

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Zuzana Kollerová

Studijní obor: Zdravotní Laborant (5345R020)

ALERGIE NA JED BLANOKŘÍDLÉHO HMYZU

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2021

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Zuzana KOLLEROVÁ**
Osobní číslo: **Z16B0109P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Alergie na jed blanokřídlého hmyzu**
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, PAULÍK, Milan a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN 978-80-247-7089-5.
- BILÓ, B. M., RUEFF, F., MOSBECH, H., BONIFAZI, F., OUDE-ELBERINK, J. N. a EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* [online]. 2005, **60**(11), 1339-1349. DOI 10.1111/j.1398-9995.2005.00963.x.
- BONIFAZI, F., JUTEL, M., BILÓ, B. M., BIRNBAUM, J., MULLER, U. a EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy* [online]. 2005, **60**(12), 1459-1470. DOI 10.1111/j.1398-9995.2005.00960.x.
- HOFFMAN, Donald R. Hymenoptera venom allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* [online]. 2006, **30**(2), 109-128. ISSN 10800549.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Bc. Tomáš Vlas**
Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **1. června 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**



PhDr. Lukáš Štich, MBA
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 29. ledna 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31.3.2021

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Kollerová Zuzana

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Alergie na jed blanokřídlého hmyzu

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 42

Počet stran – nečíslované: 21

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 28

Klíčová slova: alergie, anafylaktická reakce, jed blanokřídlého hmyzu, sIgE, tryptáza, molekulární diagnostika

Souhrn:

Bakalářská práce je zaměřena na alergii na jed blanokřídlého hmyzu. Pro diagnostiku alergie na jed blanokřídlého hmyzu se používá metoda ImmunoCAP 250 a Immulite 2000 XPi. Cílem práce je porovnání hladin jednotlivých alergenů a tryptázy u pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem a u pacientů s alergií po bodnutí hmyzem. Výsledkem práce je stanovení rozdílů hladin hmyzího jedu, alergenů a tryptázy mezi skupinou pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci nebo alergickou reakci. Také je vyhodnocena statistická významnost rozdílů hladin alergenů a tryptázy.

Abstract

Surname and name: Kollerová Zuzana

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Hymenoptera venom allergy

Consultant: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 42

Number of pages – unnumbered: 21

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 28

Keywords: allergy, anaphylaxis, hymenoptera venom, sIgE, tryptase, molecular diagnostics

Summary:

The bachelor thesis is focused on Hymenoptera venom allergy. The ImmunoCAP 250 and Immulite 2000 XPi methods are used to diagnose Hymenoptera venom allergy. The aim of the thesis is to compare the levels of individual allergens and tryptase in patients with an anaphylactic reaction after insect stings and in patients with allergy after insect stings. The result of the thesis is the determination of the differences in the levels of Hymenoptera venom, allergens and tryptase between group of patients showing an anaphylactic reaction or an allergic reaction. Another task is to compare the levels of particular allergens and tryptase in patient with an anaphylaxis after an insect sting and in patient with an allergy after in insect sting. The statistical significance is also evaluated.

Předmluva

Tato bakalářská práce byla napsána z důvodu vlastního zájmu o problematiku alergie na jed blanokřídlého hmyzu. Mým cílem bylo nejen prohloubit si znalosti z oblasti imunologie, ale také rozšířit znalosti související se včelařením, neboť moje rodina se dlouhodobě věnuje chovatelství včel.

Poděkování

Velmi děkuji vedoucímu práce Ing. Bc. Tomáši Vlasovi za pomoc při výběru tématu, za odborné vedení práce, poskytování cenných rad, doporučení a poskytnutí materiálních podkladů. Rovněž děkuji za trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnoval při konzultacích ke zpracování této kvalifikační práce. Dále bych chtěla poděkovat svojí rodině za podporu během studia.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST.....	17
1 TAXONOMIE BLANOKŘÍDLÉHO HMYZU	17
1.1 Apidae.....	17
1.2 Vespidae	18
1.3 Formicidae	18
2 JEDOVÉ ALERGENY.....	19
2.1 Dávka jedu v bodnutí.....	19
2.2 Složení jedů	19
2.3 Cross-reaktivita.....	22
3 KLINICKÉ PROJEVY	24
3.1 Velké lokální reakce	24
3.2 Systémové reakce a anafylaxe.....	24
4 EPIDEMIOLOGIE	26
5 RIZIKOVÉ FAKTORY	27
5.1 Časový interval mezi bodnutími, počet bodnutí.....	27
5.2 Předchozí senzibilizace, závažnost předchozí reakce.....	27
5.3 Věk.....	28
5.4 Kardiovaskulární onemocnění, léčba beta blokátory a ACE.....	28
5.5 Maligní neoplazie	28
5.6 Autoimunitní onemocnění	29
5.7 Inhibitory monoaminooxidázy (MAOI)	29
5.8 Těhotenství	29
5.9 Mastocytóza, sérová tryptáza	29
6 DIAGNOSTIKA.....	31
6.1 Indikace a shromažďované informace.....	31
6.2 Kožní testy	31
6.3 In vitro vyšetření sIgE k extraktům hmyzích jedů	32
6.4 Molekulární diagnostika	33
6.4.1 Molekulární diagnostika alergie na včelí jed.....	33
6.4.2 Molekulární diagnostika alergie na vosí jed.....	33

6.5	Test aktivace bazofilů.....	33
6.6	Bazální hladina tryptázy	34
7	LÉČBA A PREVENCE.....	35
7.1	Specifická imunoterapie hmyzím jedem (VIT).....	35
7.1.1	Dostupnost jedů	35
7.1.2	Druhy přípravků	35
7.1.3	Výběr správného přípravku	36
7.1.4	Mechanismus VIT	36
7.2	Prevence.....	36
7.3	Léčba SR a pohotovostní léčba	37
8	BUDOUCÍ STRATEGIE	38
	PRAKTICKÁ ČÁST	39
9	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	39
10	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	40
11	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	41
12	METODIKA PRÁCE	42
12.1	ImmunoCAP 250.....	42
12.1.1	Princip metody.....	42
12.1.2	Přístrojové vybavení a materiál	42
12.1.3	Biologický materiál	43
12.1.4	Postup	43
12.2	Immulate 2000 XPi	43
12.2.1	Princip metody.....	43
12.2.2	Přístrojové vybavení a materiál	43
12.2.3	Biologický materiál	44
12.2.4	Postup	44
13	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	46
13.1	Senzibilizační profily pacientů	46
13.2	Hladiny alergenů.....	48
	DISKUZE	55
	ZÁVĚR.....	57
	SEZNAM LITERATURY.....	58
	SEZNAM PŘÍLOH	62
	PŘÍLOHY	63

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Senzibilizační profil u pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem.....	46
Graf 2 Senzibilizační profil u pacientů s alergií po bodnutí hmyzem	47
Graf 3 Stanovení hladiny alergenu včelího jedu	48
Graf 4 Stanovení alergenu vosího jedu.....	49
Graf 5 Srovnání hladin hmyzího jedu.....	50
Graf 6 Srovnání hladin tryptázy bez rozdílu druhu hmyzího jedu	51
Graf 7 Stanovení hladiny alergenu Api m 1	52
Graf 8 Stanovení hladiny alergenu Ves v 5	53
Graf 9 Stanovení hladiny alergenu Ves v 1	54

SEZNAM OBRÁZKŮ

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled alergenů včelího a vosího jedu	22
--	----

SEZNAM ZKRATEK

ACEI	angiotenzin konvertující enzym
AIT	alergen immunotherapy
BAT	test aktivace bazofilů
bsT	bazální hladina tryptázy
CCD	zkříženě reagující uhlovodíkové determinanty
DNA.....	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EAACI.....	Evropská akademie pro alergologii a klinickou imunologii
FcεRI.....	vysokoafinní IgE receptor
i.m.	intramuskulární aplikace
IFN- γ	interferon gama
IgE.....	imunoglobulin třídy E
IgG	imunoglobulin třídy G
IL.....	interleukin
ISM	indolentní systémová mastocytóza
IU	International Unit
LIS	Laboratorní informační systém
LLR.....	large local reaction, velká lokální reakce
MAOI.....	inhibitory monoaminoxidázy
PAF	faktor ovlivňující trombocyty
rApi	rekombinantní alergen
RAST	Radio Allergo Sorbent Test
s.c.	subkutánní aplikace

sIgE specifický imunoglobulin třídy E
sIgG..... specifický imunoglobulin třídy G
SIT specifická alergenová imunoterapie
SR..... systémová reakce
SSR systematic sting reaction
TFh buňky folikulární pomocné buňky
VIT venom immunotherapy, imunoterapie hmyzím jedem

ÚVOD

Bakalářská práce s názvem „Alergie na jed blanokřídlého hmyzu“ je zpracována pomocí retrospektivní analýzy dat vybrané skupiny pacientů ambulance Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň. Pro diagnostiku a léčbu alergie na hmyzí jed je nutné znát co nejpřesnější složení jedů včetně jednotlivých alergenních molekul. V současné době se výzkum zaměřuje více na jednotlivé alergenní složky než na komplexní složení jedů. Je to dáno zejména rozvojem molekulární diagnostiky a rozvojem proteomické analýzy. Díky moderním technologiím molekulární biologie máme k dispozici několik rekombinantních alergenů jedu blanokřídlého hmyzu. Výhodou rekombinantních alergenů je vyšší diagnostická přesnost, detailní stanovení senzibilizačních profilů a hodnocení alergenově specifických imunitních odpovědí v průběhu VIT.

Cílem této práce bylo určit, kolik procent pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem vykazuje pozitivitu na včelí jed a kolik procent pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem vykazuje pozitivitu na vosí jed. Dalším úkolem bylo porovnání hladin jednotlivých alergenů včelího a vosího jedu a tryptázy.

Teoretická část se zabývá základními informacemi o problematice alergie na jed blanokřídlého hmyzu, je zde popsáno složení jedů nejvýznamnějších zástupců blanokřídlého hmyzu včetně charakteristiky jednotlivých alergenních molekul. Dalším tématem jsou klinické projevy, epidemiologie a rizikové faktory ovlivňující výsledek anafylaktické reakce. Dále jsou zde popsány metody diagnostiky alergie na jed blanokřídlého hmyzu a v neposlední řadě je zde zmíněna léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu pomocí VIT. Poslední kapitola teoretické části je věnována budoucím strategiím v oblasti diagnostiky a léčby alergie na jed blanokřídlého hmyzu.

Praktická část je věnována diagnostice alergie na jed blanokřídlého hmyzu pomocí systému ImmunoCAP 250 a Immulite 2000 XPi. Jsou zde popsány principy metod, pomůcky a pracovní postupy. Praktická část dále obsahuje porovnání výsledků pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem a pacientů s alergií po bodnutí hmyzem pomocí statistického zhodnocení.

Diskuze je věnována srovnání našich výsledků s odbornými články od různých autorů ve smyslu interpretace námi získaných dat.

TEORETICKÁ ČÁST

1 TAXONOMIE BLANOKŘÍDLÉHO HMYZU

Blanokřídlý hmyz (lat. *Hymenoptera*) patří mezi jeden z největších řádů hmyzu, který se skládá z více než 150 000 druhů. Někteří zástupci řádu *Hymenoptera* jsou považováni za škůdce (např. pilatky, vosy, mravenci), většina z nich má ale v životním prostředí nezastupitelnou roli přirozených predátorů ničivého hmyzu nebo opylovačů rostlin. (Vos, 2017)

Jméno *Hymenoptera* pochází z řečtiny ze slova *humen* (membrána) a *perón* (křídlo). Toto spojení odkazuje na charakteristická membránová křídla hmyzu. (Vos, 2017)

Řád *Hymenoptera* je rozdělen do dvou podřádů – *Symphyta* (širopasí) a *Apocrita* (štíhlopasí). *Symphyta* se vyznačují širokým spojením mezi hrudníkem a břichem, oproti tomu *Apocrita* mají typické zúžení mezi prvním a druhým břišním segmentem. *Apocrita* obsahuje skupinu čeledí, které jsou lékařsky významné, neboť jejich zástupci jsou zodpovědní za všechna lidská bodnutí. Jedná se o čeledi *Apidae* (Včelovití), *Vespidae* (Vosovití či Sršňovití) a *Formicidae* (Mravencovití). (Vos, 2017)

1.1 Apidae

Do čeledi *Apidae* patří včely (*Apis*) a čmeláci (*Bombus*). Typickým zástupcem čeledi *Apidae* je včela medonosná (*Apis mellifera*), která je na území České republiky hojně chována za účelem sběru medu. Včela medonosná je velká 12,7 až 25,3 mm a povrch jejího těla je krytý krátkými chloupky, které svým zabarvením do zlatohnědé a černé barvy vytváří charakteristické pruhy. Tělo včely se skládá ze tří hlavních částí – hlavy, hrudi a zadečku, které jsou navzájem oddělené stopkou. V zadečku je umístěn jedový váček, na který je napojeno žihadlo nesoucí zpětné háčky, které po bodnutí zabrání včele vytáhnout žihadlo z rány a včela z tohoto důvodu po bodnutí umírá. (Biló, 2016; Krishna, 2011)

Čmelák (*Genus bombus*) je oproti včele větší a může dosahovat velikosti až 38 mm, jeho tělo je více pokryto chloupky a na břicho najdeme výrazné žluté či bílé pruhování, u některých druhů může být oranžové nebo červené. Bodnutí čmelákem je ojedinělé. Čmeláci žihadlo používají především při obranně svého hnízda. Jejich žihadlo ovšem není opatřeno zpětnými háčky, a tak čmelák může bodnout opakovaně. (Biló, 2016; Krishna, 2011)

1.2 Vespidae

Čeď *Vespidae* je rozdělena na 2 podčeďi *Vespinae* a *Polistinae*, které zahrnují mnoho různých druhů vos a sršní. Mezi klinicky významné patří rody *Vespula*, *Dolichovespula* (Dlouholebé vosy) a *Vespa* patřící do podčeďi *Vespinae*. Nejvýznamnějším zástupcem v Evropě je vosa obecná (*Vespula vulgaris*), která je velká 19 mm a má velmi charakteristické zabarvení – černo-žlutě pruhovaný zadeček, žluté nohy a černá tykadla. Na vosím žihadle se nenachází zpětné háčky, proto mohou vosy bodnout opakovaně. Rod *Dolichovespula* je svým vzhledem i chováním velmi podobný rodu *Vespula* a z tohoto důvodu se v různých zdrojích tyto rody nerozlišují. Dalším významným zástupcem je sršeň obecná (*Vespa crabro*). Sršeň má mohutné tělo s celkovou délkou 35 mm a hlavou s červeno-hnědou barvou a černo-žlutě pruhovaným zadečkem. Sršní jed je slabší než včelí jed, ale po bodnutí způsobuje větší bolest. Agresivní chování je obvykle nástrojem sebeobrany. (Biló, 2005; Vos, 2017; Krishna, 2011)

