy a krku. Nicméně recentní studie rakouských autorů tuto teorii nepotvrdila [2]. Co se týká druhu hmyzu ve vztahu k tíži reakce, tak se výsledky studií různí, někteří autoři uvádějí jako rizikovější bodnutí vosou [46], jiní včelou [7]. Dalšími sledovanými faktory ve vztahu k tíži alergické reakce jsou přidružené komorbidity a medikace. Nejvíce diskutované jsou v tomto ohledu přidružená kardiovaskulární

onemocnění a léčba antihypertenzivy, zejména beta-blokátory a ACE inhibitory. Dosavadní studie potvrdily, že zejména starší pacienti s kardiovaskulárním onemocněním mají vyšší riziko fatální reakce po bodnutí hmyzem [38, 50]. Co se týká antihypertenziv, tak se prakticky již od zahájení užívání beta-blokátorů v 60. letech a ACE inhibitorů v 80. letech 20. století diskutovalo a stále diskutuje o jejich možném negativním vlivu na alergické reakce obecně, včetně alergických reakcí na hmyzí bodnutí. Recentní studie potvrdily, že se anafylaxe u pacientů léčených beta-blokátory nevyskytuje častěji, nicméně pokud u nich k anafylaxi dojde, pak mají teoreticky vyšší riziko těžší systémové reakce a navíc u nich může být léčba adrenalinem méně efektivní. Zejména tedy starší pacienti s kardiovaskulárním onemocněním léčení beta-blokátory mají vyšší riziko těžší reakce po bodnutí hmyzem [44, 64]. Zda-li jsou i ACE inhibitory rizikovým faktorem pro těžší reakce, je stále předmětem diskuze. Bohužel dřívější studie mají nedostatky (malý počet pacientů, selektovaná skupina pacientů s kardiovaskulární komorbiditou) a jejich výsledky jsou proto kontroverzní. Novější studie sice přinášejí důkazy o tom, že ACE inhibitory pravděpodobně riziko těžší reakce po bodnutí nezvyšují [64], nicméně jasno v této otázce zatím stále není. V současné době v Evropě probíhá prospektivní, multicentrická, observační studie EADOAS („Vliv antihypertenzní medikace na tíži anafylaxe a vedlejší účinky během imunoterapie hmyzím jedem“), která snad konečně vnese do této problematiky světlo a vydá jasné vyjádření týkající se vztahu antihypertenziv k HVA.

1.6 Léčba alergie na hmyzí jed

Léčebná opatření u pacienta s alergií na hmyzí jed zahrnují nejenom bezprostřední akutní léčbu alergických projevů po bodnutí, ale rovněž dlouhodobou péči, kam spadá vybavení pacienta pohotovostní medikací, edukace a v indikovaných případech léčba specifickou imunoterapií příslušným hmyzím jedem (VIT). Zatímco akutní péče je obvykle poskytnuta přímo v terénu složkami záchranného lékařského systému, dlouhodobá péče o pacienta s alergií na hmyzí jed je obvykle již v kompetenci alergologa, v součinnosti s praktickým lékařem nemocného.

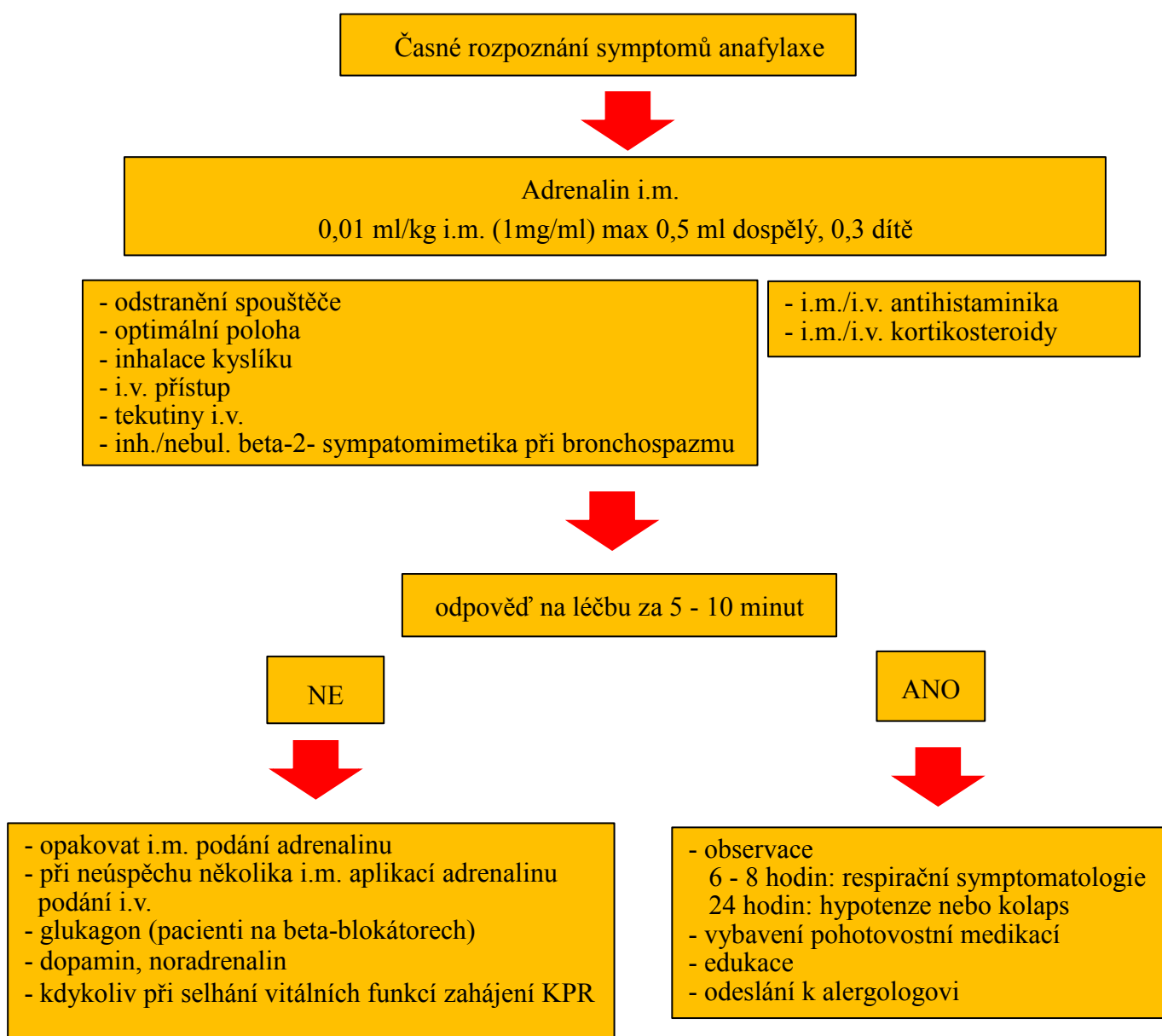
1.6.1 Léčba akutních projevů HVA

Akutní léčba záleží na rozsahu a tíži klinických projevů. Léčba lokálních reakcí obvykle spočívá v aplikaci chladivých obkladů, při větším rozsahu se podávají lokálně či celkově antihistaminika, v případě velkých lokálních reakcí společně s kortikoidy. Zvýšenou pozornost zasluhují otoky po bodnutí v oblasti hlavy a krku, v těchto případech je obvykle kromě podání antihistaminik a kortikoidů nezbytná observace s okamžitou možností zajištění průchodnosti dýchacích cest. Terapie anafylaktické reakce po bodnutí hmyzem se neliší od léčby anafylaxe vzniklé z jiných příčin [43]. Rozhodující je časné rozpoznání příznaků anafylaxe po bodnutí (Tabulka 1.10) a promptně podaná akutní léčba (Obrázek 1.4). Podrobný popis léčby anafylaxe není předmětem tohoto sdělení.

Tabulka 1.10 - Příznaky anafylaxe po hmyzím bodnutí.

Kůže	
Prodromální projevy	- pocit horka, svědění (např. v oblastech jako zevní zvukovody, dlaně, plosky), "husí kůže" (piloerекce)
Rozvinuté projevy	- flush, kopřivka, angioedém
Orální projevy	
Prodromální	- svědění nebo brnění rtů, jazyka, nebo patra, kovová pachůť
Rozvinuté	- otok rtů, jazyka, uvuly
Respirační projevy	
Prodromální	- svědění nosu, kongesce, rýma, kýchání - dysfonie, chraptot - dušnost, bolest na hrudi, kašel
Rozvinuté	- stridor, sípání a cyanóza
GIT projevy	
Prodromální	- nauzea, svědění v hrdle
Rozvinuté	- bolesti břicha, zvracení, průjem, dysfagie
Kardiovaskulární	
Prodromální	- pocit slabosti, závrať, tunelové vidění, zhoršení sluchu

Rozvinuté	- synkopa, bolest na hrudi, palpitace, porucha srdečního rytmu, hypotenze, srdeční zástava, porucha vědomí, Kounisův syndrom
Neurologické projevy	- úzkost, strach, pocit hrozící katastrofy, sopor - bolest hlavy, zmatek, poruchy chování u dětí - inkontinence moči a stolice
Oční projevy	- svědění, erytém a edém, slzení a konjunktivální zarudnutí
Jiné	- děložní stahy a krvácení u žen a dívek



Obrázek 1.4 Léčba anafylaxe – zjednodušené schéma

1.6.2 Dlouhodobý “management” pacienta s HVA

Pacient po proběhlé celkové alergické reakci po bodnutí hmyzem musí být vybaven akutní protialergickou medikací (pohotovostní balíček), musí být řádně edukován a v indikovaných případech je u něj zahájena léčba specifickou imunoterapií příslušným hmyzím jedem (VIT). Zatímco vybavení pohotovostní léčbou a základní edukace by měly proběhnout neprodleně po reakci, optimálně již při propuštění z ošetření po akutní reakci, rozhodnutí o imunoterapii je již plně v kompetenci alergologa. Z tohoto důvodu by měl být každý pacient s anamnézou celkové alergické reakce odeslán k alergologickému vyšetření.

Vybavení pohotovostní medikací a edukace

Pacient s alergií na hmyzí jed musí být seznámen s možnými projevy anafylaktické reakce po bodnutí (viz výše), musí být poučen jak postupovat v případě bodnutí hmyzem a v neposlední řadě musí být poučen také o možných preventivních opatřeních snižujících riziko bodnutí hmyzem.

Pohotovostní balíček zahrnuje autoinjektor s adrenalinem, tablety nesesativního antihistaminika s rychlým nástupem účinku (pro dospělé např. levocetirizin 10 mg, cetirizin 20 mg; pro děti dvojnásobná dávka adekvátní pro věk) a kortikoid (např. prednison: pro dospělé 50 - 100 mg; pro děti 1 - 2 mg/kg tělesné hmotnosti). Pacienti s astmatem by měli mít také rychle působící inhalační beta-2-mimetikum.

Adrenalin je při anafylaxi lékem první volby. Pro jeho podání neexistuje při anafylaxi žádná absolutní kontraindikace. V České republice jsou k dispozici momentálně 2 druhy autoinjektorů s adrenalinem – EpiPen a Emerade. Pro děti s hmotností 7,5 - 25 kg jsou k dispozici oba druhy per s obsahem 0,15 mg adrenalinu, pro pacienty nad 25 kg jsou určena pera s obsahem 0,30 mg. Dle uvážení lékaře je pro obézní pacienty k dispozici rovněž autoinjektor s vyšším obsahem adrenalinu Emerade 0,5mg. Součástí edukace pacienta je vždy nácvik aplikace autoinjektoru pomocí cvičných per.

Indikace vybavení autoinjektorem u pacientů s HVA má svá specifika. Rozhodujeme totiž o vybavení autoinjektorem u pacienta buď ještě neléčeného specifickou imunoterapií, anebo v průběhu či dokonce po ukončení této léčby. Obecně je adrenalinový autoinjektor povinně

indikován u pacientů alergických na hmyzí jed s poruchou žírných buněk a/nebo vyšší bazální hladinou tryptázy a u pacientů neléčených VIT s anamnézou systémové reakce zahrnující postižení alespoň dvou různých orgánových systémů. Indikace autoinjektoru by měla být také zvažena v dalších specifických situacích před, během a po ukončení VIT. Bohužel ani mezi experty EAACI nepanuje jednotný názor na indikaci autoinjektoru v těchto situacích (Tabulka 1.11) [8].

Tabulka 1.11 - Preskripce adrenalinového autoinjektoru u pacientů s HVA v závislosti na anamnéze a rizikových faktorech (před, během, po VIT): výsledky panelu expertů EAACI.

VIT	Tíže systémové reakce	Děti (% odpovědí)	Dospělí (% odpovědí)	Pacienti s onemocněním MC (definováno jako zvýšená bazální hladina tryptázy a/nebo dg. mastocytózy) (% odpovědí)
Před	Kožní reakce	Ano: 40% Ne*: 60%	Ano: 44% Ne*: 56%	Děti/dospělí: Ano 100%
	Více než kožní reakce	Ano: 100%	Ano: 100%	
Během	Kožní reakce	Ano: 20% Ne: 80%	Ano: 31% Ne: 69%	Děti/dospělí: Ano 100%
	Více než kožní reakce	Ano±: 100%	Ano±: 100%	
Po	Kožní reakce	Ano: 13% Ne: 87%	Ano: 13% Ne: 87%	Děti/dospělí: Ano 100%
	Více než kožní reakce	Ano±: 94%	Ano±: 100%	

* S výjimkou případů s vyšší expozicí hmyzímu jedu (např. včelaři), což může zvýšit riziko progresse tíže další reakce.

± Pokud jsou přítomny rizikové faktory pro selhání VIT (těžká pre - VIT reakce, těžká alergie na včelí jed, anafylaktická reakce během VIT nebo pokud účinnost VIT nebyla ověřena expozičním testem) nebo pokud pacient užívá ACE inhibitory.

± Pokud jsou přítomny rizikové faktory pro relaps (např. těžká alergie na včelí jed, těžká pre - VIT reakce, anafylaktická reakce během VIT).

Velmi diskutované vybavení dvěma autoinjektory je dle aktualizovaných doporučení z roku 2016 určeno pro pacienty s poruchou žírných buněk a/nebo vyšší bazální hladinou tryptázy, s předchozí potřebou více než jedné dávky adrenalinu, s předchozí téměř fatální anafylaxí, u pacientů s obtížnou dostupností lékařské péče z geografických nebo jazykových důvodů, ev. pokud je dávka v autoinjektoru příliš malá kvůli tělesné hmotnosti.

Aktualizované doporučení týkající se „self-managementu“ pacienta s alergií na hmyzí jed shrnuje nejenom principy samoléčby po hmyzím bodnutí, ale i doporučená režimová opatření pro pacienty s HVA (Tabulka 1.12 a 1.13) [8].

Tabulka 1.12 - Principy „self-managementu“ bezprostředně po bodnutí

1. Odstraňte žihadlo.
2. Po bodnutí okamžitě užívejte tablety z balíčku (antihistaminika a kortikoidy).
3. Pokud se po bodnutí objeví jakýkoliv příznak z uvedených (kašel, chrapot, dušnost, sípání, polykací potíže, poruchy řeči, slabost, intenzivní rush a otok /zejména pokud zahrnuje rty a jazyk/), aplikujte neprodleně autoinjektor, bez ohledu na užití tablety z balíčku.
4. Zavolejte pomoc.
5. Pokud se Vám špatně dýchá, sedněte. Pokud máte projevy oběhové nestability, ležte na zádech se zvýšenými dolními končetinami.
6. Po bodnutí nezůstávejte sami.

Tabulka 1.13 - Preventivní a režimová opatření pro pacienty s HVA

1. Alergičtí včelaři by měli přestat včelařit před dosažením imunoprotekce pomocí VIT (resp. do dosažení udržovací dávky VIT).
2. Vyhněte se pobytu v blízkosti kvetoucích rostlin (louky, sady), zejména pokud je na zemi spadané ovoce.
3. Nejezte venku ovoce, sladkosti, zmrzlinu, sendviče.
4. Odpadkové koše udržujte uzavřené.
5. Pamatujte, že vůně sladkostí, parfémů a deodorantů přitahuje hmyz.

6. Chůze naboso zvyšuje riziko bodnutí.
7. Doporučená barva oděvu je bílá, zelená a béžová (jasné barvy oblečení přitahují hmyz).
8. Pokud se pohybujete v místech se zvýšenou expozicí hmyzu, noste dlouhé rukávy, dlouhé nohavice, pokrývku hlavy a pokud možno i rukavice.
9. Nepijte pivo, kolové a jiné nápoje z uzavřených plechovek.
10. V případě napadení vosami nebo včelami si zakryjte hlavu.
11. Nezabíjejte hmyz bez důvodu, další hmyz může být v okolí.
12. Bodnutí je běžné při práci v blízkosti hnízd. Zkontroluje, zda nejsou hnízda v blízkosti předtím, než začnete umývat okna, věšet záclony, řezat stormy atd.
13. Vosí královny mohou hibernovat v rukavicích a botách, zkontrolujte je proto předtím, než je v zimě začnete užívat, přestože byly dobře skladovány např. ve skříni.

Specifická imunoterapie hmyzím jedem (VIT)

Kromě vybavení pohotovostní léčbou a řádné edukace je nedílnou součástí péče o pacienta s celkovou alergickou reakcí po hmyzím bodnutí v anamnéze rozhodnutí o zahájení specifické imunoterapie příslušným hmyzím jedem. Tato léčba spočívá v opakovaném subkutánním podávání definovaných dávek hmyzího jedu, s cílem navodit toleranci organismu k tomuto jedu. VIT je v současnosti jedinou možnou léčbou, která úspěšně brání opakování systémové reakce po dalším bodnutí. Poskytuje ochranu 77 - 84% pacientům léčených imunoterapií včelím jedem a 91 - 96% pacientům léčeným vosím jedem. VIT také významně zlepšuje kvalitu života pacientů s HVA. Jedná se o léčbu bezpečnou, doposud nebyly zaznamenány žádné případy úmrtí v souvislosti s aplikací VIT [64].

VIT je indikována dětem i dospělým s anamnézou systémové alergické reakce přesahující generalizovanou kožní symptomatologii s potvrzenou senzibilizací k příslušnému hmyzímu jedu buď kožním testem a/nebo specifickým IgE a/nebo bazofil aktivačním testem (BAT). VIT by měla být zvážena u dospělých pacientů i v případě pouze generalizované kožní symptomatologie, je-li vysoké riziko reexpozice hmyzímu bodnutí a/nebo je-li narušena kvalita života pacienta (Tabulka 1.14). Bylo totiž jednoznačně prokázáno, že VIT významně zlepšuje kvalitu života pacienta ve srovnání s nošením autoinjektoru. VIT není indikována, pokud není prokázána IgE senzibilizace k hmyzímu jedu. Náhodný nálezn senzibilizace k

hmyzímu jedu (např. multiplexovou metodou) u pacienta bez anamnézy systémové reakce rovněž není indikací k zahájení VIT. Neobvyklé reakce zmíněné výše také nejsou indikací k zahájení VIT. Vzhledem k malému riziku rozvoje systémové reakce u pacientů s velkou lokální reakcí v anamnéze, není obecně u těchto pacientů VIT indikována. Nicméně dle recentního doporučení z roku 2017 lze VIT u pacientů s opakujícími se, obtěžujícími velkými lokálními reakcemi zvážit, neboť bylo potvrzeno, že VIT redukuje velikost a trvání těchto reakcí [27].

Tabulka 1.14 - Zjednodušené schéma indikace VIT

Alergická reakce	Diagnostické testy	Rozhodnutí o VIT
Dospělí/děti Respirační a kardiovaskulární symptomatologie	pozitivní negativní	ano ne
Dospělí Kožní symptomatologie (přítomny rizikové faktory* nebo zhoršení kvality života)	pozitivní negativní	ano ne
velká lokální reakce	pozitivní/negativní	ne
neobvyklé reakce	pozitivní/negativní	ne

*Rizikové faktory zahrnují povolání či aktivity spojené s vyšším rizikem bodnutí.

Absolutní a relativní kontraindikace VIT

Nová doporučení týkající se kontraindikací k imunoterapii obecně a se speciálním zaměřením na imunoterapii hmyzími jedy shrnují 2 recentní doporučení expertů EAACI z roku 2015 [44] a 2017 [64] (Tabulka 1.15). Absolutních kontraindikací k VIT je poměrně

málo a k imunoterapie tudíž nyní přistupujeme i v situacích, které byly dříve považovány za kontraindikované. Nejčastěji diskutované situace ve stručnosti uvádím:

Kardiovaskulární onemocnění

Zejména starší pacienti s HVA a preexistujícím kardiovaskulárním onemocněním mají vyšší riziko úmrtí po bodnutí. Tudíž, na rozdíl od respiračních alergií, je VIT běžně prováděna u starších pacientů. Na základě zhodnocení poměru riziko/benefit nejsou kardiovaskulární choroby kontraindikací k VIT.

Beta-blokátory

Jak již bylo zmíněno, anafylaxe se u pacientů léčených beta blokátory nevyskytuje častěji. Nicméně pokud u nich k anafylaxi dojde, pak mají teoreticky vyšší riziko těžší systémové reakce a navíc u nich může být léčba adrenalinem méně efektivní. Zejména tedy starší pacienti s kardiovaskulárním onemocněním léčení beta-blokátory mají vyšší riziko těžší reakce po bodnutí hmyzem. Na základě zhodnocení poměru riziko/benefit, nejsou beta-blokátory kontraindikací k VIT.

ACE inhibitory (ACEI)

Zda-li jsou ACEI rizikovým faktorem, je stále předmětem diskuze. Výsledky studií se bohužel různí. Studie s velkým počtem probandů ukázaly, že léčba ACEI neovlivňuje bezpečnost VIT [47, 56]. Jedna studie reportovala vyšší riziko pro těžší systémové reakce po bodnutí [46], nicméně jiné studie ukázaly, že ACEI riziko těžkých SR po bodnutí u neléčených pacientů nezvyšují [2, 14, 55]. Výsledky studií mohou být ovlivněny vyšším věkem pacientů, který je rizikovým faktorem pro SR. Jedna multicentrická studie reportovala, že všichni pacienti léčení ACEI tolerovali expoziční test nebo bodnutí v přírodě během VIT [48], zatímco v jiné studii pacienti užívající ACEI měli vyšší riziko relapsu [49]. Rizikovost ACEI může být v některých studiích nadhodnocena díky malému počtu pacientů a selektované populaci s kardiovaskulárními komorbiditami. ACEI zůstávají u VIT relativně kontraindikovány. V léčbě ACEI může být pokračováno, ale pacient by měl být seznámen s možnými riziky.

Malignity

VIT může být doporučena u vysoce rizikových pacientů s HVA, je-li maligní onemocnění stabilní nebo v remisi.

Autoimunitní onemocnění

VIT je kontraindikována u pacientů s aktivním multiorgánovým autoimunitním onemocněním, u onemocnění v remisi je kontraindikace k VIT jen relativní. U stabilizovaného orgánově specifického autoimunitního onemocnění (diabetes mellitus, Hashimotova tyreoiditida, ulcerózní kolitida, Crohnova choroba, revmatoidní artritida) není VIT kontraindikována.

Děti pod 5 let

Těžké SR se u dětí pod 5 let vyskytují vzácně. V indikovaných případech je třeba postupovat individuálně zejména s ohledem na spolupráci pacienta. Od 2 - 5 let je VIT kontraindikována nyní jen relativně, pod 2 roky trvá kontraindikace absolutní.

Těhotenství

Zahájení VIT je v těhotenství kontraindikováno. V dobře tolerované VIT se může během těhotenství pokračovat.

Mastocytóza

VIT může být indikována u pacientů s mastocytózou a/nebo pacientů s vyšší hladinou bazální tryptázy. Je považována za bezpečnou a efektivní. Doba trvání by měla být prodloužena, ale bohužel zatím není jednoznačně jasné, zda-li má být podávána doživotně nebo po jaké době může být ukončena.

Tabulka 1.15 - Absolutní a relativní kontraindikace VIT

Onemocnění nebo speciální situace	Kontraindikace VIT
Astma	
Nekontrované	absolutní
Pod částečnou kontrolou	relativní
Autoimunitní onemocnění	
Aktivní	absolutní
V remisi	relativní
Malignity	relativní
Beta-blokátory	není kontraindikace

ACEI	relativní
MAOI	není kontraindikace
Kardiovaskulární choroby	není kontraindikace
Těhotenství	
Zahájení	absolutní
Pokračování	není kontraindikace
Děti	
< 2 roky	absolutní
2 - 5 let	relativní
HIV	relativní
AIDS	absolutní
Psychiatrické, duševní poruchy	relativní
Chronické infekce	relativní
Imunodeficience	relativní
Imunosupresivní léčba	relativní

Rozhodnutí o zahájení VIT je vždy individuální rozhodnutí lékaře, který musí posoudit poměr riziko x benefit u konkrétního pacienta. Při rozhodování je třeba brát v potaz, že VIT může v budoucnu významně redukovat riziko život ohrožující alergické reakce po bodnutí a tudíž může potenciálně zachránit pacienta před úmrtím. Z tohoto důvodu jsou uvedená nová doporučení revidující nejčastější možné kontraindikace s povděkem kvitována, neboť přinášejí významnou pomoc při rozhodování v mnohdy nelehkých situacích.

Provádění VIT

V České republice máme k dispozici pouze jeden preparát k provádění VIT. Jedná se o Alutard SQ (ALK – Abello), depotní preparát obsahující standardizované extrakty včelího nebo vosího jedu určený k s.c. podání. Léčba probíhá ve dvou fázích, úvodní a udržovací. Pro úvodní fázi lze dle SPC použít dvě aplikační schémata pro postupné zvyšování dávek,

standardní a clusterové (Tabulka 1.16 a 1.17). Clusterové schéma je rychlejší, neboť umožňuje aplikaci 2 - 3 injekcí v jednom sezení.

Udržovací léčba spočívá v opakované aplikaci udržovací dávky 100 µg hmyzího jedu. Tato dávka odpovídá cca 2 včelím resp. 5 vosím bodnutím. Interval aplikace udržovací dávky 100 µg se postupně prodlouží na 6 - 8 týdnů. U pacientů, u kterých dojde při této udržovací léčbě k reakci po bodnutí v přírodě ev. při expozičním testu (v ČR se neprovádí), je doporučeno navýšení dávky na 200 µg hmyzího jedu. Tato vyšší dávka by měla být také zvažena u pacientů s rizikem mnohočetného bodnutí, např. u včelařů.