1.3 Formicidae

Zástupci čeďi *Formicidae* (Mravencovití) jsou svým vzhledem nezaměnitelní s ostatními druhy rodu *Hymenoptera*. Velikost mravence je rozmanitá, pohybuje se od několika milimetrů po několik centimetrů. Základní stavba těla je shodná se stavbou jiných druhů hmyzu. Charakteristickým rysem většiny mravenců jsou lomená článkovaná tykadla na hlavě, kousací ústrojí, přítomnost křídel pouze v určitých stádiích vývoje a metapleurální žlázy produkující kyselinu fenylactovou, která má antibakteriální a antifungicidní účinek. Tak jako ostatní hmyz, mají i mravenci žihadlo, kterým mohou bodnout opakovaně. V Evropě je bodnutí mravencem velmi ojedinělé, na rozdíl od Spojených států Amerických a Austrálie. Mezi klinicky významné patří mravenci rodu *Solenopsis* (Ohniví mravenci), harvester mravenec rodu *Pogonomyrmex* (běžně známý jako červený mravenec), Jack Jumper mravenec rodu *Myrmecia* a asijský mravenec rodu *Pachycondyla*. (Biló, 2005; Vos, 2017; 18; Golden, 2017)

2 JEDOVÉ ALERGENY

Pro přesnou diagnostiku a léčbu alergie na hmyzí jed je nezbytné znát složení jedů a strukturu jednotlivých alergenů. (Biló, 2005)

2.1 Dávka jedu v bodnutí

Množství jedu, které se uvolní během bodnutí, se liší podle druhu blanokřídlého hmyzu. Zároveň ale může být toto množství u stejného druhu různé. Včela při bodnutí uvolní průměrně 50 µg až 140 µg jedového proteinu na bodnutí, přitom jedové vaky mohou obsahovat více než 300 µg jedu. Čmelák uvolní 10 µg až 30 µg jedu na bodnutí. Naopak dávka jedu v bodnutí u vos (*Vespinae*), které jsou schopny opakovaného bodnutí, je mnohem menší. *Vespula* uvolní 1,7 µg až 3,1 µg jedu, *Dolichovespula* 2,4 µg až 5,0 µg a *Polistes* 4,2 µg až 17 µg jedu na bodnutí. Množství jedu uvolněného bodnutím sršně není známo. (Biló, 2005)

2.2 Složení jedů

Jed blanokřídlého hmyzu je z většiny tvořený vodným roztokem, který obsahuje komplexní směs vysokomolekulárních proteinů, peptidů a nízkomolekulárních bioaktivních aminů. Příkladem může být histamin, acetylcholin, katecholaminy, ale také další organické látky, např. alkyl a alkenyl piperidinové alkaloidy. (Vos 2017; Hoffman 2006)

Hlavním alergenem včelího jedu je Api m 1, neboli fosfolipáza A2, která představuje 12–15 % včelího jedu. Jedná se o glykoprotein o hmotnosti 17 kDa, jehož zralá molekula je tvořena 134 aminokyselinami s N-vázaným glykanem, který se váže na asparagin 13. V blízkosti N-konce se nachází vazebné místo pro vápník. Právě na vápníku je aktivita fosfolipázy závislá. Imunoglobulinová aktivita vázající se na IgE do značné míry závisí na konformaci a je výrazně potlačena redukcí a alkylací. Rekombinantní fosfolipáza je produktem *Escherichia coli*, který je nutno renaturovat. Aktivita kožního testu a aktivita uvolněného histaminu je srovnatelná s aktivitami fosfolipázy přírodního jedu. Diagnostická specifita je v případě rekombinantní fosfolipázy vyšší, protože rekombinantní molekula není kontaminována jinými proteiny obsaženými v jedu a neobsahuje cross-reaktivní N-glykany. Trojrozměrná struktura fosfolipázy A2 byla stanovena pomocí rentgenové krystalografie. (Hoffman, 2006; Krishna, 2011)

Dalším hlavním alergenem včelího jedu je Api m 2 - hyaluronidáza. Tento enzym patří do rodiny glykosylhydroláz 56 a jeho molekulová hmotnost je 45 kDa. Jeho hlavní

funkcí je štěpení beta-1,4 glykosidové vazby mezi N-acetylglukosaminem a kyselinou D-glukuronovou, která je součástí kyseliny hyaluronové. Působením tohoto enzymu dochází k rozpuštění extracelulární matrix a tím se zvyšuje infiltrace jedu. Hyaluronidáza je z jedu izolována pomocí několika chromatografických kroků zahrnujících gelovou filtraci a vysoko-účinnou kationtovou výměnu. Rekombinantní molekula je produkována v bakuloviru a má zachovanou jak enzymovou, tak imunologickou aktivitu nativního enzymu. Hyaluronidáza exprimovaná v buňkách *E. Coli* není biologicky aktivní. Trojrozměrná struktura hyaluronidázy včelího jedu byla získána pomocí rentgenové krystalografie. Základní strukturu tvoří sedmivláknový beta-sud neboli válec složený z beta-listů, který je obklopený deseti alfa-šroubovicemi. Vazebné místo pro substrát je dostatečně velké, aby se mohl navázat hexasacharid. (Hoffman 2006; Krishna, 2011)

Včelí jed obsahuje významné množství kyselých fosfatázy (Api m 3). Enzym o molekulové hmotnosti 49 kDa se v jedu nachází nejen jako monomer, ale také jako dimer. Tento glykoprotein způsobuje uvolňování histaminu ze senzibilizovaných lidských bazofilů a vyvolává “wheal and flare” reakci (papula a makula s okolním zarudnutím) po intradermální injekci alergických jedinců. (Hoffman, 2006; Krishna, 2011)

Hlavní složkou včelího jedu je melitin (Api m 4), který tvoří 30 až 50 % sušiny včelího jedu. Melitin je amfipatický peptid s 26 aminokyselinami s molekulovou hmotností 3 kDa. Je produkován jako promelitin v jedové žláze a při průchodu jedovým kanálkem do jedového vaku se z něj postupně odštěpují dipeptidy končící na prolin či alanin působením membránově vázaného enzymu dipeptidyl peptidázy IV (Api m 5). Melitin má konformaci alfa-helix, přičemž v roztoku o vysokých koncentracích se primárně vyskytuje jako tetramer. Při vysokých koncentracích může melitin přímo lyzovat buňky, zejména erytrocyty. Počáteční bolest včelího bodnutí je s velkou pravděpodobností způsobena účinkem melitinu. Melitin má výrazně nižší alergenovou aktivitu než fosfolipáza a hyaluronidáza. Přibližně 25 až 50 % jedinců produkuje IgE protilátky proti tomuto peptidu a terapie vakcínami proti včelímu jedu způsobuje zvýšení podílu jedinců s melitin – specifickým IgE. (Hoffman, 2006; Krishna, 2011)

Api m 6 je malý proteinový alergen včelího jedu o molekulové hmotnosti 8 kDa. Tento protein byl izolován pomocí gelové filtrace a vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Sekvence byla provedena Edmanovou degradací enzymaticky štěpených peptidů a hmotnostní spektrometrií za použití karboxylpeptidázy s postupným odstraněním

C – aminokyseliny. Byly objeveny celkem 4 izoformy a největší izoforma byla tvořena 71 aminokyselinami. IgE protilátky proti Api m 6 jsou přítomny přibližně u 40 % pacientů s alergií na včelí jed. (Hoffman 2006; Krishna, 2011)

Icarpin (Api m 10) je dalším důležitým alergenem včelího jedu s molekulovou hmotností 55 kDa. Jedná se o nestabilní protein, jehož úloha při alergii na včelí jed není zcela objasněna. Senzibilizace na tento alergen vykazuje 52 až 62 % pacientů. Pomocí tohoto markerového alergenu můžeme identifikovat primární senzibilizaci na včelí jed, a tedy i rozlišovat skutečnou senzibilizaci a cross-reaktivitu. Api m 10 má potenciál přispívat k personalizovaným léčebným strategiím u alergie na včelí jed, zároveň dominantní senzibilizace vůči Api m 10 je indikována jako rizikový faktor selhání léčby. (Hoffman, 2006; Krishna, 2011; Jakob, 2020)

Jed čmeláků obsahuje fosfolipázu A2 (Bom p 1), proteázu (Bom p 4), hyaluronidázu, kyselou fosfatázu a několik dalších proteinů, které se ve včelím jedu nenachází. Tyto proteiny se nazývají bombolitiny a jedná se o povrchově aktivní peptidy, které nejsou alergenní. (Biló, 2005; Hoffman, 2006)

Jed *Vespinae* obsahuje 3 hlavní alergeny: fosfolipázu A1 (Ves v 1), hyaluronidázu (Ves v 2) a antigen 5 (Ves v 5). Fosfolipáza A 1 tvoří 6 až 14 % hmotnosti sušiny jedu a její struktura se liší od fosfolipázy včelího jedu. Fosfolipáza vosího jedu obvykle neobsahuje sacharidy. Existují dva odlišné izozymy fosfolipázy vosího jedu, jejichž rozdíly jsou především v N-koncové části molekuly. Oba izoenzymy jsou exprimovány ve stejném hmyzu. Hyaluronidáza ve vespídových jedech je velmi podobná hyaluronidáze včelího jedu. Antigen 5 je tvořený 201 až 204 aminokyselinami s několika vysoce konzervovanými oblastmi a neobsahuje sacharidy. (Biló, 2005; Hoffman, 2006)

Jed mravenců rodu *Solenopsis* obsahuje 90 až 95 % olejovitých silně bazických ve vodě nerozpustných N-alkyl a alkenyl piperidinů. Tyto alkaloidy jsou zodpovědné za vznik pustuly v místě bodnutí mravencem. Ve vodné části jedu se nachází alergenní proteiny. Existují 4 hlavní alergeny jedu mravenců: fosfolipáza A 1 (Sol i 1), Sol i 2, antigen 5 (Sol i 3) a Sol i 4. Některé alergeny jsou částečně identické s alergeny vosího jedu. Sol i 1 se částečně shoduje se sekvencí Ves v 1 a Sol i 3 má přibližně 50 % sekvence shodné s Ves v 5. Sol i 2 je nejvíce zastoupeným proteinem v jedu mravenců. Tento protein je tvořený 119 aminokyselinami, neobsahuje sacharidy a primárně se vyskytuje jako dimery spojené disulfidem. Sol i 2 je méně stabilní vůči proteolýze než Sol i 3. Obsahuje místo

pro přirozené štěpení kyselinou a může tak dojít k jeho zničení v některých extraktech nacházejících se v celém těle. Sol i 4 je strukturně velmi podobný Sol i 2. (Biló, 2005; Hoffman, 2006)

Tabulka 1 Přehled alergenů včelího a vosího jedu

Jed	Alergen	Název	Hlavní / Vedlejší alergen
Apis mellifera (včela medonosná)	Api m 1	Fosfolipáza A2	Hlavní
	Api m 2	Hyaluronidáza	Hlavní
	Api m 3	Kyselá fosfatáza	Hlavní
	Api m 4	Melitin	Vedlejší
	Api m 6		Vedlejší
	Api m 10	Iscarpin	
Vespula vulgaris (vosa obecná)	Ves v 1	Fosfolipáza A1	Hlavní
	Ves v 2	Hyaluronidáza	Hlavní
	Ves v 5	Antigen 5	Hlavní

Zdroj dat Biló, 2005 (upraveno)

2.3 Cross-reaktivita

Dvojitá pozitivita nebo i vícečetná pozitivita testů může být způsobena skutečnou dvojitou senzibilizací nebo cross-reaktivními IgE protilátkami, které rozpoznávají podobné epitopy různých jedů, především epitopy jedů obsahující karbohydráty a běžné alergeny. Rozdíl mezi cross-reaktivitou a dvojitou senzibilizací je velmi důležitý pro výběr vhodného jedu pro imunoterapii (VIT). (Biló, 2005)

Cross-reaktivita u rodu *Apidae* je způsobena vysokou podobností jedů a hlavních alergenů u různých druhů včel po celém světě. Struktura hlavního alergenu fosfolipázy A2 je vysoce identická. Naopak alergeny v jedu čmeláků jsou mnohem více variabilní. Fosfolipáza A2 čmeláků je pouze z 53 % identická s fosfolipázou A2 včel. Většina senzibilizovaných pacientů vykazuje pouze reaktivitu specifickou pro čmeláky. Nicméně existují i cross-reaktivní reakce mezi včelím jedem a jedem čmeláků. (Biló, 2005; Hoffman, 2006)

Cross-reaktivita v jedech rodu *Vespidae* je velmi silná. Důvodem je vysoká podobnost jednotlivých složek jedů a struktury hlavních alergenů. Identita alergenů různých druhů *Vespula* může dosahovat až 95 %. Je nutno zmínit, že cross-reaktivita se liší mezi podčeledi. V podčeledi *Vespinæ* (*Vespula*, *Dolichovespula*, *Vespa*) je cross-reaktivita vyšší a tedy významnější. Mezi podčeledi *Vespinæ* a podčeledi *Polistes* je cross-reaktivita nižší. Rozdíl najdeme také u druhů pocházejících z různých lokací. Evropské druhy podčeledi *Polistes* vykazují silnou cross-reaktivitu, ale mezi evropskými a americkými druhy je cross-reaktivita slabší. Cross-reaktivita je u pacientů citlivých na vespídové jedy vysoce variabilní. U významné části z nich najdeme vysokou specifiku a většina také vykazuje různé stupně cross-reaktivity mezi jednotlivými druhy *Vespidæ*. Z toho vyplývá, že může existovat více různých epitopů – některé jsou druhově či rodově specifické, jiné mají různou míru cross-reaktivity. (Biló, 2005; Hoffman, 2006)

Hlavní příčinou cross-reaktivity jedů mezi rody *Apidae* a *Vespidæ* je enzym hyaluronidáza, jejíž sekvence je mezi těmito druhy přibližně z 50 % identická. Hlavním původcem cross-reaktivity jsou uhlovodíkové determinanty, ale existuje také proteinová cross-reaktivita. (Biló, 2005; Hoffman, 2006)

U některých pacientů může existovat klinicky významná cross-reaktivita mezi vespídovými fosfolipázami a mezi Sol i 1. Většinou je způsobena zkříženě reagujícími sacharidovými determinanty, ale najdeme také cross-reaktivity založené na reakci proteinových epitopů. (Biló, 2005; Hoffman, 2006)

3 KLINICKÉ PROJEVY

Hypersenzitivita na jed blanokřídlého hmyzu může být zprostředkována imunologickými mechanismy, konkrétně prostřednictvím IgE nebo non-IgE, ale také mechanismy neimunologickými. Alergie na jed blanokřídlého hmyzu je potenciální život ohrožující alergická reakce. Reakce na bodnutí blanokřídlého hmyzu se dělí na normální lokální reakce, velké lokální reakce, systémové anafylaktické reakce, systémové toxické reakce a neobvyklé reakce. Nejčastějším klinickým projevem jsou velké lokální a systémové anafylaktické reakce. (Biló, 2005)

3.1 Velké lokální reakce

Nejméně závažné alergické reakce na jed blanokřídlého hmyzu jsou velké lokální reakce (LLR). Jejich charakteristickým projevem je otok v místě bodnutí, jehož průměr je větší než 10 cm a který trvá déle než 24 hodin. Tyto reakce obvykle postupují pomalu, vrcholí za 48 až 72 hodin a ustupují po 5 až 10 dnech. Otok může postihnout i celou končetinu a může být doprovázen systémovými příznaky zánětu, jako je malátnost, nevolnost, třes, horečka nebo bolesti hlavy. Základní mechanismy velkých lokálních reakcí nejsou známy. Podle klinického průběhu a výsledků kožních a in vitro testů u některých pacientů lze předpokládat, že mechanismus LLR je zprostředkovaný IgE. Na základě průběhu a výsledků u jiných pacientů byla navržena buněčně zprostředkovaná alergická patogeneze nebo kombinace obou. Ačkoli LLR mohou být velmi nepříjemné a znepokojující, většinou neohrožují život. U pacientů s LLR se při opakovaném bodnutí většinou vyvine podobná reakce a pouze 5 až 10 % reakcí přechází do systémové reakce, která je srovnatelná s odhadovaným rizikem asymptomaticky senzibilizovaných jedinců. (Biló, 2005; Sturm, 2018; Vachová, 2020; Vachová, 2017; Vos, 2017)

3.2 Systémové reakce a anafylaxe

Systémové reakce jsou sice méně časté alergické reakce na jed blanokřídlého hmyzu, ale jejich klinický projev může být velmi závažný. Systémové reakce jsou doprovázené různými projevy, které mohou postihnout různé orgánové systémy. Na kůži se SR často projevují jako generalizovaná kopřivka, zrudnutí, svědění či angioedém. Mohou se objevit gastrointestinální projevy, jako jsou křeče v břiše, zvracení a průjem, které jsou důsledkem edému sliznice a křečí hladké svaloviny střev. Mezi příznaky související s dýchací soustavou můžeme zařadit svírání hrdla, dysfagii, stridor, dysfonii, sípání nebo dušnost, které jsou projevem bronchospasmu anebo otokem hrtanu. Vazodilatace a vaskulární únik vedou

ke kardiovaskulárním příznakům, pro které je charakteristické snížení krevního tlaku, kolaps a ztráta vědomí, což nakonec může vést k úmrtí, které je důsledkem cerebrovaskulární hypoperfúze. Systémové reakce představují jednu z hlavních příčin anafylaxe a jsou zodpovědné až za jednu třetinu všech anafylaktických reakcí. Anafylaktické reakce jsou pro většinu pacientů a jejich rodiny velmi traumatické a vedou ke zhoršení kvality života, zejména kvůli emocionální úzkosti, která je spojená s nutností být stále ve střehu, a kvůli obavám z opakování. Pro klasifikaci systémových reakcí podle stupně závažnosti byly navrženy různé klasifikační systémy. Nejčastěji se používá systém dle Muellera a systém dle Ringa a Messmera. (Biló, 2005; Vos, 2017; Sturm, 2019; Vachová, 2020; Vachová, 2018)

Mechanismus systémových alergických reakcí je nejčastěji zprostředkovaný IgE. Podmínkou pro vznik této reakce je alespoň jedno předchozí bodnutí, při kterém došlo k senzibilizaci jedince. Buňky prezentující antigen v kůži, např. dendritické buňky, při prvním setkání s jedem zachycují alergeny a transportují je do drenážních lymfatických uzlin, zpracovávají je na peptidy a ty následně prezentují naivním CD4⁺ T buňkám. Prezentace peptidů vedou k diferenciaci naivních T buněk v Th2 buňky a TFh buňky (folikulární pomocné). Oba typy diferencovaných Th buněk vylučují cytokiny, jako je interleukin IL-4, a tím podporují další diferenciaci Th2, která je charakteristická právě pro alergická onemocnění. Th2 a folikulární pomocné buňky exprimují CD40 ligand a produkují cytokiny IL-4 a IL-13, které jsou zodpovědné za indukci přechodu izotopů těžkého řetězce v B-lymfocytech na IgE. To vede k přeměně některých B-lymfocytů v plazmatické buňky, které produkují IgE. Pokud se volný alergen specifický IgE (sIgE) nacházející se v plazmě naváže na specifický receptor FcεRI na žírné buňce nebo bazofilu, dojde k senzibilizaci buňky na příslušný alergen. Při opětovném vystavení alergenu tento alergen zesiluje receptory FcεRI na žírné buňce a to vede ke třem typům biologické odpovědi: k degranulaci, při které dochází exocytózou k sekreci obsahu granulí, zejména histaminu a tryptázy, k syntéze a sekreci lipidových mediátorů, jako je prostaglandin D2 a faktor aktivující trombocyty (PAF), a k syntéze a sekreci cytokinů, především IL-4 a IL-13. První dvě výše uvedené reakce způsobují okamžité projevy alergické reakce, třetí reakce se týká především pozdní fáze alergické reakce, která se projevuje zánětem a která zajišťuje zachování alergické reakce proliferací žírných buněk a stimulací produkce IgE. Vzácně mohou být systémové alergické reakce způsobeny krátkodobou senzibilizací protilátek IgG nebo aktivací komplementu pomocí komplexů IgG - jed. (Biló, 2005; Vos, 2017; Sturm, 2019; Vachová, 2020)

4 EPIDEMIOLOGIE

Bodnutí hmyzem druhu blanokřídlých je velmi časté a z dostupných údajů je zřejmé, že 56,6 až 94,5 % běžné populace bylo tímto hmyzem bodnuto minimálně jednou za život. Přibližně 9,2 až 28,7 % dospělé populace vykazuje senzibilizaci na jed blanokřídlých. Obvykle se jedná o přechodnou senzibilizaci, tzn. první měsíc po bodnutí vykazuje více než 30 % pacientů senzibilizaci, která se po 2 letech sníží o 30 % a po třech letech o 50 %. Prevalence LLR se pohybuje mezi 2,4 a 26,4 % u běžné populace, u dětí se uvádí prevalence 19 % a u včelařů se tato hodnota pohybuje kolem 38 %. Podle epidemiologických studií se prevalence systémových reakcí na bodnutí blanokřídlých pohybuje mezi 0,3 a 7,5 % u dospělých, u dětí jsou hodnoty nižší, naopak u včelařů se prevalence udává mezi 14 a 43 %. Výskyt úmrtí v důsledku bodnutí hmyzem rodu blanokřídlých je nízký. Počet úmrtí se udává od 0,03 do 0,48 úmrtí na 1 000 000 obyvatel za rok. Toto číslo může být ve skutečnosti vyšší, neboť přibližně u 40 až 85 % pacientů se smrtelnými reakcemi po bodnutí hmyzem rodu blanokřídlých chyběly v anamnéze záznamy o předchozích anafylaktických reakcích. (Biló, 2005; Vos, 2017; Sturm, 2018)

5 RIZIKOVÉ FAKTORY

Rizikové faktory můžeme rozdělit do dvou skupin – na faktory, které zvyšují riziko bodnutí, a faktory, které zvyšují riziko vzniku těžké alergické reakce na bodnutí. Do první skupiny faktorů můžeme zařadit region, klima, teplotu, chování hmyzu, určitá povolání a činnosti zvyšující riziko bodnutí. Do této skupiny rizikových faktorů patří také výskyt vosích hnízd v blízkosti obydlí, ale také pracovišť a venkovních sportovišť. Mezi rizikové faktory zvyšující riziko těžké alergické reakce můžeme zařadit interval mezi bodnutími a počet bodnutí, předchozí senzibilizace a závažnost vyvolané reakce, věk, kardiovaskulární onemocnění a léčba beta blokátory, ACEI, maligní neoplasie, autoimunitní onemocnění, MAOI, těhotenství a mastocytóza. (Biló, 2005; Vos, 2017; Sturm, 2019)

5.1 Časový interval mezi bodnutími, počet bodnutí

Krátký interval mezi bodnutími znamená vyšší riziko systémové reakce na další bodnutí. Interval kratší než 2 měsíce mezi bodnutími zvyšuje riziko systémové reakce o 58 %. S prodlužujícím se intervalem toto riziko klesá, ale zůstává přibližně 20 až 30 % i po 10 letech. (Biló, 2005; Vos, 2017)

Velmi časté bodnutí vede pravděpodobně k určité toleranci. 45 % včelařů, kteří byli bodáni méně než 25krát za rok, měli v anamnéze uvedeny systémové reakce, naopak žádný z včelařů, kteří byli bodnutí více než 200krát za rok, žádné systémové reakce nevykazoval. Velké množství současných bodnutí při jedné příležitosti může způsobit senzibilizaci jedince, která ovšem vede k asymptomatické senzibilizaci či anafylaxi na následující bodnutí. (Biló, 2005)

5.2 Předchozí senzibilizace, závažnost předchozí reakce

Pro dospělé jedince bez předchozí systémové anafylaktické reakce na bodnutí a s pozitivním kožním testem představuje další bodnutí riziko anafylaktické reakce 17 %. U jedinců s negativním kožním testem je toto riziko nulové. (Biló, 2005)

U pacientů s velkou lokální reakcí se v 5 až 15 % případů vyvine při dalším bodnutí systémová reakce. U pacientů s mírnými systémovými reakcemi je riziko systémových reakcí při dalším bodnutí přibližně 18 % u dětí a 14 až 20 % u dospělých v případě mírných systémových reakcí a až 79 % se závažnými systémovými reakcemi. (Biló, 2005)

5.3 Věk

Systemové reakce se mohou projevit v jakémkoli věku. U dětí se vyskytují méně často a cca 60 % systémových reakcí na bodnutí je mírných. U dospělých jedinců se respirační a kardiovaskulární příznaky vyskytují u 70 % a s vyšším věkem stoupá riziko závažnějších reakcí na bodnutí a úmrtnost je vyšší než u dětí a mladých dospělých. Děti mají také příznivější prognózu týkající se rizika systémových reakcí na opakovaná bodnutí. Zatím nebylo objasněno, jestli nižší riziko u dětí souvisí s nižší celoživotní expozicí jedu nebo s prudkým poklesem sIgE po bodnutí. (Biló, 2005; Vos, 2017)

5.4 Kardiovaskulární onemocnění, léčba beta blokátory a ACE

Kardiovaskulární onemocnění zejména u starších pacientů a související léčba beta-blokátory nebo inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI) se považuje za velmi vysoké riziko závažné reakce s rizikem úmrtí. U starších pacientů se proto běžně provádí VIT, pro kterou po porovnání potencionálního rizika a přínosu kardiovaskulární onemocnění není kontraindikací. U pacientů, kteří jsou léčeni betablokátory, se anafylaktické reakce neobjevují častěji. Podle dřívějších studií betablokátory neměly vliv na zvýšení celkového rizika systémové reakce. Novější studie poukazují na teoretickou existenci zvýšeného rizika více SSR, při kterých nouzová léčba adrenalinem může být méně efektivní. Na základě profilu rizika přínosu neexistuje žádná kontraindikace pro VIT u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními, a to ani u pacientů léčených betablokátory. Léčba ACEI nemá s velkou pravděpodobností vliv na bezpečnost VIT. Některé studie sice uvádí vyšší riziko závažnějších SSR, tyto výsledky jsou však často zkresleny vyšším věkem pacienta, který představuje silný rizikový faktor pro závažné SSR. Výsledky různých studií nejsou ani jednotné v souvislosti s vlivem léčby ACEI na VIT. (Sturm, 2019; Biló, 2005; Vos, 2017)

5.5 Maligní neoplazie

Neexistují žádné kontrolované studie zabývající se rizikem nebo účinností alergenové imunoterapie (AIT) u maligních neoplazií. Akutní maligní neoplazie jsou považovány za relativní kontraindikaci, i když neexistují přímé důkazy o nepříznivých účincích VIT na růst nádoru či na účinnost chemoterapie. VIT je možné doporučit u vysoce rizikových pacientů alergických na jed blanokřídlých, je-li maligní onemocnění stabilní nebo v remisi. Vždy je důležité zvážit přínosy VIT oproti možné zátěži léčby a aktivitě nádorového onemocnění. (Sturm, 2019)

5.6 Autoimunitní onemocnění

Z důvodu nedostatečného množství dostupných údajů existuje relativní kontraindikace u autoimunitních onemocnění v remisi a absolutní kontraindikace u autoimunitních onemocnění v aktivních formách. Orgánově specifické autoimunitní onemocnění, jako je např. Diabetes mellitus, Hashimotova thyreoiditida, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida a revmatoidní artritida, nejsou považovány za kontraindikaci, pokud je onemocnění stabilizováno. Imunosupresivní léčba však pravděpodobně může negativně ovlivnit účinnost VIT. Proto se VIT doporučuje pouze u pacientů, u nichž jsou orgánově specifická autoimunitní onemocnění stabilizována. (Sturm, 2019)

5.7 Inhibitory monoaminoxidázy (MAOI)

MAOI mají širokou škálu nebezpečných interakcí mezi léky. Hlavním problémem MAOI užívaných současně s VIT je, že zabraňují rozpadu sympatomimetických léků. V případě nežádoucích účinků by nouzová léčba adrenalinem mohla způsobit těžkou hypertenzi anebo tachykardii. Léčba MAOI není přímou kontraindikací pro VIT, je však doporučená zvýšená opatrnost při podávání adrenalinu. (Sturm, 2019)

5.8 Těhotenství

U pacientek léčených VIT během těhotenství je výskyt nedonošených dětí, toxemie, potratů, úmrtí novorozenců a vrozených vývojových vad srovnatelný s výskytem u běžné populace. Údajů o nežádoucích účincích VIT u těhotných je velmi málo, a proto se zahájení VIT nedoporučuje. Naopak v dobře tolerovaném VIT zahájeném již v době před otěhotněním je vhodné pokračovat, a to za použití tolerované udržovací dávky. Důvodem pokračování VIT během těhotenství je vysoké riziko relapsu po předčasném ukončení léčby a také nízké riziko nežádoucích účinků. (Sturm, 2019)

5.9 Mastocytóza, sérová tryptáza

Z několika dostupných kazuistik je patrné, že u pacientů s mastocytózou se mohou objevit obzvláště závažné, a dokonce fatální reakce na bodnutí. (Biló, 2005)

Mastocytóza je rizikovým faktorem jak pro rozvoj samotné alergie na jed blanokřídlého hmyzu, tak i pro rozvoj závažnějších systémových reakcí. Výskyt a závažnost reakcí úzce souvisí se zvýšenou hladinou výchozí sérové tryptázy (bsT). Sérová tryptáza je produkována žírnými buňkami a její zvýšená hladina je dána zvýšeným počtem a aktivitou žírných buněk. Asi 10 % populace s alergií na jed blanokřídlého hmyzu má zvýšenou hladinu bsT.