Tabulka 1.16 - Standardní schéma dávkování v úvodní fázi léčby

Lahvička č.	Koncentrace SQ-U/ml	Týden č.	Injekce č.	Objem ml	Dávka SQ-U
1	100	1	1	0.2	20
1	100	2	2	0.4	40
1	100	3	3	0.8	80
2	1000	4	4	0.2	200
2	1000	5	5	0.4	400
2	1000	6	6	0.8	800
3	10 000	7	7	0.2	2000
3	10 000	8	8	0.4	4000
3	10 000	9	9	0.8	8000
4	100 000	10	10	0.1	10 000
4	100 000	11	11	0.2	20 000
4	100 000	12	12	0.4	40 000
4	100 000	13	13	0.6	60 000
4	100 000	14	14	0.8	80 000
4	100 000	15	15	1.0	100 000

Tabulka 1.17 - Clusterové schéma dávkování v úvodní fázi léčby

	Koncentrace SQ-U/ml	Týden č.	Injekce č.	Objem ml	Dávka SQ-U
1	100	1	1	0,1	10
2	1 000	1	2	0,1	100
3	10 000	1	3	0,1	1000
3	10 000	2	4	0,2	2 000
	10 000	2	5	0,4	4 000
3	10 000	3	6	0,6	6 000
4	100 000	3	7	0,1	10 000
4	100 000	4	8	0,1	10 000
	100 000	4	9	0,2	20 000
4	100 000	5	10	0,3	30 000
	100 000	5	11	0,3	30 000
4	100 000	6	12	0,5	50 000
	100 000	6	13	0,5	50 000

Doba trvání a účinnost VIT

Doba trvání VIT se obecně udává v intervalu 3 - 5 let. Většina studií se však shoduje na tom, že z pohledu dlouhodobé účinnosti je pětiletá léčba vhodnější [24, 32]. Dlouhodobější léčba (> než 5 let) by měla být zvažována u pacientů s velmi těžkou iniciální SR, se SR během VIT a u pacientů s alergií na včelí jed s vysokým rizikem bodnutí.

Účinnost imunoterapie včelím jedem se pohybuje v rozmezí 77 - 84%, účinnost vosí VIT v rozmezí od 91 - 96%. Příčina vyšší účinnosti vosí vakciny je nejasná. Zvažují se různé příčiny, např. větší množství jedu uvolněného po bodnutí včelou a širší senzibilizační profil u pacientů s alergií na včelí jed. Někteří pacienti mohou být predominantně senzibilizováni na alergenové složky, které chybí v terapeutických extraktech (např. rApi m 10) [9, 22].

Jak rychle protekce při imunoterapii nastupuje a jak dlouho trvá po jejím ukončení je stále předmětem sledování. Pouze jedna recentní studie hodnotí nástup ochrany po dokončení iniciální fáze VIT. Tato studie potvrdila, že 89% pacientů s alergií na včelí jed tolerovalo expoziční test (sting challenge) již týden po dosažení udržovací dávky [23]. Podobně existuje pouze málo studií hodnotících účinnost VIT více než 5 let po jejím ukončení. Ve 2 studiích

relabovalo po 7 - 10 letech po ukončení VIT 7 - 7,5% pacientů léčených imunoterapií vosím a 15,8% pacientů léčených včelím jedem [39, 45]. Jiná studie hodnotící období 4 - 10 let po ukončení VIT zjistila recidivu reakce u 10,2% pacientů léčených vosí a u 16,2% pacientů léčených včelí VIT [25]. Bohužel data hodnotící efektivitu VIT více než 10 let po jejím ukončení chybí.

Možnosti monitorace imunoterapie

V periferní krvi pacientů léčených specifickou imunoterapií dochází vlivem imunologické odpovědi na léčbu k signifikantním změnám mnoha různých imunologických parametrů. Najít optimální laboratorní parametr, který by umožnil odhalit přítomnost vytvořené tolerance k hmyzímu jedu je snahou mnoha expertů věnujících se HVA. V současnosti však bohužel stále nemáme k dispozici vhodný biomarker, který by jednoznačně odhalil klinickou účinnost VIT a pomocí kterého bychom mohli odhadnout individuální riziko relapsu SR. Provokační test (sting challenge) tak stále zůstává zlatým standardem k zhodnocení klinické účinnosti VIT. Pokud není možné provést sting challenge, pak se doporučuje pro zhodnocení klinické účinnosti VIT zaznamenávat reaktivitu pacienta na náhodná bodnutí hmyzem v přírodě [64].

Sting challenge

Dle EAACI je provedení tohoto provokačního testu s živým hmyzem nejvhodnější metodou ke zhodnocení klinické účinnosti VIT. Optimálně by se tento test měl provést co nejdříve po dosažení udržovací dávky, s cílem identifikovat pacienty, kteří nejsou udržovací dávkou 100 µg dostatečně chráněni. Pouze pokud není možné tento test provést, může být pomocné hodnocení charakteru reakce po náhodném bodnutí hmyzem v přírodě. Spolehlivost hodnocení reaktivity na bodnutí v přírodě však snižuje fakt, že se jedná o nestandardizovaný děj a navíc pacient může špatně identifikovat bodající hmyz. Nicméně i věrohodnost sting challenge testu je předmětem diskuzí. Jednou studií bylo potvrzeno, že 21% pacientů neléčených VIT, kteří iniciálně tolerovali sting challenge, mělo SR po druhém sting challenge testu [21]. Spolehlivost časného sting challenge k monitoraci efektivit VIT se zdá být vysoká, ačkoli opakovaný test během 3 - 5 let po léčbě identifikoval 8 - 10% pacientů,

kteří relabovali, resp. u nich po testu došlo k SR [67]. Dle doporučení EAACI je však i přes výše uvedené sting challenge stále zlatým standardem k hodnocení klinické účinnosti VIT. Jeho výhodou je také zlepšení kvality života léčeného pacienta, neboť tolerance testu výrazně přispívá k odstranění strachu nemocného z případného bodnutí hmyzem v přírodě. V České republice se však tento test, na rozdíl od většiny evropských států, neprovádí. Důvodem jsou pravděpodobně etické důvody a výše uvedené skutečnosti snižující věrohodnost tohoto testu. Jsme tedy odkázáni pouze na monitoraci reakcí po bodnutí hmyzem v přírodě, kterých je u našich dobře edukovaných pacientů málo a nezdá se, že pacient po celou dobu léčby VIT není bodnut.

Změny imunologických parametrů

Specifické IgE protilátky k příslušnému hmyzímu jedu v průběhu léčby VIT po iniciálním nárůstu v průběhu prvních měsíců léčby klesají, naopak hladiny IgG4 protilátek k hmyzímu jedu v průběhu léčby stoupají. Podobně jako specifické IgE protilátky klesá i reaktivita v kožním testu (resp. se zvyšuje koncentrace jedu, při které je test pozitivní) s příslušným hmyzím jedem v průběhu VIT. Alergen specifická odpověď bazofilů v bazofil aktivním testu (BAT) se rovněž mění, tyto změny závisí na použité koncentraci hmyzího jedu. Bylo prokázáno, že při užití submaximální koncentrace je odpověď bazofilů u pacientů po VIT tolerujících hmyzí bodnutí významně snížena. Zdá se tedy, že tento pokles je pravděpodobně asociován s navozením klinické tolerance k hmyzímu jedu [20, 69]. Asi poslední metodou použitou k monitoraci efektu imunoterapie je ELIFAB (enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding). Jedná se o metodu umožňující demonstrovat inhibici vazby mezi alergenem a specifickou IgE protilátkou blokujícími protilátkami. Bylo potvrzeno, že Ves v 5 inhibiční aktivita séra se liší u pacientů před, v průběhu a po VIT. Ves v 5 inhibiční aktivita séra je zvýšená u pacientů v průběhu VIT oproti hodnotám před VIT. Naopak u pacientů, kteří dokončili VIT před 5 - 12 lety je tato aktivita redukována. Alergen-blokující kapacita séra korelovala s Ves v 5 specifickými IgG4 protilátkami, které narůstají během VIT a po ukončení VIT klesají zpět k hodnotám před léčbou [41].

Navzdory lepší dostupnosti metod jako je BAT a ELIFAB, nemůže většina parametrů stále rozlišit mezi pacienty, kteří jsou již chráněni a kteří jsou nadále ohroženi SR. Dle stanoviska

EAACI nelze odhadovat riziko relapsu VIT na základě žádného aktuálně dostupného laboratorního parametru (IgE, IgG4, BAT, ELIFAB) [64].

2 Cíl práce

Pacienti s alergií na hmyzí jed představují rizikovou skupinu populace, která je ohrožena potenciálně fatální anafylaktickou reakcí po hmyzím bodnutí. Cílem práce bylo poskytnout komplexní pohled na tyto nemocné z mnoha různých úhlů.

2.1 Sběr a vyhodnocení epidemiologických dat

- Základní charakteristika souboru pacientů: věk, pohlaví, tíže reakcí, lokalizace bodnutí, přidružené komorbidity a medikace, přítomnost vyšší hladiny bazální tryptázy a mastocytózy, charakter předchozí reakce po bodnutí, charakter reakce po bodnutí v průběhu a po ukončení léčby VIT.
- Srovnání uvedených parametrů u pacientů s lehkými a těžkými reakcemi s cílem identifikovat prediktory těžké reakce.

2.2 Diagnostika alergie na jed blanokřídlého hmyzu

- Zhodnocení přínosu jednotlivých laboratorních diagnostických metod (specifické IgE k extraktům včelího a vosího jedu, test aktivace bazofilů, molekulární diagnostika) pro potvrzení senzibilizace k příslušnému hmyzímu jedu.
- Cílený pohled na molekulární diagnostiku alergie na včelí jed s využitím všech aktuálně dostupných alergenových molekul.

2.3 Léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu pomocí VIT

- Sledování dynamiky změn laboratorních parametrů v průběhu VIT (specifické IgE a IgG4 protilátky k extraktům a hlavním molekulám hmyzích jedů, test aktivace bazofilů).
- Korelace zjištěných dat s klinickou reaktivitou pacienta na bodnutí hmyzem v přírodě.

3 Popis řešení a výsledky výzkumu

3.1 Sběr a vyhodnocení epidemiologických dat

3.1.1 Metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 171 pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí včelou nebo vosou v anamnéze, léčených na ÚIA FN Plzeň v letech 2006 - 2016. Jednalo se o pacienty s jednoznačně potvrzenou alergií k včelímu nebo vosímu jedu, kteří byli nově indikováni k zahájení imunoterapie (17 pacientů), již docházeli na imunoterapii prvním až pátým rokem (89 pacientů), případně tuto léčbu již dokončili (65 pacientů). Sběr dat proběhl při jejich ambulantní kontrole na podzim 2016. Data byla získávána od pacientů při podrobném anamnestickém rozhovoru, případně byla využita i dostupná dokumentace. Mezi sledované údaje patřilo pohlaví pacienta, věk při reakci, lokalizace bodnutí, tíže SR, přidružené komorbidity a léčba v době reakce, hladina bazální tryptázy, předchozí anamnéza s ohledem na výskyt velké lokální či systémové reakce po předchozím bodnutí, charakter reakce na bodnutí v průběhu ev. po ukončení léčby. Ke klasifikaci SR bylo použito schéma dle Ringa a Messmera. Shromážděná data pak byla statisticky zhodnocena. Naším cílem bylo zejména odhalit prediktory těžké reakce po bodnutí.

3.1.2 Postup hodnocení

Shromážděná data byla nejprve vyhodnocena v celé skupině pacientů, následně pak ve dvou podskupinách - ve skupině pacientů s lehkou SR (stupeň I a II dle Ringa a Messmera) a ve skupině s těžkou SR (stupeň III a IV dle Ringa a Messmera). Sledované parametry jsme pak statisticky porovnali s cílem nalézt prediktory těžké reakce. Procentuální zastoupení těžších a lehčích reakcí podle jednotlivých zkoumaných faktorů (pohlaví, lokalizace, předchozí reakce...) bylo hodnoceno na základě kontingenčních tabulek prostřednictvím Fisherova exaktního testu. Konečným bodem naší analýzy byla vícenásobná logistická regrese, pomocí které byl analyzován souběžný vliv více prediktorů těžšího průběhu současně. Byla použita

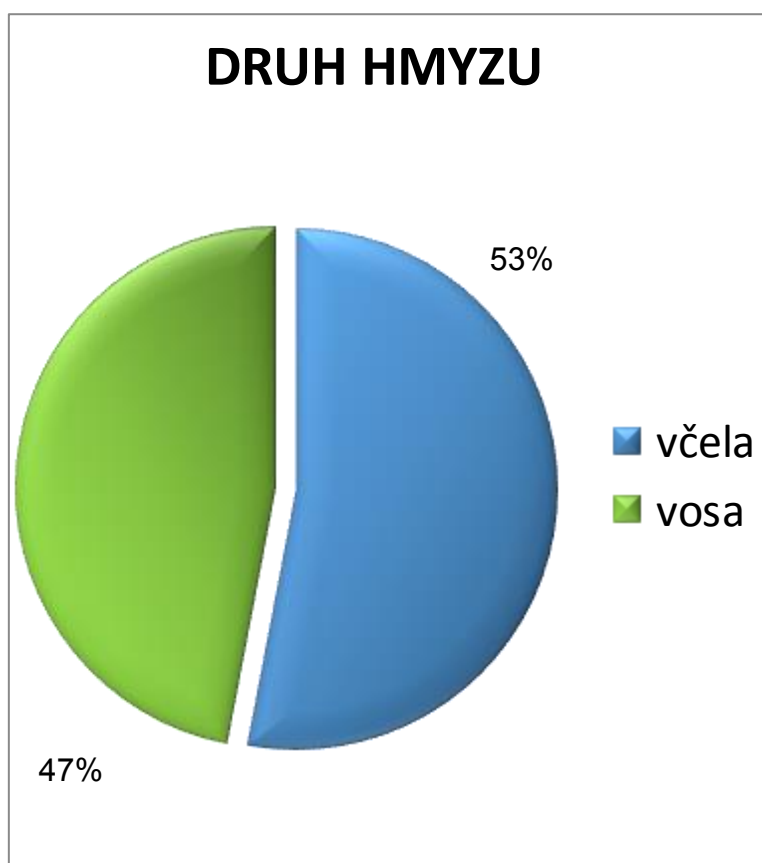
procedura krokové (stepwise) regrese, která postupně z modelu odstraňuje statisticky nevýznamné prediktory, až nakonec zůstanou jen ty, které jsou statisticky významné či se významnosti blíží. U vícenásobné regrese jsou p-hodnoty jednotlivých prediktorů adjustovány vůči vlivu ostatních prediktorů zařazených v modelu. Asociace mezi prediktorem a tíží reakce jsou charakterizovány pomocí poměrů šancí (odds ratio, OR) a příslušných 95% intervalů spolehlivosti. Všechny statistické testy byly prováděny na hladině významnosti 0,05.

3.1.3 Výsledky

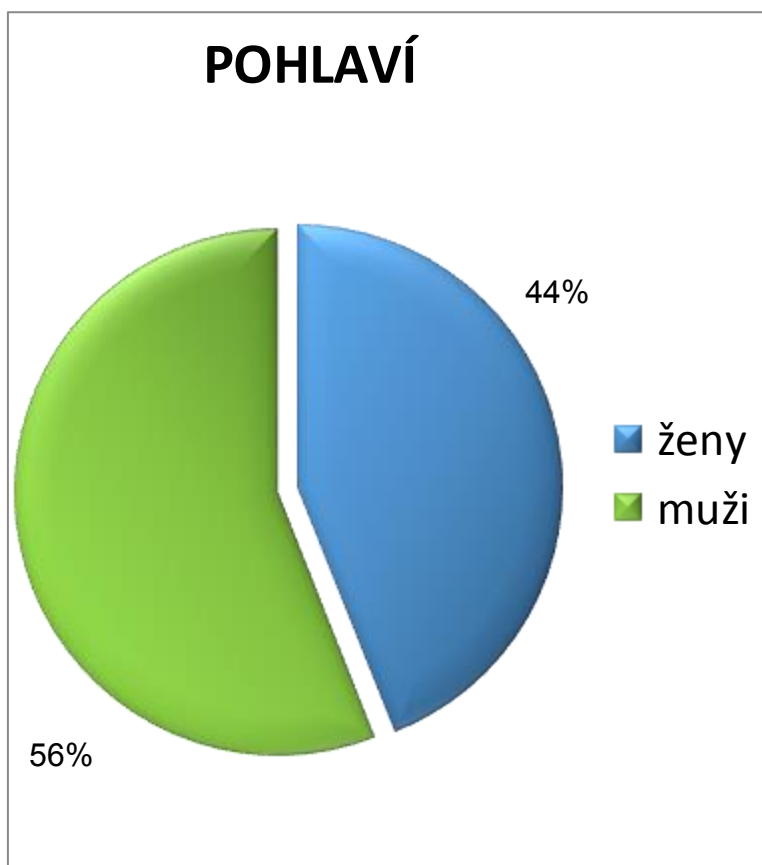
Obecná charakteristika souboru pacientů

Ve skupině 171 pacientů bylo 53% pacientů s alergií na včelí jed a 47% pacientů s alergií na vosí jed (Graf 3.1). Skupinu tvořilo 44% žen a 56% mužů (Graf 3.2).

Graf 3.1 - Druh hmyzu

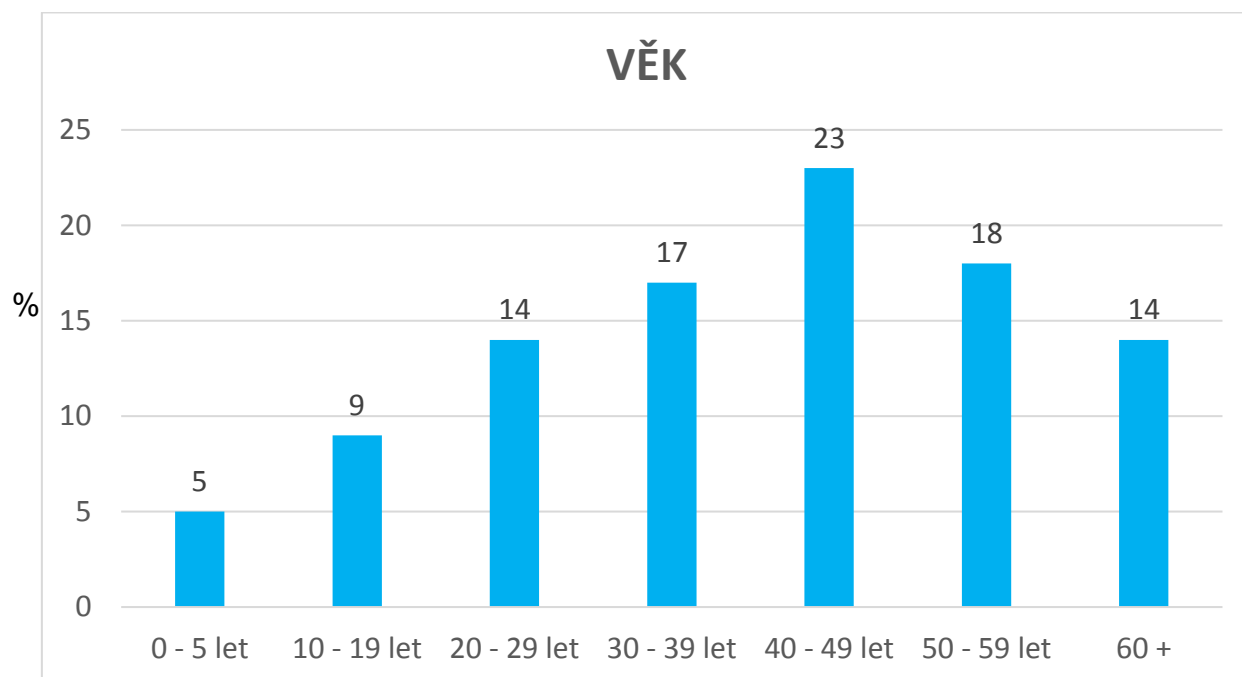


Graf 3.2 - Pohlaví pacienta

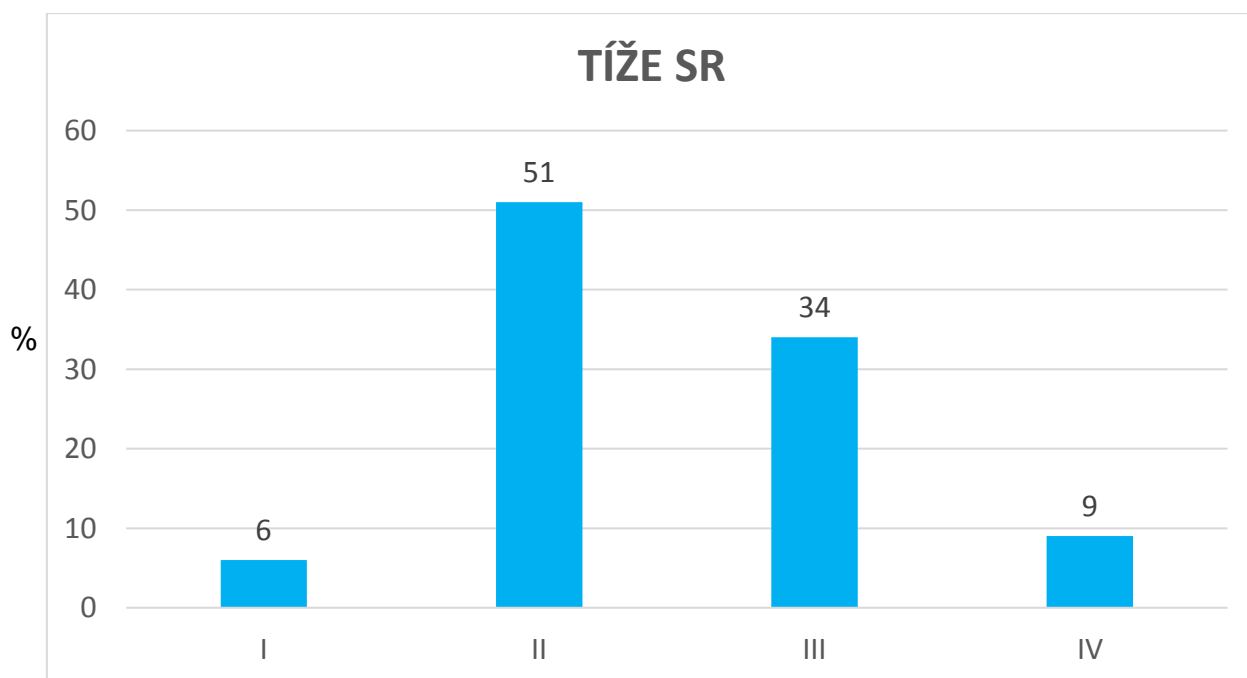


Ve skupině bylo výrazně více dospělých než dětí do 18 let věku, 86% dospělých resp. 14% dětí. Nejčastěji zastoupená věková skupina byla 40 - 49 let s 23% pacientů (Graf 3.3). Nejmladšímu pacientovi bylo v době reakce 5 let, nejstaršímu 76 let. Nejčastěji pacienti prodělali II. a III. typ SR (Graf 3.4). Pacienti byli nejčastěji bodnuti do oblasti končetin, kam bylo bodnuto celkem 56% pacientů (Graf 3.5).