Dokonce i malé zvýšení hladiny bsT stačí pro vznik častějších a závažnějších systémových reakcí. Se základní systémovou mastocytózou je VIT u většiny pacientů dobře tolerována, i když je zde určité riziko častějšího výskytu nežádoucích účinků, jejichž přesná příčina nebyla zatím zcela objasněna. U pacientů s těžkou počáteční SSR a mastocytózou anebo zvýšenou sérovou tryptázou (nad 11,4 µg/L) může být VIT méně ochranný, a proto je vhodné VIT u těchto pacientů prodloužit. (Vos, 2017; Sturm, 2019)

6 DIAGNOSTIKA

Diagnostika alergie je dlouhodobě založena na kožním prick testu s alergenovými extrakty a na in vitro vyšetření sIgE protilátek k extraktům hmyzích jedů. V posledních letech došlo k rozvoji v oblasti molekulární diagnostiky, díky které můžeme stanovit sIgE pro každou jednotlivou molekulu hmyzího jedu a která na rozdíl od standardních in vitro testů není zatížena chybou dvojí pozitivitu výsledků a cross-reaktivitou. (Incorvaia, 2020)

6.1 Indikace a shromažďované informace

Evropská akademie pro alergologii a klinickou imunologii (EAACI) vydala doporučení týkající se diagnostiky alergie na hmyzí jed, na základě kterého je hlavní indikací k diagnostickému testování proběhlá systémová reakce po bodnutí blanokřídlým hmyzem. LLR nepatří mezi hlavní indikace z důvodu velmi nízkého rizika rozvoje následné systémové reakce. Systémová reakce na bodnutí či senzibilizaci se prokazuje pozitivním kožním testem anebo sérologickým testem pro detekci sIgE jedu. Důležité je zaznamenat informace o počtu, datu a místě všech bodnutí, druhu a závažnosti příznaků, intervalu mezi bodnutím a nástupem příznaků, nouzové léčbě, zadrženém nebo odstraněném žihadle, faktory související s bodnutím (např. prostředí, činnost jedince), rizikové faktory pro závažné reakce a rizikové faktory pro opakovaná bodnutí, tolerovaná bodnutí po prvních systémových reakcích a další alergie. (Biló, 2005; Vos, 2017; Tripolt, 2020)

6.2 Kožní testy

Kožní testy představují diagnostický test první volby. Jejich výhodou je především rychlý výsledek, ale také jednoduchost a finanční dostupnost. Kožní testy se doporučuje provést nejdříve 2 týdny po reakci na bodnutí z důvodu možnosti falešně negativních výsledků během refrakterní periody. Pokud jsou negativní v případě definitivní anamnézy systematické reakce na bodnutí, měly by se po 1 až 2 měsících opakovat z důvodu možné prodloužené doby. Existují dva druhy kožních testů – prick testy, které se provádí kožním vpichem, a intradermální testy, při kterých se aplikuje jed injekčně do volárního povrchu předloktí. Používají se komerčně dostupné standardizované extrakty hmyzích jedů, nezbytné jsou negativní a pozitivní kontroly. Testy se provádí postupným podáváním dávky se vzestupně rostoucí koncentrací v rozmezí od 0,01 do 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pro kožní prick testy a od 0,001 do 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pro intradermální testy. Každých 15 minut se provádí odečítání výsledků a podání přírůstkové dávky, a to tak dlouho, dokud se neobjeví pozitivní reakce nebo není dosaženo maximální dávky. V praxi se jako první provádí prick testy. V případě negativního výsledku

prick testu se doporučuje výsledek potvrdit intradermálními testy. Pokud jsou intradermální testy negativní i při maximální koncentraci, testování ukončíme, neboť vyšší koncentrace jedů by mohla vyvolat falešně pozitivní výsledek. Pozitivní výsledek prick testu a intradermálního testu je definován jako pupen o průměru větším než 3 mm. Citlivost prick testů je jednoznačně nižší než u intradermálních testů, u kterých se citlivost pohybuje kolem 90 % pro koncentraci 1 µg/mL. I přes velmi vysokou citlivost intradermálních testů je jejich provádění v ČR méně časté. Důvodem je skutečnost, že preparáty určené k intradermálním testům nejsou v ČR registrovány a jejich použití je proto nutné hlásit Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv, ale také jejich horší dostupnost. (Biló, 2005; Vachová, 2017; Vachová, 2020; Vos, 2017)

6.3 In vitro vyšetření sIgE k extraktům hmyzích jedů

K vyšetření sIgE se dříve používala *in vitro* metoda RAST (Radio Allergo Sorbent Test). V současné době se používá řada metod odvozených z této metody, které jsou neradioaktivního typu a obvykle citlivější. Mezi nejčastěji používané metody pro diagnostiku alergie na jed blanokřídlých patří ImmunoCAP a Immulite. Koncentrace sIgE se měří *in vitro* v séru pacienta proti standardizovanému extraktu jedu, naměřená hodnota poskytuje informaci o hladině cirkulujícího sIgE. V prvních dnech po bodnutí může být hladina sIgE nízká nebo nemusí být vůbec prokazatelná. Jedově specifické IgE se obvykle zvyšuje během několika dnů nebo týdnů po bodnutí a poté pomalu klesá. U pacientů, u nichž nebylo sIgE pro příslušný jed detekováno, se doporučuje po několika týdnech opakování testů. Citlivost sérových testů IgE specifických pro jed je u pacientů s anamnézou systémových reakcí na bodnutí poněkud nižší než u intradermálních kožních testů, a to zejména po prvním roce po reakci. Přesto se citlivost pohybuje v rozmezí 83,4 až 91 %, přičemž některé publikace uvádí hodnotu až 96,8 %. Mezinárodní referenční hodnota byla stanovena na 0,35 kIU/L. Je však důležité veškeré výsledky vyšetření hodnotit v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a zohlednit také hladinu celkového IgE. Například u pacientů s ISM a klinickou anamnézou systémových reakcí na bodnutí může být hladina sIgE nižší než 0,35 kIU/L. Příčinou je pravděpodobně adsorpce sIgE na povrch expandující populace mastocytů, která vede k méně detekovatelnému volnému sIgE. Dalším významným problémem při sérologickém vyšetření sIgE je falešně pozitivní dvojitá senzibilizace na včelí a vespídové jedy a zkřížená reaktivita mezi epitopy hlavních alergenů těchto dvou jedů. K řešení těchto problémů byla stanovena sekvence a struktura některých hlavních alergenů, které byly vyjádřeny rekombinantní formou bez CCD. Tyto rekombinantní alergeny jsou specifitější než extrakty

z celého jedu, ale nejsou schopny detekovat všechny pacienty senzibilizované na jed. Z tohoto důvodu se v rutinní praxi stále používají extrakty celého jedu. (Biló, 2005; Vachová, 2017; Vos, 2017)

6.4 Molekulární diagnostika

V posledních letech dochází stále k rozvoji molekulární diagnostiky alergie na jed blanokřídlého hmyzu. Výhodou molekulární diagnostiky je jednoznačně schopnost určit přesně alergeny, proti kterým se IgE protilátky vytváří v těle pacienta. Zatím nejsou k dispozici všechny cross-reaktivní alergeny včelího a vespídivého jedu, pro rutinní diagnostiku chybí např. Api m 12, Ves 3 a Ves 6. Molekulární diagnostika má omezené použití a jedná se pouze o podpůrnou metodu ke klasickému testování alergií. (Sturm, 2018; Blank, 2018; Vachová, 2017)

6.4.1 Molekulární diagnostika alergie na včelí jed

V současné době se pro molekulární diagnostiku alergie na včelí jed používá jen 6 z 12 známých alergenových molekul včelího jedu. Mezi komerčně dostupné druhově specifické molekuly, které se vyskytují pouze ve včelím jedu, patří rApi m 1, rApi m 3, rApi m 4 a rApi m 10. Další komerčně dostupné molekuly jsou cross-reaktivní molekuly a jedná se o rApi m 2 a rApi m 5. Z dostupných výsledků studií vyplývá, že diagnostická citlivost u molekulární diagnostiky alergie na včelí jed kolísá a je potřeba provést další studie na předem přesně definované populaci s cílem vyhodnotit, zda je citlivost dostupných testů sIgE a počet dostupných alergenů dostačující pro diagnostiku cross-reaktivity u pacientů s alergií na včelí jed. I přesto je molekulární diagnostika přínosem, neboť přibližně dvě třetiny pacientů s negativním s IgE na Api m 1 mohou být diagnostikováni pomocí Api m3 a Api m 10. (Vachová, 2018; Blank, 2018)

6.4.2 Molekulární diagnostika alergie na vosí jed

Diagnostická citlivost komerčně dostupných vespídivých alergenů Ves v 1 a Ves v 5 je oproti včelím alergenům velmi vysoká, pohybuje se v rozmezí 92 až 98 %. I přesto v několika studiích selhala cross-reaktivní diagnostika u 2 až 8 % pacientů s jasně prokazatelnou anamnézou alergie na vosí jed. Proto je pro molekulární diagnostiku alergie na vosí jed potřeba více alergenových složek vosího jedu. (Vachová, 2018; Blank, 2018)

6.5 Test aktivace bazofilů

Test aktivace bazofilů (BAT) s molekulárními alergeny slouží k identifikaci alergenu, na který je pacient senzibilizován IgE, a také ke stanovení alergenní aktivity těchto

specifických IgE protilátek. BAT se může využívat v případě nejasných výsledků, dvojitě pozitivních či negativních výsledků kožních testů a testů sIgE. Posouzení reaktivity na jednotlivé složky alergenu pomocí BAT má lepší diagnostickou výkonnost než měření IgE v séru k celým extraktům. BAT se dále uplatňuje pro monitorování VIT. (Matricardi, 2016; Sturm, 2018; Blank, 2018; Vachová, 2017)

6.6 Bazální hladina tryptázy

Stanovení bazální hladiny tryptázy je doporučeno u všech pacientů s anamnézou těžké reakce po bodnutí blanokřídlým hmyzem. Vyšší hladina tryptázy může indikovat přítomnost mastocytózy. Podle jedné studie u pacientů s hladinou tryptázy větší než 20 µg/L anebo mastocytózou bylo 2,7krát vyšší riziko selhání léčby. V jiné studii se souvislost mezi vyšší hodnotou tryptázy a selháním léčby nepotvrdila. Zvýšená hladina tryptázy je tedy významným rizikovým faktorem pro opakování těžkých reakcí po bodnutí. (Vachová, 2017; Matricardi, 2016; Sturm, 2019)

7 LÉČBA A PREVENCE

Jedinou dostupnou profylaktickou léčbou alergie na jed blanokřídlého hmyzu je specifická imunoterapie hmyzím jedem (VIT, venom immunotherapy). Pomocí VIT lze dlouhodobě zmírnit morbiditu a zabránit úmrtí na bodnutí *Hymenoptera*. VIT také snižuje riziko opětovného vzniku SSR po dalším bodnutí hmyzem a významně zlepšuje kvalitu života pacientů vzhledem ke snížení strachu z opakování nežádoucích reakcí. (Vachová, 2017; Sturm, 2019; Vos, 2017)

7.1 Specifická imunoterapie hmyzím jedem (VIT)

Pomocí VIT, stejně jako pomocí jakékoli jiné specifické alergenové imunoterapie, lze dosáhnout tolerance k bodnutí hmyzem, či jiného alergenu. Přesný mechanismus VIT a SIT nebyl zatím zcela objasněn. Úspěšná imunoterapie je úzce spjatá s nárůstem alergen blokujících protilátek IgG, zejména IgG4, dále pak s indukcí regulačních T buněk a se sníženým uvolňováním mediátorů. Pro SIT je typická snížená produkce IL - 4 a IL 5 prostřednictvím CD4+ T buněk a také zvýšená produkce IFN- γ . Účinnost VIT je velmi vysoká a po VIT je chráněno 97 až 98 % pacientů. Účinnost VIT se liší u terapie včelím jedem a terapie vespídním jedem. U pacientů léčených včelím jedem se pohybuje v rozmezí 77 až 84 % a u pacientů léčených vespídním jedem dokonce v rozmezí 91 až 96 %. (Hoffman, 2006; Sturm, 2019; Sturm, 2018; Hořejší, 2017)

7.1.1 Dostupnost jedů

Některé jedy jsou dostupné celosvětově, jiné jedy jsou dostupné pouze v zemích, kde se alergie na příslušný jed vyskytuje nejčastěji. Jed druhu *Apis mellifera* a *Vespula* je dostupný v celé Evropě. Oproti tomu jed druhu *Polistes* je dostupný pouze lokálně, např. ve Španělsku a Itálii. Podobně je to s dostupností jedu čmeláka, který je k dispozici např. v Itálii. (Sturm, 2019)

7.1.2 Druhy přípravků

Pro VIT existují v Evropě 3 druhy přípravků určené k subkutánnímu podání injekcí. Jedná se o nepurifikované vodné přípravky, purifikované vodné přípravky a purifikované přípravky adsorbované na nosič hydroxid hlinitý, tzv. depotní přípravky. Vodné přípravky mají široké využití. Je možné je použít k vytvoření protokolů (klasických i zrychlených), stejně tak je lze uplatnit v udržovací fázi. Depotní přípravky se obvykle využívají pro konvenční režimy či režimy seskupené. Léčba může být převedena z vodných přípravků na depotní po předchozím rychlém navýšení dávky. Depotní přípravky pravděpodobně vykazují

méně lokálních vedlejších účinků než přípravky vodné. Lokální reakce u vodných přípravků jsou u purifikovaných vodných přípravků menší než u nepurifikovaných vodných přípravků. (Vachová, 2020; Sturm, 2019)

7.1.3 Výběr správného přípravku

Pro zahájení VIT je velmi důležité pomocí diagnostických metod určit a potvrdit, na jaký druh jedu má pacient alergii, a na základě získaných výsledků vybrat správný přípravek. U pacientů s alergií na hmyzí jed je obvyklá senzibilizace na jed více druhů blanokřídlých a není vždy snadné určit, zda se jedná o dvojitou anebo vícenásobnou skutečnou senzibilizaci či dvojitou senzibilizaci v důsledku cross-reaktivity. V obou případech je většinou léčba za použití jednoho jedu dostatečná. Pro správný výběr vhodného přípravku je nezbytné si uvědomit, že dostupné testy, jako jsou kožní testy, stanovení sIgE *in vitro*, molekulární diagnostika nebo BAT, nemají schopnost rozlišit asymptotickou senzibilizaci od klinicky významné alergie s LLR a SSR. V případě závažné počáteční reakce na bodnutí a velmi podobně pozitivních výsledků na včelí a vespídný jed u všech provedených testů se doporučuje zvážit VIT pomocí obou jedů. Simultánní podání včelího a vespídného jedu by mělo být bezpečné, neboť mezi těmito jedy existuje pouze omezená cross-reaktivita. (Vachová, 2020; Sturm, 2019)

7.1.4 Mechanismus VIT

VIT je založena na podávání postupně zvyšujících se dávek příslušného alergenu subkutánními injekcemi. V ČR jsou k dispozici standardizované depotní přípravky. VIT má dvě fáze – iniciální (úvodní) fázi a udržovací fázi. Během iniciální fáze se nejprve aplikuje nízká dávka alergenu, která se postupně zvyšuje až do dosažení udržovací nebo maximální tolerované dávky. Léčba probíhá 1x týdně 1 injekce po dobu 3 až 4 měsíců. Počet dávek v jeden den je možné zvýšit na 2 až 3 injekce a tím výrazně zkrátíme dobu iniciální fáze na 6 týdnů. Po této fázi následuje udržovací fáze, během které se aplikuje udržovací či maximální tolerovaná dávka v intervalu 6 až 8 týdnů po dobu 5 let. (Vachová, 2020; Petřů, 2011; Bystroň, 2012)

7.2 Prevence

Nezbytnou součástí celkové léčby je kromě VIT také důsledná edukace pacienta, zahrnující podrobné informace o tom, jak se vyhnout dalšímu bodnutí. *Hymenoptera* bodají pouze v sebeobraně, proto je důležité pacienty upozornit na chování, které by hmyzem mohlo být vnímáno jako potenciální ohrožení, což by následně vedlo k bodnutí. Pacienti by měli být poučeni, kde si jednotlivé druhy Hymenopter staví hnízda a jaké potraviny je

přitahují. Pro včely jsou iritující například i výrazné parfémů či pach potu. V případě bodnutí včelou by mělo být žihadlo co nejrychleji odstraněno. Součástí edukace pacienta je také poučení o použití pohotovostních léků a také praktický nácvik použití autoinjektoru pro aplikaci adrenalinu. (Hoffman, 2006; Vachová, 2020)

7.3 Léčba SR a pohotovostní léčba

Pro léčbu systémových alergických reakcí jsou pacienti vybaveni sympatomimetiky, antihistaminiky a kortikoidy ve formě tablet. Pacienti s alergií na jed blanokřídlého hmyzu by měli dále obdržet pohotovostní soupravu obsahující autoinjektor s epinefrinem pro případ akutní anafylaxe. Pro přežití pacienta s anafylaktickým šokem je nejdůležitější rychlé rozpoznání anafylaktického šoku a okamžité podání epinefrinu. Podávání epinefrinu se doporučuje *i.m.* cestou. Důvodem je rychlejší zvýšení koncentrace v plazmě a rychlejší nástup farmakologických účinků, než je tomu u aplikace *s.c.* cestou. Rychlé dosažení vysokých plazmatických i tkáňových koncentrací epinefrinu je přitom zásadní pro přežití pacienta. U pacientů s kardiovaskulárními či cerebrovaskulárními onemocněními je zvýšené riziko nežádoucích účinků epinefrinu, ale i přesto stále výhody léčby epinefrinem převažují. (Hoffman, 2006; Vachová 2020)

8 BUDOUCÍ STRATEGIE

V oblasti diagnostiky a léčby alergie na jed blanokřídlých došlo v posledních letech k značnému vývoji. Znalosti o složení jedů blanokřídlých, o zastoupení jednotlivých alergenů a o jejich důležitosti se neustále rozšiřují a prohlubují. Přesto zde existuje mnoho, co lze udělat pro zlepšení diagnostiky i léčby alergie na jed blanokřídlých. (Biló, 2005; Bonifazi, 2005; Jakob, 2017)

Velkým přínosem zdá se být moderní technologie molekulární biologie, díky které jsou k dispozici některé hlavní alergeny jedu včel a některé alergeny jedu vos v rekombinantní formě. Právě rekombinantní alergeny jsou stěžejní pro budoucí vývoj diagnostiky i léčby alergie na jed blanokřídlých. Díky rekombinantním alergenům je možné určit senzibilizační profil pacienta a individuálně přizpůsobit imunoterapii každému pacientovi. Výhodou rekombinantních přípravků je vysoce snížená reaktivita na IgE protilátky vázaných na efektorové B-buňky. Důsledkem toho dochází ke sníženému uvolňování mediátorů a k vyšší toleranci, tzn. schopnost interagovat s T-buňkami je zachována, a to vede k vyvolání ochranných imunologických reakcí. Na základě rozšiřujících se znalostí molekulárních mechanismů imunitní tolerance lze očekávat snadnější a optimalizovanější navrhování vakcín, které budou zaměřeny na více epitopů. (Biló, 2005; Bonifazi, 2005; Zahirović, 2020)

Existují experimentální strategie pro imunoterapii, kdy jsou senzibilizovaným myším injekčně aplikovány DNA-plazmidy kódující příslušné alergeny. Úspěch očkování byl zaznamenán u plazmidů z fosfolipázy A2 včelího jedu. (Bonifazi, 2005)

Lze také předpokládat, že dostupný seznam alergenů na jed blanokřídlých není stále úplný a že díky pokrokům v analýze proteomu se bude jejich počet i nadále zvyšovat. (Jakob, 2016)

PRAKTICKÁ ČÁST

9 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Praktická část této kvalifikační práce byla založena na vytvoření senzibilizačních profilů u vybrané skupiny pacientů ambulance Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň.

Hlavním cílem praktické části bylo porovnat výsledky vyšetření sIgE mezi skupinou pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem a skupinou pacientů s alergickou reakcí po bodnutí hmyzem. Úkolem práce bylo určit rozdíl hladin sIgE mezi těmito dvěma skupinami pacientů a porovnání hladin tryptázy.

10 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

V praktické části této kvalifikační práce jsem se zabývala otázkou rozdílu hladin sIgE u včely, popř. vosy, mezi skupinou vykazující po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a skupinou s alergií po bodnutí hmyzem. Na základě výsledku tohoto rozdílu jsem dále zhodnotila statistickou významnost.

1. Jaký je rozdíl hladin alergenu včelího jedu mezi skupinou pacientů s anafylaktickou reakcí a skupinou pacientů s alergií?
2. Jaký je rozdíl hladin alergenu vosího jedu mezi skupinou pacientů s anafylaktickou reakcí a skupinou pacientů s alergií?
3. Jaký je rozdíl hladin tryptázy mezi skupinou pacientů s anafylaktickou reakcí a skupinou pacientů s alergií?
4. Jaký je rozdíl hladin alergenu včely Api m 1 mezi skupinou pacientů s anafylaktickou reakcí a skupinou pacientů s alergií?
5. Jaký je rozdíl hladin alergenu vosy Ves v 5 mezi skupinou pacientů s anafylaktickou reakcí a skupinou pacientů s alergií?
6. Jaký je rozdíl hladin alergenu vosy Ves v 1 mezi skupinou pacientů s anafylaktickou reakcí a skupinou pacientů s alergií?

11 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Pro praktickou část byli vybráni pacienti ambulance Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň, u kterých bylo za posledních 5 let provedeno vyšetření pro diagnostiku alergie na hmyzí jed. Z celkového počtu 1557 pacientů prodělalo po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci 265 pacientů, z toho bylo 144 žen a 121 mužů. Průměrný věk pacientů s anafylaktickou reakcí byl 48 let. K této skupině byla vytvořena kontrolní skupina tvořená pacienty, u kterých došlo po bodnutí hmyzem k alergické reakci. Pacientů s alergickou reakcí po bodnutí hmyzem bylo 106, z toho bylo 65 žen a 41 mužů. Průměrný věk pacientů s alergickou reakcí byl 54 let. Veškerá získaná data byla anonymizovaná.

12 METODIKA PRÁCE

Koncentrace alergen specifických protilátek IgE se měří pomocí systému ImmunoCAP 250 a pomocí systému Immulite 2000 XPI. Jedná se o *in vitro* metody, které slouží jako podpůrné metody pro klinickou diagnostiku alergických onemocnění způsobených IgE protilátkami.

12.1 ImmunoCAP 250

12.1.1 Princip metody

Jedná se o vysokoafinní fluorescenční enzymatickou imunoanalýzu. Stanovovaný alergen je kovalentně navázaný na ImmunoCAP a reaguje s IgE protilátkami ve vzorku séra pacienta. Po vymytí nespecifických IgE protilátek a následném přidání značené protilátky proti IgE vzniká komplex, který se inkubuje s vyvíjejícím roztokem. Po přidání zastavovacího roztoku se reakce ukončí a komplex je uvolněn do roztoku. Následně se měří fluorescence eluátu, přičemž mohutnost fluorescence je přímo úměrná koncentraci specifických IgE protilátek ve vzorku séra. Pro vyhodnocení testu je mohutnost fluorescence převedena na koncentraci pomocí kalibrační křivky. (Phadia AB, 2018; SOPV/ÚIA/017/06, 2020)

12.1.2 Přístrojové vybavení a materiál

Automatický analyzátor UNICAP 250 a příslušná příručka uživatele.

Reagencie

- ImmunoCAP Specific IgE Conjugate – konjugát s myší monoklonální protilátkou
- ImmunoCAP Specific Curve Control – lidské IgE v pufru
- ImmunoCAP Specific IgE Calibrators – lidské IgE v pufru
- Specific IgE Anti-IgE ImmunoCAP – myší monoklonální protilátky
- Development Kit – vyvíjející roztok s konzervačním činidlem
- ImmunoCAP Stop solution (stop roztok) – 4 % vodný roztok uhličitanu sodného
- Allergen ImmunoCAP Carriers – zásobníky se 16 nebo 10 ImmunoCAPy pro jednotlivé alergeny nebo smíšené alergikové panely
- UniCAP System Washing Solution (promývací roztok)
- ImmunoCAP Specific IgE Control – kontrola s Anti-IgE

- Destilovaná nebo deionizovaná voda (Phadia AB, 2018; SOPV/ÚIA/017/06, 2020)

12.1.3 Biologický materiál

Sérum ze srážlivé plné krve odebrané v rozmezí 2-3 týdnů až 6 měsíců po bodnutí hmyzem. K analýze na analyzátoru UNICAP 250 se používají alikvotací připravené vzorky, které jsou skladovány při -20°C. (Phadia AB, 2018; SOPV/ÚIA/017/06, 2020)

12.1.4 Postup

Nejprve se zapne analyzátor UNICAP 250. Připraví se promývací roztok a vyndají se všechny potřebné reagentie z lednice. Do nosiče zkumavek se umístí alikvoty pacientských vzorků opatřené barcodem a nosič se vloží do analyzátoru. Následně se zvolí metoda sIgE. Po přetažení všech požadavků z LIS se do analyzátoru vloží všechny potřebné reagentie a roztoky a spustí se analýza. Po skončení analýzy jsou výsledky exportovány do LIS a přiřazeny pacientům.

12.2 Immulite 2000 XPi

12.2.1 Princip metody

Jedná se o dvoukrokovou chemiluminiscenční imunochemickou reakci v pevné fázi za využití kinetiky kapalně fáze na pevné fázi. Pevnou fázi představuje kulička, na jejímž povrchu se nachází antiligand. Kapalná fáze se skládá z alkalické fosfatázy konjugované s monoklonální protilátkou proti lidskému IgE v sérové pufové matrici. V prvním kroku dochází k inkubaci patientského vzorku a specifického alergenu značeného ligandem spolu s kuličkou. Specifický IgE ve vzorku se naváže na ligandem značený alergen, který se naváže na antiligand přítomný na kuličce. Centrifugačním mytím je odstraněn nenavázaný vzorek. V druhém kroku se přidá do reakční zkumavky s enzymem konjugovaná protilátka proti lidskému IgE a inkubuje se. Během inkubace dojde k navázání s enzymem konjugované monoklonální protilátky proti lidskému IgE na imobilizovaný IgE. Centrifugačním mytím je odstraněn nenavázaný enzymový konjugát. Po přidání substrátu do reakční zkumavky s kuličkou vznikne nestabilní produkt. Tento nestabilní produkt se rozpadá a dojde k vyzáření fotonu, jehož množství je detekováno luminometrem. Množství fotonů je přímo úměrné množství enzymového konjugátu navázaného na kuličce. (Siemens, 2017; SOPV/ÚIA/016/04, 2018)

12.2.2 Přístrojové vybavení a materiál

Automatický analyzátor IMMULITE 2000 XPi a příslušná příručka uživatele.

Diagnostická souprava 3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit

- Specifické IgE zásobník s kuličkami
- Specifické IgE reagentie – alkalická fosfatáza konjugovaná s monoklonální vyšší protilátkou proti lidskému IgE v humánní/nehumánní sérové pufové matrici
- Specifické IgE kalibrátory (adjustory) – dvě ampulky s vysokou a nízkou koncentrací lidského IgE v nehumánní sérové matrici s konzervačním prostředkem
- Specifické IgE protilátka proti kalibrátoru – kapalina s ligandem značenou polyklonální kozí protilátkou proti lidskému IgE s konzervačním prostředkem
- Specifické IgE kontroly z univerzální soupravy – lidské IgE v nehumánní sérové matrici s konzervačním prostředkem
- Specifické IgE protilátka proti kontrole – kapalina s ligandem značenou polyklonální kozí protilátkou proti IgE s konzervačním prostředkem

Materiál dodávaný zvlášť

- 3gAllergy™ Specifické alergeny a smíšené panely alergenů
- Alergen specifické IgE kontroly na bázi lidského séra
- Chemiluminiscenční substrát
- Promývací roztok
- Čistící roztok na jehly
- Reakční zkumavky (jednorázové)
- Zásobník s alergeny (s čárovým kódem)
- Septa zkumavek na alergeny (Siemens, 2017; SOPV/ÚIA/016/04, 2018)

12.2.3 Biologický materiál

Sérum ze srážlivé plné krve. (Siemens, 2017; SOPV/ÚIA/016/04, 2018)

12.2.4 Postup

Před vlastní analýzou se nejprve provede denní údržba analyzátoru Immulite 2000 XPi a kontrola množství reagentů včetně spotřebního materiálu v analyzátoru. Následně se provede měření kontrolních materiálů, jejichž hodnoty se musí pohybovat v rozmezí, které udává výrobce. Do nosiče zkumavek se vloží zkumavky s patientskými vzorky, které jsou opatřené barcodem. Po vložení nosiče se zkumavkami do analyzátoru dojde k přetažení

požadavků z LIS. Analyzátor automaticky provede analýzu vzorků a po ukončení analýzy jsou výsledky exportovány do LIS a přiřazeny pacientům.

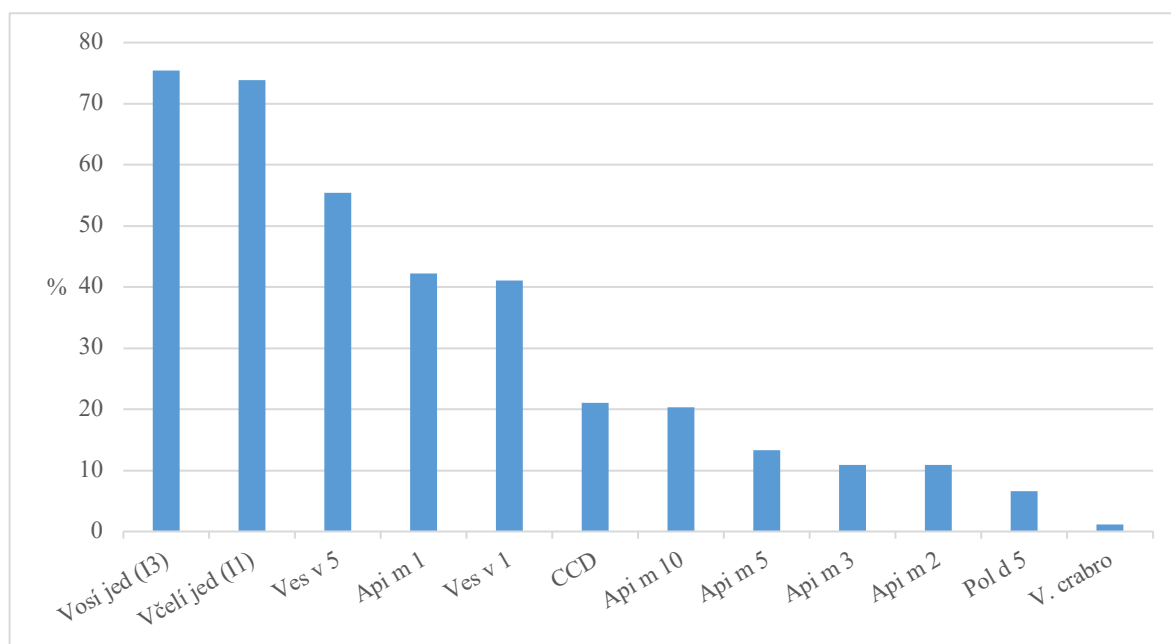
13 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Ze souboru dat byla vyfiltrována skupina pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem. Byl vytvořen senzibilizační profil a zároveň byly určeny nejvíce zastoupené alergeny. Za pozitivní výsledky byly považovány hodnoty vyšší než 0,35 kIU/L.

K výše uvedené skupině pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem byla ze souboru dat vyfiltrována kontrolní skupina, tj. pacienti, kteří vykazovali po bodnutí hmyzem alergii. Byla vytvořena tabulka obsahující hladiny jednotlivých alergenů pro skupinu s anafylaktickou reakcí a pro skupinu s alergií. V programu R byly vytvořeny grafy typu boxplot. Zároveň byly na základě hodnot ve vytvořené tabulce vypočítány mediány pro jednotlivé alergeny u obou skupin a dále rozdíl mediánů skupiny s anafylaktickou reakcí a skupiny s alergií. Pomocí Wilcoxonova testu byla nakonec vyhodnocena statistická významnost.