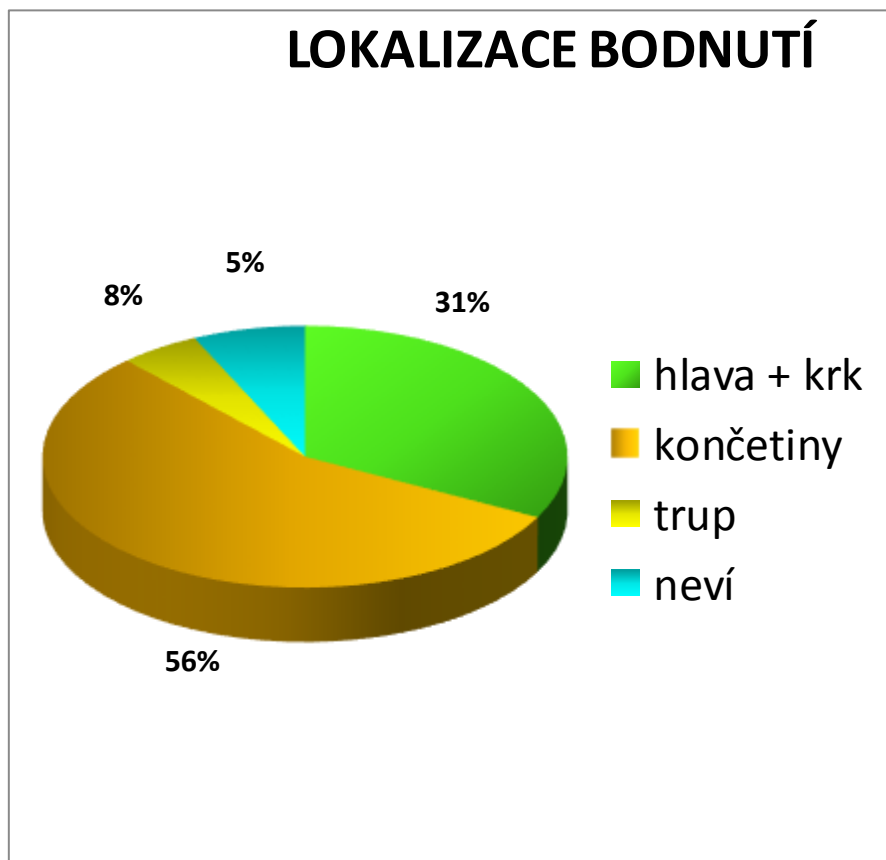
Graf 3.3 - Věk pacienta



Graf 3.4 - Tíže SR dle Ringa a Messmera



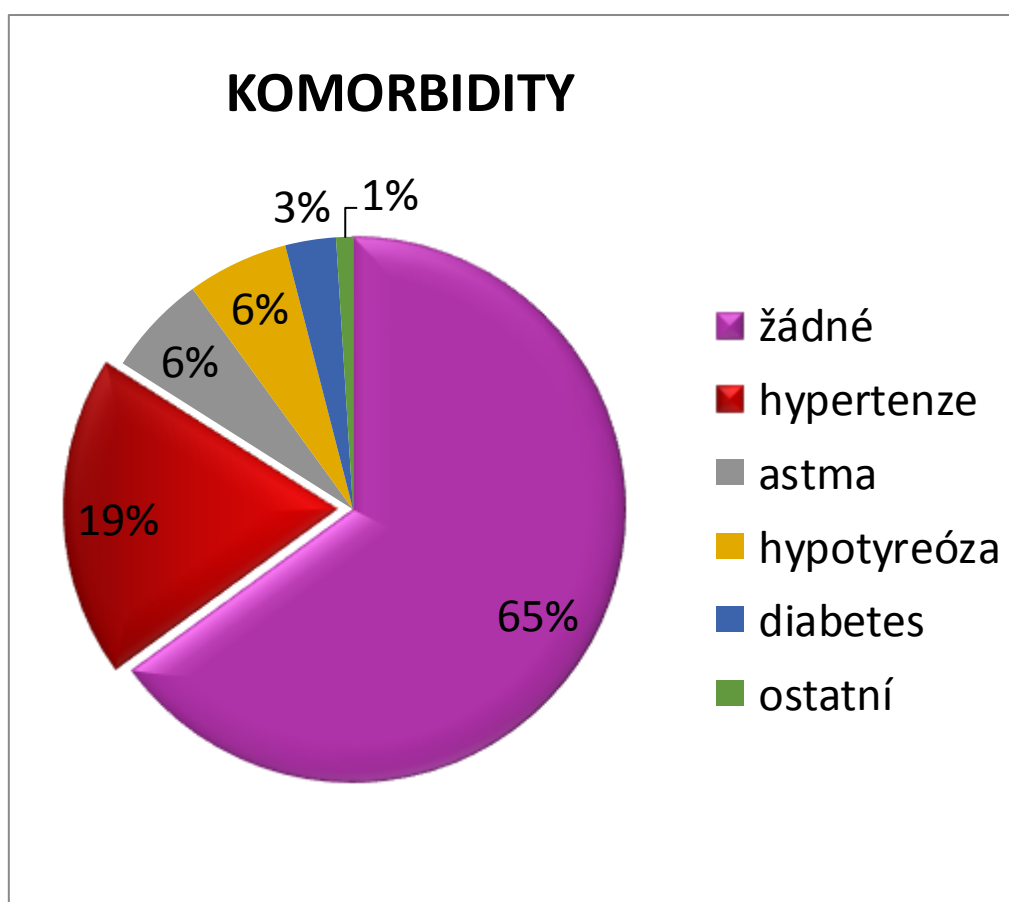
Graf 3.5 - Lokalizace bodnutí



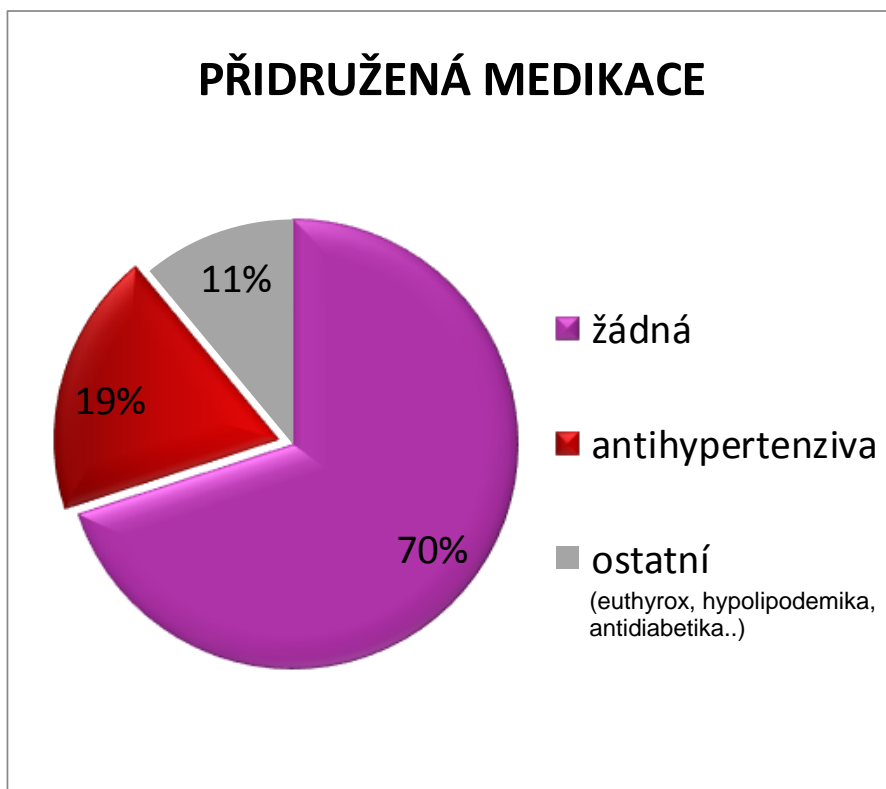
Celkem 65% pacientů nemělo žádnou přidruženou interní komorbiditu. Nejčastější komorbiditou byla arteriální hypertenze, kterou uvedlo 19% pacientů (Graf 3.6). Až 70% pacientů neužívalo žádné léky. Nejčastější přidruženou medikací byla antihypertenziva, z nichž nejčastěji užívané byly beta-blokátory a ACE inhibitory, které užívalo 9% resp. 7% pacientů (Graf 3.7). Vyšší bazální hladinu tryptázy mělo 5% pacientů, pouze 2% pacientů mělo potvrzenou systémovou mastocytózu. Alergii na inhalační alergeny mělo celkem 22% pacientů. Většina pacientů v anamnéze neměla žádnou předchozí reakci po bodnutí hmyzem, 18% pacientů uvedlo v předchorobí SR po bodnutí a jen 11% pacientů mělo v minulosti po bodnutí velkou lokální reakci (Graf 3.8). V průběhu léčby VIT bylo bodnuto celkem 71 pacientů, z nichž 6 (8%) prodělalo SR. 38 bodnutých pacientů bylo léčeno včelí VIT, v této skupině mělo reakci 5 (13%) pacientů. Naproti tomu ve skupině 33 bodnutých pacientů léčených imunoterapií vosím jedem prodělal SR jen 1 (3%) pacient. Pacienti léčení imunoterapií včelím jedem tedy v průběhu VIT reagovali na bodnutí častěji než pacienti léčení vosím jedem, nicméně tento rozdíl není statisticky významný s ohledem na celkový

nízký počet bodnutí ($p = 0,206$). Všechny reakce zaznamenané v průběhu VIT byly lehké, I. stupně dle Ringa a Messmera a nevyžadovaly aplikaci autoinjektoru s adrenalinem. Po ukončení léčby imunoterapií bylo zaznamenáno celkem 18 bodnutí, z toho 12 ve skupině pacientů léčených včelí a 6 ve skupině pacientů léčených vosí VIT. Po všech bodnutích byly zaznamenány celkem 2 SR, obě ve skupině pacientů s alergií na včelí jed. Statisticky jde opět o nevýznamný rozdíl ve srovnání s žádnou reakcí po bodnutí vosou ($p = 0,529$), nicméně 1 z reakcí byla velmi těžká s nutností aplikace adrenalinu a vedla k rozhodnutí o znovuzahájení VIT.

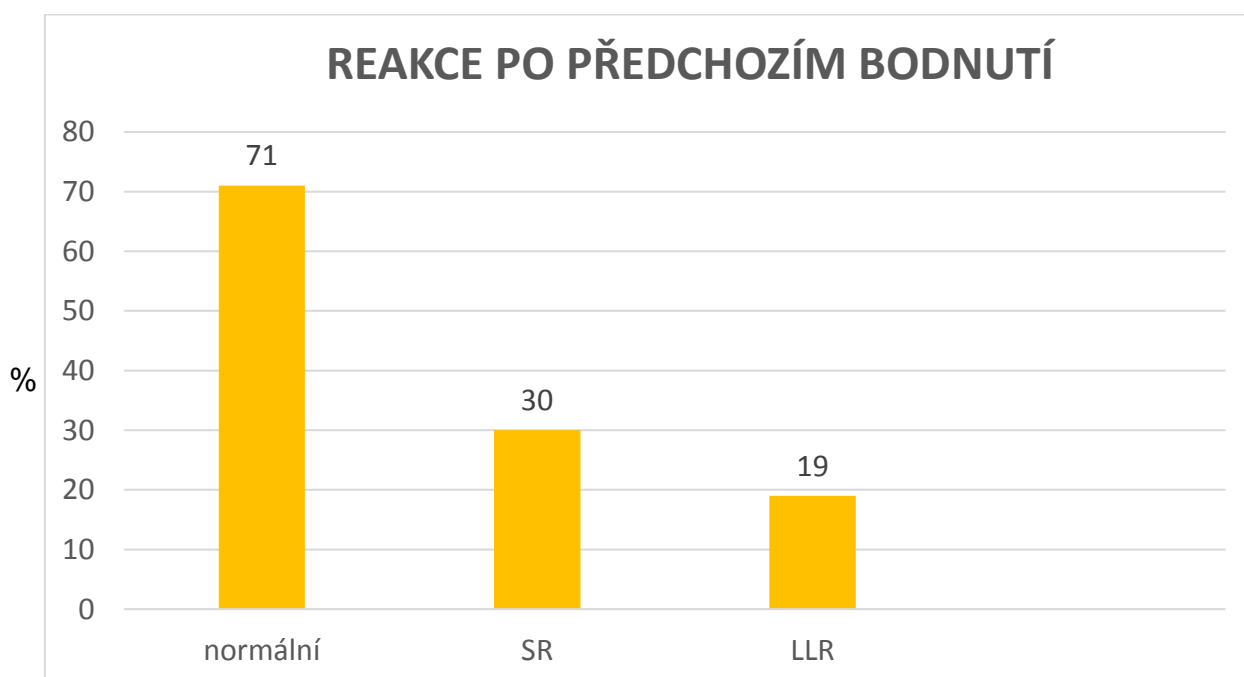
Graf 3.6 - Komorbidity



Graf 3.7 - Přidružená medikace



Graf 3.8 - Charakter předchozí reakce po bodnutí

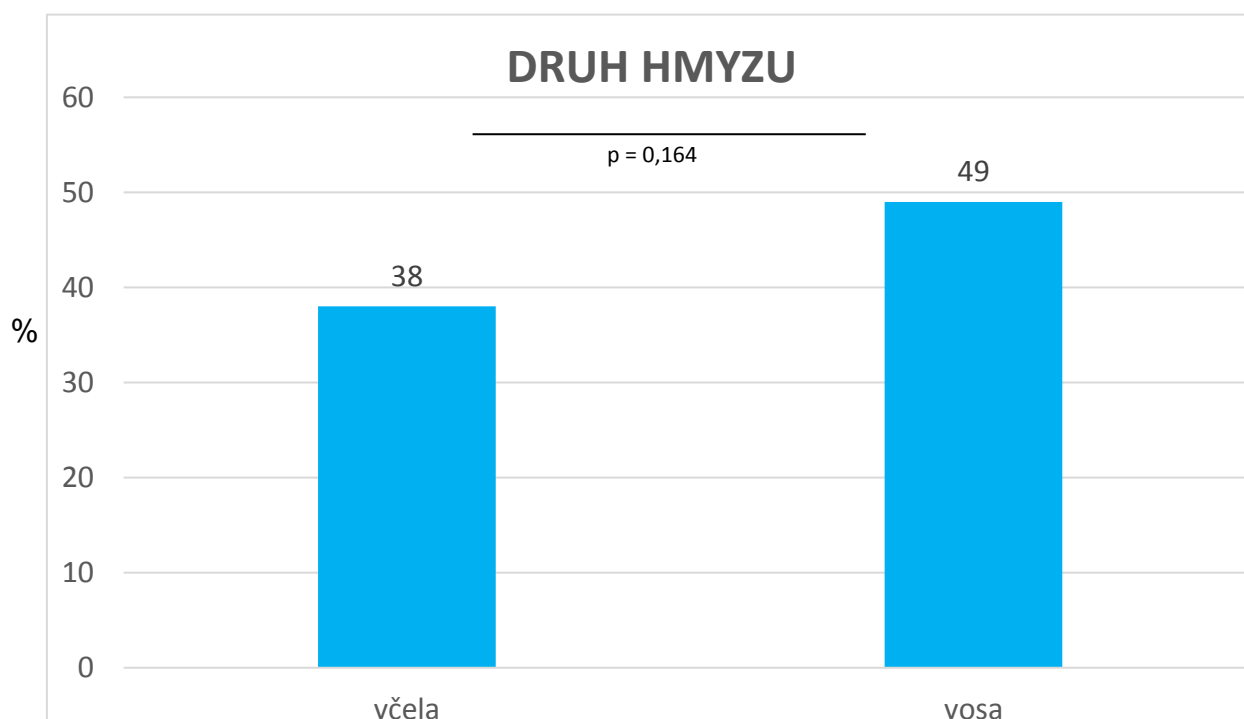


Srovnání pacientů s lehkou a těžkou reakcí

Ve skupině pacientů s lehčími reakcemi (I. a II. stupeň dle Ringa a Messmera) bylo celkem 57% a ve skupině pacientů s těžkými reakcemi (III. a IV. stupeň dle Ringa a Messmera) 43% pacientů. Všechny výše uvedené sledované parametry byly porovnány mezi oběma skupinami s cílem nalézt prediktory těžké reakce.

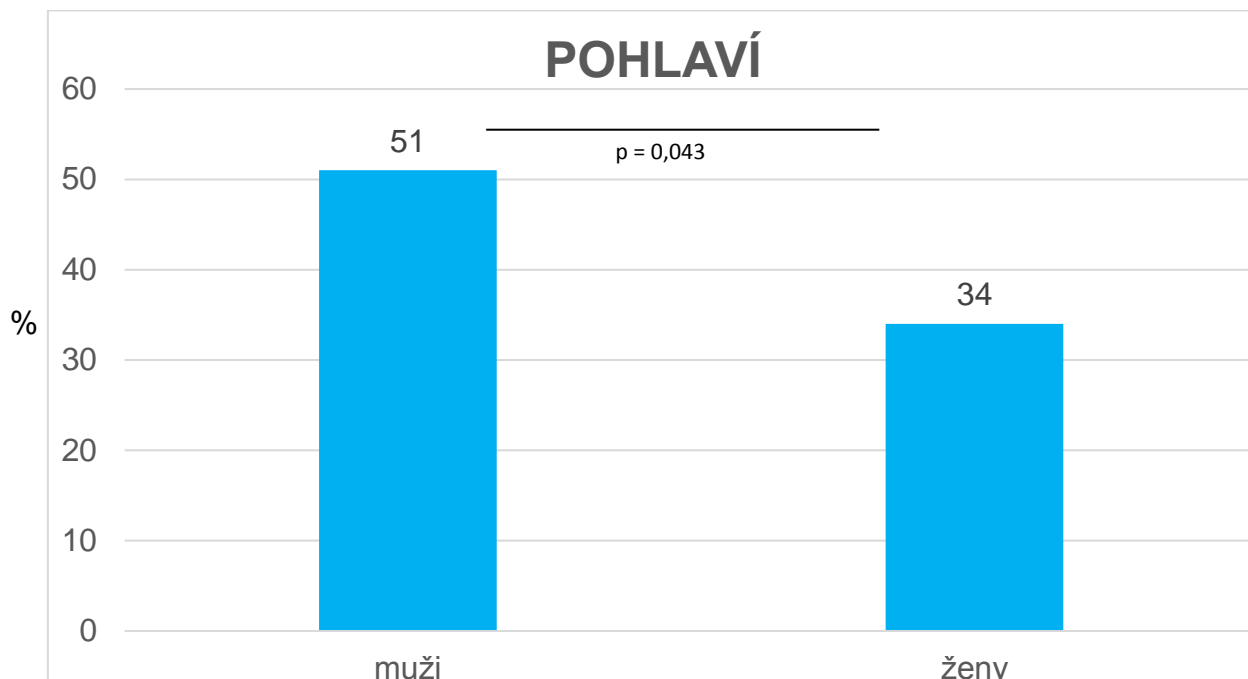
Těžší reakce byla zaznamenána u 38% pacientů s alergií na včelí jed a u 49% pacientů s alergií na vosí jed. I když bylo u pacientů s alergií na vosí jed zaznamenáno více těžkých reakcí, není tento rozdíl statisticky významný ($p = 0,164$) (Graf 3.9)

Graf 3.9 - Výskyt těžkých reakcí u pacientů s alergií na včelí a vosí jed



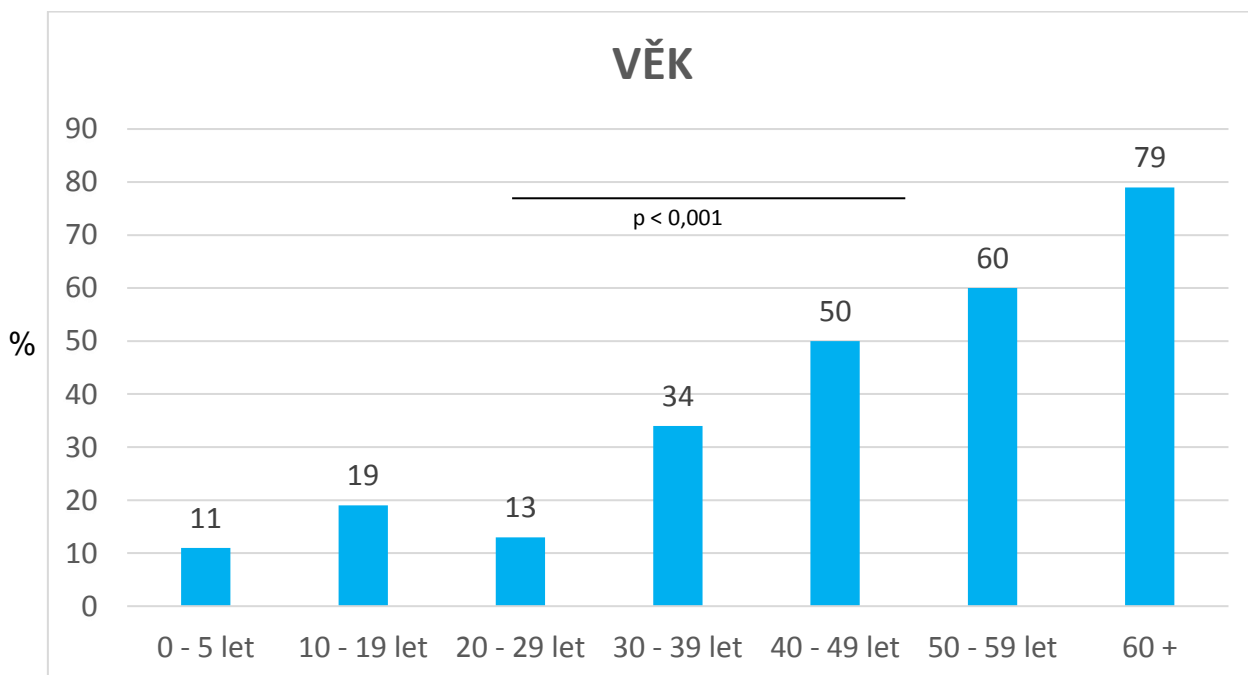
Těžší reakce byla zaznamenána u 51% mužů a u 34% žen (Graf 3.10). Tento rozdíl je statisticky významný ($p = 0,04$). U mužů je tedy statisticky významně vyšší výskyt těžších reakcí.

Graf 3.10 - Výskyt těžkých reakcí u mužů a žen



Těžší reakce byla zaznamenána u 17% dětí a u 48% dospělých, tento rozdíl je statisticky významný ($p = 0,007$). U dospělých jsou těžší reakce statisticky významně častější než u dětí. Podíl těžších reakcí rovněž významně roste s věkem ($p < 0,001$) (Graf 3.11).

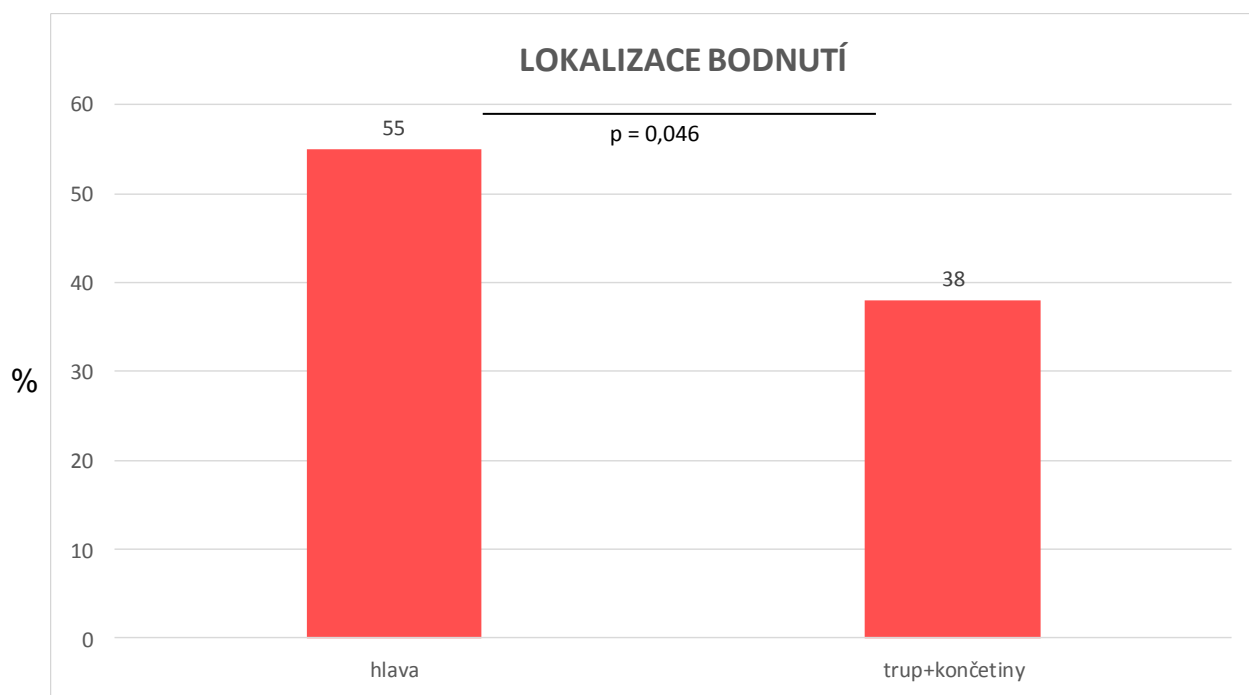
Graf 3.11 - Výskyt těžkých reakcí v závislosti na věku



Těžší reakci mělo 88% pacientů s vyšší bazální hladinou tryptázy a 41% pacientů s normální bazální hladinou tryptázy. U pacientů s vyšší bazální hladinou tryptázy je statisticky významně vyšší výskyt těžších reakcí ($p = 0,022$). Případů mastocytózy je velmi málo, což limituje možnosti statistického srovnání, nicméně všichni 3 pacienti s mastocytózou měli těžký průběh reakce.

Při hodnocení výskytu těžkých reakcí v závislosti na lokalizaci bodnutí jsme vyřadili 8 pacientů, kteří nebyli schopni určit, kam byli bodnuti. Soubor bez nich tvořilo 163 pacientů, z nichž většina byla bodnuta do oblasti končetin, dále do oblasti hlavy a trupu (viz výše). Těžkou reakci mělo 55% pacientů při bodnutí do oblasti hlavy, 50% pacientů bodnutých do trupu a 37% pacientů bodnutých do končetin. Zdá se tedy, že končetiny zřejmě představují poněkud nižší riziko těžké reakce, ale tento nálezn není statisticky významný ($p = 0,074$). Pokud jsme při hodnocení porovnali výskyt těžkých reakcí u pacientů bodnutých do oblasti hlavy oproti těžkým reakcím při bodnutí do jiných lokalizací (končetiny + trup), dospěli jsme ke zjištění, že 55% pacientů bodnutých do hlavy má těžkou reakci, zatímco při bodnutí do jiné lokalizace (mimo oblast hlavy) má těžkou reakci 38% pacientů. Tento rozdíl je již statisticky významný ($p = 0,046$). Můžeme tedy konstatovat, že při bodnutí do hlavy jsme zaznamenali významně více těžkých reakcí (Graf 3.12).

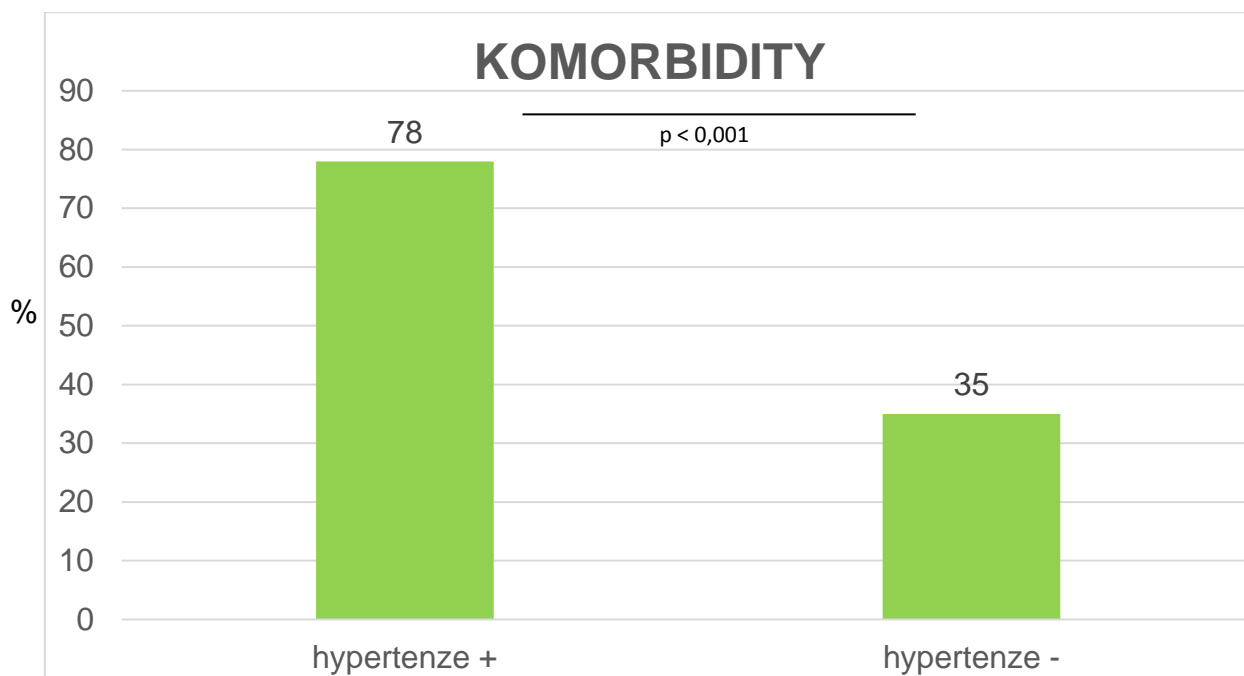
Graf 3.12 - Výskyt těžkých reakcí v závislosti na lokalizaci bodnutí



Nejčastější interní komorbiditou v našem souboru je arteriální hypertenze, kterou trpí 19% pacientů. Těžší reakci mělo 78% pacientů s arteriální hypertenzí a pouze 35% pacientů bez této komorbidit. Tento rozdíl je statisticky významný ($p < 0,001$) (Graf 3.13).

U žádné další komorbidit (astma, diabetes, hypotyreóza...) jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly ve výskytu těžkých a lehkých reakcí. Stejně tak u pacientů, kteří trpěli současně i alergií na inhalační alergeny (pyly, roztoče..) jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl v zastoupení lehkých a těžších reakcí.