13.1 Senzibilizační profily pacientů

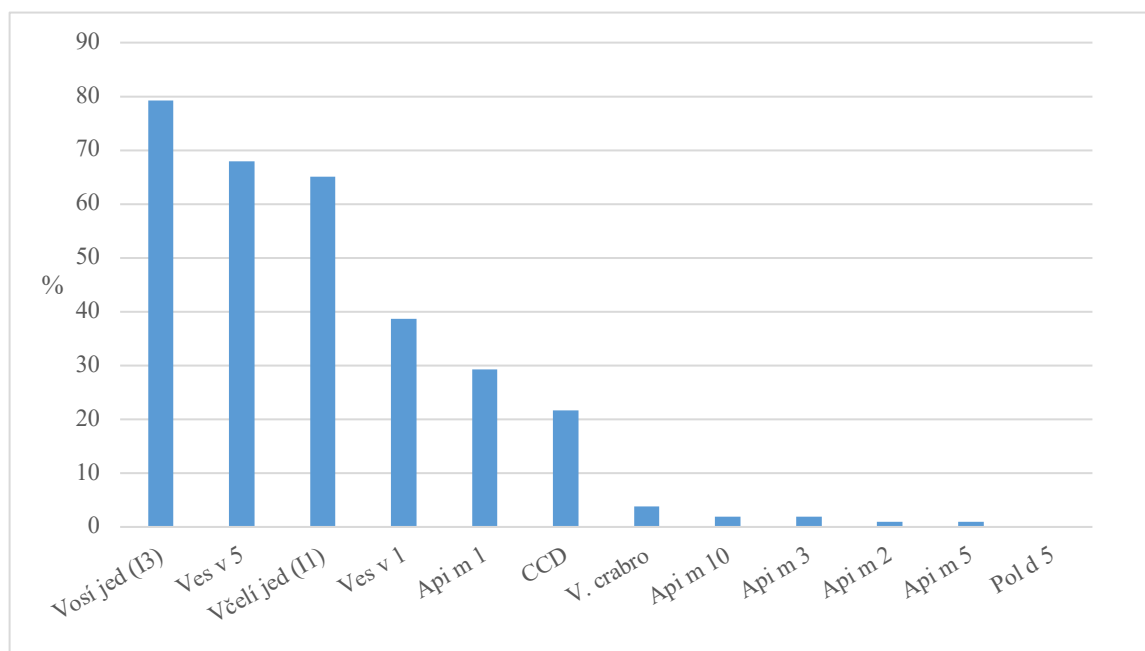
Graf 1 Senzibilizační profil u pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem



Zdroj Vlastní

Anafylaktickou reakci po bodnutí hmyzem vykazovalo celkem 265 pacientů. Nejvíce pacientů bylo senzibilizovaných vosím jedem (75 %) a včelím jedem (74 %). Jako třetí nejvíce zastoupený alergen u pacientů vykazujících anafylaktickou reakci byl alergen Ves v 5 (55 %).

Graf 2 Senzibilizační profil u pacientů s alergií po bodnutí hmyzem

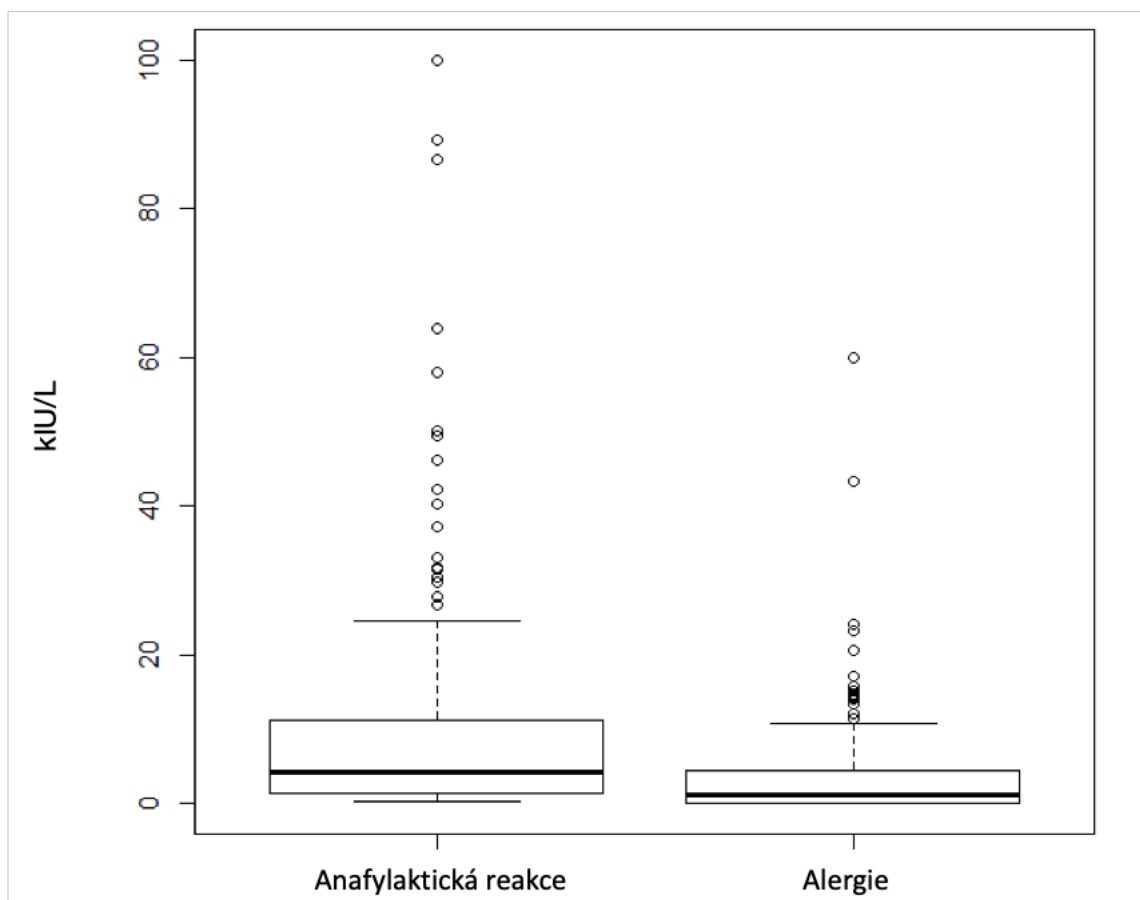


Zdroj Vlastní

Alergickou reakci po bodnutí hmyzem vykazovalo celkem 106 pacientů. Nejvíce pacientů bylo senzibilizovaných vosím jedem (79 %). Druhým nejvíce zastoupeným alergenem byl Ves v 5 (68 %) a jako třetí nejvíce zastoupený alergen u pacientů s alergií byl včelí jed (65 %).

13.2 Hladiny alergenů

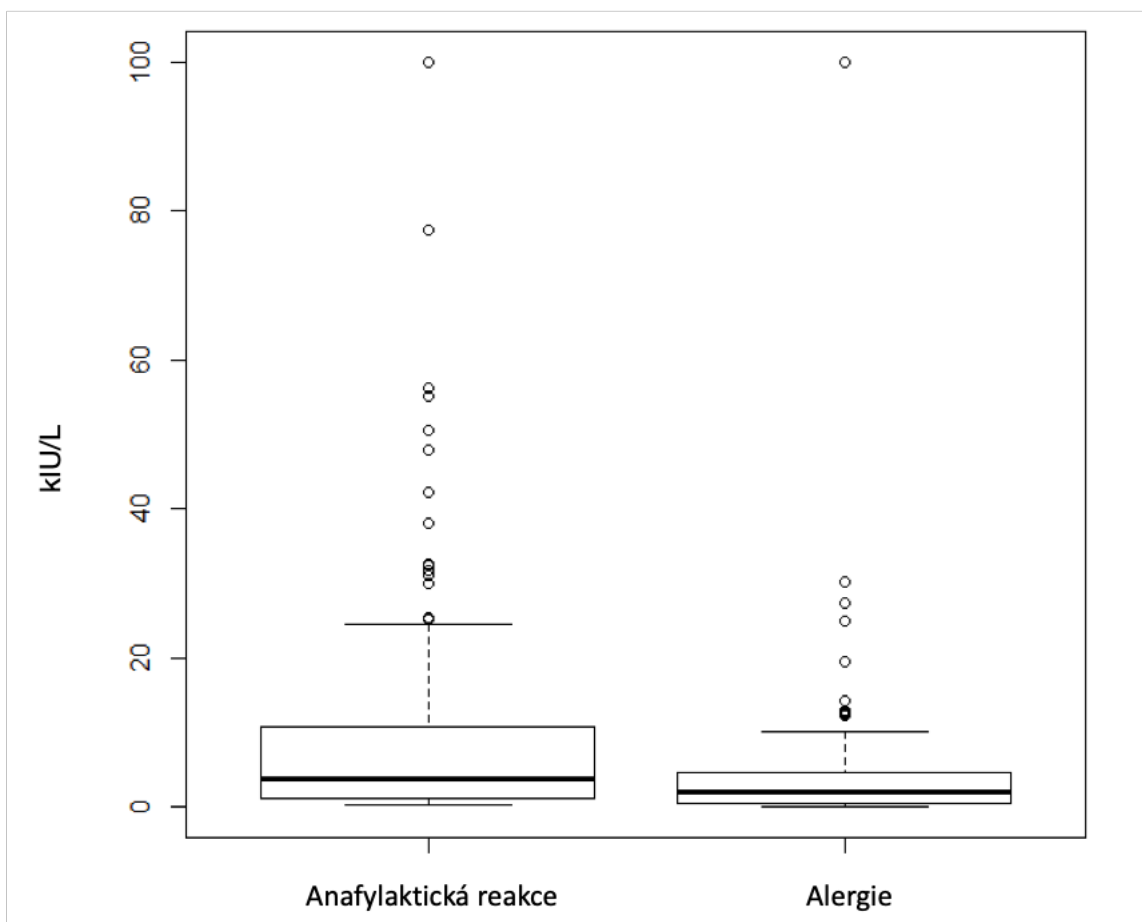
Graf 3 Stanovení hladiny alergenu včelího jedu



Zdroj Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 3 zobrazuje mediány hladin alergenu včelího jedu u skupiny pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a u skupiny pacientů s alergií na včelí jed. Medián pro skupinu s anafylaktickou reakcí odpovídá hodnotě 4,14 a medián pro skupinu s alergií odpovídá hodnotě 1,156. Rozdíl mediánů je tedy 2,984. Tento rozdíl je velmi statisticky významný. Statistickou významnost potvrzuje i hodnota-p vypočítaná pomocí Wilcoxonova testu, jejíž hodnota je 4.68×10^{-9} ($p \leq 0,001$).

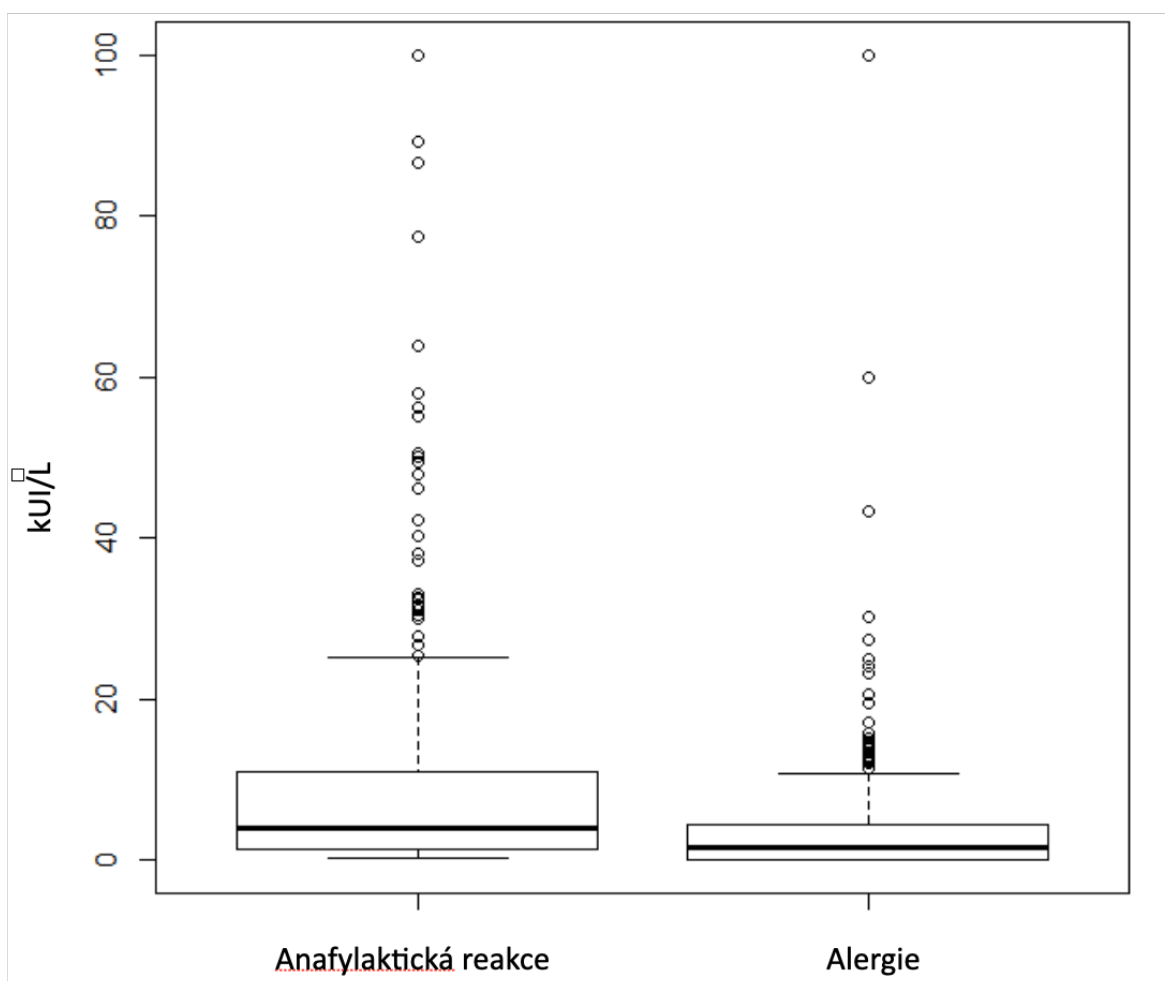
Graf 4 Stanovení alergenu vosího jedu



Zdroj Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 4 zobrazuje mediány hladin alergenu vosího jedu u skupiny pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a u skupiny pacientů s alergií na vosí jed. Medián pro skupinu s anafylaktickou reakcí odpovídá hodnotě 3,73 a medián pro skupinu pacientů s alergií odpovídá hodnotě 1,926. Rozdíl mediánů je tedy 1,804. Tento rozdíl je velmi statisticky významný. Hodnota-p vypočítaná pomocí Wilcoxonova testu je 2.856×10^{-5} ($p \leq 0,001$).

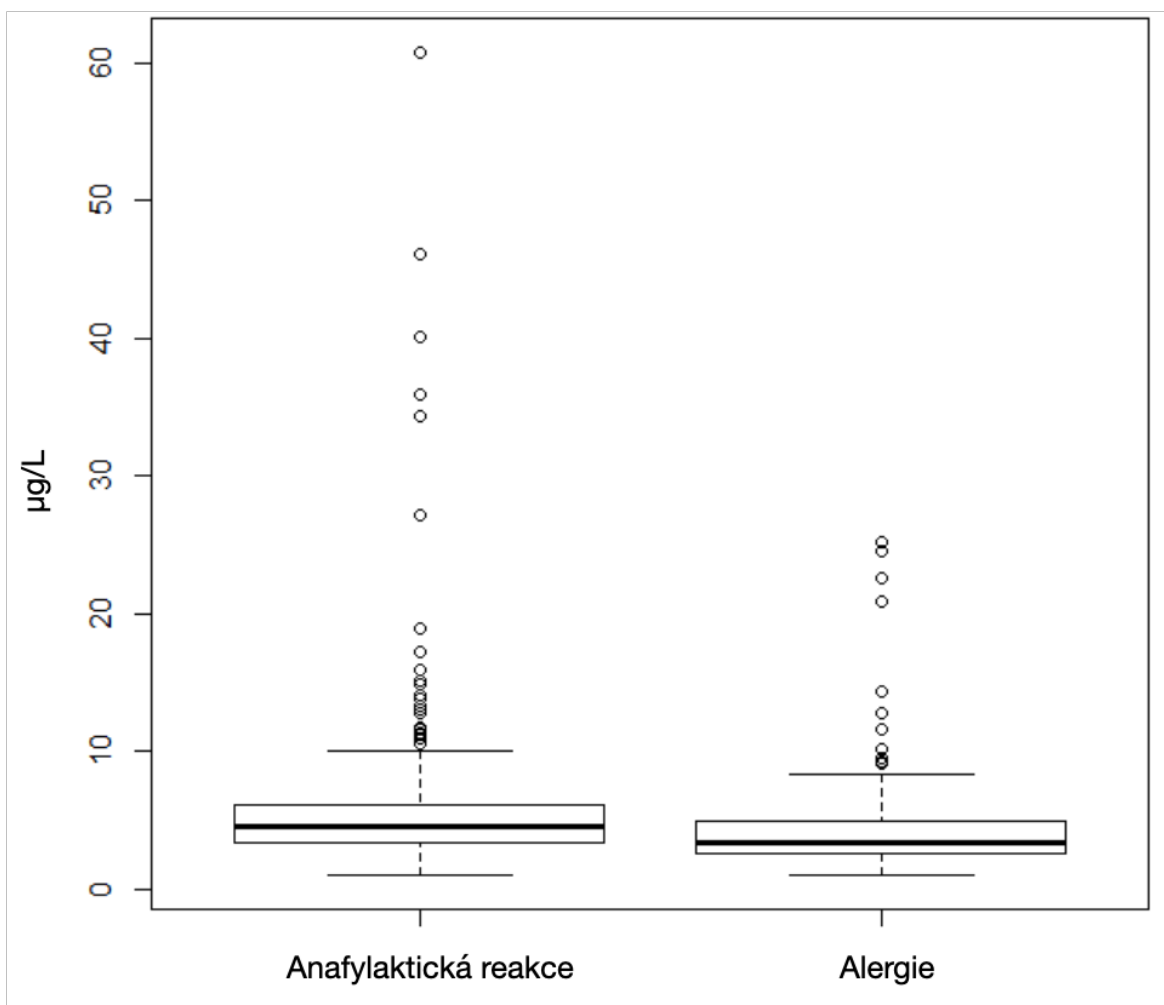
Graf 5 Srovnání hladin hmyzího jedu



Zdroj Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Z grafu 5 je patrné, že hladina alergenu u skupiny pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem je vyšší než u skupiny pacientů s alergií. Medián pro skupinu s anafylaktickou reakcí odpovídá hodnotě 3,985 a medián pro skupinu pacientů s alergií odpovídá hodnotě 1,636. Rozdíl mediánů je tedy 2,349. Tento rozdíl je velmi statisticky významný. Hodnota-p vypočítaná pomocí Wilcoxonova testu je $1,079 \times 10^{-12}$ ($p \leq 0,001$).

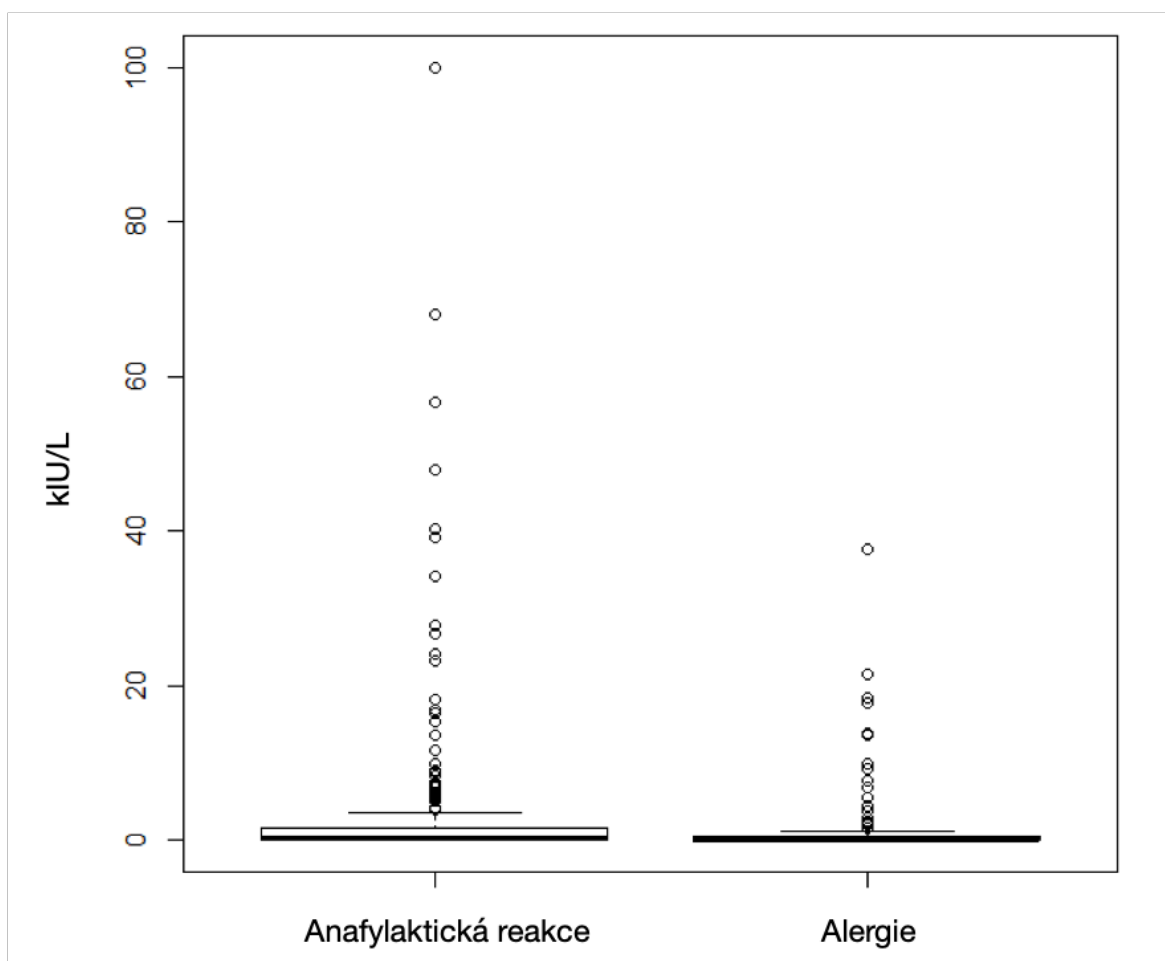
Graf 6 Srovnání hladin tryptázy bez rozdílu druhu hmyziho jedu



Zdroj Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 6 zobrazuje mediány hladin tryptázy u skupiny pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a u skupiny pacientů s alergií. Medián pro skupinu s anafylaktickou reakcí odpovídá hodnotě 4,5 a medián pro skupinu s alergií odpovídá hodnotě 3,45. Rozdíl mediánů je tedy 1,05. Tento rozdíl je velmi statisticky významný. Hodnota-p vypočítaná pomocí Wilcoxonova testu je 0,0002892 ($p \leq 0,001$).

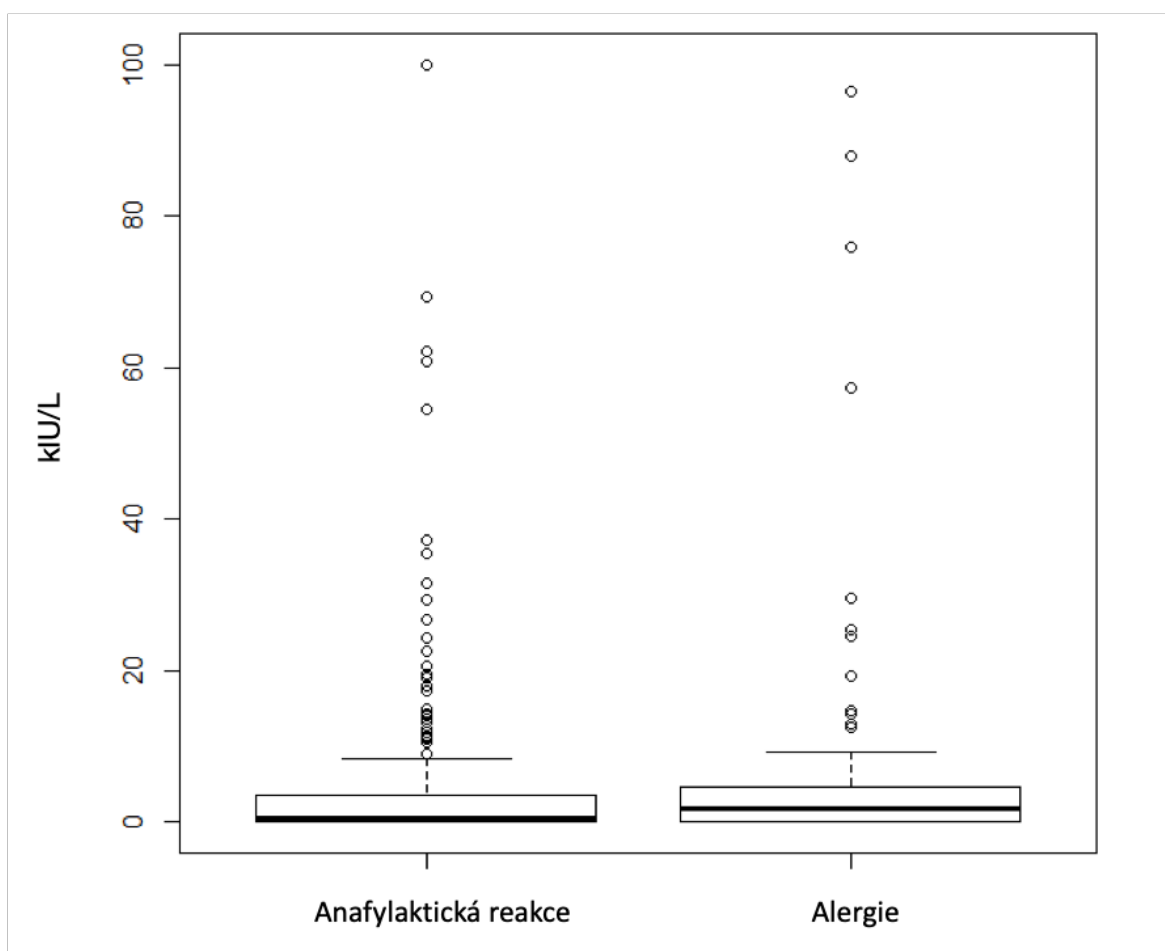
Graf 7 Stanovení hladiny alergenu Api m 1



Zdroj Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 7 zobrazuje mediány alergenu Api m 1 u skupiny pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a u skupiny pacientů s alergií. Medián pro skupinu s anafylaktickou reakcí odpovídá hodnotě 0,18 a medián pro skupinu s alergií odpovídá hodnotě 0. Rozdíl mediánů je tedy 0,18. Tento rozdíl je velmi statisticky významný. Hodnota-p vypočítaná pomocí Wilcoxonova testu je 9.291×10^{-7} ($p \leq 0,001$).

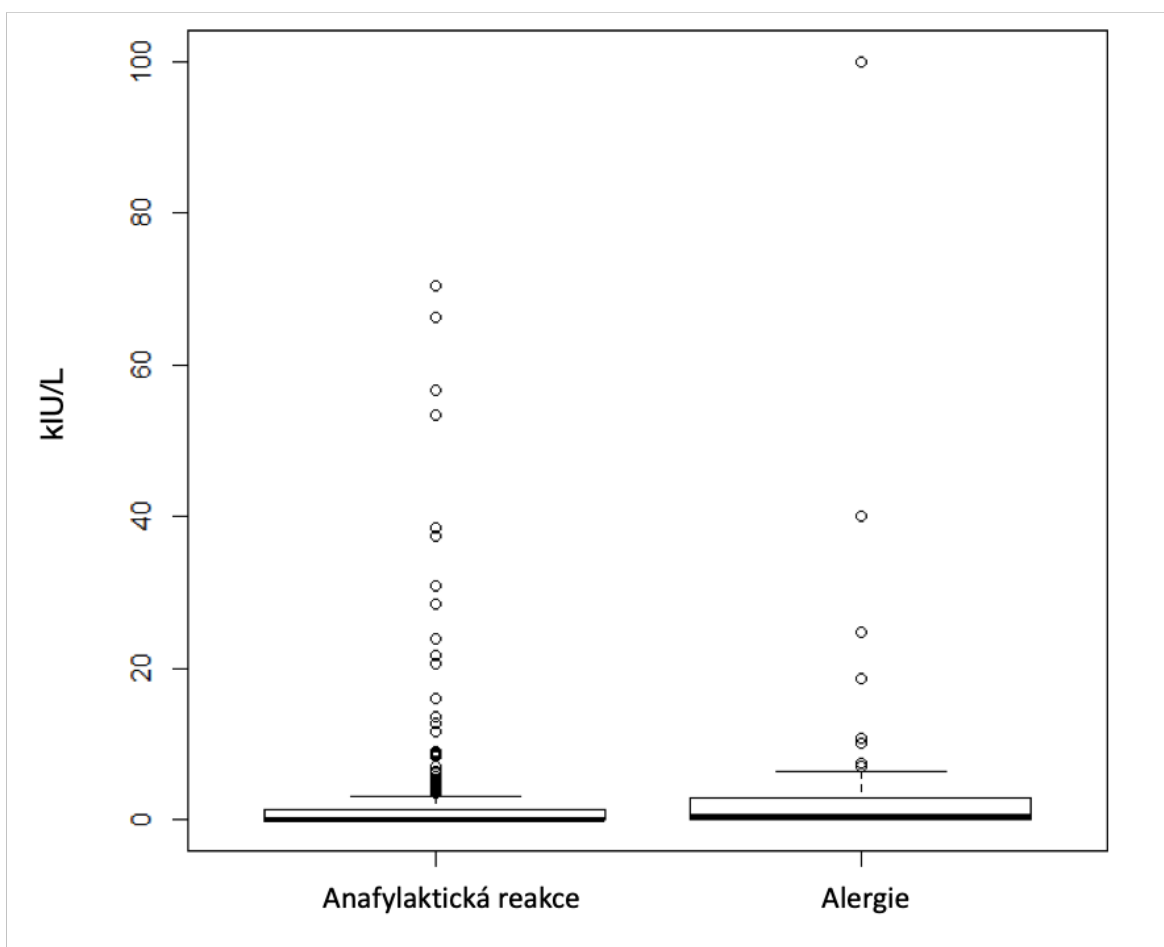
Graf 8 Stanovení hladiny alergenu Ves v 5



Zdroj Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 8 zobrazuje mediány alergenu Ves v 5 u skupiny pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a u skupiny pacientů s alergií. Medián pro skupinu s anafylaktickou reakcí odpovídá hodnotě 0,465 a medián pro skupinu s alergií odpovídá hodnotě 1,87. Rozdíl mediánů je tedy -1,405. Tento rozdíl je statisticky nevýznamný. Hodnota-p vypočítaná pomocí Wilcoxonova testu je 0,1855 ($p > 0,05$).