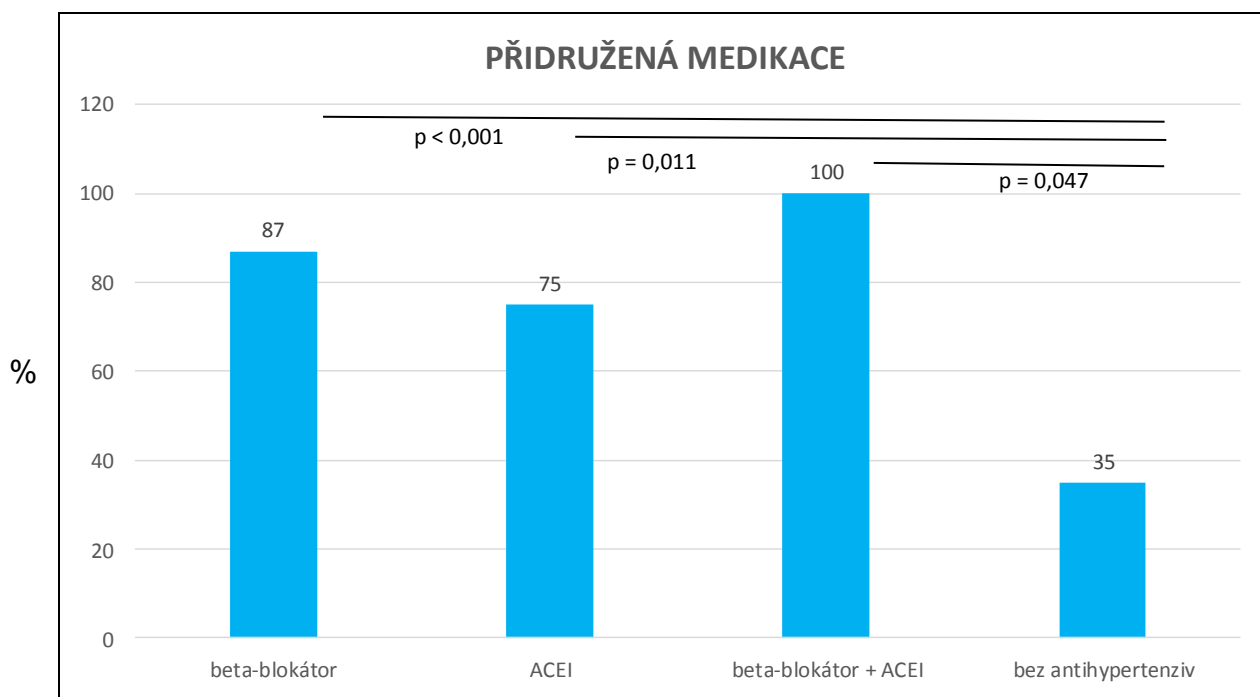
Graf 3.13 - Výskyt těžkých reakcí u pacientů s hypertenzí a bez ní



Nejčastěji užívanou medikací v době reakce po bodnutí byla antihypertenziva. Vzhledem k tomu, že tyto léky užívali pacienti s arteriální hypertenzí, dospěli jsme u nich ke stejným závěrům. Pacienti, kteří užívali antihypertenziva, měli statisticky významně více těžších reakcí ve srovnání s pacienty, kteří tyto léky neužívali. Pokusili jsme se i o podrobnější analýzu zaměřenou na konkrétní skupiny antihypertenziv. Zaměřili jsme se na nejvíce diskutované beta-blokátory a ACE inhibitory. Těžší reakci prodělalo 87% pacientů užívajících beta-blokátor oproti 35% pacientům neužívajícím žádná antihypertenziva ($p < 0,001$). Podobně těžší reakci mělo 75% pacientů užívajících ACEI oproti 35% u pacientů

bez antihypertenzní léčby ($p = 0,011$). Pacienti užívající kombinaci beta-blokátor a ACEI byli celkem pouze 3 a všichni měli těžší reakci. I při tak malém počtu pacientů byl rozdíl mezi pacienty užívajícími tuto kombinaci ve srovnání s pacienty bez antihypertenziv prokazatelný, byť těsně ($p = 0,047$) (Graf 3.14).

Graf 3.14 - Výskyt těžkých reakcí v závislosti na užívání antihypertenziv



U pacientů, kteří udali v anamnéze předchozí velkou lokální reakci po bodnutí hmyzem jsme nezaznamenali statisticky významně vyšší výskyt těžších reakcí oproti pacientům, kteří v minulosti na bodnutí hmyzem nijak nereagovali.

Logistická regrese

Posledním krokem naší analýzy byla tzv. logistická regrese. Byla použita procedura krokové/stepwise logistické regrese, která postupně z modelu odstranila statisticky nevýznamné prediktory, až nakonec zůstaly jen ty, které jsou statisticky významné či se významnosti blíží. Do výpočtů byly zařazeny sledované faktory: druh alergie (včela x vosy), pohlaví, věk, lokalizace bodnutí, komorbidita, přidružená medikace, předchozí reakce po

bodnutí. Do modelu obecně nelze zahrnout prediktory, které se vyskytují velmi zřídka. V našem případě tedy nebyla zahrnuta vyšší bazální hladina tryptázy a mastocytóza. Konečný výsledek modelu logistické regrese, který zahrnuje pouze ty faktory, jež vyšly statisticky významně, shrnuje tabulka 3.1.

Tabulka 3.1 - Konečný výsledek logistické regrese s prediktory těžké reakce

Prediktor	odds ratio	p-hodnota	95% CI pro odds ratio
pohlaví (mužské x ženské)	2,25	0,040	1,04 – 4,90
věk	1,07	0,000	1,04 – 1,10
lokalizace (hlava x ostatní)	2,78	0,013	1,24 – 6,25

Jako statisticky významné prediktory těžké reakce vycházejí věk (riziko roste s věkem, $p < 0.001$), lokalizace hlava ($p = 0.013$) a mužské pohlaví ($p = 0.040$). Hodnoty odds ratio lze interpretovat tak, že muži mají 2,25x větší šanci těžké reakce v porovnání se ženami, u lokalizace hlava je 2,78x vyšší šance těžké reakce než u ostatních lokalizací (končetiny + trup). Riziko těžké reakce roste při zvýšení věku o 1 rok zhruba 1,07x, tedy o 7 %.

3.1.4 Hodnocení a diskuze

Naši sledovanou skupinu pacientů s alergií na hmyzí jed lze obecně charakterizovat takto: skupinu tvoří více pacientů s alergií na včelí jed, více mužů, nejmladšímu pacientovi je 5 a nejstaršímu 76 let, dospělých je více než dětí, nejpočetnější věkovou kategorií tvoří pacienti ve věku od 40 – 49 let, nejčastěji byl zaznamenán II. typ SR dle Ringa a Messmera, bodnutí do končetin, většina pacientů nemá žádnou komorbiditu a neužívá žádné léky, z přítomných komorbidit a přidružené medikace jsou nejčastější arteriální hypertenze a antihypertenziva. V průběhu léčby a po jejím ukončení jsme po bodnutí hmyzem v přírodě zaznamenali jen ojedinělé případy SR, které zatím nelze statisticky zhodnotit.

Srovnání pacientů s lehkou a těžkou reakcí umožnilo odhalit signifikantní rozdíly mezi oběma skupinami. Zaznamenali jsme statisticky významně vyšší výskyt těžších reakcí u

mužů, u pacientů s vyšší bazální hladinou tryptázy, u pacientů s arteriální hypertenzí užívajících antihypertenziva, u dospělých pacientů a rovněž jsme potvrdili, že podíl těžších reakcí významně roste s věkem.

Finální logistická regrese odhalila jako statisticky významné prediktory těžké reakce věk (riziko roste s věkem), bodnutí do oblasti hlavy a mužské pohlaví. Dle naší analýzy při zvýšení věku o 1 rok narůstá riziko těžké reakce zhruba 1,07x, tedy o 7 %. Vyšší věk je tedy nepochybně významným rizikovým faktorem pro těžší reakce po bodnutí, což je v souladu s doposud publikovanými daty [2]. Dle naší analýzy mají muži 2,25x větší šanci těžké reakce v porovnání se ženami. Při bodnutí do hlavy je 2,78x vyšší šance těžké reakce než při bodnutí do ostatních lokalizací (končetiny + trup). Naše zjištění stran vlivu pohlaví a lokalizace bodnutí do oblasti hlavy jsou bohužel v rozporu s výsledky nedávno publikované práce rakouských autorů, kteří nepotvrdili významný vliv těchto faktorů na závažnost SR [2]. Nicméně v souladu se závěry zmíněné práce není ani dle našich výsledků logistické regrese užívání antihypertenziv rizikovým faktorem pro těžké reakce.

3.2 Diagnostika alergie na jed blanokřídleho hmyzu

3.2.1 Zhodnocení přínosu laboratorních metod pro diagnostiku alergie na včelí a vosí jed

Metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 95 pacientů s alergií na hmyzí jed indikovaných k imunoterapii včelím nebo vosím jedem. Všem pacientům byly provedeny všechny dostupné diagnostické laboratorní metody určené k potvrzení senzibilizace k hmyzím jedům - extraktové IgE, molekulární diagnostika (rApi m 1, rVes v 5, rVes v 1) a BAT. Následně jsme pro každou metodu spočítali senzitivitu a specifitu při standardní hodnotě hranice pozitivity (cut-off) pro danou metodu. Poté jsme pomocí ROC křivek pátrali po optimální hodnotě cut-off pro každou metodu zvlášť. Nakonec jsme statisticky zhodnotili přínos různých kombinací laboratorních metod.

Pacienti

35 pacientů trpělo alergií na včelí jed, 60 pacientů alergií na jed vosy. Vstupním kritériem pro zařazení do studie byla indikace k zahájení VIT. Tato indikace byla založena na anamnéze a na potvrzené senzibilizaci k hmyzímu jedu. Všichni pacienti prodělali v předchozích 3 letech SR po bodnutí včelou nebo vosou a všichni měli jednoznačně potvrzenou senzibilizaci k příslušnému hmyzímu jedu kožním testem. Ve skupině pacientů s alergií na včelí jed bylo 17 (49%) mužů a 18 (51%) žen ve věku od 14 – 73 let (průměrný věk 47 let). Celkem 8 (23%) pacientů prodělalo II. stupeň, 16 (46%) III. stupeň a 11 (31%) IV. stupeň systémové reakce dle Müllera. Ve skupině pacientů s alergií na vosí jed bylo 23 (38%) mužů a 37 (62%) žen. Celkem 10 (16%) pacientů prodělalo I. stupeň, 13 (22%) II. stupeň, 21 (35%) III. stupeň a 16 (27%) IV. stupeň systémové reakce dle Müllera. Kontrolní skupinu tvořilo 22 jedinců bez anamnézy alergie na hmyzí jed.

Provedené metody:

Kožní testy

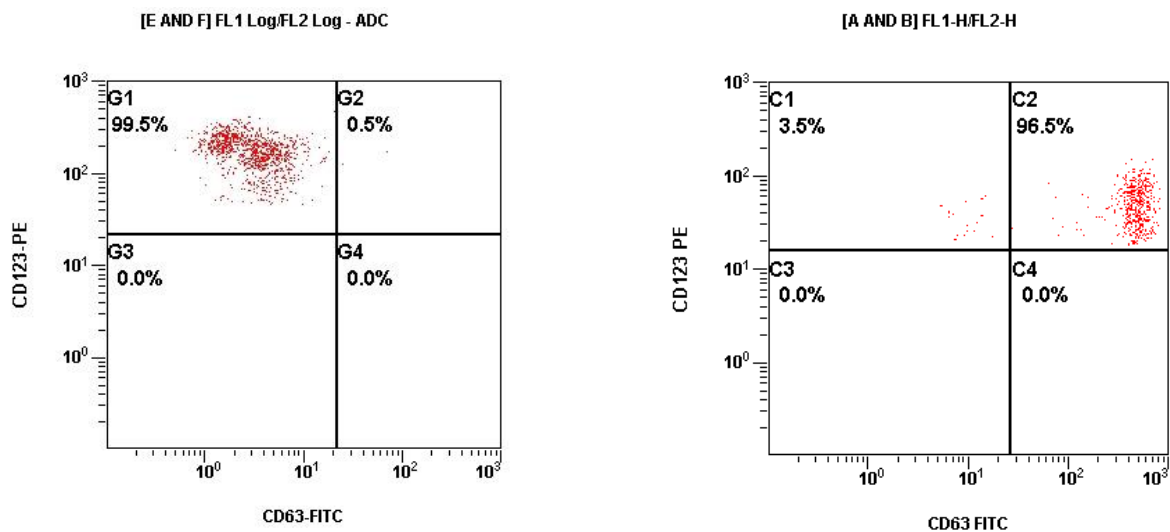
Kožní testy byly provedeny všem pacientům zařazeným do studie. Testaci jsme zahájili prick testy s extrakty včelího a vosího jedu o koncentraci 100 µg/ml, v případě negativity jsme pokračovali koncentrací 300 µg/ml (Soluprick SQ, ALK - Abello). V případě negativity prick testů jsme doplnili intradermální testy, které jsme provedli opět „stupňovitě“. Zahájili jsme koncentrací 0,01 µg/ml, v případě potřeby jsme dále pokračovali s koncentrací 0,1 µg/ml a pak ev. i koncentrací 1 µg/ml (Pharmalgen Venom, ALK - Abelló). Vzhledem k tomu, že jsme kožní testy neprovedli v kontrolní skupině, nemohly být jejich výsledky dále statisticky analyzovány.

Vyšetření specifických IgE protilátek

Specifické IgE k extraktům včelího a vosího jedu (I1 a I3), stejně tak i specifické IgE k dostupným molekulám rApi m 1, r Ves v 1 a rVes v 5, bylo vyšetřeno pomocí systému ImmunoCAP (ThermoFisher Scientific, Uppsala, Sweden). Jako hranice positivity byla pro všechny metody použita standardně používaná hodnota 0,35 kIU/l doporučená výrobcem.

Test aktivace bazofilů (BAT)

Stanovení jsme provedli z plné krve odebrané do zkumavky s heparinem. Vzorek krve byl inkubován ve stimulačním pufru obsahujícím IL - 3 s alergenem o koncentraci 0,1 µg/ml (Pharmalgen Venom, ALK - Abelló). Inkubace probíhala při 37°C po dobu 20 minut. Aktivace bazofilů byla po ukončení inkubace zastavena ponořením zkumavek do lázně s tajícím ledem. Poté byla přidána kombinace monoklonálních protilátek CD123 FITC/HLA-DR PE/CD63 PerCP (Becton Dickinson). Následně bylo provedeno hodnocení na průtokovém cytometru FC500 (Beckman Coulter). Hledané aktivované bazofily jsou CD123+, HLA-DR-, CD 63+ (Obrázek 3.1) Přítomnost více než 15% těchto aktivovaných bazofilů bylo hodnoceno jako pozitivní výsledek.



Obrázek 3.1 - Vizualizace populace aktivovaných bazofilů pomocí průtokového cytometru (vlevo negativní nález, vpravo pozitivní nález)

Statistická analýza

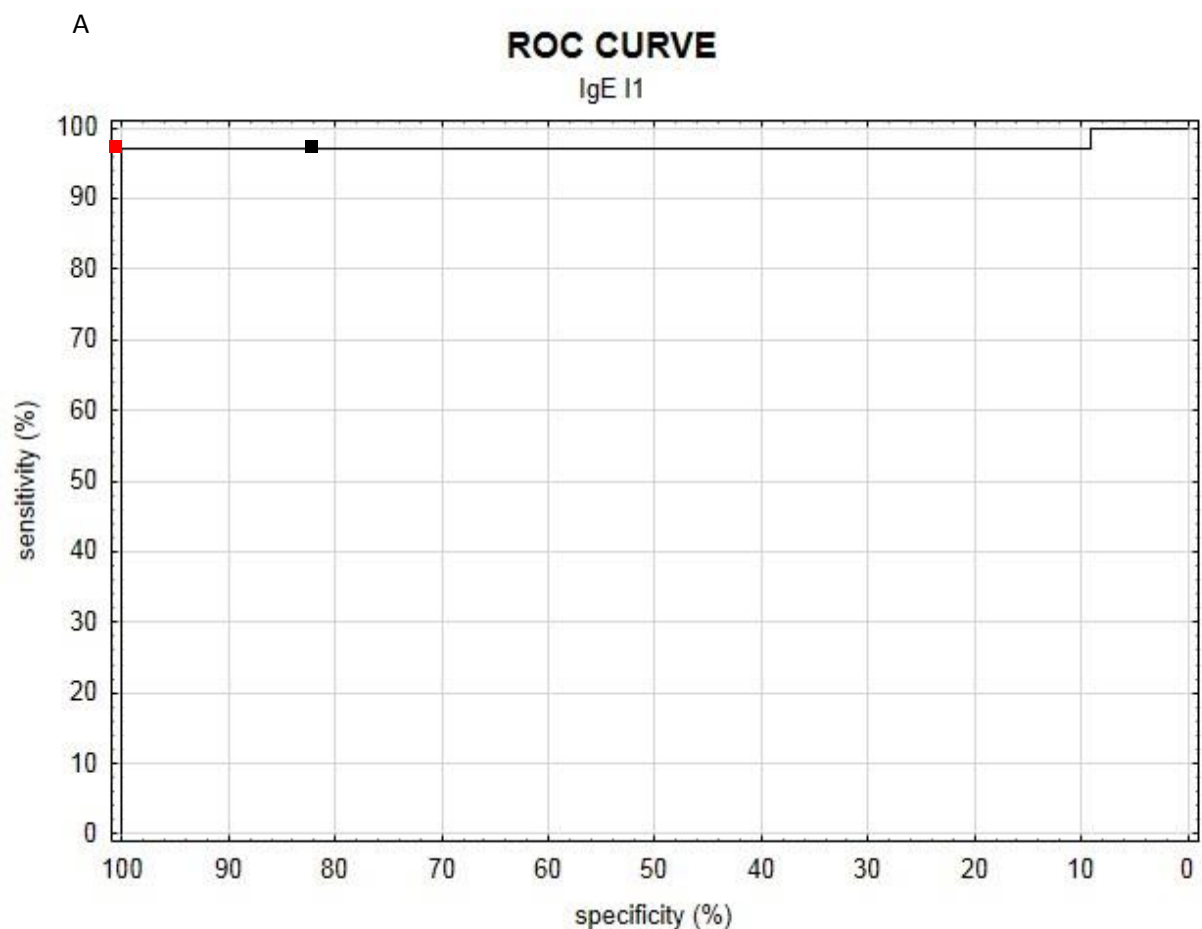
Statistická analýza byla provedena s užitím softwaru SAS 9.3 (Cary, NC, USA). Pro měření parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách a podskupinách byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum. Vybrané statistické údaje byly též zpracovány graficky do tzv. Box & Whisker plot. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách, vzhledem k distribucím těchto proměnných, byly použity neparametrické testy (Wilcoxon Two Sample Test). Pro zjištění závislosti zkoumaných znaků, vzhledem k negausovskému rozdělení těchto proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. Jednotlivé faktory jsme zkoumali nejprve univariálně. Nejprve jsme spočítali senzitivitu a specifitu pro každou metodu při užití standardní hodnoty cut-off. Pomocí ROC křivek jsme pak pátrali po optimální hodnotě cut-off pro každou metodu. Optimální hodnota cut-off byla definována jako hodnota s nejvyšší senzitivitou a specificitou alespoň 95%. Následně byly parametry analyzovány pomocí tzv. "OR" kombinací. Byly analyzovány všechny možné kombinace zkoumaných metod. Pozitivita "OR" kombinace znamená, že je alespoň jeden parametr v kombinaci pozitivní resp. nad hranicí daného cut-off. Parametry byly nejprve analyzovány při použití standardních hodnot cut-off, ale poté i s užitím námi zjištěných optimálních hodnot cut-off předchozí ROC analýzou. Statistická významnost byla stanovena na hranici 0,05.

Výsledky

Výsledky u pacientů s alergií na včelí jed

Při užití standardních hodnot cut-off jsme potvrdili senzitivitu resp. specificitu 97,14% resp. 81,82% pro IgE I1, 68,57% resp. 100% pro IgE rApi m 1 a 74,29% resp. 100% pro BAT I1. Následně jsme pro každou metodu sestrojili ROC křivku, pomocí které jsme hledali optimální hodnotu cut-off (Graf 3.15). Optimální cut-off pro IgE I1 a BAT I1 se liší od standardně užívaných hodnot 0,35 kIU/l a 15%, pro IgE I1 činí 1,0 kIU/l se senzitivitou resp. specificitou 97,14% resp. 100% a pro BAT I1 je pouze 6% se senzitivitou resp. specificitou 80% resp. 95,45%. Pro rApi m1 jsme nenalezli vhodnější cut-off než je zavedeno (Tabulka 3.2).

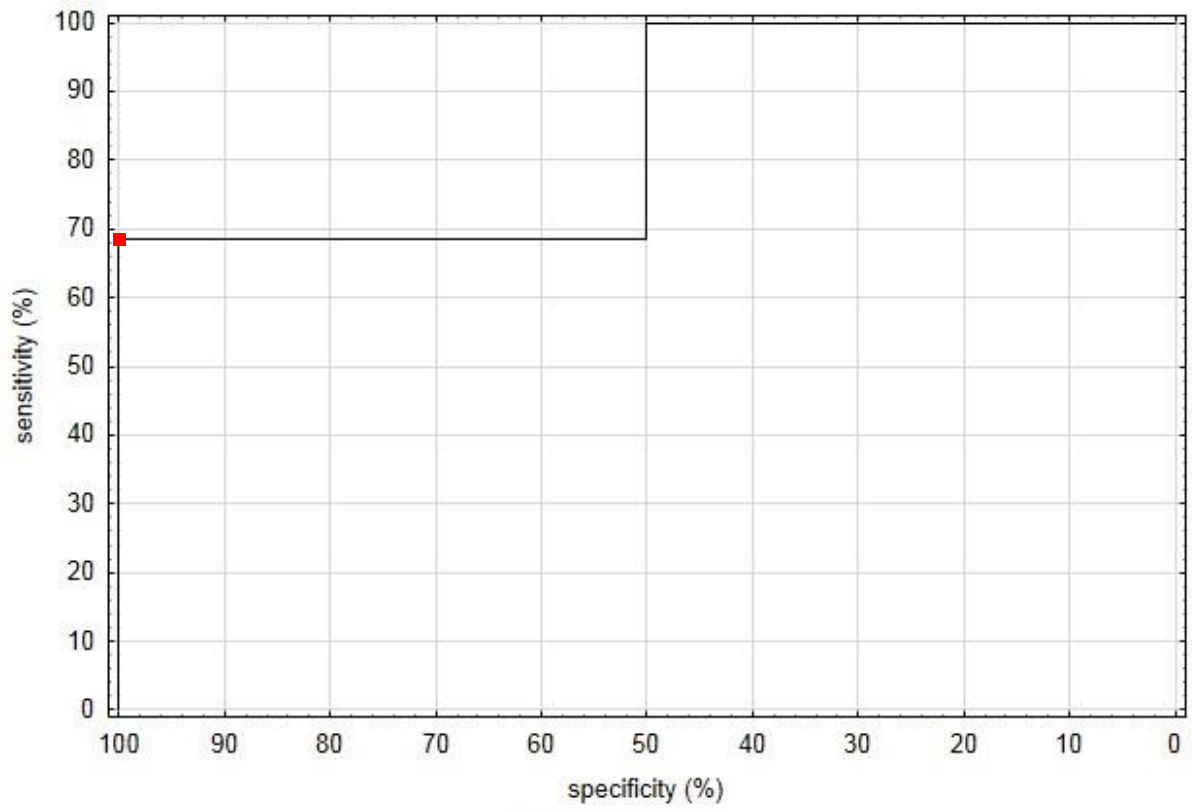
Graf 3.15 - ROC křivky pro laboratorní metody u pacientů s alergií na včelí jed s vyznačením standardní (■) a optimální hodnoty cut-off (■) (A- ROC IgE I1, B – ROC IgE rApi m 1, C – ROC BAT I1)



B

ROC CURVE

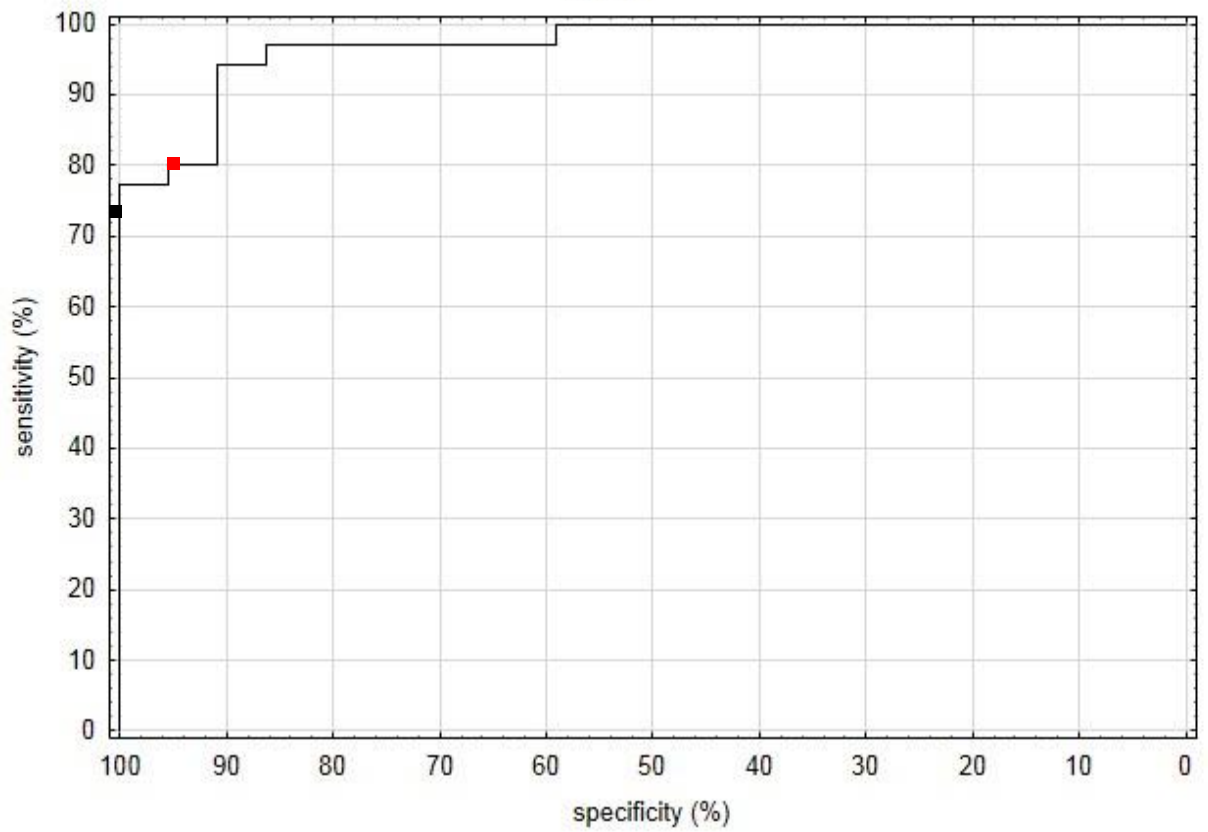
IgE Api m1



C

ROC CURVE

BAT I1



Tabulka 3.2 - Senzitivity a specificity pro jednotlivé laboratorní metody u pacientů s alergií na včelí jed

Metoda	Cut-off	Senzitivita (%)	Specificita (%)
IgE II	standardní 0,35 kIU/l	97,14	81,82
	optimální 1,00 kIU/l	97,14	100,00
IgE rApi m 1	standardní 0,35 kIU/l	68,57	100,00
	optimální 0,35 kIU/l	68,57	100,00
BAT II	standardní 15,0%	74,29	100,00
	optimální 6,5%	80,00	95,45

Následně jsme provedli tzv. "OR" kombinační analýzu. Touto metodou byly zkoumány všechny možné kombinace laboratorních metod nejprve při použití standardních cut-off, posléze i při využití námi zjištěných "optimálních" cut-off. Nejlepší kombinací je vyšetření IgE II + IgE rApi m 1 s užitím optimálních cut-off se senzitivitou resp. specificitou 97,14% resp. 95,45% (Tabulka 3.3).

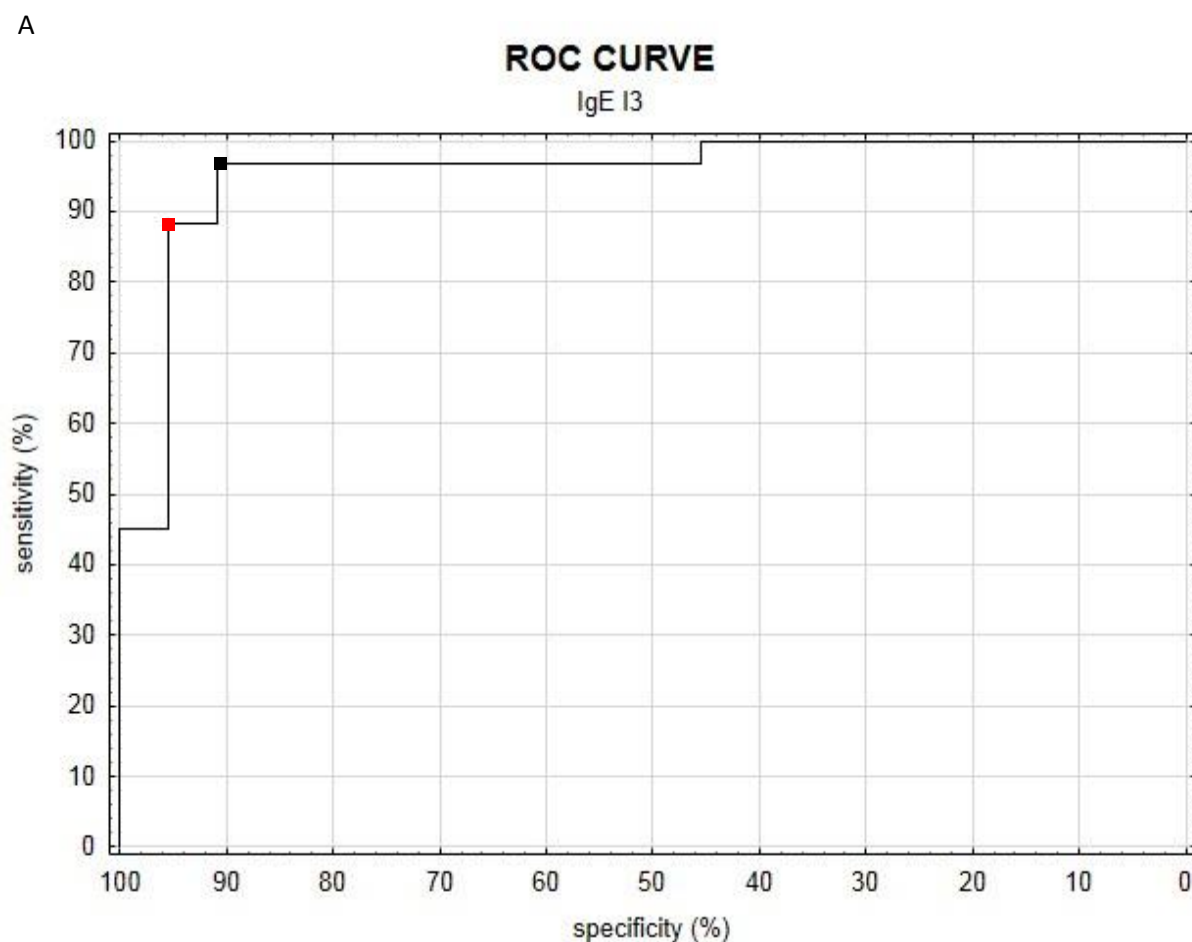
Tabulka 3.3 - Analýza "OR" kombinací u pacientů s alergií na včelí jed

Metody	Cut-off	Senzitivita (%)	Specificita (%)
II + rApi m 1	standardní	97,14	81,82
	optimální	97,14	95,45
II + BAT	standardní	97,14	81,82
	optimální	97,14	90,91
II + rApi m 1 + BAT	standardní	97,14	81,82
	optimální	97,14	90,91
rApi m 1 + BAT	standardní	85,71	100,00
	optimální	88,57	95,45

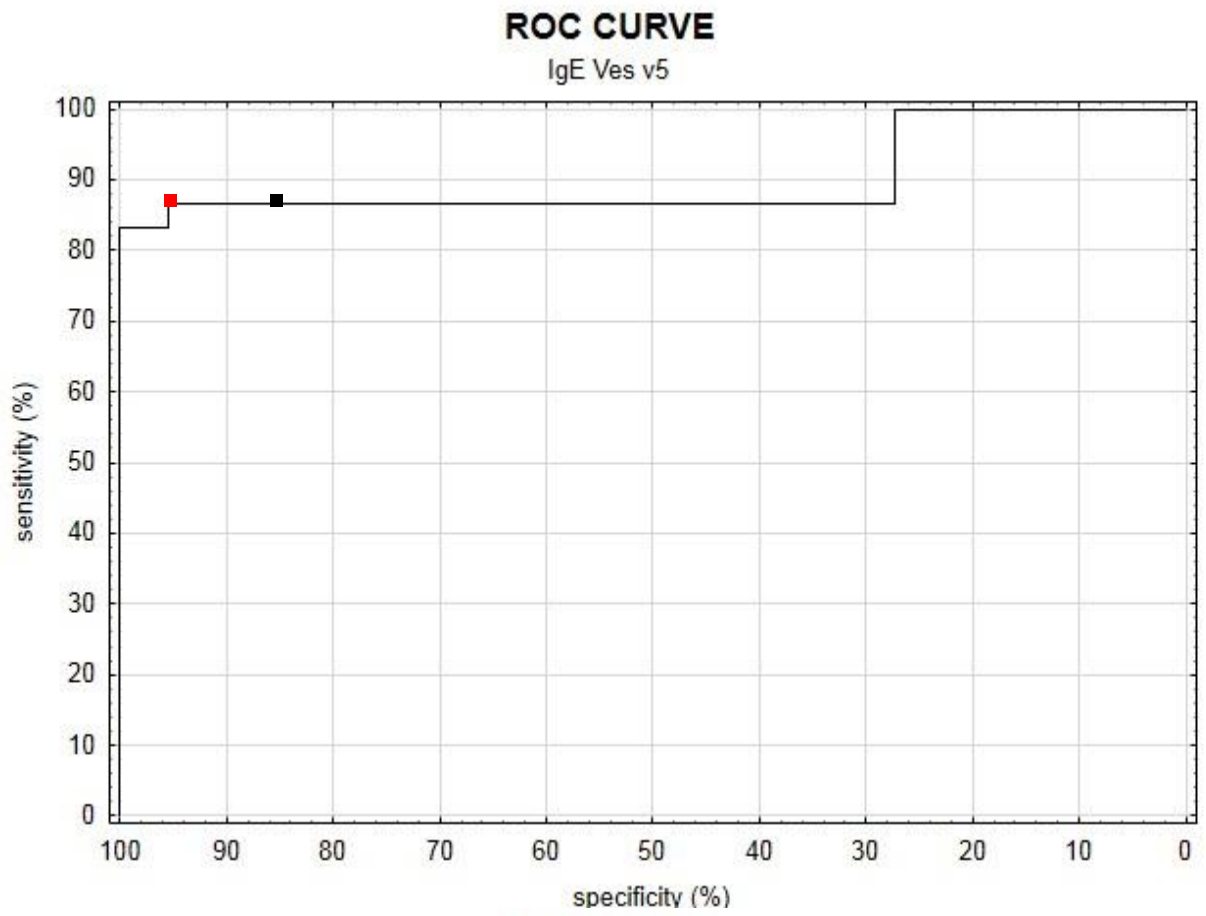
Výsledky u pacientů s alergií na vosí jed

Při užití standardních hodnot cut-off jsme potvrdili senzitivitu resp. specificitu 96,67% resp. 81,82% pro IgE I3, 86,67% resp. 86,36% pro IgE rVes v 5, 68,33% resp. 90,91% pro IgE rVes v 1 a 72,88% resp. 100% pro BAT I3. Následně jsme pro každou metodu sestrojili ROC křivku, pomocí které jsme hledali optimální hodnotu cut-off (Graf 3.16). Optimální cut-off pro všechny metody se liší od standardně užívaných hodnot. Pro všechna specifická IgE jsou optimální hodnoty cut-off vyšší než standardních 0,35 kIU/l, pro IgE I3 je 1,22 kIU/l, pro IgE rVes v 5 0,6 kIU/l a pro IgE rVes v 1 1,0 kIU/l. Optimální cut-off pro BAT I3 je nižší než standardních 15%, pouze 4,5% (Tabulka 3.4).

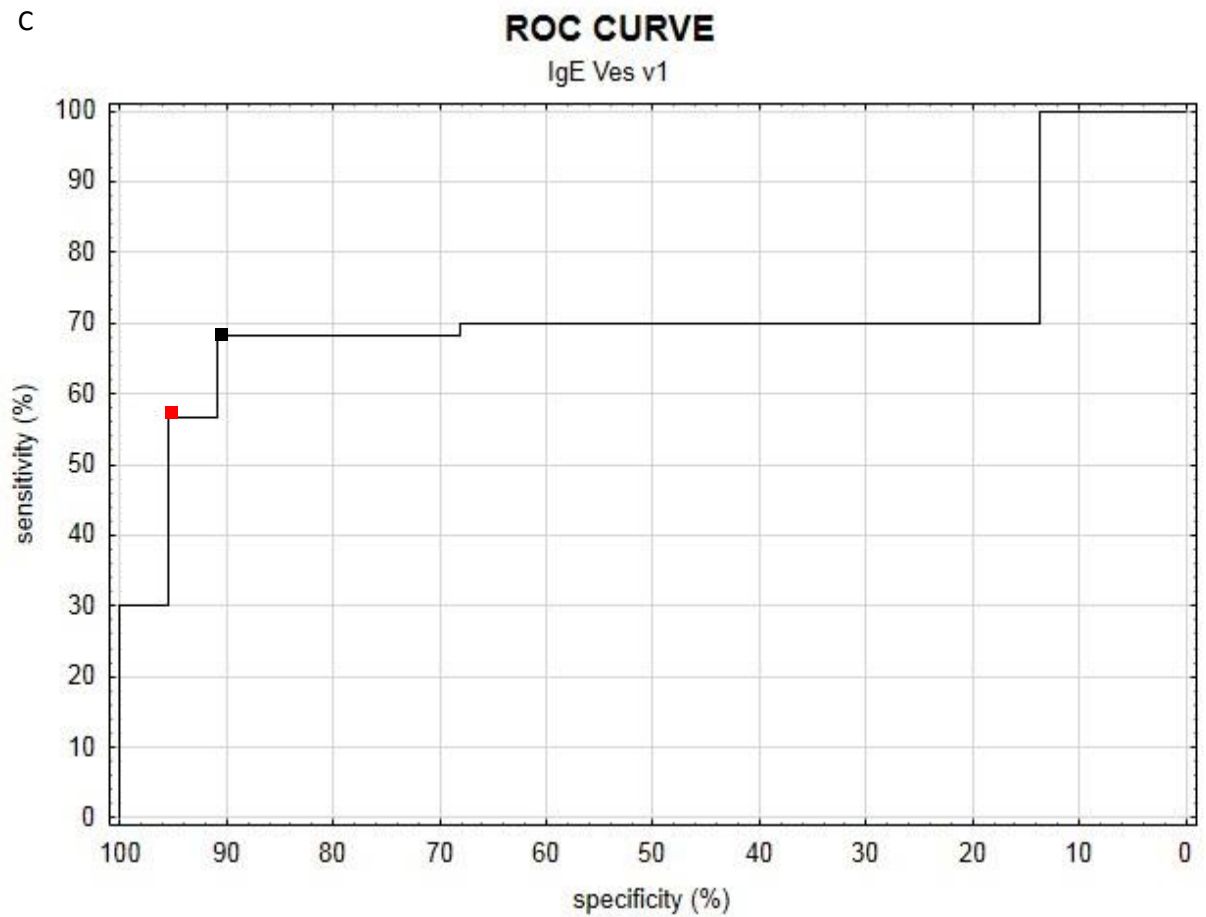
Graf 3.16 - ROC křivky pro laboratorní metody u pacientů s alergií na vosí jed s vyznačením standardního (■) a optimálního (■) cut-off (A- ROC IgE I3, B – ROC IgE rVes v 5, C – ROC IgE rVes v 1, D – ROC BAT I3)

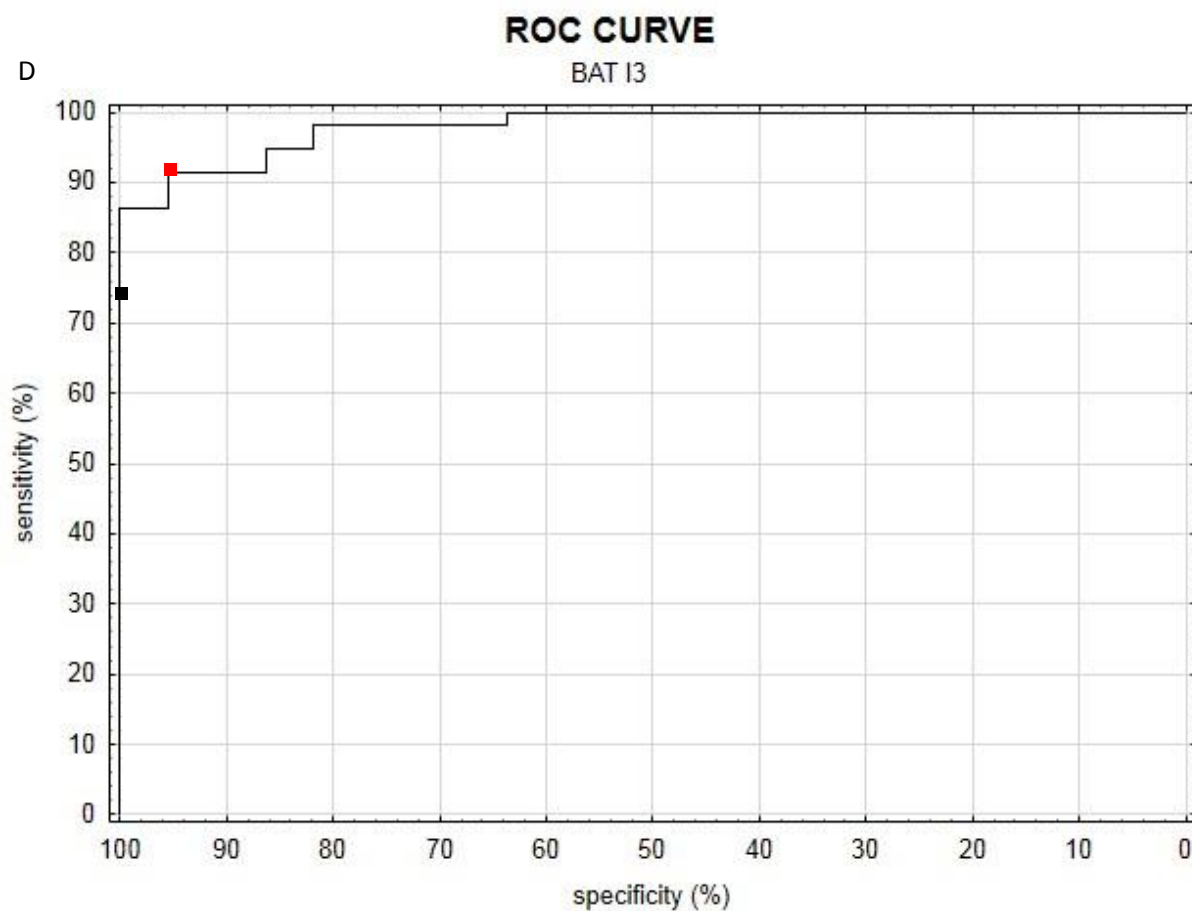


B



C





Tabulka 3.4 - Senzitivity a specificity pro jednotlivé laboratorní metody u pacientů s alergií na vosí jed

Metoda	Cut-off	Senzitivita (%)	Specificita (%)
IgE I3	standardní 0,35 kIU/l	96,67	81,82
	optimální 1,22 kIU/l	88,33	95,54
IgE rVes v 5	standardní 0,35 kIU/l	86,67	86,36
	optimální 0,70 kIU/l	86,67	95,45
IgE rVes v 1	standardní 0,35 kIU/l	68,33	90,91
	optimální 1,00 kIU/l	56,67	95,45
BAT I3	standardní 15,0%	72,88	100,00
	optimální 4,5%	91,53	95,45

I u pacientů s alergií na vosí jed byla provedena "OR" analýza různých kombinací uvedených laboratorních metod, nejprve při použití standardních cut-off, posléze i při využití námi zjištěných "optimálních" cut-off. Nejlepší kombinace jsou vyšetření IgE I3 + IgE rVes v 5, IgE I3 + IgE rVes v 5 + IgE rVes v 1 nebo IgE rVes v 5 + IgE rVes v 1, vše při užití optimálních hodnot cut-off (Tabulka 3.5).

Tabulka 3.5 - Analýza "OR" kombinací u pacientů s alergií na vosí jed

Metody	Cut-off	Senzitivita (%)	Specifická (%)
I3 + rVes v 1	standardní	98,33	81,82
	optimální	90,00	95,45
I3 + rVes v 5	standardní	98,33	77,27
	optimální	98,33	95,45
I3 + rVes v 5 + rVes v 1	standardní	100,00	77,27
	optimální	98,33	95,45
rVes v 5 + rVes v 1	standardní	100,00	81,82
	optimální	98,33	95,45
I3 + BAT I3	standardní	98,33	81,82
	optimální	98,31	90,91
I3 + rVes v 5 + rVes v 1 + BAT I3	standardní	100,00	77,27
	optimální	100,00	90,91
rVes v 5 + rVes v 1 + BAT I3	standardní	100,00	81,82
	optimální	100,00	90,91

Hodnocení a diskuze

Cílem naší studie bylo zhodnotit přínos dostupných laboratorních metod k potvrzení alergie na hmyzí jed a identifikovat tak optimální test nebo kombinaci testů vhodných k potvrzení HVA. Ve srovnání s většinou doposud publikovaných prací jsme kromě hodnocení senzitivit a specifit pro jednotlivé metody (při využití standardně užívaných hodnot cut-off), provedli také ROC analýzu s cílem nalézt optimální hodnoty cut-off pro jednotlivé testy.

ROC analýzy pátrající po optimálních hodnotách cut-off byly v nedávné době publikovány pouze pro BAT. Optimální cut-off se dle těchto prací pohybuje v rozmezí od 15% do 25% [18, 34, 59]. Dle našich dat je optimální hodnota cut-off nižší. Při užití cut-off 15% jsme nezachytili 6% pacientů s alergií na včelí a dokonce 19% pacientů s alergií na vosí jed. Příčinou rozdílných výsledků předchozích studií může být fakt, že protokol k provedení testu aktivace bazofilů není standardizován a jeho provedení se mezi pracovišti liší [16].

Detailní ROC analýzy pro specifické IgE nebyly doposud publikovány. Hodnota 0,35 kIU/l je standardní hodnotou cut-off užívanou pro IgE k extraktům hmyzích jedů i k dostupným molekulám hmyzích jedů. Naše analýza potvrdila recentně publikovaná data týkající se senzitivity specifických IgE pro standardní hodnoty cut-off. Navíc prokázala, že hodnoty cut-off mohou být "optimalizovány". Při použití těchto tzv. optimálních cut-off jsme dosáhli stejné nebo podobné senzitivity a signifikantně vyšší specificity ve srovnání s užitím standardních cut-off. Vhodnější cut-off jsme našli pro IgE k extraktům včelího a vosího jedu a pro IgE k alergenovým složkám vosího jedu. Všechny tyto "optimální" hodnoty cut-off jsou vyšší než hodnoty standardně užívané. Původně jsme předpokládali, že zvýšení cut-off bude spojeno s poklesem senzitivity a nárůstem specifity. Nicméně jsme zjistili, že senzitivita zůstala buď nezměněna nebo je jen nesignifikantně nižší, ale specifita významně narostla pro většinu IgE testů. To znamená, že užití optimálních cut-off významně redukuje počet falešně pozitivních výsledků. Např. užití optimální hodnoty cut-off pro IgE I1 redukuje počet falešně pozitivních výsledků o 18% a užití optimální hodnoty cut-off pro IgE rVes v 5 o 9%.

Statistická analýza kombinací laboratorních metod přinesla také zajímavá data. Jako optimální vyšetření pro potvrzení alergie na včelí jed určila kombinaci IgE I1 + IgE rApi m 1 při užití optimálních cut-off pro obě metody. Nicméně senzitivita samotného IgE I1 při použití optimálního cut-off je stejná a specifita je dokonce o 5% vyšší. Tato data bohužel svědčí o limitovaném přínosu stanovení IgE rApi m 1. Rozšíření spektra dostupných včelích alergenů se tudíž jeví pro zlepšení diagnostiky alergie na včelí jed vysoce žádoucí. Optimální kombinací pro potvrzení alergie na vosí jed je IgE I3 + IgE rVes v 5, případně IgE I3 + IgE rVes v 5 + IgE rVes v 1 nebo IgE rVes v 5 + IgE rVes v 1, při použití optimálních cut-off pro všechny metody [66].

Naše analýza nepochybně nabízí jiný pohled na laboratorní diagnostiku alergie na hmyzí jed a nabízí možnou cestu, jak optimalizovat diagnostiku HVA. Nicméně naše závěry nelze doporučit v tuto chvíli k běžnému užití v klinické praxi, neboť rozhodně musí být potvrzeny dalšími studii.

3.2.2 Cílený pohled na molekulární diagnostiku s využitím všech dostupných alergenových molekul včelího jedu

Přínos stanovení IgE protilátek k rApi m 1 pro diagnostiku HVA je limitován, což potvrdila i naše výše uvedená studie. Vzhledem k tomu, že v letech 2016 - 17 došlo k podstatnému rozšíření spektra dostupných alergenových molekul včelího jedu a rozšířila se i možnost jejich stanovení nejenom pomocí doposud běžně užívaného systému ImmunoCAP, ale i systémem Immulite, byla předchozí studie doplněna o cílený pohled na molekulární diagnostiku alergie na včelí jed.

Metodika

Skupina pacientů s alergií na včelí jed byla rozšířena na 50 pacientů, podobně byla rozšířena i kontrolní skupina, která nyní čítala 41 pacientů. Vstupním kritériem pro zařazení do skupiny pacientů s alergií na včelí jed byla opět indikace k zahájení imunoterapie včelím jedom, která byla založena na anamnéze SR po bodnutí včelou společně s potvrzenou senzibilizací k včelímu jedu kožním testem a/nebo specifickým IgE k extraktu včelího jedu. Do kontrolní skupiny byli zařazeni pacienti bez klinické reakce po bodnutí hmyzem v anamnéze. Všem pacientům bylo stanoveno specifické IgE k dostupným molekulám včelího jedu systémem ImmunoCAP a systémem Immulite. Systémem ImmunoCAP bylo stanoveno IgE k rApi m 1, 2, 3, 5 a 10. Systémem Immulite bylo vyšetřeno IgE k rApi m 1 a 2 (stanovení více molekul není tímto systémem k dispozici). Nejprve byla spočítána senzitivita a specifita pro jednotlivé molekuly zvlášť, následně i pro různé kombinace molekul s cílem nalézt optimální kombinaci vyšetření. K porovnání senzitivit a specifit byl použit McNemarův test. Všechny statistické testy byly prováděny na hladině významnosti 0,05.

Výsledky:

Nejvyšší senzitivitu má stanovení IgE protilátek k rApi m 1 při užití obou detekčních systémů, při užití systému ImmunoCAP dosahuje 76%, při užití systému Immulite 88%. Senzitivita stanovení IgE rApi m 1 je tedy při použití systému Immulite významně vyšší oproti stanovení systémem ImmunoCAP ($p < 0,001$), přitom specificita obou systémů je stejná. Podobný nálezn byl pozorován i pro IgE rApi m 2, opět byla zachycena signifikantně vyšší senzitivita při užití systému Immulite oproti systému ImmunoCAP, 56% resp. 41% ($p = 0,023$), s podobnou specificitou pro oba systémy, 90% resp. 95%. Pro další alergénové molekuly byla při užití systému ImmunoCAP zachycena senzitivita resp. specificita 59% resp. 98% pro IgE rApi m 10, 41% resp. 100% pro IgE rApi m 3 a 34% resp. 100% pro IgE rApi m 5 (Tabulka 3.6).

Tabulka 3.6 - Senzitivita a specificita stanovení IgE k dostupným molekulám včelího jedu při použití systému ImmunoCAP a Immulite

Molekula / Systém	Senzitivita %	Specificita %
IgE rApi m1 / ImmunoCAP	76	98
IgE rApi m2 / ImmunoCAP	41	95
IgE rApi m3 / ImmunoCAP	41	100
IgE rApi m5 / ImmunoCAP	34	100
IgE rApi m10 / ImmunoCAP	59	98
IgE rApi m1 / Immulite	88	98
IgE rApi m2 / Immulite	56	90

Kromě stanovení senzitivit a specificit pro jednotlivé molekuly byly také vyhodnoceny senzitivity a specificity pro různé kombinace molekul. Při užití celého dostupného ImmunoCAP panelu (IgE r Api m 1, 2, 3, 5 a 10) a celého Immulite panelu (IgE rApi m 1 a 2) jsme dosáhli senzitivity resp. specificity 94% resp. 92% pro ImmunoCAP a 96% resp. 90% pro Immulite. (Tabulka 3.7). Rozdíl v senzitivitách obou panelů nebyl statisticky významný.

Tabulka 3.7 Senzitivita a specificita stanovení IgE k různým kombinacím dostupných molekul včelího jedu při použití systému ImmunoCAP a Immulite

Kombinace/systém	Senzitivita %	Specificita %
IgE rApi m 1 + 2 / ImmunoCAP	88	95
IgE rApi m 1 + 2 + 3 / ImmunoCAP	90	95
IgE rApi m 1 + 2 + 3 + 5 / ImmunoCAP	90	95
IgE rApi m 1 + 2 + 3 + 5 + 10 / ImmunoCAP	94	92
IgE rApi m 1 + 2 / Immulite	96	90

Hodnocení a diskuze

Naše studie potvrdila stále dominantní postavení hlavního včelího alergenu Api m 1 pro diagnostiku HVA. Vyšetření IgE protilátek k rApi m 1 má nejvyšší senzitivitu ze všech dostupných molekul a to při použití obou systémů. V souladu s publikovanými pracemi jsme i my potvrdili vyšší senzitivitu tohoto stanovení při užití systému Immulite ve srovnání se systémem ImmunoCAP [52, 53].

Navíc jsme potvrdili, že použití širšího spektra včelích molekul významně zvyšuje senzitivitu molekulární diagnostiky oproti samotnému vyšetření IgE rApi m 1, opět při využití obou dostupných systémů. Výsledná senzitivita obou systémů je srovnatelná a zachytí až 94% resp. 96% pacientů s alergií na včelí jed. Na druhou stranu až 6% pacientů nebylo při využití všech dostupných molekul stále zachyceno.

3.3 Léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu pomocí VIT

3.3.1 Metodika

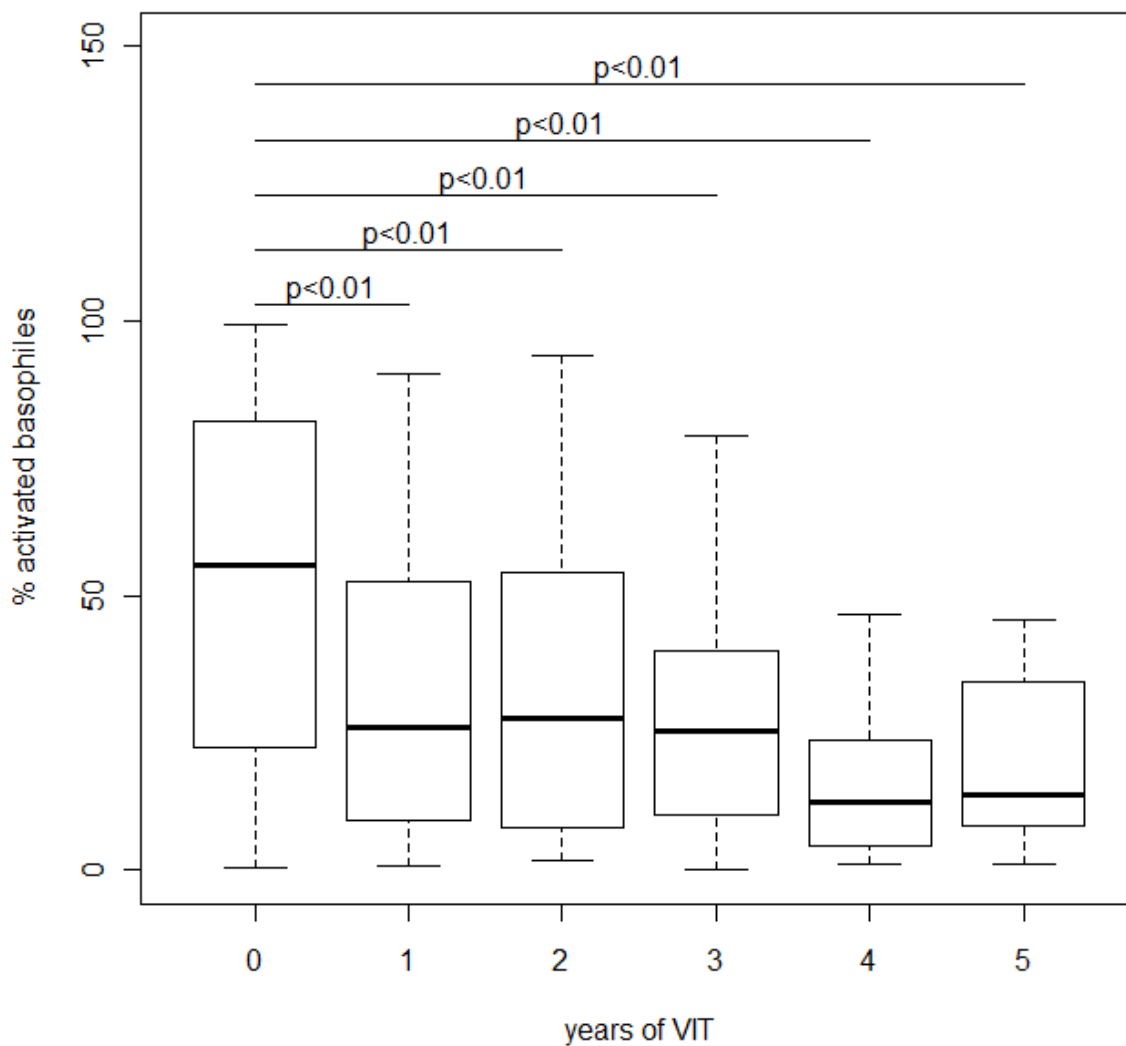
Do studie bylo zařazeno celkem 117 pacientů s alergií na včelí (58 pacientů) a vosí (59 pacientů) jed léčených VIT. Před zahájením imunoterapie a po dokončení každého roku léčby (1. – 5.) bylo všem pacientům provedeno laboratorní vyšetření. Všem byl proveden test aktivace bazofilů (BAT) s extraktem včelího resp. vosího jedu o koncentraci 0,1 µg/ml. Kromě tohoto vyšetření byly pacientům stanoveny specifické IgE a IgG4 protilátky k extraktům a k dostupným alergenovým molekulám příslušného jedu. Pacientům s alergií na včelí jed bylo stanoveno IgE a IgG4 k I1 a k rApi m 1, pacientům s alergií na vosí jed bylo vyšetřeno IgE a IgG4 k I3, rVes v 5 a Ves v 1. Kromě laboratorního vyšetření byl každý pacient dotazován na charakter reakce po náhodném bodnutí hmyzem v přírodě. Změny jednotlivých parametrů v průběhu léčby byly následně statisticky zhodnoceny. Pro statistické hodnocení byl použit Wilcoxonův párový test. Změny parametrů po každém roce léčby byly hodnoceny ve vztahu k hodnotám před léčbou. Počty léčených pacientů každým rokem narůstají, proto je největší počet pacientů v prvním roce VIT a nejnižší počet v posledním roce VIT.

3.3.1 Výsledky

Výsledky u pacientů s alergií na včelí jed

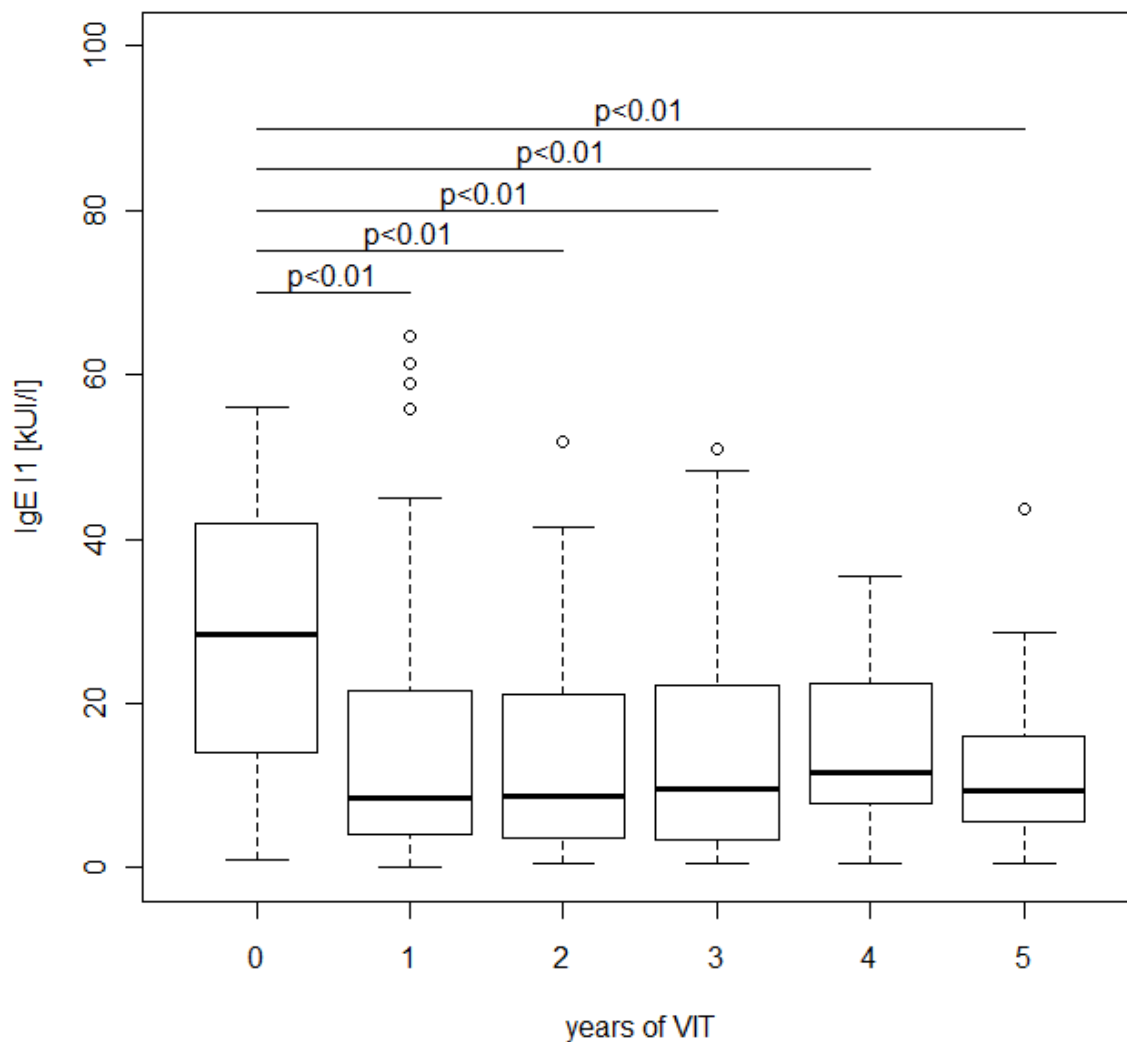
Zachytili jsme signifikantní změny v poklesu aktivace bazofilů, v poklesu IgE a ve vzestupu IgG4 protilátek k I1 v průběhu VIT. Změny v poklesu hladin IgE protilátek k rApi m 1 překvapivě statisticky významné nebyly, nicméně nárůst IgG4 protilátek k rApi m 1 po 1. - 4. roce VIT zaznamenán byl (Grafy 3.17 – 3.21).

Graf 3.17 - Změny v testu aktivace bazofilů u pacientů s alergií na včelí jed v průběhu léčby VIT



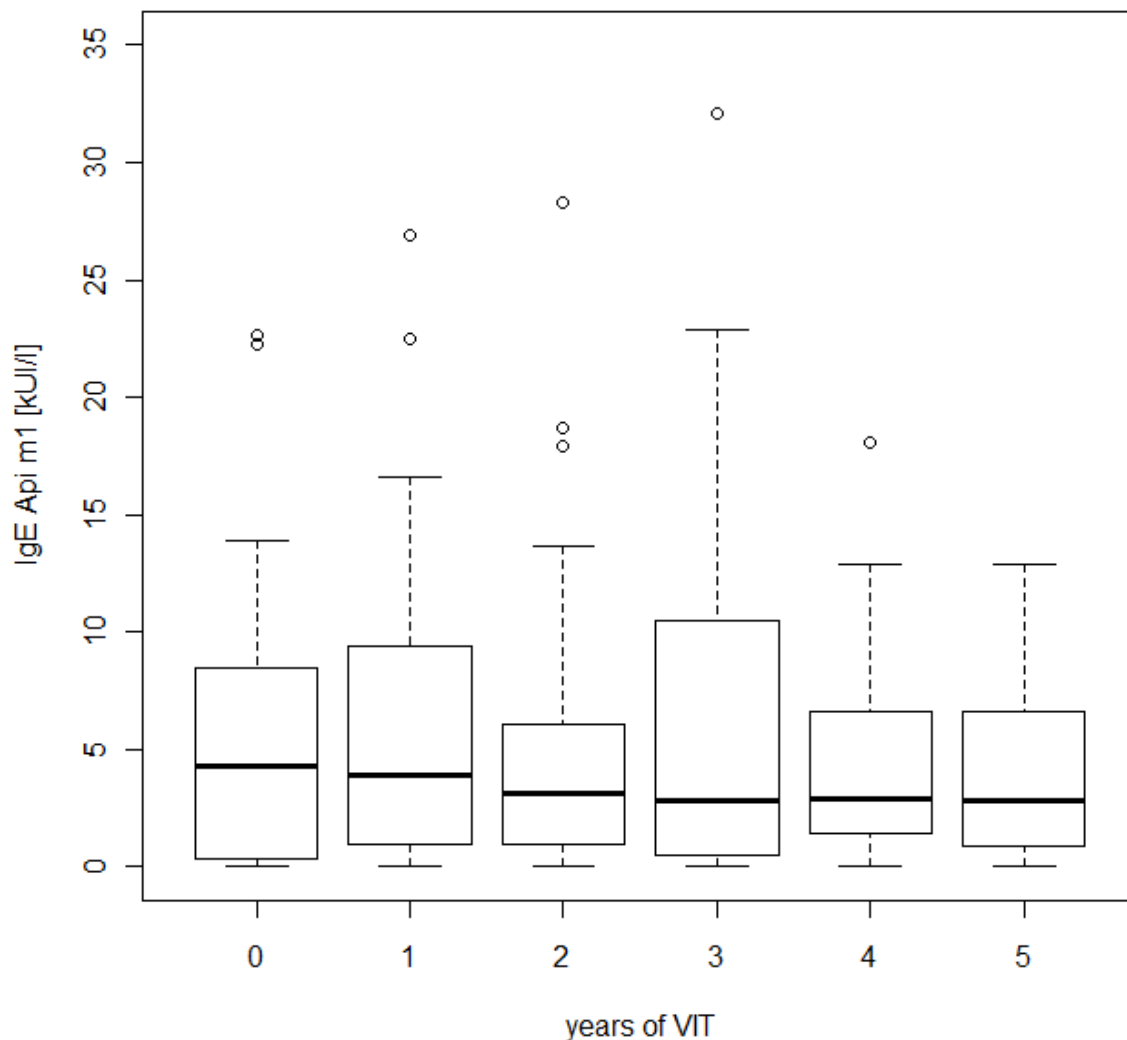
Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	56	48	39	30	20	14
Median	55,48	26,05	27,79	25,23	12,41	13,84
1st Qu.	24,93	9,30	7,88	10,29	4,62	8,29
3rd Qu.	81,25	52,19	54,16	39,13	21,36	32,05

Graf 3.18 - Změny hladin IgE II v průběhu VIT



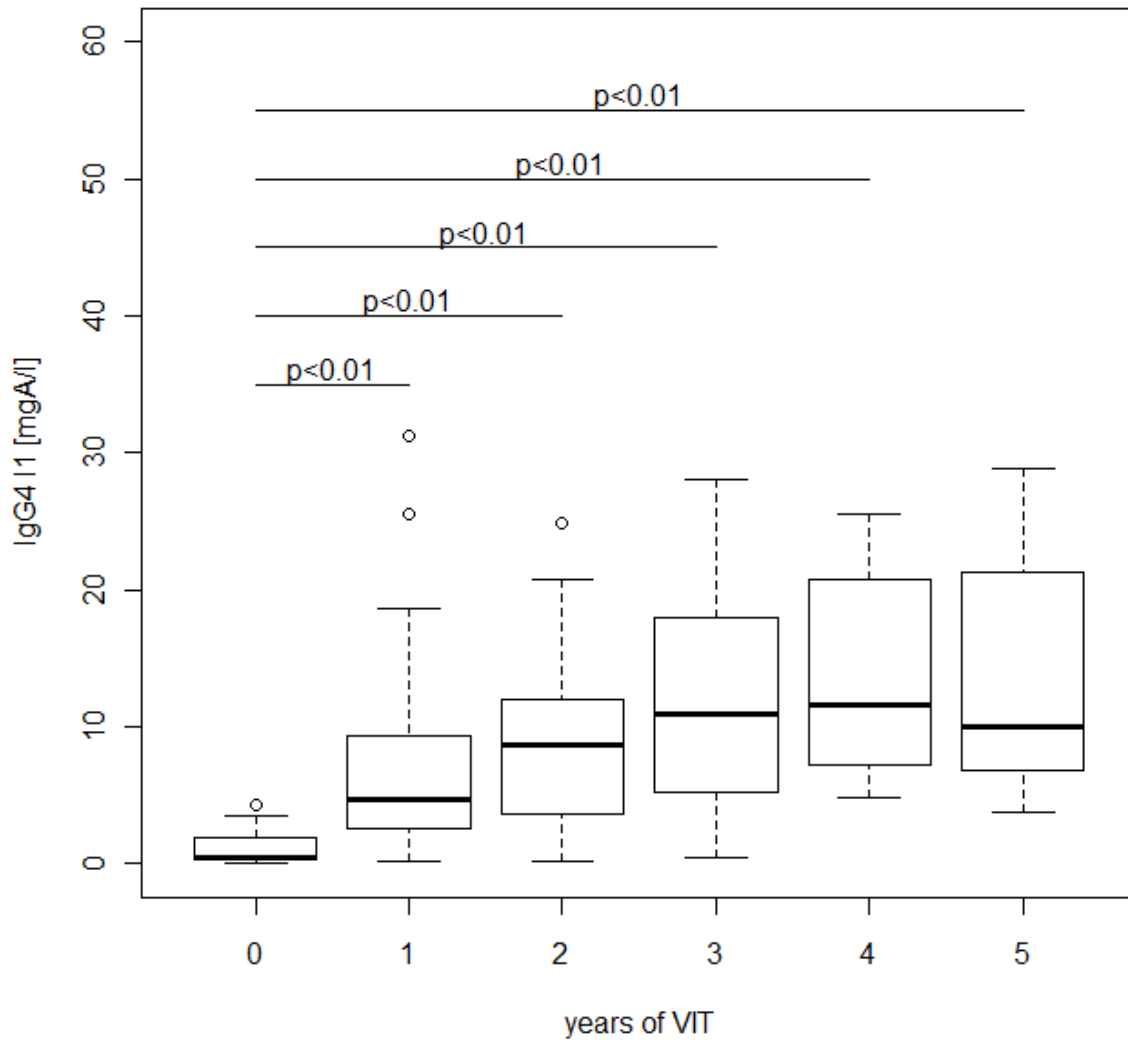
Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	58	48	38	30	15	14
Median	29,00	8,60	8,71	9,51	11,50	9,34
1st Qu.	15,90	4,42	3,59	3,52	7,83	5,67
3rd Qu.	41,00	20,95	21,05	22,15	22,45	16,05

Graf 3.19 - Změny hladin IgE rApi m 1 v průběhu VIT



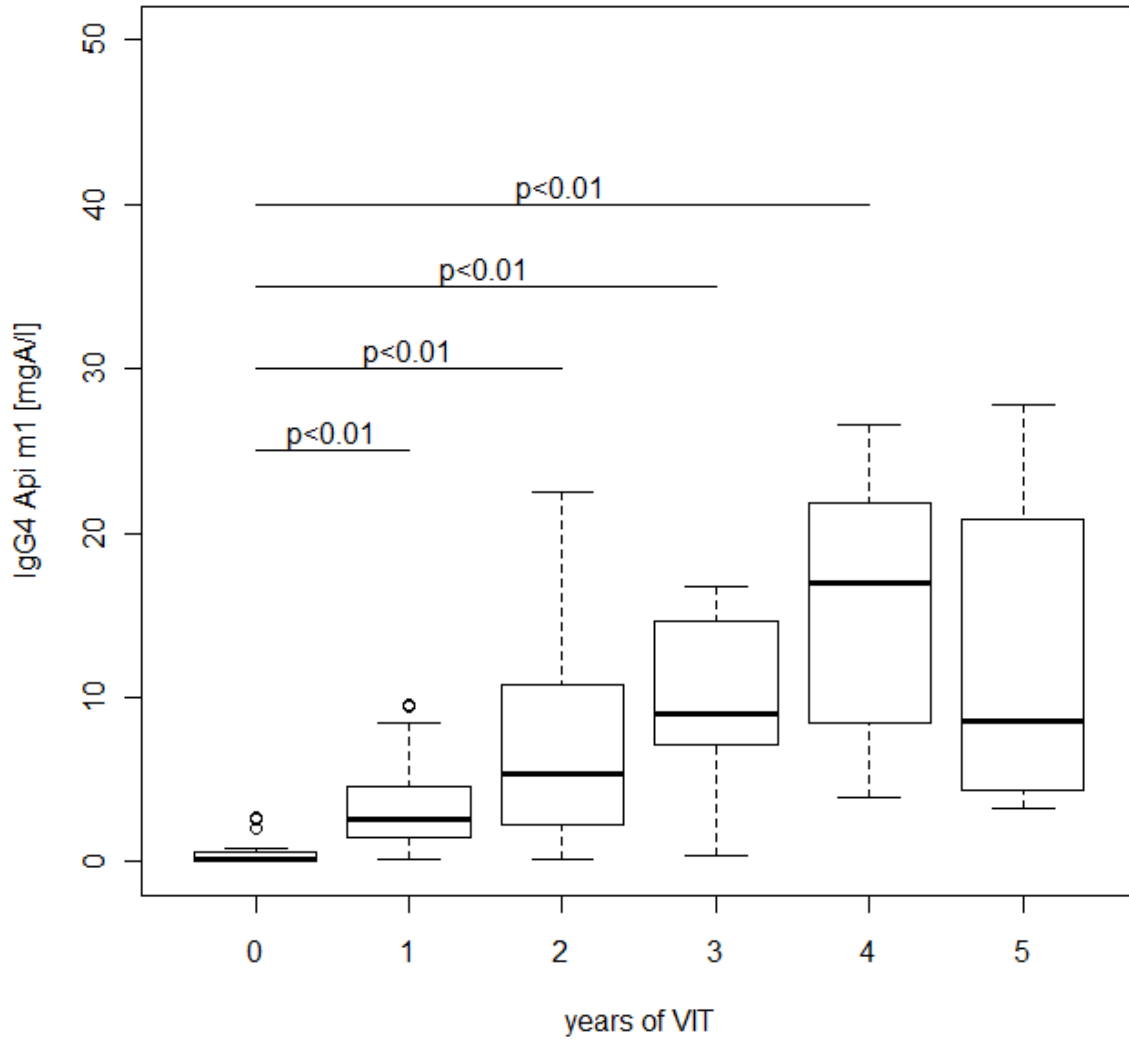
Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	43	42	29	22	20	14
Median	4,33	3,88	3,13	2,83	2,92	2,82
1st Qu.	0,36	1,01	0,97	0,61	1,51	1,08
3rd Qu.	8,49	9,39	6,09	10,47	6,12	6,47

Graf 3.20 - Změny hladin IgG4 I1 v průběhu VIT



Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	43	42	22	20	19	13
Median	0,52	4,68	8,66	10,90	11,60	9,97
1st Qu.	0,30	2,62	3,95	5,62	7,27	7,21
3rd Qu.	1,87	9,30	11,95	17,67	20,70	21,30

Graf 3.21 - Změny hladin IgG4 rApi m 1

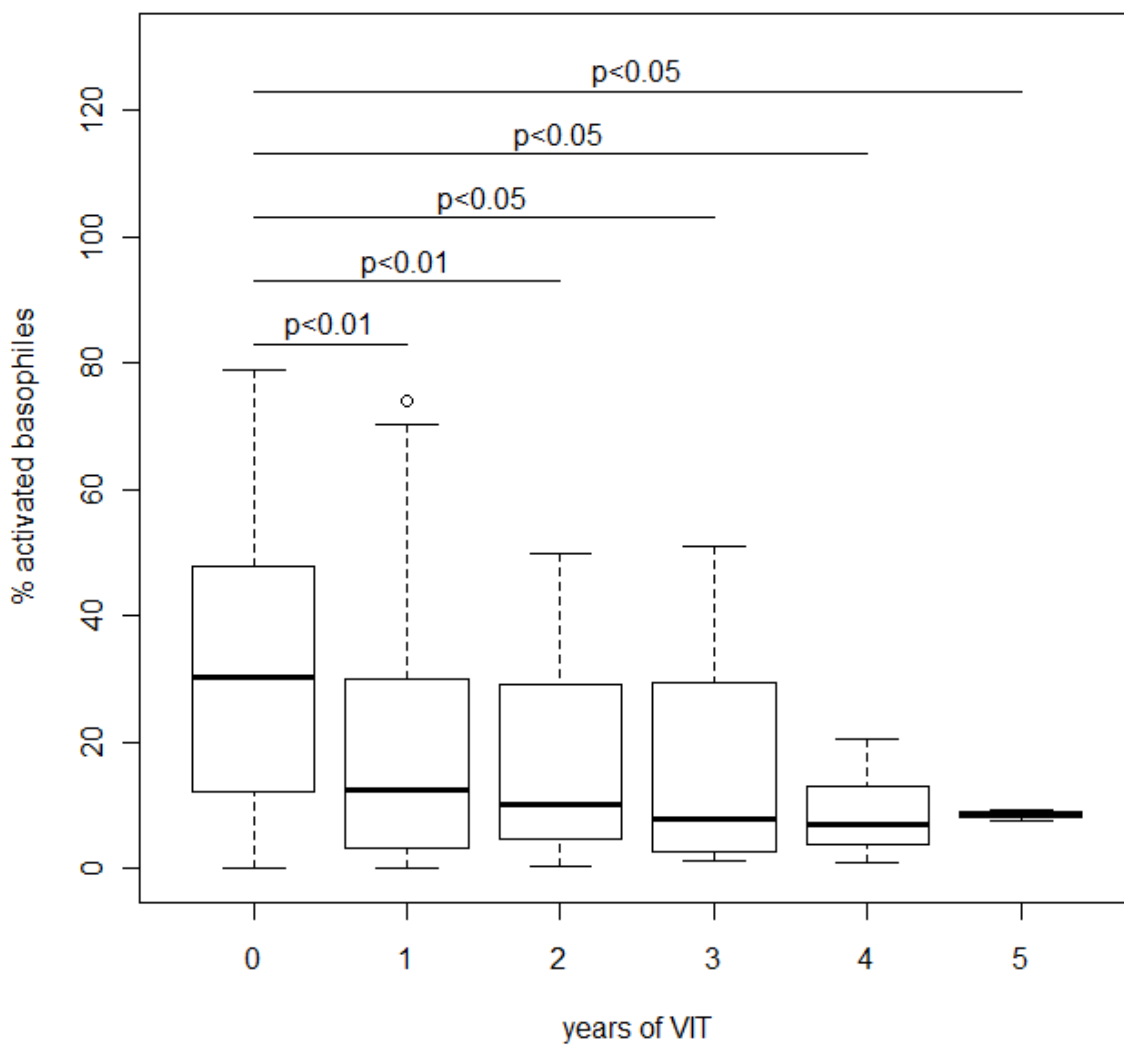


Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	25	15	15	14	13	11
Median	0,16	2,65	5,41	9,03	17,00	8,51
1st Qu.	0,03	1,47	2,22	7,15	8,45	4,54
3rd Qu.	0,59	4,60	10,80	14,60	21,80	20,17

Výsledky u pacientů s alergií na vosí jed

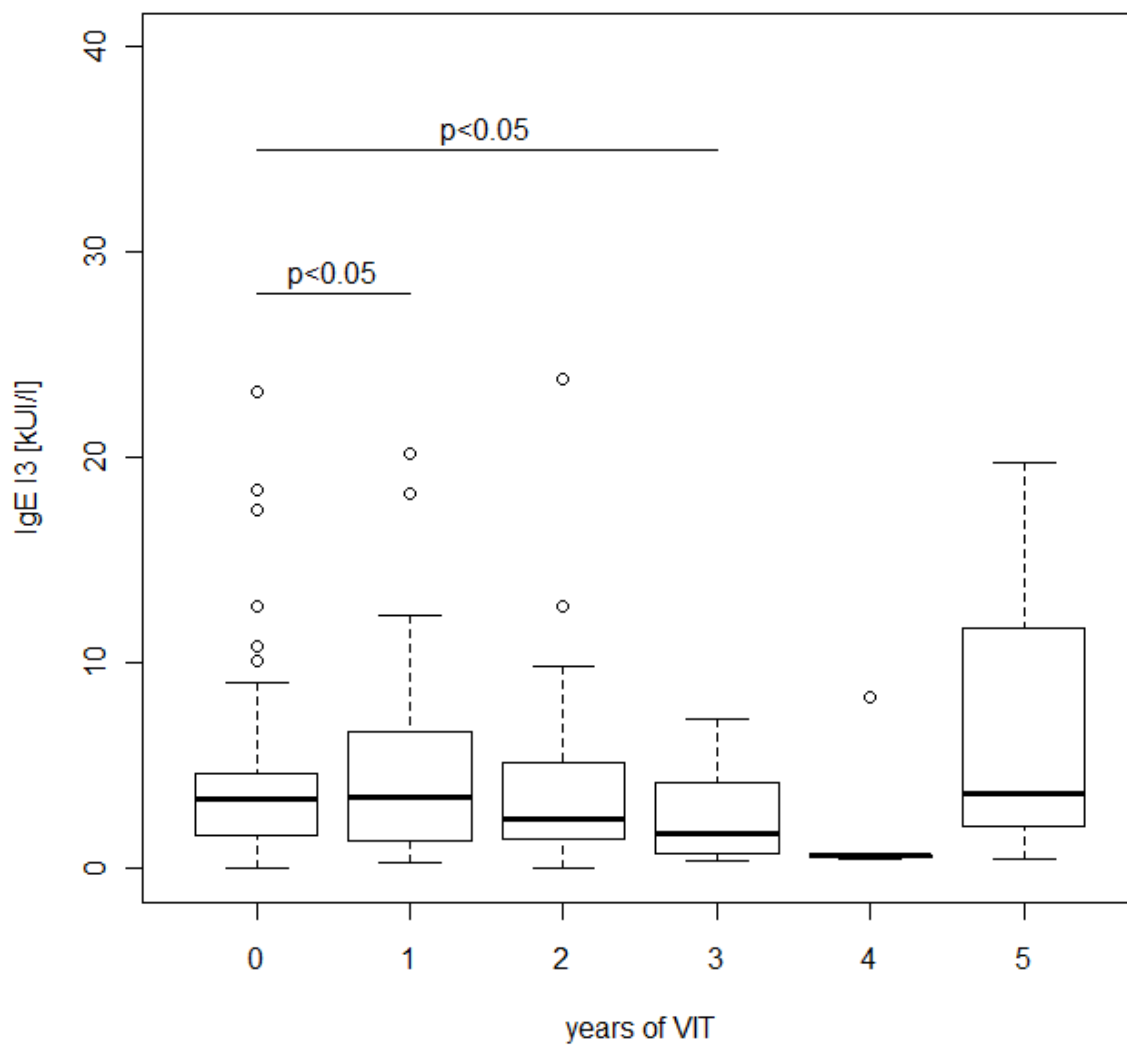
U pacientů s alergií na vosí jed byly zaznamenány statisticky významné změny ve všech sledovaných parametrech v průběhu VIT, byť u některých jen po část sledovaného období. Statisticky významné změny byly nejvíce vyjádřeny při poklesu aktivace bazofilů a při nárůstu IgG4 protilátek k I3, rVes v 1 a rVes v 5. Naproti tomu méně významných změn bylo zaznamenáno při sledování hladin IgE protilátek. Pokles hladin IgE I3 byl statisticky významný pouze po 1. a 3. roce léčby a byl tedy méně vyjádřený než pokles IgE I1 u pacientů s alergií na včelí jed. Naproti tomu pokles hladin IgE rVes v 1 a rVes v 5 byl zaznamenán po 2., 3. a 4. roce VIT a byl tedy více vyjádřený ve srovnání s IgE rApi m 1 u pacientů s alergií na včelí jed (Grafy 3.22 – 3.28).

Graf 3.22 - Změny v testu aktivace bazofilů u pacientů s alergií na vosí jed v průběhu léčby VIT



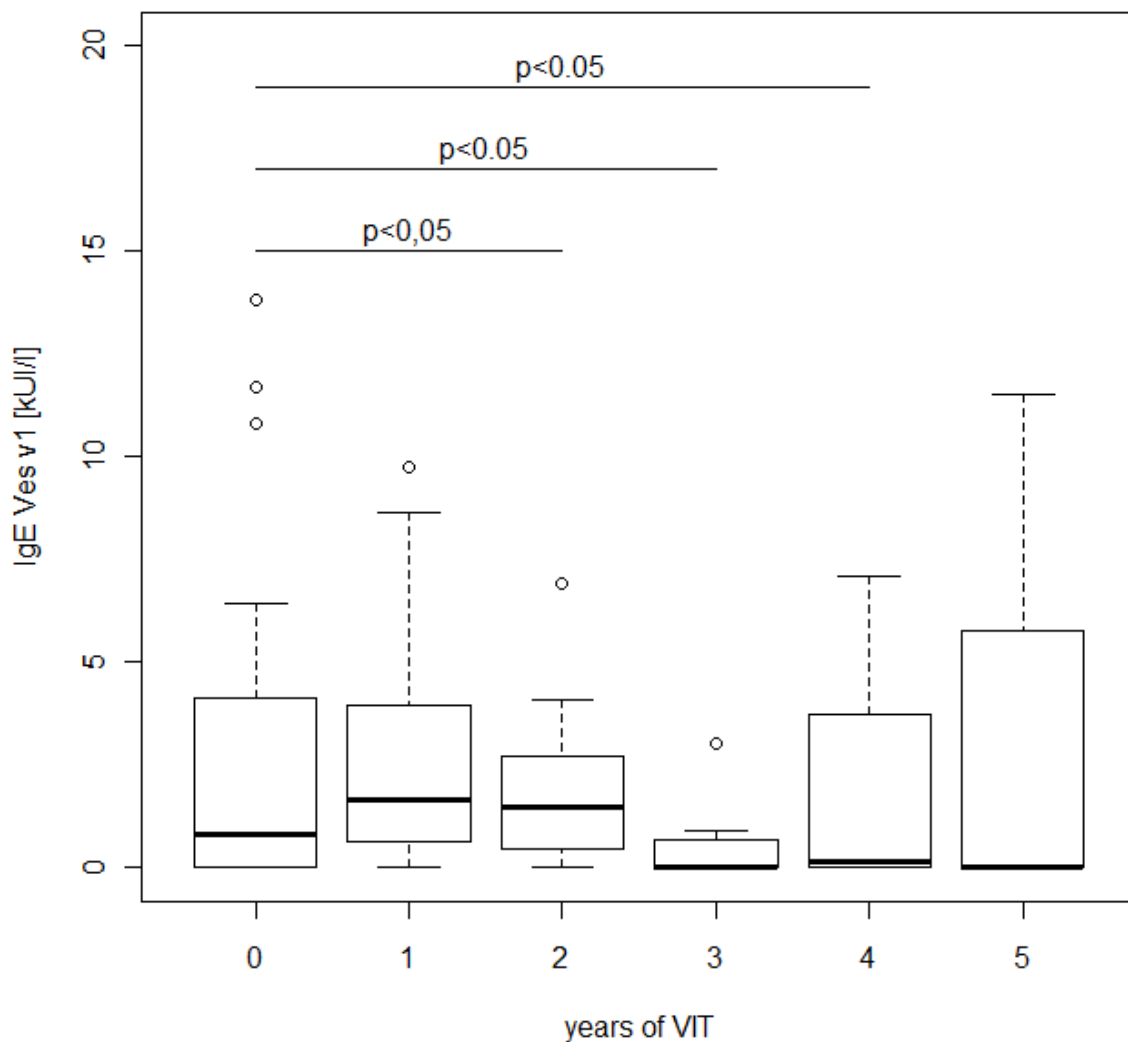
Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	56	43	23	9	5	3
Median	30,45	12,44	10,20	7,79	7,15	8,74
1st Qu.	12,53	3,25	4,82	2,76	4,00	8,11
3rd Qu.	47,62	30,15	29,16	29,45	12,95	9,02

Graf 3.23 Změny hladin IgE I3 v průběhu VIT



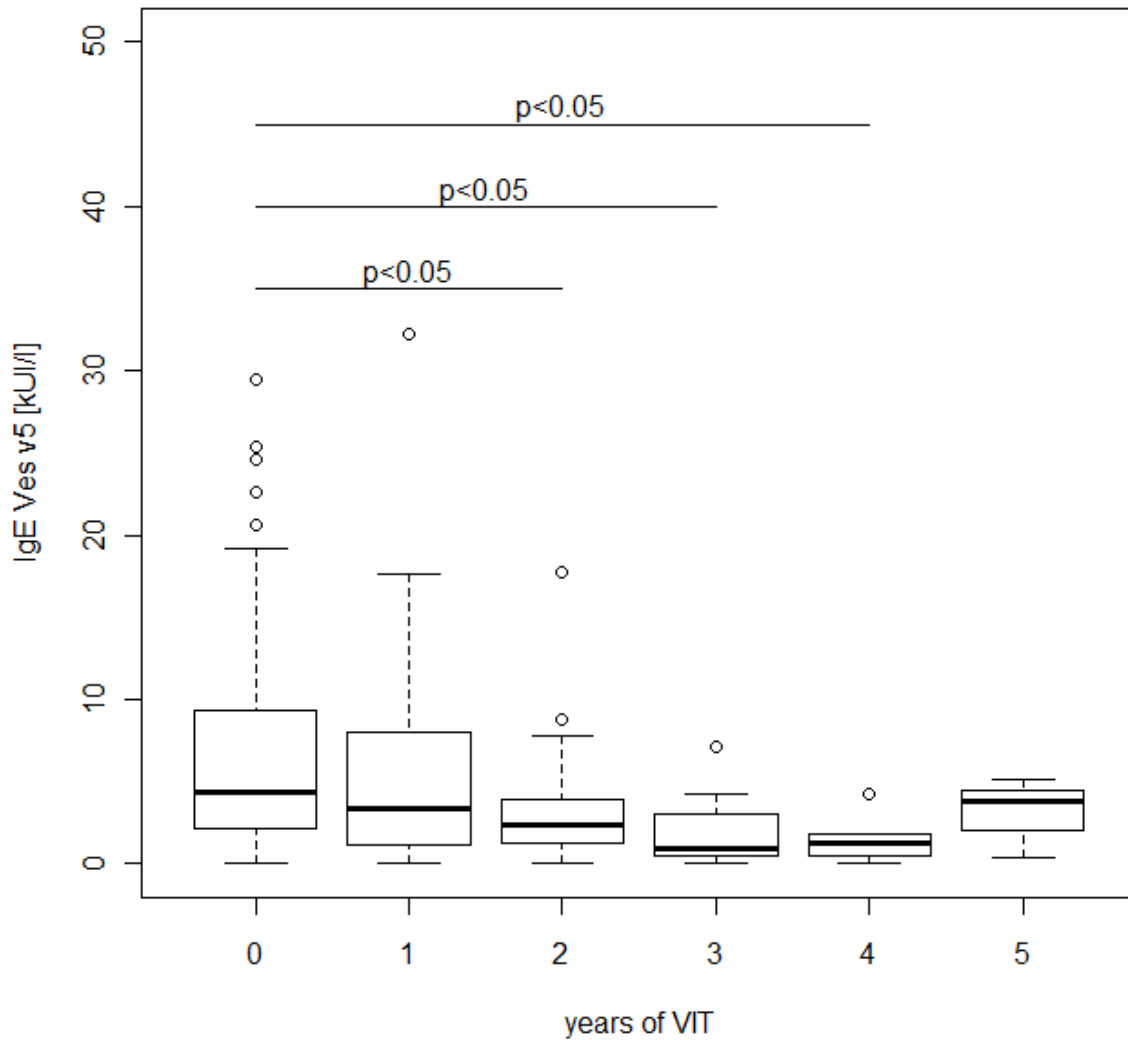
Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	58	46	24	10	5	3
Median	3,41	3,46	2,47	1,74	0,68	3,71
1st Qu.	1,62	1,39	1,47	0,77	0,57	2,09
3rd Qu.	4,60	6,68	5,15	3,73	0,69	11,75

Graf 3.24 - Změny hladin IgE rVes v 1 v průběhu VIT



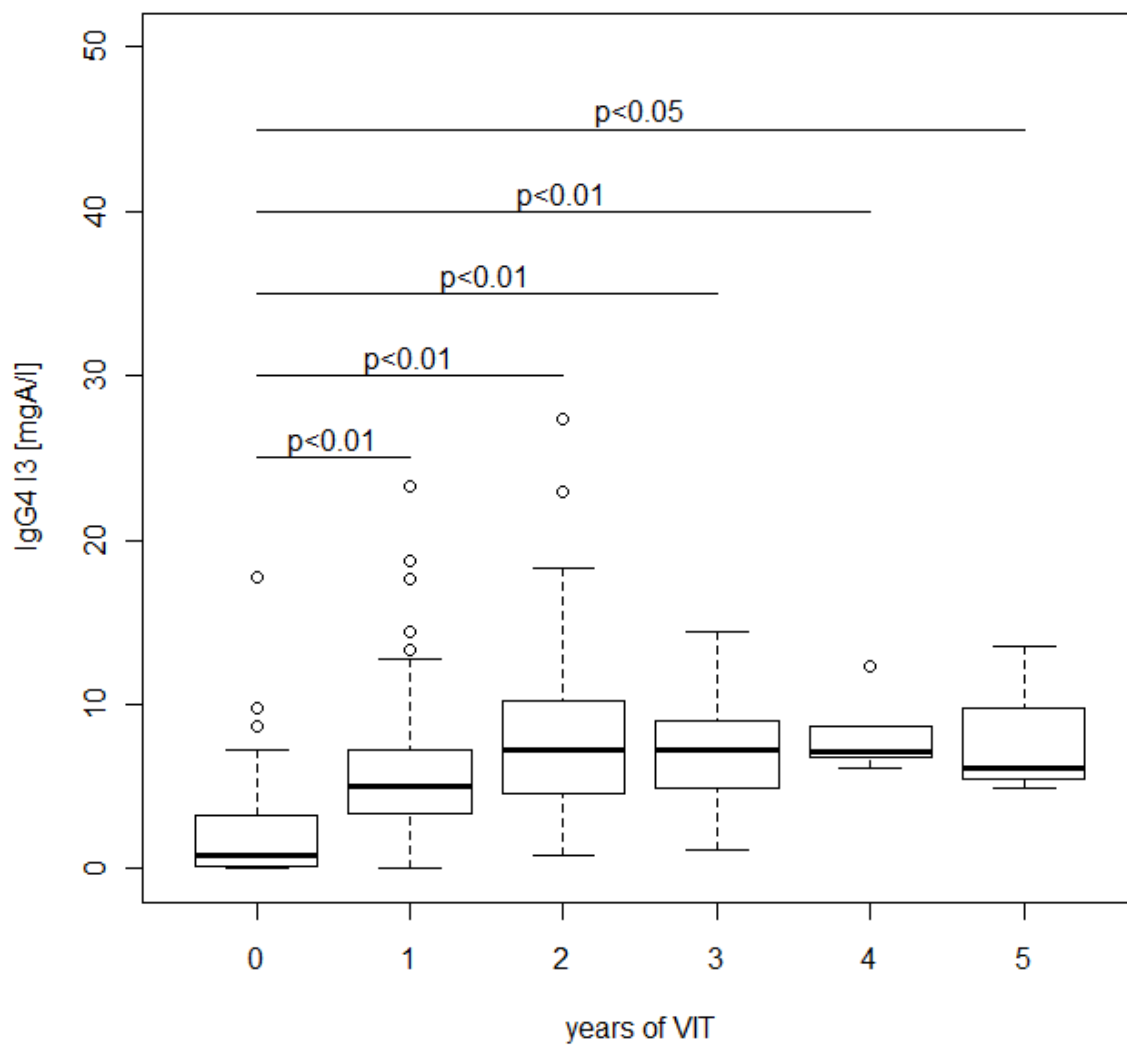
Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	47	34	19	7	4	3
Median	0,82	1,64	1,48	0,01	0,17	0,01
1st Qu.	0,01	0,65	0,46	0,01	0,00	0,01
3rd Qu.	3,89	3,89	2,60	0,66	2,04	5,75

Graf 3.25 - Změny hladin IgE rVes v 5 v průběhu VIT



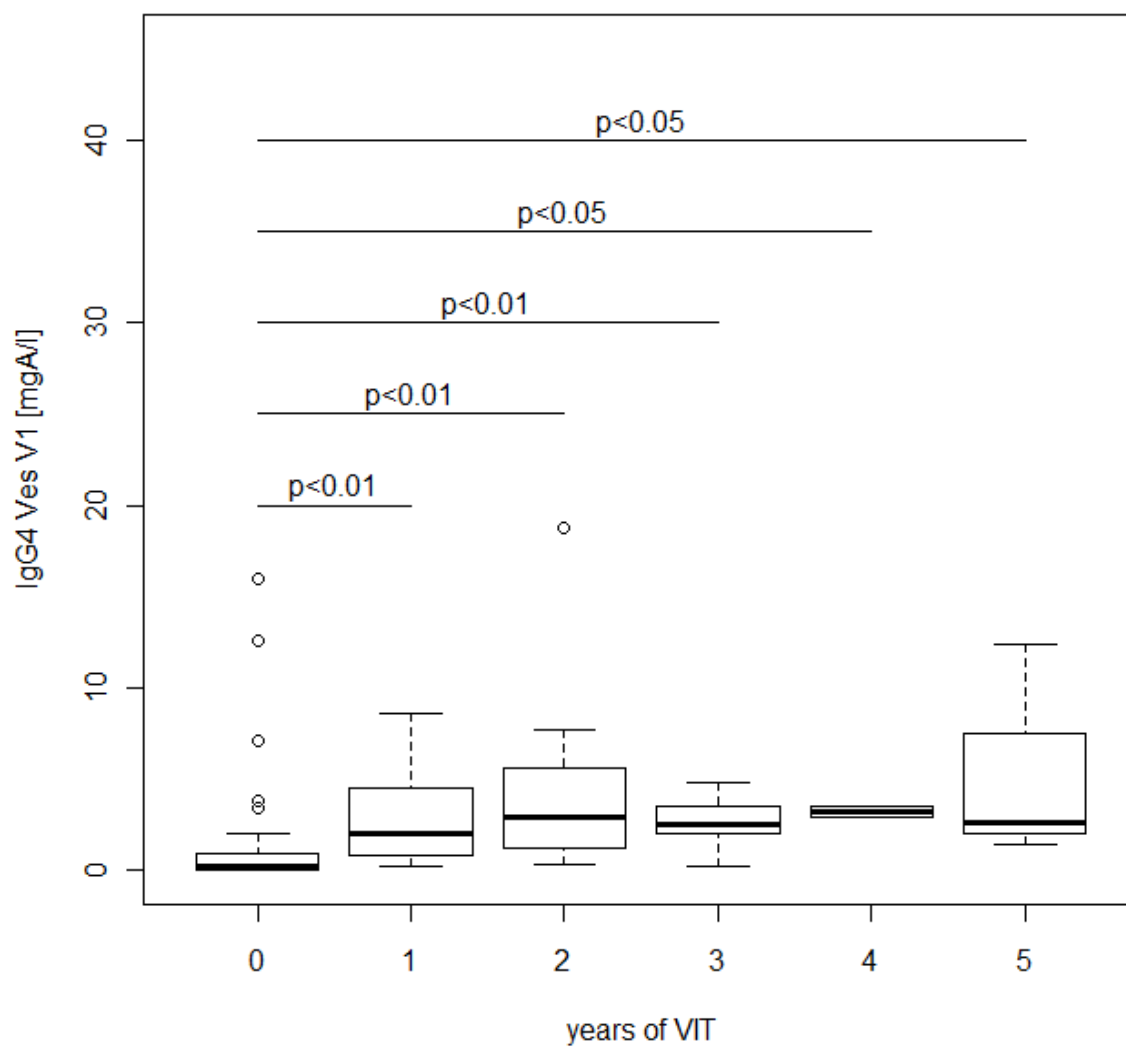
Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	47	41	21	9	5	3
Median	4,34	3,40	2,36	0,96	1,28	3,77
1st Qu.	2,19	1,20	1,23	0,55	0,53	2,07
3rd Qu.	9,32	7,43	3,95	3,02	1,85	4,43

Graf 3.26 - Změny hladin IgG4 I3 v průběhu VIT



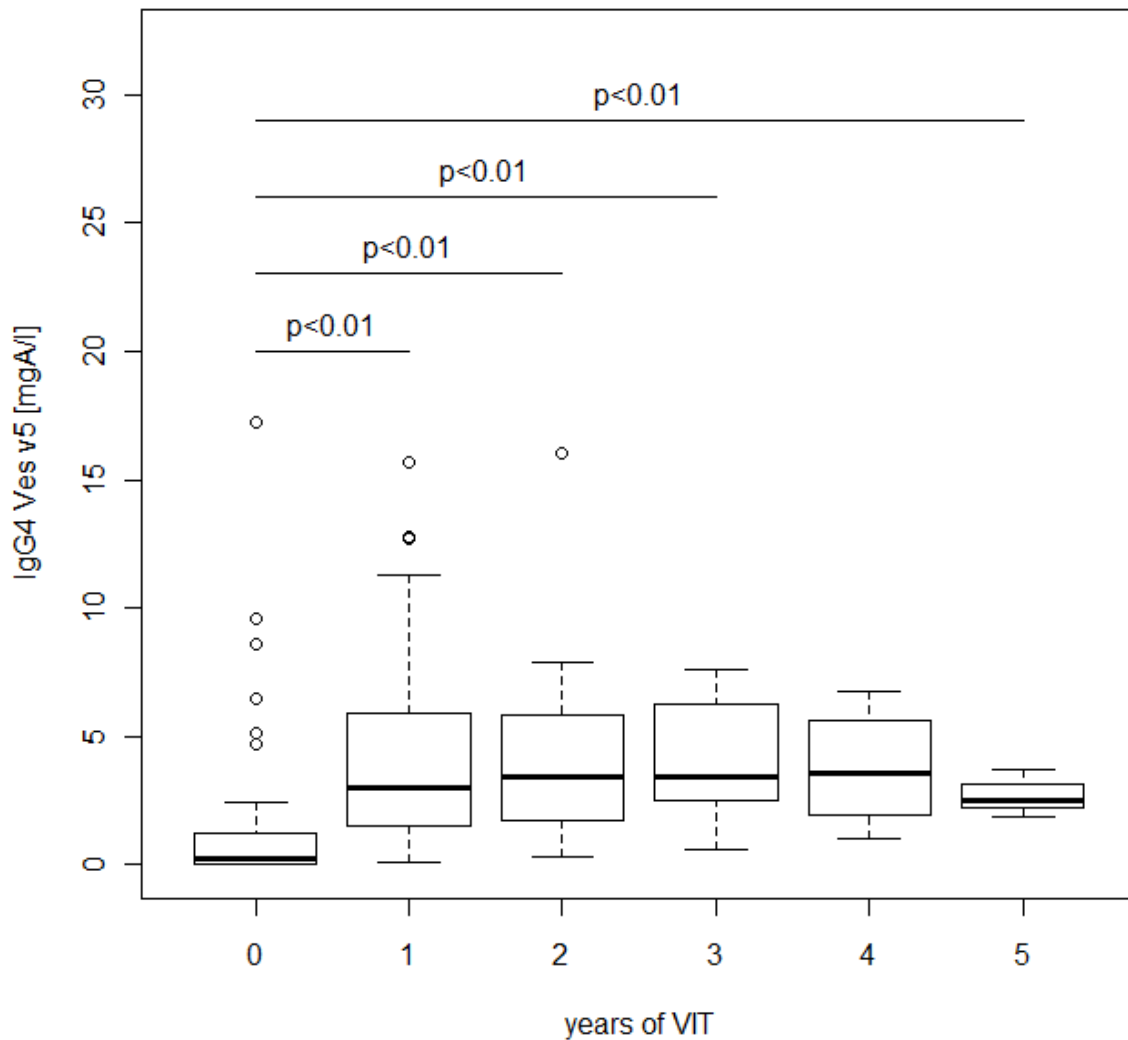
Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	47	41	21	9	5	3
Median	0,83	5,05	7,27	7,25	7,18	6,09
1st Qu.	0,21	3,50	4,58	4,92	6,85	5,48
3rd Qu.	3,04	7,16	10,20	8,99	8,73	9,75

Graf 3.27 Změny hladin IgG4 rVes v 1 v průběhu VIT



Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	47	34	19	7	4	3
Median	0,20	2,07	2,90	2,56	3,25	2,66
1st Qu.	0,05	0,87	1,24	1,99	3,01	2,04
3rd Qu.	0,94	4,52	5,62	3,53	3,48	7,53

Graf 3.28 - Změny hladin IgG4 rVes v 5 v průběhu VIT



Year of VIT	0	1	2	3	4	5
No. of patients	47	34	19	7	4	3
Median	0,24	2,99	3,42	3,40	3,60	2,52
1st Qu.	0,06	1,54	1,71	2,53	2,35	2,20
3rd Qu.	1,16	5,82	5,81	6,24	5,00	3,12

Hodnocení a diskuze

Bohužel v tuto chvíli stále nemáme k dispozici žádný laboratorní parametr, na základě kterého bychom mohli posoudit, zda-li již k navození tolerance k hmyzímu jedu v průběhu VIT došlo a který by nám tudíž pomohl posoudit individuální riziko relapsu SR po bodnutí hmyzem. Dle posledního doporučení EAACI tak zlatým standardem k posouzení navození tolerance k hmyzímu jedu v průběhu VIT stále zůstává expoziční test s živým hmyzem (sting challenge) [64]. Nicméně pátrání po laboratorním markeru, který by svědčil o navození vzniklé tolerance, je z mnoha důvodů vysoce žádoucí. Jedním z důvodů je fakt, že provedení expozičního testu je pro pacienta potenciálně rizikové, neboť je zatíženo rizikem SR. Dalším důvodem je i pokračující diskuze ohledně jeho věrohodnosti a v neposlední řadě i jeho nedostupnost v ČR. Naše studie hodnotící kinetiku laboratorních parametrů v průběhu VIT nabízí dlouhodobý pohled na pacienty léčené imunoterapií. Prezentované údaje shrnují počáteční data dlouhodobého sledování, která však již potvrzují některé statisticky významné změny ve sledovaných parametrech. Zatímco většina změn byla vzhledem k podstatě mechanismu VIT očekávaná, některé výsledky očekávané nebyly a vedly nás k zamyšlení se nad jejich příčinou. Jedním z takových výsledků je statisticky nevýznamný pokles hladin IgE k rApl m 1 v průběhu VIT, což nás vede k zamyšlení se nad tím, je-li tato složka včelího jedu v dostatečném množství obsažena v terapeutickém extraktu užívaném k léčbě. Tento jev však také může odrážet širší senzibilizační profil pacientů s alergií na hmyzí jed a skutečnost, že ne všichni pacienti s alergií na jed včely jsou senzibilizováni k Apl m 1 [33]. Podobným výsledkem je i nesignifikantní pokles hladin IgE I3, což může být pravděpodobně dáno tím, že v průběhu léčby začal výrobce dodávat jiný alergenový extrakt, který nově obohatil o hlavní složku vosího jedu, čímž se výrazně zvýšila jeho senzitivita [68]. Tyto závěry jsou však zatím pouze předběžné a jsou předmětem našeho dalšího zkoumání. Abychom mohli námi nashromážděná data hodnotit z pohledu klinické relevance, je třeba je korelovat s klinickou reaktivitou pacienta po bodnutí hmyzem. Toto se nám však zatím nepodařilo splnit, jelikož jsme odkázáni pouze na údaje pacienta o reakcích po bodnutí hmyzem v přírodě, kterých bylo v našem souboru zatím málo. Nicméně doufáme, že se nám to podaří v průběhu dalších let, neboť ve sledování našich pacientů stále pokračujeme.

4 Závěr

Podářilo se nám poskytnout komplexní pohled na pacienty se závažnou diagnózou alergie na včelí a vosí jed. Identifikovali jsme významné prediktory těžkých systémových reakcí po bodnutí, kterými jsou vyšší věk, bodnutí do oblasti hlavy a mužské pohlaví. Riziko těžké reakce roste při zvýšení věku o 1 rok zhruba 1,07krát, tedy o 7 %. Při bodnutí do oblasti hlavy je 2,78krát vyšší šance těžké reakce než při bodnutí do jiných částí těla. A konečně muži mají 2,25krát větší šanci těžké reakce v porovnání se ženami. Dále jsme potvrdili přínos všech dostupných laboratorních metod k potvrzení alergie na včelí a vosí jed včetně molekulární diagnostiky s využitím dostupných molekul včelího i vosího jedu. Na základě našich výsledků můžeme s jistotou říci, že máme k dispozici paletu testů s dobrou senzitivitou i specificitou a že při jejich správném použití bychom naprostou většinu pacientů s alergií na včelí a vosí jed měli odhalit. Naše práce nabídla i možnou cestu, jak diagnostiku HVA zlepšit, a to prostřednictvím “optimalizace” hodnot užívaných jako hranice positivity (cut-off) pro jednotlivé metody. Při sledování pacientů v průběhu léčby VIT jsme zaznamenali statisticky významné změny v hladinách mnoha laboratorních imunologických parametrů. Z důvodu malého počtu bodnutí se nám však zatím bohužel nepodařilo objasnit klinickou relevanci těchto změn. Nicméně doufáme, že se nám to v průběhu dalších let podaří, neboť v monitoraci imunologických parametrů i klinických údajů o charakteru reakce po bodnutí nadále pokračujeme.

5 Seznam použité literatury

1. Akin C. Mast cell activation syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Aug;140(2):349-55.
2. Arzt L, Bokanovic D, Schwarz I, Schrautzer C, Massone C, Horn M, et al. Hymenoptera stings in the head region induce impressive, but not severe sting reactions. *Allergy*. 2016 Nov;71(11):1632-4.
3. Arzt L, Bokanovic D, Schrautzer C, Schwarz I, Laipold K, Aberer W, et al. Questionable diagnostic benefit of the commercially available panel of bee venom components. *Allergy*. 2017 Sep;72(9):1419-22.
4. Balzer L, Pennino D, Blank S, Seismann H, Darsow U, Schnedler M, et al. Basophil activation test using recombinant allergens: highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. *PLoS One*. 2014 Oct 17;9(10):e108619.
5. Bilò BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN, EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005 Nov;60(11):1339-49.
6. Bilò BM, Bonifazi F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;8(4):330-7.
7. Bilò MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. *Clinical & Experimental Allergy*. 2009;39(10):1467-76.
8. Bilò MB, Cichočka-Jarosz E, Pumphrey R, Oude-Elberink JN, Lange J, Jakob T, et al. Self-medication of anaphylactic reactions due to Hymenoptera stings-an EAACI Task Force Consensus Statement. *Allergy*. 2016 Jul;71(7):931-43.
9. Blank S, Seismann H, Michel Y, McIntyre M, Cifuentes L, Braren I, et al. Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy*. 2011 Oct;66(10):1322-9.

10. Bonadonna P, Zanotti R, Muller U. Mastocytosis and insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010 Aug;10(4):347-53.
11. Bonadonna P, Bonifacio M, Lombardo C, Zanotti R. Hymenoptera Allergy and Mast Cell Activation Syndromes. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016 Jan;16(1):5,015-0582-5.
12. Bonifazi F, Jutel M, Bilo BM, Birnbaum J, Muller U, EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy*. 2005 Dec;60(12):1459-70.
13. Brockow K, Akin C. Hymenoptera-induced anaphylaxis: is it a mast cell driven hematological disorder? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2017 Oct;17(5):356-62.
14. Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Aug;114(2):371-6.
15. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):155-61.
16. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008 Jul;74(4):201-10.
17. Ebo DG, Faber M, Sabato V, Leysen J, Bridts CH, De Clerck LS. Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy. *Clin Exp Allergy*. 2013 Feb;43(2):255-61.
18. Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy*. 2004 Oct;59(10):1102-9.
19. Erzen R, Korosec P, Silar M, Music E, Kosnik M. Carbohydrate epitopes as a cause of cross-reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom. *Wien Klin Wochenschr*. 2009;121(9-10):349-52.

20. Erzen R, Kosnik M, Silar M, Korosec P. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy*. 2012 Jun;67(6):822-30.
21. Franken HH, Dubois AE, Minkema HJ, van der Heide S, de Monchy JG. Lack of reproducibility of a single negative sting challenge response in the assessment of anaphylactic risk in patients with suspected yellow jacket hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Feb;93(2):431-6.
22. Frick M, Fischer J, Helbling A, Rueff F, Wiczorek D, Ollert M, et al. Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Dec;138(6):1663-1671.
23. Goldberg A, Confino-Cohen R. Bee venom immunotherapy - how early is it effective? *Allergy*. 2010 Mar;65(3):391-5.
24. Golden DB, Kwiterovich KA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Discontinuing venom immunotherapy: extended observations. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Mar;101(3):298-305.
25. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 1):385-90.
26. Golden DBK, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Outcomes of Allergy to Insect Stings in Children, with and without Venom Immunotherapy. *N Engl J Med*. 2004 08/12; 2017/06;351(7):668-74.
27. Golden DBK, Kelly D, Hamilton RG, Craig TJ. Venom immunotherapy reduces large local reactions to insect stings. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009 June 2009;123(6):1371-5.
28. Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S, Huss-Marp J, Jakob T. Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan;127(1):265-7.

29. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015 Nov;70(11):1393-405.
30. Jakob T, Rafei-Shamsabadi D, Spillner E, Muller S. Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. *Allergo J Int*. 2017;26(3):93-105.
31. Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jan;125(1):184-90.
32. Keating MU, Kagey-Sobotka A, Hamilton RG, Yunginger JW. Clinical and immunologic follow-up of patients who stop venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 Sep;88(3 Pt 1):339-48.
33. Kohler J, Blank S, Muller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133(5):1383-9.
34. Korosec P, Erzen R, Silar M, Bajrovic N, Kopac P, Kosnik M. Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. *Clin Exp Allergy*. 2009 Nov;39(11):1730-7.
35. Korosec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Erzen R, Zidarn M, et al. Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128(3):671-3.
36. Korosec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Silar M, Zidarn M, et al. High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 May;129(5):1406-8.
37. Korosec P, Silar M, Erzen R, Celesnik N, Bajrovic N, Zidarn M, et al. Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(4):363-8.

38. Lee S, Hess EP, Nestler DM, Bellamkonda Athmaram VR, Bellolio MF, Decker WW, et al. Antihypertensive medication use is associated with increased organ system involvement and hospitalization in emergency department patients with anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Apr;131(4):1103-8.
39. Lerch E, Muller UR. Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 May;101(5):606-12.
40. Lockey RF, Turkeltaub PC, Olive CA, Baird-Warren IA, Olive ES, Bukantz SC. The Hymenoptera venom study. II: Skin test results and safety of venom skin testing. *J Allergy Clin Immunol.* 1989 Dec;84(6 Pt 1):967-74.
41. Mobs C, Muller J, Rudzio A, Pickert J, Blank S, Jakob T, et al. Decline of Ves v 5-specific blocking capacity in wasp venom-allergic patients after stopping allergen immunotherapy. *Allergy.* 2015 Jun;70(6):715-9.
42. Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy.* 2009 Apr;64(4):543-8.
43. Muraro A, Roberts G, Worm M, Bilo MB, Brockow K, Fernandez Rivas M, et al. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy.* 2014 Aug;69(8):1026-45.
44. Pitsios C, Demoly P, Bilo MB, Gerth van Wijk R, Pfaar O, Sturm GJ, et al. Clinical contraindications to allergen immunotherapy: an EAACI position paper. *Allergy.* 2015 Aug;70(8):897-909.
45. Reisman RE. Duration of venom immunotherapy: relationship to the severity of symptoms of initial insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 1993 Dec;92(6):831-6.
46. Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical

Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Nov;124(5):1047-54.

47. Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of side effects during the buildup phase of venom immunotherapy for Hymenoptera venom allergy: the importance of baseline serum tryptase. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jul;126(1):105-11.

48. Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Seitz MJ, et al. Clinical effectiveness of hymenoptera venom immunotherapy: a prospective observational multicenter study of the European academy of allergology and clinical immunology interest group on insect venom hypersensitivity. *PLoS One*. 2013 May 20;8(5):e63233.

49. Rueff F, Vos B, Elberink JO, Bender A, Chatelain R, Dugas-Breit S, et al. Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2014 Jan;44(5):736-746.

50. Sasvary T, Muller U. Fatalities from insect stings in Switzerland 1978 to 1987. *Schweiz Med Wochenschr*. 1994 Oct 29;124(43):1887-94.

51. Seismann H, Blank S, Braren I, Greunke K, Cifuentes L, Grunwald T, et al. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. *Mol Immunol*. 2010 Jan;47(4):799-808.

52. Selb J, Kogovsek R, Silar M, Kosnik M, Korosec P. Improved recombinant Api m 1- and Ves v 5-based IgE testing to dissect bee and yellow jacket allergy and their correlation with the severity of the sting reaction. *Clin Exp Allergy*. 2016 Apr;46(4):621-30.

53. Schrautzer C, Bokanovic D, Hemmer W, Lang R, Hawranek T, Schwarz I, et al. Sensitivity and specificity of Hymenoptera allergen components depend on the diagnostic assay employed. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 May;137(5):1603-5.

54. Spillner E, Blank S, Jakob T. Hymenoptera Allergens: From Venom to "Venome". *Front Immunol*. 2014 Feb 28;5:77.

55. Stoevesandt J, Hain J, Kerstan A, Trautmann A. Over- and underestimated parameters in severe Hymenoptera venom-induced anaphylaxis: cardiovascular medication and absence of urticaria/angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Sep;130(3):698-704.
56. Stoevesandt J, Hain J, Stolze I, Kerstan A, Trautmann A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors do not impair the safety of Hymenoptera venom immunotherapy build-up phase. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(5):747-55.
57. Strohmeier B, Aberer W, Bokanovic D, Komericki P, Sturm GJ. Simultaneous intradermal testing with hymenoptera venoms is safe and more efficient than sequential testing. *Allergy*. 2013 Apr;68(4):542-4.
58. Sturm GJ, Heinemann A, Schuster C, Wiednig M, Groselj-Strele A, Sturm EM, et al. Influence of total IgE levels on the severity of sting reactions in Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2007 Aug;62(8):884-9.
59. Sturm EM, Kranzelbinder B, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W, Sturm GJ. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010 Sep;78(5):308-18.
60. Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, Hemmer W, Sturm EM, Griesbacher A, et al. Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One*. 2011;6(6):e20842.
61. Sturm GJ, Hemmer W, Hawranek T, Lang R, Ollert M, Spillner E, et al. Detection of IgE to recombinant Api m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jul;128(1):247-8; author reply 248.
62. Sturm GJ, Bilo MB, Bonadonna P, Hemmer W, Caruso B, Bokanovic D, et al. Ves v 5 can establish the diagnosis in patients without detectable specific IgE to wasp venom and a possible north-south difference in Api m 1 sensitization in Europe. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Sep;130(3):817; author reply 818-9.

63. Sturm GJ, Kranzelbinder B, Schuster C, Sturm EM, Bokanovic D, Vollmann J, et al. Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jun;133(6):1635-43.
64. Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, Mosbech H, Bilo MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2017;00:1-20.
65. Tomsitz D, Brockow K. Component Resolved Diagnosis in Hymenoptera Anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017 Jun;17(6):38,017-0707-0.
66. Vachova M, Panzner P, Malkusova I, Hanzlikova J, Vlas T. Utility of laboratory testing for the diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy Asthma Proc*. 2016 May;37(3):248-55.
67. Van Halteren HK, van der Linden PW, Burgers JA, Bartelink AK. Discontinuation of yellow jacket venom immunotherapy: follow-up of 75 patients by means of deliberate sting challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Dec;100(6 Pt 1):767-70.
68. Vos B, Kohler J, Muller S, Stretz E, Rueff F, Jakob T. Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to *Vespula* venom. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Apr;131(4):1225-7.
69. Zitnik SE, Vesel T, Avcin T, Silar M, Kosnik M, Korosec P. Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Mar;23(2):166-72.

6 Přílohy

Příloha 1 Publikace autorky ve vztahu k tématu

Vachová M., Panzner P., Vlas T.:

Diagnostické postupy u pacientů s alergií na včelí a vosí jed.

Alergie, 14, 2012, No. 3, p. 223-229.

Vachová M.:

Diagnostika alergie na blanokřídlý hmyz.

CEVA [online] 19. červen 2012 , poslední aktualizace 19. červen 2012 [cit.]. Dostupný z www: <http://www.ceva-edu.cz/mod/data/view.php?id=13&rid=153>. ISSN 1803-8999.

Vachová M.:

Indikační kritéria pro imunoterapii hmyzími jedy.

CEVA [online] 12. září 2013, dostupný z www:

<http://www.ceva-edu.cz/mod/book/view.php?id=1296&chapterid=555>

Vachová M.:

Alergie na hmyzí jed.

Postgraduální medicína, 17, 2015, No. 3, p. 246-251.

Vachová M., Panzner P., Malkusová I., Hanzlíková J., Vlas T.:

Utility of laboratory testing for the diagnosis of Hymenoptera venom allergy.

Alergy Asthma Proc, 37, 3 May/June,2016, p. 248-255(8); doi: 10.2500/aap.2016.37.3934)

Vachová M., Panzner P.:

Diagnostika alergie na jed Hymenopter.

Alergie, 19, 2017, No. 3, p. 165-171.

Vachová M., Panzner P., Kopač P., Bidovec Stojkovič U., Korošec P.:

Routine clinical utility of honeybee venom allergen components

JACI: In Practice, submitted, under review

Příloha 2 Informace pro pacienty a informovaný souhlas pacienta se sledováním laboratorních parametrů v průběhu léčby specifickou imunoterapií hmyzími jedy

Studie byla schválena Etickou komisí FN v Plzni 6.3.2014.

Informace pro pacienty

Sledování laboratorních parametrů u pacientů léčených specifickou imunoterapií hmyzími jedy

MUDr. Martina Vachová, ÚIA FN Plzeň

Doc. MUDr. Petr Panzner, CSc., ÚIA FN Plzeň

Vážená paní, vážený pane,

byli jste Vaším lékařem dotázáni, zda máte zájem účastnit se projektu, ve kterém budou sledováni pacienti s alergií na hmyzí jed léčení specifickou imunoterapií hmyzím jedem. Přečtěte si, prosím, pozorně následující text. Pokud nebudete něčemu rozumět nebo budete-li chtít více informací, zeptejte se ošetřujícího lékaře.

Hmyzí bodnutí je jednou z nejčastějších příčin anafylaxe (celkové alergické reakce), která díky své nepředvídatelnosti a potenciálně život ohrožujícímu průběhu, představuje závažný medicínský problém. Správná diagnostika a léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu je tudíž nesmírně významnou a z hlediska dalšího osudu pacienta klíčovou úlohou, patřící do rukou zkušeného alergologa. V současné době se při diagnostice a léčbě alergie na jed blanokřídlého hmyzu řídíme doporučeným postupem Evropské Akademie Alergologie a Klinické Imunologie (EAACI) z roku 2005. Specifická imunoterapie představuje jedinou možnou léčbu alergie na hmyzí jed, která ovlivňuje podstatu tohoto onemocnění. Tato léčba výrazně snižuje riziko opakování celkové alergické reakce při opětovném bodnutí hmyzem. Je indikována u pacientů po proběhlé anafylaktické reakci po bodnutí hmyzem při splnění některých dalších diagnostických podmínek. V průběhu léčby dochází ke změnám některých laboratorních parametrů. Bohužel doposud není zcela jasné, který z těchto parametrů odráží účinnost specifické imunoterapie nejlépe. Jedinou možností, jak ověřit účinnost specifické imunoterapie, je zaznamenávat údaje pacienta o náhodném bodnutí hmyzem v přírodě s vyhodnocením reakce po tomto bodnutí. Pokud k reakci po bodnutí nedojde, svědčí to o správné účinnosti specifické imunoterapie.

Jak je studie uspořádána a co je jejím cílem?

Cílem naší studie je vybrat nejvhodnější laboratorní parametr, který nejlépe odráží klinickou účinnost specifické imunoterapie. Toho chceme dosáhnout dlouhodobým sledováním různých laboratorních parametrů u pacientů s alergií na hmyzí jed před zahájením, v průběhu a po ukončení specifické imunoterapie hmyzím jedem. Současně budeme zaznamenávat i

informace pacienta o charakteru reakce po náhodném bodnutí hmyzem v přírodě, ke kterému dojde v průběhu nebo po ukončení léčby vakcinou.

Zapojení se do studie pro pacienta neznamena žádnou zátěž navíc oproti běžným kontrolám pacientů do studie nezapojených – tj. 1x ročně odběr krve spojený s rozhovorem s ošetřujícím lékařem. Při tomto rozhovoru bude pacient tázán, zda byl v uplynulé sezóně bodnut hmyzem a zda po bodnutí došlo k nějaké reakci. Z odebraného vzorku krve bude stanoveno v laboratoři našeho pracoviště několik laboratorních parametrů vztahujících se k alergii na hmyzí jed.

Pro účely statistického zhodnocení obdržených výsledků laboratorních vyšetření v průběhu léčby rozdělíme pacienty do dvou skupin. Jednu skupinu budou tvořit nemocní, kteří po náhodném bodnutí reagují stále alergicky. Druhou skupinu budou představovat pacienti, kteří na náhodná bodnutí nijak nereagují. Naším cílem je porovnat změny provedených laboratorních parametrů v průběhu léčby mezi těmito dvěma skupinami pacientů- mezi skupinou pacientů, kteří stále reagují alergicky na případné bodnutí, ve srovnání s těmi, kteří při náhodném bodnutí alergickou reakci nevytvoří. Statistickým zhodnocením dat zjistíme, která laboratorní metoda nejlépe odráží klinickou účinnost specifické imunoterapie.

Rizika a nepříjemnosti spojené s Vaší účastí ve studii

Zapojení se do studie pro Vás znamená pouze poskytnutí výsledků Vašeho laboratorního vyšetření k průběžnému shromažďování a následnému vyhodnocení. Budeme shromažďovat výsledky laboratorních vyšetření prováděných před zahájením imunoterapie, po každém dokončení roční léčby a následně i po jejím ukončení. Současně budeme shromažďovat informace o tom, zda jste byli bodnuti hmyzem a zda došlo po bodnutí k alergické reakci s případnou nutností použití protialergické léčby, kterou jste vybaveni.

Nakládání s daty a jejich zabezpečení

Data (výsledky) získaná v rámci tohoto projektu a uchovávaná a statisticky zpracovávaná nad rámec Vaší běžné zdravotnické dokumentace budou elektronicky uchována v takové podobě, že nebude zjistitelné, od kterého pacienta pocházejí. Bude s nimi nakládáno důvěrně.

Podepsáním informovaného souhlasu vyjadřujete svůj souhlas s výše uvedeným zacházením s Vašimi údaji.

Přínos Vaší účasti ve studii

Alergie na hmyzí jed představuje závažný medicínský problém. Je nejčastější příčinou anafylaxe, která může i přes okamžitý lékařský zásah vést k smrti doposud zcela zdravého člověka bez ohledu na jeho věk či přidružené choroby. Vaše účast ve studii povede k optimalizaci doporučeného léčebného postupu pro péči o tyto nemocné.

Dobrovolná účast ve studii

Vaše účast v projektu je zcela dobrovolná. Pokud se rozhodnete studii nezúčastnit, bude Vám nadále poskytována Vaším lékařem normální lékařská péče. Máte také právo ze studie v kterémkoli období vystoupit, aniž byste udali důvody a aniž by to pro Vás znamenalo nevýhody ve vztahu k další lékařské péči. Stejně tak můžete být ze studie vyřazeni z objektivních důvodů dle uvážení studijního lékaře (např. z důvodu přerušení léčby, jiných medicínských komplikací apod.).

Další otázky

Pokud máte další otázky nebo byste chtěli získat další informace, zeptejte se, prosím, bez váhání svého ošetřujícího lékaře, který s Vámi Vaše event. pochybnosti rád prodiskutuje.

Samozřejmě obdržíte veškeré informace o svém zdravotním stavu získané v průběhu sledování.

Kontaktní adresa pro případ dotazů:

Adresa a telefonní číslo Vašeho ošetřujícího lékaře:

MUDr. Martina Vachová

Ústav imunologie a alergologie

FN Plzeň-Lochotín

Alej Svobody 80

304 60 Plzeň tel.: 377103398

Písemný informovaný souhlas

Název projektu: Sledování laboratorních parametrů u pacientů léčených specifickou imunoterapií hmyzími jedy

Já,.....

(jméno hůlkovým písmem)

potvrzuji, že jsem si přečetl/a přiložené „Informace pro pacienty“ týkající se mé účasti ve studii.

Všem informacím zde uvedeným rozumím a všechny mé otázky byly zodpovězeny k mé spokojenosti.

Tímto dobrovolně souhlasím se svojí účastí v tomto projektu.

Bude mi předána jedna kopie „Informace pro pacienty“ i tohoto souhlasu.

Dávám svolení k přístupu ke svým zdravotním záznamům ošetřujícím lékařům, členům etické komise a osobám blízkým, kterým jsem udělil/a souhlas s nahlížením od své zdravotní dokumentace.

Jsem srozuměn/a s tím, že mé zdravotní záznamy budou zpracovány a hodnoceny podle požadavků tohoto projektu a zároveň budou hodnoceny v souladu se zákonem pro ochranu dat a se zákonem pro ochranu osobních údajů.

.....

Podpis pacienta

.....

Datum a čas (vlastní rukou)

Vysvětlil/a jsem podstatu a účel tohoto projektu výše jmenovanému pacientovi

.....

Jméno lékaře (tiskace)

.....

Podpis lékaře

.....

Datum a čas (vlastní rukou)

Příloha 3 Informace pro pacienty a informovaný souhlas pacienta se statistickým zpracováním laboratorního vyšetření u pacientů s alergií na hmyzí jed

Studie byla schválena Etickou komisí FN v Plzni 6.10.2016.

Informace pro pacienty

Souhlas se statistickým zpracováním výsledků laboratorního vyšetření u pacientů s alergií na hmyzí jed

MUDr. Martina Vachová, ÚIA FN Plzeň

Prof. MUDr. Petr Panzner, CSc., ÚIA FN Plzeň

Vážená paní, vážený pane,

byli jste Vaším lékařem dotázáni, zda máte zájem účastnit se projektu, do kterého budou zapojeni pacienti s alergií na hmyzí jed. Přečtěte si, prosím, pozorně následující text. Pokud nebudete něčemu rozumět nebo budete-li chtít více informací, zeptejte se ošetřujícího lékaře.

Vzhledem k tomu, že jste prodělal alergickou reakci po bodnutí hmyzem, budete nyní na našem pracovišti vyšetřen a léčen. Při diagnostice a léčbě alergie na hmyzí jed se řídíme nejmodernějšími diagnostickými a léčebnými postupy. Vyšetření obsahuje rozhovor s lékařem, provedení kožních testů a odběr krve na laboratorní vyšetření. Cílem laboratorního vyšetření je potvrdit, případně vyloučit alergii na hmyzí jed.

Jak je projekt uspořádán a co je jeho cílem?

Cílem našeho projektu je zhodnotit výsledky provedených vyšetření v souboru pacientů s alergií na hmyzí jed. Na základě statistického porovnání výsledků jednotlivých diagnostických testů chceme vybrat metodu, která je pro potvrzení alergie na hmyzí jed nejpřínosnější.

Zapojení se do projektu pro Vás neznamena žádnou zátěž navíc oproti běžnému vyšetření, neboť laboratorní vyšetření provádíme rutinně všem pacientům s podezřením na alergii na hmyzí jed.

Rizika a nepříjemnosti spojené s Vaší účastí v projektu

Zapojení se do projektu pro Vás znamená pouze poskytnutí výsledků Vašeho laboratorního vyšetření k statistickému zpracování.

Nakládání s daty a jejich zabezpečení

Data (výsledky) získaná v rámci tohoto projektu budou elektronicky uchována v takové podobě, že nebude zjistitelné, od kterého pacienta pocházejí. Bude s nimi nakládáno důvěrně.

Podepsáním informovaného souhlasu vyjadřujete svůj souhlas s výše uvedeným zacházením s Vašimi údaji.

Přínos Vaší účasti v projektu

Alergie na hmyzí jed představuje závažný medicínský problém. Vaše spolupráce povede k optimalizaci doporučeného diagnostického postupu pro péči o pacienty s alergií na hmyzí jed.

Dobrovolná účast ve studii

Vaše účast v projektu je zcela dobrovolná. Pokud se rozhodnete nezúčastnit, bude Vám nadále poskytována Vaším lékařem normální lékařská péče.

Další otázky

Pokud máte další otázky nebo byste chtěli získat další informace, zeptejte se, prosím, bez váhání svého ošetřujícího lékaře, který s Vámi Vaše event. pochybnosti rád prodiskutuje.

Kontaktní adresa pro případ dotazů: Adresa a telefonní číslo Vašeho ošetřujícího lékaře:

MUDr. Martina Vachová,

Ústav imunologie a alergologie, FN Plzeň, Alej Svobody 80, 304 60 Plzeň, tel. 377103399

Písenný informovaný souhlas

Název projektu: Souhlas se statistickým zpracováním výsledků laboratorního vyšetření u pacientů s alergií na hmyzí jed

Já,.....

(jméno hůlkovým písmem)

potvrzuji, že jsem si přečetl/a přiložené „Informace pro pacienty“ týkající se mé účasti v projektu.

Všem informacím zde uvedeným rozumím a všechny mé otázky byly zodpovězeny k mé spokojenosti.

Tímto dobrovolně souhlasím se svojí účastí v tomto projektu.

Bude mi předána jedna kopie „Informace pro pacienty“ i tohoto souhlasu.

Jsem srozuměn/a s tím, že mé zdravotní záznamy budou zpracovány a hodnoceny podle požadavků tohoto projektu a zároveň budou hodnoceny v souladu se zákonem pro ochranu dat a se zákonem pro ochranu osobních údajů.

.....

Podpis pacienta

.....

Datum a čas (vlastní rukou)

Vysvětlil/a jsem podstatu a účel tohoto projektu výše jmenovanému pacientovi

.....

Jméno lékaře (tiskace)

.....

Podpis lékaře

.....

Datum a čas (vlastní rukou)

7 Poděkování

V souvislosti s tvorbou této dizertační práce bych chtěla poděkovat především svému školiteli prof. MUDr. Petru Panznerovi, CSc. za jeho vstřícnost, ochotu a cenné rady. Také bych ráda poděkovala RNDr. Marku Malému, CSc. za pomoc se statistickým vyhodnocením výsledků. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit svůj dík i všem spolupracovníkům z ÚIA FN Plzeň za spolupráci při péči o pacienty s alergií na včelí a vosí jed. Dík patří samozřejmě i mé rodině, zejména mému manželovi Radkovi za tolerantní přístup po celou dobu mého studia.