Graf 9 Stanovení hladiny alergenu Ves v 1



Zdroj Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 9 zobrazuje mediány alergenu Ves v 5 u skupiny pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a u skupiny pacientů s alergií. Medián pro skupinu s anafylaktickou reakcí odpovídá hodnotě 0,16 a medián pro skupinu s alergií odpovídá hodnotě 0,461. Rozdíl mediánů je tedy -0,301. Tento rozdíl je statisticky nevýznamný. Hodnota-p vypočítaná pomocí Wilcoxonova testu je 0,7374 ($p > 0,05$).

DISKUZE

Cílem této kvalifikační práce bylo porovnat rozdíly hladin sIgE u včely, popř. vosy, mezi skupinou pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a skupinou pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem alergickou reakci. Dále byla u těchto dvou skupin pacientů porovnána hladina tryptázy.

Na základě výsledků vyšetření vybrané skupiny pacientů byl vytvořen senzibilizační profil pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem a senzibilizační profil pacientů s alergií po bodnutí hmyzem. Ze senzibilizačních profilů je patrné, že u obou skupin pacientů převažuje senzibilizace vosím jedem. U skupiny pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem bylo senzibilizováno vosím jedem 75 % pacientů a u skupiny pacientů s alergií po bodnutí hmyzem bylo vosím jedem senzibilizováno 79 % pacientů.

U skupiny pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem bylo na včelí jed senzibilizováno 74 % pacientů, tzn. přibližně stejný počet pacientů jako u senzibilizace vosím jedem. U skupiny pacientů s alergií po bodnutí hmyzem vykazovalo pozitivitu na včelí jed pouze 65 % pacientů. Tyto výsledky tedy vypovídají o větší míře nebezpečnosti vosího jedu, stejně jako uvádí Ruëff (2009).

Mezi tři nejčastěji zastoupené alergeny u obou skupin pacientů můžeme na základě námi vytvořených senzibilizačních profilů zařadit alergen Ves v 5. Na alergen Ves v 5 bylo senzibilizováno 55 % pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a 68 % pacientů s alergií po bodnutí hmyzem.

Dále bylo v rámci praktické části provedeno srovnání hladin včelího jedu, vosího jedu, tryptázy a také alergenů Api m 1, Ves v 5 a Ves v 1, a to mezi skupinami pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci a pacientů s alergií po bodnutí hmyzem.

U pacientů vykazujících anafylaktickou reakci po bodnutí hmyzem je vyšší hladina alergenu včelího i vosího jedu, než je tomu u skupiny pacientů s alergií po bodnutí hmyzem. Hladina hmyzího jedu je vyšší u skupiny pacientů vykazujících anafylaktickou reakci po bodnutí hmyzem než u skupiny pacientů s alergií po bodnutí hmyzem a není přitom podstatné, jestli se jedná o jed včelí či jed vosí. Zatím není k dispozici žádná studie, která by potvrdovala korelaci mezi vyšší hladinou hmyzího jedu a anafylaktickou reakcí. Bylo by vhodné se v budoucnu této otázce věnovat.

Za důležitý marker je obecně považována tryptáza. Její zvýšená hladina souvisí se vznikem častějších a závažnějších systémových reakcí, jak uvádí Vos (2017) a Sturm (2019). Naše výsledky ukazují, že mezi hladinami tryptázy u skupiny pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem a u skupiny pacientů s alergií po bodnutí hmyzem není velký rozdíl, jak by se mohlo očekávat. Ke stejnému zjištění vedla i studie Tripolta (2020).

Rozdíl hladin jednotlivých alergenů u porovnávaných skupin pacientů můžeme považovat za nízký. Příslušná statistická významnost je ovlivněna počtem pacientů. Z důvodu nízkých rozdílů hladin alergenů nelze jednoznačně definovat prahovou hodnotu mezi anafylaktickou reakcí a alergickou reakcí. Z tohoto důvodu není stanovení sIgE vhodnou metodou pro rozlišení anafylaktické reakce a alergie. (Tripolt, 2020)

Hladina hlavního alergenu včelího jedu Api m 1 je vyšší u skupiny pacientů s anafylaktickou reakcí po bodnutí hmyzem než u skupiny pacientů s alergií. Hladiny alergenu Api m 1 jsou ale velmi nízké. To může být způsobeno nízkou citlivostí sIgE na Api m 1, což může vést k diagnostickým problémům. (Arzt, 2017)

Určitou odlišnost od předchozích alergenů můžeme pozorovat u alergenů Ves v 5 a Ves v 1. Hladiny těchto dvou alergenů jsou na rozdíl od výše zmiňovaných alergenů vyšší u skupiny pacientů s alergií po bodnutí hmyzem než u skupiny pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci. Tato skutečnost by mohla být způsobena nedostatečným zastoupením Ves v 5 v extraktu jedu, ale také neúčinná vazba Ves v 5 na pevnou fázi testu či maskování epitopů alergenu specifickými ligandy přítomnými v extraktu přírodního jedu, jak uvádí Ollert (2015). Nižší hladiny alergenu Ves v 5 a Ves v 1 mohou být ovlivněny mírou exprese receptoru $Fc\epsilon RI$. Pokud je $Fc\epsilon RI$ receptor více exprimován, dochází k vyššímu vychytávání sIgE, což způsobuje nižší koncentraci alergenu v periferní krvi pacienta.

Na základě výsledků statistického vyhodnocení analyzovaných dat je vhodné v rámci diagnostiky alergie na jed blanokřídlého hmyzu pokračovat ve sledování hladin včelího jedu, vosího jedu, tryptázy a Api m 1 a rozšiřování stávajících diagnostických panelů o další alergeny. Pro nižší citlivost sIgE na Api m 1 by bylo možné uvažovat o snížení hodnoty pro pozitivitu alergenu pod 0,35 kIU/L, jak doporučuje např. Arzt (2017).

ZÁVĚR

Tato kvalifikační práce se zabývala problematikou alergie na jed blanokřídlého hmyzu a byla zaměřena na porovnání hladin hmyzího jedu u pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci, popř. alergii.

V teoretické části je popsáno složení jedů nejvýznamnějších zástupců blanokřídlého hmyzu, klinické projevy, rizikové faktory či diagnostika. Praktická část je zaměřena na diagnostiku alergie na jed blanokřídlého hmyzu, konkrétně se jedná o molekulární diagnostiku na jed včely a vosy pomocí metody ImmunoCAP 250 a Immulite 2000 XPI. Na základě retrospektivní analýzy výsledků vyšetření vybrané skupiny pacientů ambulance Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň bylo provedeno grafické a statistické zhodnocení dat.

Cíl a úkoly práce byly splněny a všechny výzkumné otázky zodpovězeny. Byly vytvořeny senzibilizační profily pro skupinu pacientů vykazujících po bodnutí hmyzem anafylaktickou reakci, popř. alergii, dále byly stanoveny a porovnány hladiny jednotlivých alergenů a tryptázy.

Pro praxi lze doporučit rozšiřování diagnostických panelů pro zvýšení přesnosti diagnostiky alergie na hmyzí jed a z důvodu nižší citlivosti sIgE na Api m 1 můžeme zvážit snížení hodnoty alergenu pro pozitivitu pod 0,35 kIU/L. Zároveň by mohlo být přínosem sledovat korelaci mezi zvýšenou hladinou hmyzího jedu a vznikem anafylaktické reakce.

SEZNAM LITERATURY

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

GOLDEN, David B.K. Chapter 15 - Insect Allergy. *Middleton's Allergy Essentials* [online]. Elsevier, 2017, 377-393 [cit. 2021-03-13]. ISBN 9780323375795. DOI: 10.1016/B978-0-323-37579-5.00015-5

JAKOB, T., S. BLANK a E. SPILLNER. Benefits and Limitations of Recombinant Allergens in Diagnostics of Insect Venom Allergy. KLEINE-TEBBE, Jörg a Thilo JAKOB, ed. *Molecular Allergy Diagnostics* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-05-09, s. 341-362 [cit. 2021-03-28]. ISBN 978-3-319-42498-9. DOI:10.1007/978-3-319-42499-6_18

VOS, Byrthe. Hymenoptera venom allergy: Challenges in diagnosis and treatment [online]. Groningen, 2017 [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <https://research.rug.nl/en/publications/hymenoptera-venom-allergy-challenges-in-diagnosis-and-treatment>. Diplomová práce. University of Groningen.

ARZT, L., D. BOKANOVIC, C. SCHRAUTZER, I. SCHWARZ, K. LAIPOLD, W. ABERER a G. J. STURM. Questionable diagnostic benefit of the commercially available panel of bee venom components. *Allergy* [online]. 2017, **72**(9), 1419-1422 [cit. 2021-03-28]. ISSN 01054538. DOI: 10.1111/all.13154

BILO, B. M., F. RUEFF, H. MOSBECH, F. BONIFAZI a J. N. G. OUDE-ELBERINK. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* [online]. 2005, **60**(11), 1339-1349 [cit. 2021-03-13]. ISSN 0105-4538. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00963.x

BLANK, S., M. B. BILÒ a M. OLLERT. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: Important steps towards precision medicine. *Clinical & Experimental Allergy* [online]. 2018, **48**(4), 354-364 [cit. 2021-03-13]. ISSN 09547894. DOI: 10.1111/cea.13090

BONIFAZI, F., M. JUTEL, B. M. BILO, J. BIRNBAUM a U. MULLER. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy* [online].

2005, **60**(12), 1459-1470 [cit. 2021-03-28]. ISSN 0105-4538. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00960.x

BYSTRONĚ, Jaromír. Alergenová imunoterapie. *Remedia* [online]. 2012, **22**(4), 264-268 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Alergenova-imunoterapie/6-F-1kq.magarticle.aspx>

HOFFMAN, Donald R. Hymenoptera Venom Allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* [online]. 2006, **30**(2), 109-128 [cit. 2021-03-13]. ISSN 1080-0549. DOI: 10.1385/CRIAI:30:2:109

INCORVAIA, Cristoforo, Mona AL-AHMAD, Ignacio J. ANSOTEGUI, et al. Personalized medicine for allergy treatment: Allergen immunotherapy still a unique and unmatched model. *Allergy* [online]. 2020, [cit. 2021-03-28]. ISSN 0105-4538. DOI: 10.1111/all.14575

JAKOB, Thilo, Michèle Myriam RAUBER, Amilcar PEREZ-RIVEROL, Edzard SPILLNER a Simon BLANK. The Honeybee Venom Major Allergen Api m 10 (Icarapin) and Its Role in Diagnostics and Treatment of Hymenoptera Venom Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports* [online]. 2020, **20**(9) [cit. 2021-03-13]. ISSN 1529-7322. DOI:10.1007/s11882-020-00943-3

KRISHNA, M. T., P. W. EWAN, L. DIWAKAR, S. R. DURHAM, A. J. FREW, S. C. LEECH a S. M. NASSER. Diagnosis and management of hymenoptera venom allergy: British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI) guidelines. *Clinical & Experimental Allergy* [online]. 2011, **41**(9), 1201-1220 [cit. 2021-03-13]. ISSN 09547894. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03788.x

MATRICARDI, P. M., J. KLEINE-TEBBE, H. J. HOFFMANN, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology* [online]. 2016, **27**(23), 1-250 [cit. 2021-03-13]. ISSN 09056157. DOI: 10.1111/pai.12563

OLLERT, Markus a Simon BLANK. Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics. *Current Allergy and Asthma Reports* [online]. 2015, **15**(5) [cit. 2021-03-28]. ISSN 1529-7322. DOI: 10.1007/s11882-015-0527-z

ROOF, Jennifer. Formicidae. *Animal Diversity Web* [online]. University of Michigan, 2001 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: <https://animaldiversity.org/accounts/Formicidae/>

RUĚFF, Franziska, Bernhard PRZYBILLA, Maria Beatrice BILÓ, 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2009, **124**(5), 1047-1054 [cit. 2021-03-28]. ISSN 00916749. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.08.027

STURM, G. J., E-M. VARGA, G. ROBERTS, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy* [online]. 2018, **73**(4), 744-764 [cit. 2021-03-13]. ISSN 01054538. DOI: 10.1111/all.13262

STURM, G. J., L. ARZT-GRADWOHL a E-M. VARGA. Medical Algorithms: Diagnosis and treatment of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* [online]. 2019, **74**(10), 2016-2018 [cit. 2021-03-13]. ISSN 0105-4538. DOI: 10.1111/all.13817

TRIPOLT, P., L. ARZT-GRADWOHL, U. ČERPES, K. LAIPOLD, et al. Large local reactions and systemic reactions to insect stings: Similarities and differences. *PLOS ONE* [online]. 2020, **15**(4) [cit. 2021-03-13]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0231747

VACHOVÁ, Martina. Alergie na včelí a vosí jed. *Remedia* [online]. 2020, **30**(1), 1-3 [cit. 2021-03-13]. Dostupné z: https://uia.fnplzen.cz/sites//users/uia2/Alergie%20na%20vceli%20a%20vosi%20jed_0.pdf

VACHOVÁ, Martina a Petr PANZNER. Diagnostika alergie na jed Hymenopter. *Alergie* [online]. 2017, (3), 165-171 [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <https://uia.fnplzen.cz/sites//users/uia/Diagnostika%20alergie%20na%20jed%20Hymenopter.pdf>

PETRŮ, Vít. Specifická alergenová imunoterapie u alergií a astmatu. *Medicina pro praxi* [online]. 2011, **8**(10), 407-409 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: <https://www.medicina-propraxi.cz/pdfs/med/2011/10/02.pdf>

ZAHIROVIĆ, Abida, Jernej LUZAR, Peter MOLEK, Nika KRULJEC a Mojca LUNDER. Bee Venom Immunotherapy: Current Status and Future Directions. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* [online]. 2020, **58**(3), 326-341 [cit. 2021-03-28]. ISSN 1080-0549. DOI: 10.1007/s12016-019-08752-x

PHADIA AB. *ImmunoCAP Specific IgE: Directions for use*. Uppsala, Sweden: Phadia AB, 2018.

SIEMENS. *Immulite 2000 3gAllergy: Specific IgE Universal Kit*. United Kingdom: Siemens Healthcare Diagnostics, 2017.

SOPV/ÚIA/016/04. *Specifické IgE/Dermatophagoides pteronyssinus*. Plzeň: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň, 2018.

SOPV/ÚIA/017/06. *SIgE proti: včela medonosná*. Plzeň: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň, 2020.

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHY