

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Tereza Peřinová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**ZMĚNY V HODNOTÁCH TESTU BAZOFILŮ V PRŮBĚHU
SPECIFICKÉ IMUNOTERAPIE NA JED BLANOKŘÍDLÉHO HMYZU**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Jitka Ochočná

PLZEŇ 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsou bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 29. 3. 2016

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji Mgr. Jitce Ochočné za odborné vedení diplomové práce a cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Dále děkuji Ing. Tomáši Vlasovi za poskytování cených odborných rad, podnětů a materiálních podkladů.

Anotace

Příjmení a jméno: Peřinová Tereza

Katedra: Teoretických oborů

Název práce: Změny v hodnotách testu bazofilů v průběhu specifické imunoterapie na jed blanokřídlého hmyzu

Vedoucí práce: Mgr. Jitka Ochotná

Počet stran – číslované: 36

Počet stran – nečíslované: 18

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 28

Klíčová slova: alergie na jed blanokřídlého hmyzu, specifická imunoterapie, test aktivace bazofilů, bazotest

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá změnami v hodnotách testu bazofilů v průběhu specifické imunoterapie na jed blanokřídlého hmyzu. Práce se skládá ze dvou hlavních částí, teoretické a praktické. Teoretická část se zabývá alergií na jed blanokřídlého hmyzu, její patogenezi, klinickými reakcemi, diagnostikou a léčbou. Praktická část se zaměřuje na statistické zpracování dat a metodu, kterou jsme tyto data získali. Výsledky práce jsou zobrazeny v tabulkách a grafech. Pro zpracování této práce byla použita odborná literatura. Tato práce může položit základ pro zhodnocení účinnosti specifické imunoterapie.

Annotation:

Surname and name: Tereza Peřinová

Department: Theoretical Fields

Title of thesis: Changes in test values basophils during specific immunotherapy for Hymenoptera venom

Consultant: Mgr. Jitka Ochoťná

Number of pages – numbered: 36

Number of pages – unnumbered: 18

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 28

Key words: allergy to Hymenoptera venom, specific immunotherapy, basophil activation test, bazotest

Summary:

This bachelor thesis deals with changes in test values basophils during specific immunotherapy for Hymenoptera venom. The work consists of two main parts, theoretical and practical. The theoretical part deals with allergy to Hymenoptera venom, pathogenesis, clinical reactions, diagnosis and treatment. The practical part focuses on statistical processing of data and the method by which these data are obtained. The results are shown in tables and graphs. For preparation of this work were used literature. This work may lay the groundwork to evaluate the efficacy of specific immunotherapy.

Obsah

Úvod.....	12
Teoretická část.....	13
1.0 Alergie na jed blanokřídlého hmyzu	13
2.0 Patogeneze onemocnění	13
2.1 Toxická reakce.....	13
2.2 Imunopatologická reakce závislá na IgE.....	14
2.3 Imunopatologická reakce nezávislá na IgE.....	14
3.0 Klinické projevy alergie na jed blanokřídlého hmyzu	14
3.1 Závažnost reakce.....	14
3.1.1 Normální reakce	14
3.1.2 Alergická reakce.....	14
3.2 Anafylaxe	15
4.0 Složení jedu a zkřížená reaktivita.....	16
4.1 Zkřížená reaktivita.....	17
5.0 Diagnostické testy	17
5.1 Anamnéza.....	18
5.2 Kožní testy	19
5.3 Vyšetření specifických IgE protilátek k extraktům včelího a vosího jedu 19	
5.4 Diagnostika pomocí složek alergenů	19
5.5 Test aktivace bazofilů	20
5.5.1 Vyšetření hladiny tryptázy	20
5.5.2 Bazofily.....	20
5.5.3 Žírné buňky	21
6.0 Léčba	22
6.1 Anafylaxe	22
6.2 Imunoterapie	22
6.2.1 Indikace.....	23
6.2.2 Kontraindikace.....	23
6.2.3 Imunologické mechanismy	23
6.2.4 Výběr alergenu pro imunoterapii	24

6.2.5	Postup	24
6.2.5.1	Fáze vzestupné dávky	24
6.2.5.2	Fáze udržovací dávky	24
6.2.5.3	Ukončení léčby	25
6.2.6	Nežádoucí účinky	25
	Praktická část.....	26
7.0	Cíl.....	26
8.0	Specifická imunoterapie a změny hodnot Bazotestu	26
9.0	Test aktivace bazofilů.....	26
9.1	Varianty testu	27
9.1.1	Metoda BAT	27
9.1.1.1	Aktivační markery.....	28
9.1.2	Metoda CAST	28
9.1.2.1	Metody stanovení.....	28
9.1.3	Alternativní testy aktivace	29
9.2	Úskalí metody BAT	29
9.3	Metodika	29
9.3.1	Monoklonální protilátky.....	29
9.3.1.1	Skladování protilátek.....	30
9.3.2	Alergeny	31
9.3.3	Princip metody.....	31
9.3.4	Provedení testu	32
9.3.5	Referenční rozmezí	32
9.4	Výsledky.....	33
10.0	Statistické hodnocení	36
10.1	Hodnocení alergie na včelí jed pomocí metody test aktivace bazofilů 36	
10.2	Hodnocení alergie na vosí jed pomocí metody test aktivace bazofilů	41
	Diskuze	45
	Závěr	47
	Použité zdroje.....	48
	Seznam zkratk.....	51
	Seznam tabulek.....	52
	Seznam grafů	53

Seznam obrázků	54
----------------------	----

Úvod

Téma "Změny v hodnotách testu bazofilů v průběhu specifické imunoterapie na jed blanokřídlého hmyzu" jsem si vybrala pro svojí bakalářskou práci, protože je to zajímavé téma a zasahuje do oboru imunologie, která mne zaujala.

V bakalářské práci rozebíráme alergii na blanokřídlý hmyz. Mezi blanokřídlý hmyz patří včela, vosa, čmelák a sršeň. Jelikož jed čmeláka je podobný jako jed včely a jed sršně je podobný jako jed vosy, je tato bakalářská práce zaměřena hlavně na alergii na včelí a vosí jed. Toto onemocnění může ohrozit člověka během celého života a je velmi závažné. Včasná diagnostika této alergie a okamžité nastoupení léčby, může člověku s alergií na blanokřídlý hmyz ulehčit život nebo dokonce život zachránit. Reakce na tuto alergii jsou velmi rozmanité, od lehké reakce, až po anafylaktický šok, který ohrožuje pacienta na životě.

Metod vyšetření, zda se opravdu jedná o alergii na blanokřídlý hmyz, je velké množství. Každá z metod má své klady a zápory. Největším problémem všech testů je rozlišení, zda se jedná o alergii na včelí či vosí bodnutí. Toto rozlišení je důležité pro správnou léčbu alergie, aby nedocházelo k zbytečnému nasazení léčby.

Jediná kauzální léčba této alergie je specifická imunoterapie, která trvá 5 let. Po léčbě by měla reakce na hmyzí bodnutí vymizet nebo alespoň dojít k jejímu snížení.

Léčbu alergie na blanokřídlý hmyz sledujeme pomocí vyšetřovacích testů, které hodnotí zda léčba probíhá správně.

Výsledkem mé bakalářské práce bude zhodnocení, zda se v průběhu specifické imunoterapie mění hodnoty testu aktivace bazofilů. Tato práce může sloužit jako základ pro hodnocení účinnosti specifické imunoterapie.

Teoretická část

1.0 Alergie na jed blanokřídlého hmyzu

Alergické choroby jsou v současné době v ekonomicky vyspělých státech nejčastější poruchou imunity. Touto chorobou trpí asi 20% obyvatel a je způsobena abnormální reakcí imunitního systému na běžné antigeny zevního prostředí. Alergie vzniká kombinací vrozených vloh a expozicí příslušného alergenů.

V této bakalářské práci se zaměříme na alergii způsobenou jedem blanokřídlého hmyzu. Hlavními představiteli jsou včela medonosná (*Apis mellifera*), vosy z rodu *Vespula* (*Vespula vulgaris*, *Vespula germanica*), sršeň obecný (*Vespa crabro*) a čmelák (*Bombus*). Alergie na jed blanokřídlého hmyzu se u nás pohybuje okolo 10% nemocných a je častější u dospělých osob než u dětí. Klinické projevy mají široké spektrum, mohou být velmi dramatické, a proto se tato alergie považuje za závažný zdravotní problém. (1; 2; 3; 4; 5)

2.0 Patogeneze onemocnění

Reakce po bodnutí blanokřídlým hmyzem může mít různý charakter od toxické reakce, imunopatologické reakce závislé na IgE, až po imunologickou reakci nezávislou na IgE. (2; 4; 5; 6)

2.1 Toxická reakce

Toxickou reakci způsobují přímo složky jedu. U nealergických jedinců dochází k toxické reakci od určitého počtu bodnutí. U dětí přibližně po 50 bodnutích, u dospělých asi po 100 – 500 bodnutí. U včelího jedu, převážně složka melittin způsobí hemolýzu a následně akutní renální insuficienci. Fosfolipáza porušuje strukturální fosfolipidy buněčných membrán a následuje kontrakce hladkého svalstva, hypotenze a zvýšená vaskulární permeabilita. (2; 6)

2.2 Imunopatologická reakce závislá na IgE

V rozvoji anafylaxe hrají centrální roli aktivované mastocyty a bazofily. Tyto buňky uvolňují ze svých granul vazoaktivní látky, zejména histamin, tryptázu. Dále také metabolity kyseliny arachidonové, které se však vytváří až po aktivaci. Tyto buňky jsou aktivovány pomocí specifických protilátek IgE proti složkám jedu. Jde o tzv. reakci časné přecitlivělosti. (2; 6)

2.3 Imunopatologická reakce nezávislá na IgE

Při imunopatologické reakci nezávislé na IgE uvažujeme nad jinou patogenezi reakce. Může se jednat o účinek různých látek, například formylovaného peptidu na receptorech bazofilů, faktorů odvozených z epitelů a aktivačního faktoru kininů, nebo fybrinolytického systému. Dále se může jednat o účast komplementu, zejména anafylatoxinů C3a a C5a. Také může dojít k alergické reakci s opožděným účinkem, kdy se alergie projeví až po několika dnech. (2; 6)

3.0 Klinické projevy alergie na jed blanokřídlého hmyzu

3.1 Závažnost reakce

Reakce po bodnutí blanokřídlým hmyzem má široké spektrum od normální reakce až po anafylaxi.

3.1.1 Normální reakce

Normální reakce se hodnotí jako bolestivost místa vpichu, podráždění, svědění, zčervenání a otok chvíli po bodnutí, které do několika hodin ustoupí. Tyto reakce nejsou způsobeny alergií, ale hmyzím jedem, který se dostal do těla žihadlem. (1; 2; 3; 5; 6)

3.1.2 Alergická reakce

Alergická reakce se člení do spetkra projevů, od lehké reakce, přes závažnější, až po anafylaxi.

Lehké klinické příznaky se většinou projevují lokálně, ale oproti normální reakci jsou příznaky větší. Jejich projev je nejčastěji na kůži do 4 hodin po bodnutí a spontánně vymizí. (1; 2; 3; 5; 6)

Závažnější reakce se projevují jak na kůži, tak na sliznicích. Mezi příznaky patří rýma, kašel, ztížené dýchání, popřípadě polykaní, bolesti břicha, průjem, zvracení, bolesti hlavy, hučení v uších, závratě a pokles krevního tlaku. (1; 2; 3; 5; 6)

Nejzávažnější reakcí je anafylaktický šok, který se může projevit až ztrátou vědomí, z důvodu poruchy prokrvení CNS. Anafylaktický šok může vést až ke smrti. Léčba musí nastoupit co nejdříve po vzniku obtíží. Podáváme adrenalin (Adrenalin Léčiva inj., Adrenalin 1:1 000 Jenafarm inj.) v dávce 0,2 až 0,5 ml u dospělých a 0,1 ml na 10 kg u dětí do 12 let. Dávku můžeme opakovat podle klinických příznaků každých 10 až 15 minut. Dále podáváme antihistaminikum a glukokortikoidy. Pacient zůstává 24 hodin v nemocnici, kdy sledujeme krevní tlak a zda nenastupuje pozdní fáze alergické reakce. (1; 2; 3; 5; 6)

Charakter projevu alergických reakcí není konstantní. Někdy se střídají velké lokální reakce se systémovými příznaky. Ve 20 až 80% případů se reakce po následujícím bodnutí neprojeví, což může být dáno dávkou jedu nebo spontánním vyhasínáním reaktivity v době bez expozice alergenu. (1; 2; 3; 5; 6)

Dále může docházet k reakcím neobvyklým. Jedná se o heterogenní skupinu symptomů od neurologických po vaskulární. Například sérová nemoc, vaskulitida, nefropatie, reakce při systémové mastocytóze, encefelitida, hepatotoxicita, renální insuficience, renální toxicita a infarkt myokardu. Tyto symptomy mohou mít základ jak imunologický, tak toxický. (1; 2; 3; 5; 6)

3.2 Anafylaxe

Nejčastější příčinou anafylaxe je reakce na potraviny, léky, hmyzí jed, latex, očkovací látky, atd. Mezi nejčastější projevy anafylaxe patří svědění celého těla, kopřivka, celkový otok, potíže s dýcháním, polykáním, mluvením, rychlý pulz, bušení srdce, úzkost, dezorientace, bolesti břicha, průjem, závratě, mdloby až bezvědomí. První příznaky nastupují rychle, ale jsou velmi závažné. Okamžitá pomoc je základem pro záchranu života. Anafylaxe se může rozvinout až do anafylaktického šoku, který se projevuje ztrátou vědomí, křečemi, selháním dýchacího a cévního systému a může skončit až smrtí pacienta. (2; 3; 7)

Tabulka 1 Tabulka klasifikace systémové reakce dle H.L.Müllera

Stupeň	Příznaky
I	generalizovaná urtikarie, 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 dva z následujících: dysartie, 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

Zdroj: Diagnostické postupy u pacientů s alergií na včelí a vosí jed

4.0 Složení jedu a zkřížená reaktivita

Jed blanokřídlého hmyzu se skládá z řady proteinů, peptidů a biogenních aminů, z nichž některé se mohou chovat jako antigeny. Dále také jed obsahuje mnoho nízkomolekulárních látek, jako například histamin, biogenní aminy a lipidy, které vyvolávají v organismu fyziologickou odpověď, ale samy o sobě nejsou imunogenní. (2)

Včelí jed obsahuje řadu látek. Hlavními složkami jedu jsou fosfolipáza A₂, hyaluronidáza a kyselá fosfatáza a dále slabé alergeny jako melittin a alergen C. Melittin ve včelím jedu zvyšuje permeabilitu membrán, hlavně únik draselných iontů z buněk, což vede k následné lýze buněk. Fosfolipáza A₂, která patří do skupiny glykoproteinů, štěpí mastné kyseliny ve fosfolipidech. Hyaluronidáza štěpí mukopolysacharidy a umožňuje průnik aktivních peptidů do tkáně v místě vpichu. Hyaluronidáza se ve včelím jedu vyskytuje jen v malém množství. (2)

Vosí jed, na rozdíl od včelího jedu, obsahuje fosfolipázu A₁, B, hyaluronidázu a antigen 5. Podobné složení jako včelí jed má jed čmeláka, avšak neobsahuje mellittin. Obdobné je to s jedem sršně, který má podobné složení jako vosí jed.

Obsah jedu u různých jedinců stejného druhu blanokřídlého hmyzu je velmi variabilní. Tento fakt může vysvětlovat různou reaktivitu při opakovaném bodnutí blanokřídlým hmyzem. (2)

4.1 Zkřížená reaktivita

U alergie na jed blanokřídlého hmyzu je velmi častá reakce na více než jeden alergen jedu. Zkřížená reaktivita k oběma jedům je pozorována až u 59% vyšetřených pacientů, avšak jejich klinický význam je vzácný. Tyto pacienti obvykle reagují jen na včelí či vosí bodnutí. Zkřížená reaktivita velmi ztěžuje správný výběr jedu pro následnou imunoterapii a proto je snaha najít takovou diagnostickou metodu, která by přesně určila jed vyvolávající alergii u pacienta. Může se jednat buď o polyvalentní senzibilizaci, což je reakce k oběma jedům, nebo o zkříženou reaktivitu mezi proteiny složek jedu. Touto látkou může být například hyaluronidáza, která je obsažena ve včelím i vosím jedu. (2; 8; 3)

5.0 Diagnostické testy

Diagnóza alergie na jed blanokřídlého hmyzu je založena na správně sestavené anamnéze a na výsledcích diagnostických testů. Indikací k těmto testům je systémová alergická reakce po bodnutí hmyzem. Po potvrzení alergie na jed blanokřídlého hmyzu je obvykle pacientům nasazena imunoterapie. Diagnostické testy se neprovádějí jako screeningová vyšetření a nejsou indikovány u pacientů s velkou lokální reakcí po bodnutí, u pacientů s rodinnou anamnézou a ani u osob, kde je riziko rozvoje reakce. (2; 9; 10)

Mezi nejužívanější diagnostické testy patří kožní testy a stanovení specifických IgE protilátek k extraktům včelího a vosího jedu. U těchto metod je častým problémem dvojitá pozitivita až u 30 – 60 % pacientů. Většinou však nejde o skutečnou senzibilizaci k oběma jedům, ale o zkříženou reaktivitu mezi jedy.

Skutečná senzibilizace k oběma jedům je zodpovědná za dvojitě pozitivní výsledky pouze ve 20 – 40 % pacientů. Dvojitá senzibilizace je způsobená současnou senzibilizací k druhově specifickým složkám obou jedů. Zbytek dvojitě pozitivních výsledků představuje zkříženou reaktivitu mezi jedy. (2; 9; 10)

Z důvodu velmi časté přítomnosti dvojitě pozitivních výsledků dochází k rozvoji dalších diagnostických metod, které by dokázaly rozlišit skutečnou dvojitou pozitivitu od zkřížené reaktivity. V současné době se užívá test aktivace bazofilů a diagnostika pomocí složek alergenů. Tyto metody přispívají k jednoznačnému rozlišení alergie na včelí či vosí jed. Tím pomáhají s výběrem jedu

pro imunoterapii, která v současné době je jedinou kauzální léčbou alergie na jed blanokřídlého hmyzu. (2; 9; 10)

5.1 Anamnéza

Pro správné stanovení diagnózy alergie na jed blanokřídlého hmyzu je nezbytně důkladná anamnéza. Anamnéza se zaměřuje na zhodnocení charakteru klinické reakce a identifikaci bodajícího hmyzu.

Klinické reakce mohou mít široké spektrum. Normální reakce se projevují lokální bolestivostí místa vpichu, svěděním, zčervenáním a otokem s ústupem do několika hodin. Velká lokální reakce se popisuje jako otok v okolí místa vpichu přesahující 10 cm v průměru, zarudnutí a svědění trvající déle než 24 hodin. Nejzávažnější reakce představuje anafylaktická reakce klasifikovaná dle Müllera podle rozsahu a tíže příznaků. (2; 3; 9; 10)

Dalším důležitým bodem v určení správné anamnézy je identifikace bodajícího hmyzu, který vyvolal danou alergickou reakci. Většina pacientů nedokáže určit druh hmyzu, který vyvolal reakci. Pacient se může snažit poznat hmyz na obrázku nebo fotografii. Dále můžeme usuzovat dle ročního období. Kdy včely jsou aktivní hlavně na jaře a začátkem léta, na rozdíl od vosy, která je aktivní na konci léta a na podzim. Včely se vyskytují v blízkosti rozkvetlých květin na louce nebo na zahradě, vosy se většinou vyskytují spíše v blízkosti spadaného ovoce nebo v blízkosti jídla. Přítomnost žihadla v ráně ukazuje spíše na včelu.

Posledním tématem je posouzení rizika opakování reakce, což závisí na závažnosti reakce a stupni expozice. Závažnost reakce hodnotíme podle klinických příznaků, které se velmi často opakují. Nejzávažnější příznaky jsou symptomy dýchacích cest a kardiovaskulárního systému. Stupeň expozice je určen počtem opakovaných bodnutí, oblastí života a životním stylem. Rizikové jsou včelaři, jejich rodina a sousedé, farmáři a zahradníci.

Každý pacient, který prodělal anafylaktickou reakci, je vybaven pohotovostní léčbou. Pokud se potvrdí senzibilizace k hmyzímu jedu, je následně indikován ke specifické imunoterapii, která trvá 5 let. (2; 3; 9; 10)

5.2 Kožní testy

Kožní testy patří k testům první volby při určení diagnózy alergie na jed blanokřídlého hmyzu. Užíváme čisté standardizované extrakty jedu, které jsou dodávány od výrobce. Začínáme prick testy a při negativitě pokračujeme interdermálními testy.

Prick test se provádí s alergeny o vzestupné koncentraci jedu od 0,1 do 100 µg/ml. Je-li test negativní, použije se koncentrace 300µg/ml. Při negativní reakci i u této koncentrace se přejde k intradermálnímu testu. Tento test se provádí podáním jedu o objemu 0,02 ml se stoupající koncentrací jedu od 0,01 µg/ml přes 0,1 µg/ml do 1 µg/ml. Vyšší koncentrace se nedoporučuje, jelikož dochází ke snižování specifity testu, z důvodu uvolnění histaminu a biogenních aminů. Toto by se mělo do budoucna vyřešit díky použitím dialyzovaných jedů, což by mělo umožnit provádět testy až do koncentrace 10 µg/ml.

Tyto testy obvykle nevyvolávají systémové alergické reakce. Ojedinele se může projevit pozdní alergická reakce za 2 – 3 dny po testu. Nejčastějším projevem je tuberkulinová reakce. (1; 2; 3; 9; 10; 11)

5.3 Vyšetření specifických IgE protilátek k extraktům včelího a vosího jedu

K vyšetření specifických protilátek IgE z krve pacienta se užívají in vitro testy. Toto vyšetření je v současné době nejrozšířenější a nejpoužívanější diagnostikou alergie. Používají se neradioaktivní metody, jako například ImmnoCap nebo IMMULITE 2000. Dříve se používaly RAST testy. Za pozitivní výsledek je považována hodnota vyšší než 0,35 kIU/l. Tato hodnota sice potvrzuje senzibilizaci pacienta, ale nijak nevypovídá o charakteru klinické reakce při opakovaném bodnutí. Dále také neexistuje souvislost mezi závažností klinické reakce po bodnutí a koncentrací specifického IgE v séru. (1; 2; 9; 10; 12)

5.4 Diagnostika pomocí složek alergenů

Diagnostika pomocí složek alergenů je nejmodernější metoda diagnostiky alergie na jed blanokřídlý hmyz, která vychází ze znalosti složení včelího a vosího jedu. Doposud byla identifikována celá řada včelích či vosích alergenů. Hlavním alergenem včelího jedu je fosfolipáza A2 (Api m1). Hlavními alergeny vosího jedu

je antigen 5 (Ves v5) a fosfolipáza A1 (Ves v1). Znalost struktury těchto alergenů umožnila jejich výrobu v neglykosylované formě pomocí biotechnologických metod. Pomocí tohoto vyšetření lze jednoznačně určit dvojí pozitivitu nebo zkříženou reaktivitu. Užívaná metoda v této diagnostice je ImmunoCAP Phadia. Jako pozitivní je hodnocen výsledek nad 0,35 kIU/l. (2; 9; 13; 14)

5.5 Test aktivace bazofilů

Bazofily společně s žírnými buňkami fungují jako efektorové buňky časně fáze alergické reakce 1. typu. Syntetizují řadu vysoce aktivních mediátorů, které určují klinický obraz alergického onemocnění. Na povrchu exprimují vysokoafinní receptor FcεRI pro protilátku IgE. Pokud dojde k přemostění dvou sousedních molekul IgE alergenem, dochází k aktivaci buňky. Buňka vypouští svá granula do okolí a exprimuje povrchový aktivační znak CD63 na své buněčné membráně.

Tento test je založen na stanovení procenta aktivovaných bazofilů po jejich stimulaci hmyzím jedem. Pomocí průtokové cytometrie se po označení monoklonálními protilátkami stanovují aktivační znaky CD63 nebo CD203c na bazofilech. (1; 9; 10; 13; 15; 16)

5.5.1 Vyšetření hladiny tryptázy

Vyšetření hladiny tryptázy probíhá u všech pacientů po anafylaktické reakci vyvolané bodnutím blanokřídlým hmyzem. Zvýšená hladina je rizikovým faktorem pro opakování těžkých reakcí. U všech pacientů se zvýšenou hladinou je indikována imunoterapie, která je často provázená nežádoucími alergickými účinky, hlavně u alergií na vosy. Pokud je hladina tryptázy nad 11,4 µg/l je indikací k vyšetření na přítomnost mastocytózy. (9)

5.5.2 Bazofily

Bazofily vznikají během hematopoézy v kostní dřeni z myeloidní řady. Jsou podobné mastocytům, ale nacházejí se v krvi. Od mastocytů se liší dynamikou a spektrem produkovaných mediátorů a cytokinů. Hrají důležitou roli v imunitní a zánětlivé reakci. Bazofily se účastní časně fáze alergické reakce a jsou zodpovědné za vznik anafylaktické reakce. Na jejich vysokoafinních receptorech FcεRI jsou navázány IgE protilátky. Pokud dojde k propojení alespoň dvou

protilátek alergenem, dojde k degranulaci bazofilů a uvolnění histaminu, serotoninu a dalších preformovaných mediátorů. Po aktivaci začínají bazofily tvořit metabolity kyseliny arachidonové (prostaglandiny, leukotrieny) a cytokiny. Tyto mediátory jsou zodpovědné za příznaky alergické reakce. (1; 2; 4; 17)

5.5.3 Žírné buňky

Žírné buňky patří mezi granulocyty. Vznikají v kostní dřeni a jsou uvolňovány do krve. Krví putují do tkání, kde dochází k jejich konečné diferenciaci. Podle lokalizace a struktury je dělíme na pojivové a slizniční. Jejich základní funkcí je obrana proti parazitárním infekcím. Mohou fungovat i jako fagocyty nebo antigen prezentující buňky. Zabezpečují fyziologickou funkci sliznic a normální metabolismus pojivových tkání. První se aktivují při zánětu a jsou zodpovědné za časný typ přecitlivělosti. Spolu s bazofily jsou zodpovědné za vznik anafylaktického šoku. Jejich základní funkcí je obrana proti parazitárním infekcím.

Stejně jako bazofily obsahují na svém povrchu vysokoafinní Fc receptor. Aktivace probíhá stejně jako u bazofilů. Aktivace mastocytů vyvolá degranulaci. Tyto mechanismy jsou zodpovědné za časný typ přecitlivělosti. (1; 2; 4; 17)

Granula žírných buněk obsahují řadu látek. Například hydrolyzované aminy, proteoglykany do nichž patří heparin a chondroitinsulfát a biogenní aminy, histamin a serotonin. Histamin působí jako vasodilátor, uvolňuje hladké svalstvo cév a tím je rozšiřuje, ale také způsobuje bronchokonstrikci. Tento mechanismus napomáhá k vypuzení parazita ven z těla. Z granul se také uvolňují enzymy, které jsou přímo schopni poškozovat parazita.

Zároveň s degranulací se v žírných buňkách aktivuje metabolismus kyseliny arachidonové, při němž dochází ke vzniku a sekreci leukotrienu C_4 a prostaglandinu PGD_2 . Dále žírné buňky sekretují cytokiny, které přispívají k rozvoji lokálního zánětu a dalším imunitním reakcím. TNF aktivuje fagocyty a zvyšuje expresi adhezivních molekul na endotelích, TGF- β napomáhá hojení poškozené tkáně, IL-5 stimuluje eosinofily a IL-6 podporuje produkci imunoglobulínů. Další velmi důležitá látka je IL-4, která rozhoduje zda dojde k diferenciaci Th na Th2, které řídí diferenciaci B buněk na plazmocyty, produkující IgE protilátky. (1; 2; 4; 17)

6.0 Léčba

Léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu je kombinací prevence, léčby akutních stavů a imunoterapie alergenem. (2; 3; 5)

6.1 Anafylaxe

Nejzávažnějším projevem alergie na jed blanokřídlého hmyzu je anafylaxe. Léčba je závislá na klinických projevech pacienta. Lékem první volby u léčby anafylaxe je adrenalin, dalším lékem, který se podává je injekčním antihistaminikum. Většině pacientů s anafylaktickou reakcí je doporučena léčba imunoterapií, která sníží nebo zcela potlačí alergickou reakci na bodnutí blanokřídlým hmyzem. (2; 3; 7)

6.2 Imunoterapie

Alergie na jed blanokřídlého hmyzu je jednou z nejvýznamnějších indikací pro imunoterapii. Imunoterapie je nejúčinnější léčba této alergie. Snižuje riziko systémové reakce a dokonce může i obnovit normální imunitu proti alergenům jedu blanokřídlého hmyzu a tím poskytnou pacientům doživotní toleranci k jedu. Velmi důležitý je vhodný výběr pacientů, aby nedocházelo ke zbytečné léčbě a aby se vyřadili pacienti nevhodní k léčbě. Dále musí být zvolen správný léčebný protokol a stanovena udržovací dávka vzhledem k léčebnému efektu a bezpečnosti. Dále se snažíme eliminovat nežádoucí účinky a stanovit délku a účinnost imunoterapie v závislosti na druhu alergenu.

Během imunoterapie hmyzím jedem se tvoří Treg buňky, které potlačují proliferativní a cytokinové odpovědi proti alergenům. Tyto buňky produkují IL-10, který přímo či nepřímo ovlivňuje efektorové buňky alergického zánětu, jako jsou žírné buňky, basofily a eosinofily. Ovlivňuje také B buňky, potlačením tvorby protilátek IgE a podpořením tvorby blokovacího typu protilátek IgG4.

Úspěšnost imunoterapie na jed blanokřídlého hmyzu je vysoká. U léčby alergie na jed včely je to 80% u vosy až 90%. (2; 3; 5; 18; 19)

6.2.1 Indikace

Správná indikace pro imunoterapii je velmi důležitá. Imunoterapie je léčba, která je časově náročná, velmi nákladná a může být provázená nežádoucími účinky. Indikace je dána pravděpodobností rozvoje systémové reakce při opakovaném bodnutí blanokřídlým hmyzem, což je ovlivněno věkem pacienta, závažností proběhlé reakce a druhem hmyzu. Pro zahájení imunoterapie je nezbytná diagnostika pomocí kožních testů nebo vyšetřením specifických IgE protilátek k extraktům včelího a vosího jedu. Pokud se neprokáže přítomnost IgE protilátek v krvi pacienta, léčbu nezahajujeme pro neúčinnost. (2; 3; 19)

6.2.2 Kontraindikace

Nejčastější kontraindikací je přítomnost závažného celkového onemocnění. Například imunodeficientní stavy, malignity, autoimunitní onemocnění, kardiovaskulární, renální, hepatální a jiná systémová onemocnění. Tyto onemocnění by mohla zkomplikovat průběh specifické imunoterapie nebo dokonce zkomplikovat zvládnutí nežádoucích reakcí. Jednou z nejdůležitějších kontraindikací je nesouhlas pacienta. (19)

6.2.3 Imunologické mechanismy

Imunoterapie snižuje tvorbu specifických protilátek třídy IgE a podporuje tvorbu specifických protilátek třídy IgG. Protilátky třídy IgG fungují jako ochrana. Váže se na alergen a tím blokuje jeho vazbu na protilátku třídy IgE. Neaktivují komplement a na Fc receptory fagocytů se váží velmi slabě, a tak mají protektivní efekt. Imunoterapie tedy snižuje tvorbu protilátek IgE a také snižuje počet efektorových buněk.

Protilátka třídy IgG je tvořena čtyřmi podtřídami. Při imunoterapii se převážně tvoří protilátky třídy IgG1, které jsou dominantní v časně fázi imunoterapie přibližně do 3 let léčby a protilátky třídy IgG4, které jsou významnější v pozdějších fázích léčby. Nicméně specifické protilátky třídy IgG po dlouhodobé léčbě klesají a pokles je obvykle nalézán 1 až 2 roky po ukončení léčby, což je vysvětlováno produkcí autoprottilátek. (2; 18; 19)

6.2.4 Výběr alergenu pro imunoterapii

Správný výběr alergenu pro imunoterapii je prováděn na základě anamnézy a výsledků diagnostických testů. Pokud výsledky testu ukazují na dvojitou senzibilizaci musíme se přesvědčit zda jde skutečně o dvojitou senzibilizaci, pak bychom pacienta léčili oběma druhy alergenu, nebo o zkříženou reaktivitu, kde se snažíme určit skutečně ten alergen, který vyvolává senzibilizaci.

Extrakt alergenu, který se užívá v imunoterapii, je ve formě vodného roztoku a aplikuje se injekčně. V současné době se rovněž užívá extrakt vázaný na aluminium hydroxid. (2; 3; 11)

6.2.5 Postup

6.2.5.1 Fáze vzestupné dávky

Ve fázi vzestupné dávky se může použít několik aplikačních postupů. Obvyklé schéma aplikace má týdenní interval mezi aplikacemi a trvá nejdéle. Zrychlený tzv. rush postup probíhá za hospitalizace pacienta a doba nutná k dosažení udržovací dávky trvá přibližně od 3 hodin do 4 až 6 dní. Shlukový tzv. cluster postup aplikuje více injekcí v intervalu jednoho týdne. Výhodou pro pacienta je méně návštěv v ordinaci a lepší odezva na léčbu. (2; 3; 11)

6.2.5.2 Fáze udržovací dávky

Udržovací dávka se aplikuje zpočátku po 14 dnech a následně po měsíci. Druhý rok aplikujeme po 6 týdnech, třetí rok po 8 týdnech. Pokud dojde k přerušení léčby déle jak na 2 měsíce, redukuje se dávku na polovinu naposledy tolerované dávky a zvyšujeme v týdenních intervalech do dosažení udržovací dávky. Nejčastěji doporučovaná udržovací dávka je 100 µg jedu, což odpovídá dvěma bodnutím včely nebo mnohem více bodnutí vosy. U včelařů se podává dávka 200 µg jedu nebo také při selhání léčby. Úspěch léčby roste s velikostí dávky, bohužel s velikostí dávky rostou i nežádoucí účinky. Optimální dávka jedu by měla být kombinací uspokojivého efektu léčby s minimem nežádoucích účinků. (2; 3; 11)

6.2.5.3 Ukončení léčby

V průběhu imunoterapie by mělo docházet k poklesu reaktivity v kožních testech a k poklesu specifických protilátek třídy IgE a ke vzestupu protilátek třídy IgG. Při rozhodnutí o ukončení léčby by se mělo k těmto parametrům přihlížet. Optimální doba léčby u dětí a dospělých s lehčí reakcí by měla být tři roky až pět let. U pacientů s život ohrožující anafylaxí je minimální doba léčby pět let, někdy i déle. Frekvence systémových reakcí po léčbě se snižuje na 5 až 14% a jsou významně méně závažné než před léčbou. (2; 3; 11)

6.2.6 Nežádoucí účinky

Imunoterapie vosím alergenem je většinou velmi dobře tolerována. Na rozdíl od imunoterapie včelím alergenem, která je provázena větším počtem vedlejších účinků. Rychlý neboli rush postup má vyšší frekvenci nežádoucích účinků než konvenční postup, který je většinou dobře tolerován. Avšak trvá delší dobu, než je dosaženo udržovací dávky, což může být nevýhoda u pacientů s vysokým rizikem systémové reakce. Jako bezpečný se jeví shlukovací neboli cluster postup. Pokud dochází k vysokému výskytu nežádoucích účinků, měníme aplikační protokol. Mírnější projevy lze tlumit antihistaminiky. (2; 3; 19)

Praktická část

7.0 Cíl

Cílem této bakalářské práce je zhodnotit zda v průběhu specifické imunoterapie dochází ke změnám v hodnotách testu bazofilů.

8.0 Specifická imunoterapie a změny hodnot Bazotestu

Specifická imunoterapie je jediná možná kauzální léčba alergie na jed blanokřídlého hmyzu. Mechanismem specifické imunoterapie je tedy snižování specifických protilátek typu IgE a vzestup specifických protilátek typu IgG4. Tím by měla být snížena i reaktivita bazofilů k alergenům v testu aktivace bazofilů. Tyto tři hodnoty nám mohou odrážet reakci organismu na specifickou imunoterapii. Pokud specifická imunoterapie funguje, měla by navodit u pacienta toleranci k alergenu.

V této bakalářské práci se věnujeme testu aktivace bazofilů a změnám jeho hodnot v průběhu specifické imunoterapie na jed blanokřídlého hmyzu. Hodnotíme procento aktivovaných bazofilů pomocí exprese aktivačního znaku CD63, které by se během specifické imunoterapie mělo snižovat. Toto stanovení provádíme před zahájením léčby a pak v jednoročním intervalu po celou dobu léčby. (6; 19; 20; 21; 22; 23)

9.0 Test aktivace bazofilů

Test aktivace bazofilů nebo také bazotest je metoda pozorující aktivaci bazofilů. Jedná se o funkční test, který zjišťuje alergickou reakci zprostředkovanou IgE protilátkami. Při aktivaci bazofilů zjišťujeme expresi znaku CD63 na povrchu bazofilů. K aktivaci dochází po přemostění receptoru FcεRI na povrchu bazofilů alergenem, nebo anti-IgE protilátkou a nebo protilátkou proti FcεRI receptorům.

Test je užíván jako doplňkové vyšetření při neshodě výsledků specifických IgE a kožních testů s klinickými příznaky, nebo při neproveditelnosti těchto testů. Jeho největším problémem je nestejně provedení mezi laboratořemi, různá mezní hodnota cut-off pro hodnocení a nedostatečná standardizace testu. Proto se musí nejprve stanovit cut-off hodnota pro pozitivitu testu pro jednotlivé užívané alergeny. Toho se dosáhne provedením kalibrace a ředěním alergenů.

Pokud chceme vyšetřit alergii na jed blanokřídlého hmyzu musíme nejprve odlišit pravou klinickou reakci na včelu nebo vosu a falešně pozitivní zkříženou reaktivitu. Tento test zaujímá místo v diagnostice alergií a může být důležitou pomocnou laboratorní metodou. (1; 9; 10; 15; 24; 25; 16)

9.1 Varianty testu

Aktivace bazofilů se dá stanovit více metodami. První metoda je metoda BAT, která je založena na stanovení aktivačních molekul CD63 na průtokovém cytometru. Druhá metoda metoda CAST stanovuje hladinu mediátorů uvolněných během degranulace. Dále můžeme použít další alternativní cesty aktivace bezofilů. (1; 16)

9.1.1 Metoda BAT

Tato metoda je tedy založena na stanovení aktivačního znaku CD63. Tento znak je na povrchu bazofilů exprimován po jejich degranulaci. Jeho citlivost a specifita není větší než u ostatních testů, které měří přítomnost alergen specifických IgE protilátek přímo. Avšak jeho citlivost a specifita není špatná a proto se řadí mezi diagnostické testy.

Pro zvýšení citlivosti testu se užívá IL-3. IL-3 působí rychle a způsobuje lepší uvolnění mediátoru z granul bazofilů. Zvyšuje uvolňování histaminu a lepší odpověď aktivačního znaku CD63.

Stanovení se provádí ve vzorku krve pacienta, který inkubujeme s vodným roztokem alergenu. Současně se vzorkem krve pacienta musíme stanovit negativní a pozitivní kontrolu. Po inkubaci s alergeny musíme přidat dvě protilátky. První protilátka anti-IgE, nebo anti-CD203c a nebo anti-CD123 označuje bazofily. Druhá protilátka anti-CD63 označuje aktivované bazofily. Po inkubaci s protilátkami necháme zlyzovat erytrocyty a následně vzorky stanovujeme na průtokovém cytometru. Na průtokovém cytometru musíme na základě bočního rozptylu a značení bazofilů pomocí protilátek anti-IgE, nebo anti-CD203c a nebo anti-CD123 dobře označit bazofily. Tomu se říká gatování. Na těchto označených bazofilech měříme expresi aktivačního znaku CD63. Výsledkem testu je procento aktivovaných bazofilů anti-IgE+/CD63+, nebo CD123+/CD63+ a nebo CD203c+/CD63+. Metoda je specifická pro bazofily. Užívá se rutinně při vyšetření alergie na jed blanokřídlého hmyzu. (1; 9; 10; 15; 24; 25; 16)

9.1.1.1 Aktivační markery

K aktivaci bazofilů je nutná celá řada proteinů, které mohou být detekovány specifickými protilátkami na průtokovém cytometru. Výhodou je možné stanovení těchto aktivačních markerů z heparinizované plné krve pacienta. Největší zkušenost je s markery CD63, CD123 a CD203c. V této práci pracujeme s markery CD63, které jsou v komerční soupravě pro stanovení aktivace bazofilů. Exprese znaku CD63 je spojena s degranulací bazofilu a tedy s jejich aktivací. Aktivační znak CD123 je specifický pro bazofily. Užívá se pro výběr bazofilů na průtokovém cytometru. Aktivační znak CD203c je ectonucleotid pyrofosfatáza/fosfodiesteráza. Je exprimován po stimulaci cytokinem IL-3. Nachází se ve vezikulárním prostoru buňky spolu s CD11b. Tento prostor je odlišný od granulí obsahující histamin. Při stimulaci je z tohoto prostoru uvolněn a je možné ho stanovit pomocí protilátky anti-203c. (16)

9.1.2 Metoda CAST

Metoda CAST je založena na stanovení hladiny uvolněných mediátorů ve vzorku krve. Tato metoda závisí na přítomnosti předem vytvořených mediátorů v granulích bazofilů. Stanovuje se buď hladina sulfidopeptidových leukotrienů (LTC₄), hladina histaminu, ale také IL-4. Histamin a leukotrieny se uvolňují okamžitě po vazbě alergenu na IgE protilátku navázanou na vysokoafinním receptoru FcεRI. Nevýhodou této metody je nutnost izolace buněk. Pokud bychom měřili hladinu uvolněných mediátorů v plné krvi, naměřili bychom hladinu mediátorů nejen z bazofilů, ale i z ostatních krevních buněk. Izolace buněk lze provést dvěma způsoby. Můžeme použít buď separaci na hustotním gradientu, nebo separaci pomocí sedimentace. Bohužel separace pomocí sedimentace obsahuje i značný podíl červených krvinek, a proto se tolik nevyužívá. (1; 15; 16)

9.1.2.1 Metody stanovení

Histamin lze stanovit pomocí metody ELISA nebo na automatickém analyzátoru. Cytokiny se stanovují pomocí ELISA metod, leukotrieny pomocí RIA a ELISA metod. Bohužel tyto metody nejsou dostatečně robustní a jsou finančně náročné. Proto se nevyužívají rutině. Jejich citlivost není dostatečně vysoká pro aktivaci bazofilů. (16)

9.1.3 Alternativní testy aktivace

Reakce bazofilů na nějakou formu aktivace zahrnuje širokou škálu změn. Sekrece mediátorů je pouze jednou formou odezvy bazofilů. Cytokiny indukují širokou škálu fenotypových změn. Tyto změny fenotypu mohou být hodnoceny pomocí stanovení mRNA na mikročipech. Některé změny jsou přechodné, některé mají delší životnost. Překážkou v tomto testu je nutnost přečištění bazofilů.

Další možností je stanovení bazofilů na základě tvarové změny. Tyto změny jsou vyvolané stimulací nedostatečnou pro uvolnění mediátorů a indukují pouze chemotaxi. Změna tvaru bazofilů je detekována pomocí průtokového cytometru. (16)

9.2 Úskalí metody BAT

Metoda se provádí z plné krve pacienta. Krev musí být čerstvá, maximálně 2 hodiny po odběru. Jako protisrážlivé činidlo se používá heparin. V krvi odebrané do EDTA činidla dochází k vyvázání kalciových iontů a test vyjde falešně negativní. Pro optimalizaci metody je dobrá inkubace krve s IL-3, který pomáhá stimulovat bazofily. (1; 15)

9.3 Metodika

Test aktivace bazofilů provádíme metodou BD FastImmune od společnosti Becton Dickinson. Souprava obsahuje monoklonální protilátky CD63, CD123 a Anti-HLA-DR, které detekují lidské antigeny. (26)

9.3.1 Monoklonální protilátky

Protilátka CD63 reaguje s lysozomálním glykoproteinem, který je obsažen v mnoha typech buněk, včetně monocytů, krevních destiček a bazofilů. Jeho povrchová exprese je aktivována na povrchu aktivovaných krevních destiček, degranulovaných neutrofilů, monocytů, makrofágů, endotelu a aktivovaných bazofilů. Protilátka CD63 je produkována klonem H5C6 připraveným fúzí myelomových buněk P3x653 Ag8 se splenocyty z BALB/c imunizovaných myší. Skládá se z myšího těžkého řetězce IgG1 a lehkého řetězce kappa. (26)

Protilátka CD123 se váže na receptor interleukinu-3 k α řetězci. Označuje se tedy jako anti-IL-3R α . Selektivně rozpoznává buňky, které byly navázány s IL-3. Klon 9F5 neblokuje vazbu IL-3 na receptor. CD123 antigen je expromován na plasmocytoidních a myeloidních dendritických buňkách, na basofilech, monocytech, eosinofilech a na části populace hematopoetických progenitorových buněk. Neutrofili vykazují expresi IL-3R α pouze když jsou kultivovány s GM-CSF. Pokud jsou čerstvě izolované expresi nevykazují. Jelikož IL-3 stimuluje produkci hematopoetických buněk, předpokládá se, že IL-3R α vykazují také megakaryocyty, erytroidní buňky i B buňky. Protilátka CD123 je produkován klonem 9F5, která je odvozen z fúze NS-1 buněk se splenocyty myší BALB/c imunizovancý IL-3R α z COS buněk. Skládá se z těžkého řetězce myší IgG1 a lehkého řetězce kappa. (26)

Protilátka Anti-HLA-DR rozpoznává lidské antigeny HLA II. třídy. Jedná se o transmembránový glykoprotein složený z α a β podjednotky. Molekulová hmotnost je 36 a 27 kD. HLA-DR je exprimován na B lymfocytech, monocytech, aktivovaných makrofázích, T lymfocytech, aktivovaných NK buňkách a progenitorových buňkách. Také je přítomen na thymu, epitelu, slezině v oblasti B lymfocytů, lymfatických uzlinách a lymfomech pocházejících z B buněk. Protilátka Anti-HLA-DR je produkována klonem L243, který je odvozen hybridizací myších NS-1/1-AG4 myelomových buněk s buňkami sleziny myší BALB/c imunizovaných lidskými lymfoblastickými B buňkami linie RPMI 8866. Skládá se z těžkého řetězce IgG2 myší a lehkých řetězců kappa. (26)

Při stanovení BAT se užívá koktejl protilátek CD63 FITC/CD123 PE/anti-HLA-DR PerCP v 1,0 ml fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS) obsahujícím hovězí sérový albumín (BSA) a 0,1% azid sodný. (26)

9.3.1.1 Skladování protilátek

Lahvičky s monoklonálními protilátkami uchováváme při teplotě 2 až 8 °C. Konjugovaná forma protilátky by neměla být zmrazena a měla by být chráněna před delším vystavením světlu. Protilátka je stabilní po dobu uvedenou na štítku lahvičky při správném skladování dle pokynů. (26)

9.3.2 Alergeny

Běžně dostupné alergeny používány během testu jsou od roku 2010 2 vosí alergeny a 1 včelí alergen. Vosí alergeny užívané ke stanovení jsou rVes v 5, což je složka vosího jedu antigen 5 a rVes v 1, což je fosfolipáza A1. Včelí alergen užívaný ke stanovení je rApi m 1, což je složka včelího jedu fosfolipáza A2. Od roku 2014 přibyl ještě jeden včelí alergen a to rApi m 2, neboli hyaluronidáza.

Pro stanovení alergie na vosí jed nám zcela dostačuje kombinace alergenů rVes v 5 a rVes v 1.

Stanovení alergie na včelí jed pomocí alergenu rApi m 1 není dostačující, proto v některých případech nelze potvrdit tuto diagnózu. Zvýšení citlivosti vyšetření by pomohlo stanovení dalších včelích alergenů. Bohužel ani nově dostupný alergen r Api m 2 nezvyšuje citlivost stanovení alergie na včelí jed, jelikož vykazuje podobnou homologii s obdobným alergenem obsaženým ve vosím jedu. Pro potvrzení alergie na včelí jed by byly přínosnější další složky včelího jedu. Další složka včelího jedu, která by měla být brzy k dispozici je rApi m 4 (mellitin). Tato složka jedu by byla specifická pro alergii na včelí jed a mohla by pomoci k potvrzení diagnózy alergie na včelí jed.

Během testu používáme alergeny Pharmalgen Venom od firmy ALK. Tyto alergeny jsou užívané ke specifické imunoterapii. Jsou dodávány v lyofilizované podobě. Pro diagnostiku se musí naředit na koncentraci potřebnou pro stanovení. Obvykle se stanovení provádí při koncentraci 0,1 a 1,0 ng/l. Alergeny musí být skladované v ledničce při teplotě 2 až 8 °C a musí být chráněny před mrazem a před světlem. (11; 14; 25)

9.3.3 Princip metody

Principem testu je stanovení procenta aktivovaných bazofilů v plné krvi pacienta na průtokovém cytometru. Stanovení se provádí po inkubaci plné krve s hmyzím jedem a po označení monoklonálními protilátkami. O aktivaci bazofilů nám svědčí povrchové znaky CD63 a CD123. (9; 10)

9.3.4 Provedení testu

1. Test provádíme z plné krve pacienta odebrané do zkumavky s heparinem. Pro vyšetření pacienta si připravíme 4 zkumavky. První zkumavka je negativní kontrola. Druhá zkumavka je pozitivní kontrola. Třetí zkumavka je test na včelí jed. Čtvrtá zkumavka je test na vosí jed.
2. Do 1. 3. a 4. zkumavky napipetujeme 20 μ l stimulačního pufru (BSB). Do 2. zkumavky napipetujeme pouze 10 μ l stimulačního pufru (BSB) a 10 μ l fMLP (anti-IgE N-formyl-methionyl-leucyl-fenyl-alanin.)
3. Po rozpipetování přidáme do všech zkumavek 100 μ l plné krve pacienta. Promícháme a inkubujeme 20 minut ve vodní lázni při 37 °C.
4. Po proběhlé inkubaci přidáme 18 μ l směsi protilátek CD63FITC /CD123PE/HLA-DRPerCP a ponoříme zkumavky do lázně s tajícím ledem, čímž zastavíme aktivaci bazofilů. Inkubujeme v lednici 25 minut.
5. Po inkubaci do zkumavek přidáme 2 ml lyzačního roztoku BD FACT, čímž dojde k lyzaci erytrocytů. Necháme inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě.
6. Poté zkumavky centrifugujeme při 300 otáčkách 5 minut. Supernatant slijeme. Vzorky promyjeme v 1-2 ml PBS pufru.
7. Naposled přidáme 0,3 ml 0,5% paraformaldehydu (PFA) k promísení vzorku.
8. Vzorky jsou připravené pro analýzu na průtokovém cytometru. Používáme průtokový cytometr FC500. Vzorky analyzujeme v panelu Bazotest nový pacient. Pořadí zkumavek v přístroji je od negativní kontroly, pozitivní kontroly, včelí alergen, po vosí alergen. Jako pozitivní sledujeme aktivované bazofily CD123+, HLA-DR -, CD63+. Obvykle se hodnotí nejméně 500 buněk. (9; 13; 15; 26)

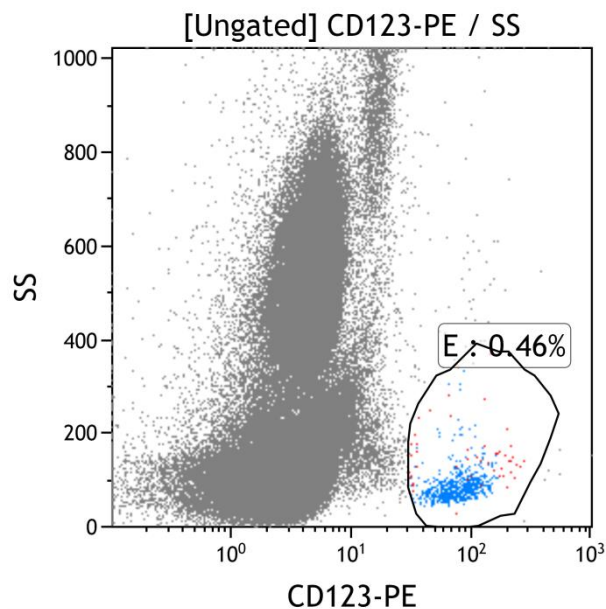
9.3.5 Referenční rozmezí

Jako normální hodnota se považuje aktivace bazofilů do 5%. Pozitivní reakce je hodnota v rozmezí od 10 do 15% aktivovaných bazofilů. Senzitivita testu se pohybuje mezi 50 až 90%. Specifita testu mezi 70 až 100%. (1; 10; 15; 24; 26)

9.4 Výsledky

Vzorky se analyzují na průtokovém cytometru FC 500 od firmy Beckman Coulter. Analýza je prováděna z lyzované plné krve nebo s jakýmkoliv stupněm obohacení. Průtokový cytometr nastavíme tak, aby se zaměřil na bazofily. Tomu se říká gatování. Buňky jsou zobrazeny v tzv. histogramu. V histogramu jsou buňky zobrazeny podle parametru, který chceme stanovit. Bazofily identifikujeme na principu positivity exprese CD123 a pomocí bočního rozptylu SSC. Vytvoří se nám tzv. tečkový diagram, který se užívá pro analýzu 3 a více parametrů. (1; 16; 26)

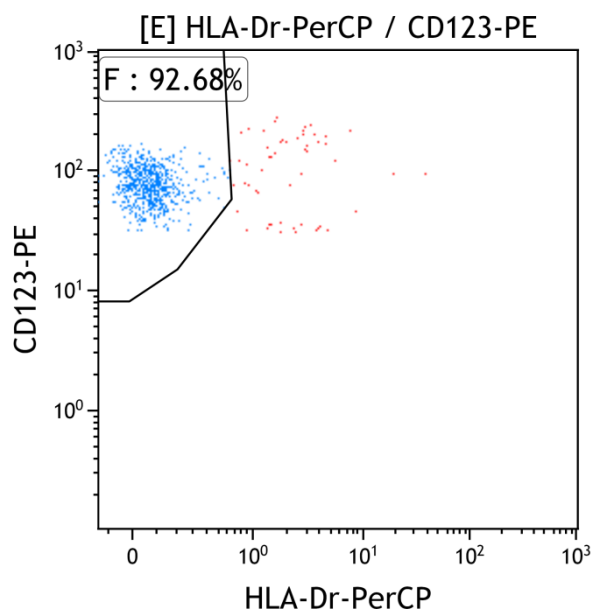
Obrázek 1 Výběr bazofilů pomocí znaku CD123 a bočního rozptylu SSC



Zdroj: vlastní zpracování na průtokovém cytometru z dat ústavu imunologie a alergologie

Dále musíme pomocí znaku CD123 a HLA-DR oddělit monocyty od bazofilů. Průtokový cytometr vytvoří další graf tzv. dvojrozměrný, který je sestaven podle dvou parametrů. Nejběžněji je používán tzv. bodový graf neboli dot plot, kde je každá buňka zobrazena tečkou. Bazofily identifikujeme jako CD123 pozitivní a HLA-DR negativní buňky. (1; 16; 26)

Obrázek 2 Výběr bazofilů na základě znaku CD123 pozitivní a HLA-DR negativní

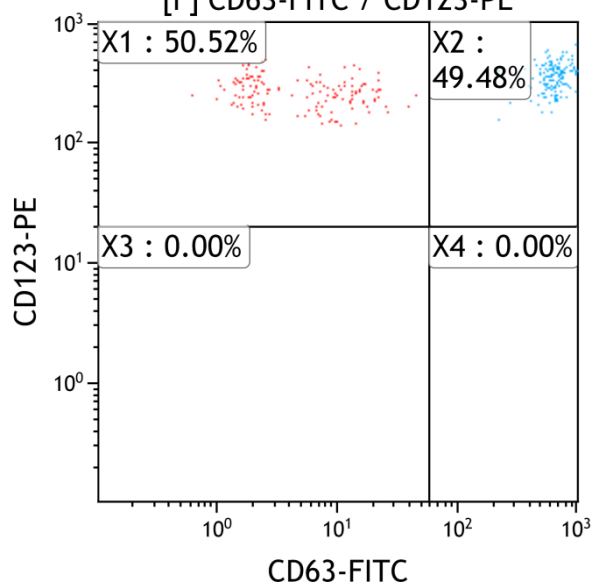


Zdroj: vlastní zpracování na průtokovém cytometru z dat ústavu imunologie a alergologie

Pro toto rozlišení se mohou použít i jiné markery, například protilátka IgE nebo protilátka CCR3. Nejběžněji je to ale právě protilátka HLA-DR, kterou jsme využili v našem testu.

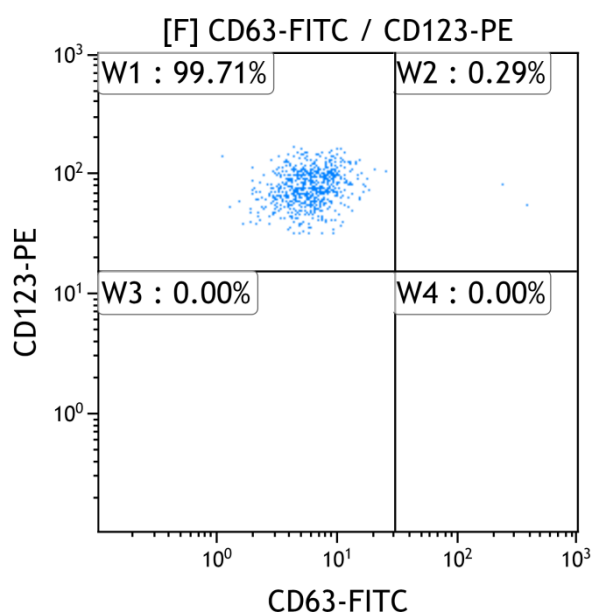
Poslední gaty vytvoříme pomocí exprese CD123 a CD63. Aktivované bazofily určíme jako CD123 pozitivní a CD63 pozitivní buňky. (1; 16; 26)

Obrázek 3 Aktivované bazofily CD63 pozitivní a CD123 pozitivní
[F] CD63-FITC / CD123-PE



Zdroj: vlastní zpracování na průtokovém cytometru z dat ústavu imunologie a alergologie

Obrázek 4 Negativní výsledek aktivace bazofilů buňky CD63 negativní CD123 pozitivní



Zdroj: vlastní zpracování na průtokovém cytometru z dat ústavu imunologie a alergologie

Po proběhlém stanovení průtokový cytometr vytvoří výsledkový list, kde je vidět celý průběh stanovení pro jednoho pacienta. (1; 16; 26)

10.0 Statistické hodnocení

Pro analýzu jsme použili data z ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Plzni. Data jsme zpracovali v programu Microsoft Excel a graf vytvořili v programu R. Data byla rozdělena podle alergie na včelí a vosí jed.

10.1 Hodnocení alergie na včelí jed pomocí metody test aktivace bazofilů

Celkem jsme vyhodnocovali 58 pacientů. Z toho 36 mužů, což je 62% a 22 žen, což je 38%.

Tabulka 2 Celkový počet pacientů - alergie na včelí jed

BAZOTEST	počet	%
MUŽI	36	62,06897
ŽENY	22	37,93103
CELKEM	58	100

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Pacienti byli rozděleni podle roku, kdy nastoupili na léčbu specifickou imunoterapií. V roce 2006 nastoupilo léčbu 10 pacientů, z toho 6 mužů a 4 ženy. V roce 2007 to bylo 9 nových pacientů a všichni byli muži. V roce 2008 5 nových pacientů 2 muži a 3 ženy. V roce 2010 7 nových pacientů 4 muži a 3 ženy. V roce 2011 8 nových pacientů 6 mužů a 2 ženy. A v posledním roce 2012 10 nových pacientů 5 mužů a 5 žen. Vše jsme zanesli do tabulky.

Tabulka 3 Počty pacientů podle roku nastoupení léčby - alergie na včelí jed

BAZOTEST	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
MUŽI	6	9	2	4	4	6	5
ŽENY	4	0	3	5	3	2	5
CELKEM	10	9	5	9	7	8	10

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Z dat získaných metodou bazotestu jsme si vypočítali průměrnou hodnotu a medián. Hodnoty jsou udány v procentech aktivovaných bazofilů. Data jsme hodnotili před nasazením léčby a po jednotlivých rocích léčby specifickou imunoterapií. Před nasazením léčby vyšla průměrná hodnota 51,99, medián vyšel 55,48. Pro první rok léčby vyšla průměrná hodnota 32,23 a medián 26,05. Pro druhý rok průměrná hodnota vyšla 33,14, medián 27,79. Třetí rok specifické imunoterapie vyšla průměrná hodnota bazotestu 26,38, medián 25,24. Pro čtvrtý

rok vyšla průměrná hodnota 17,51, medián 12,42. Pátý a poslední rok specifické imunoterapie vyšla průměrná hodnota 19,90, medián 13,84. Dále jsme si vypočítali rozdíly mezi mediánem před nasazením specifické imunoterapie a mediánem z každého roku specifické imunoterapie. Rozdíl mediánu z prvního roku léčby vyšel 29,43, z druhého roku 27,69, z třetího roku 30,25, ze čtvrtého roku 43,07 a z pátého roku 41,64. Vše jsme zanesli do tabulky.

Tabulka 4 Průměry, mediány, změny mezi mediány v jednotlivých rocích léčby - alergie na včelí jed

BAZOTEST						
ROKY	0	1	2	3	4	5
PRŮMĚR	51,99	32,23	33,14	26,38	17,51	19,90
MEDIAN	55,48	26,05	27,79	25,24	12,42	13,84
ROZDÍL		29,43	27,69	30,25	43,07	41,64

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Ke zhodnocení významnosti těchto dat jsme použili Wilcoxonův statistický test v programu R. Test se užívá pro hodnocení metod, které neodpovídají Gaussovu normálnímu rozložení. Takové metody označujeme jako neparametrické. Test pracuje s rozdíly mezi mediány. Výsledkem Wilcoxonova testu je hodnota p. Pokud hodnota p je nižší než 0,05 což odpovídá 5%, změna hodnot je statisticky významná. Hodnota p z první změny vyšla 0,002377, z druhé změny 0,00801, z třetí změny 0,0005559, ze čtvrté změny 0,0002613 a z páté změny 0,002204. Hodnoty z programu R jsme zanesli do tabulky.

Tabulka 5 Wilcoxonův statistický test - alergie na včelí jed

WILCOXONŮV STATISTICKÝ TEST					
roky specifické imunoterapie	1	2	3	4	5
P	p-value = 0,002377	p-value = 0,00801	p-value = 0,0005559	p-value = 0,0002613	p-value = 0,002204

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Všechny hodnoty vyšly nižší než 0,05, tudíž data, které jsme zpracovávali jsou statisticky významná.

Jako další krok jsme získaná data z bazotestu od pacientů před nasazením léčby a po jednotlivých letech léčby, zadali do programu R. Program R vypočítal minimální hodnotu, maximální hodnotu, průměr, medián, hodnotu dolního kvartilu, hodnotu horního kvartilu a vynechané hodnoty pro jednotlivé roky. Před nasazením léčby byla minimální hodnota 0,45, maximální hodnota 99,5, průměrná hodnota 51,99, medián 55,48, hodnota horního kvartilu 81,25, hodnota dolního kvartilu 24,93 a vynechaná data 2. Pro první rok léčby minimální hodnota vyšla 0,7, maximální hodnota 90,3, průměrná hodnota 32,23, medián 26,05, hodnota horního kvartilu 52,19, hodnota dolního kvartilu 9,3 a vynechaná data 10. Pro druhý rok léčby minimální hodnota vyšla 1,78, maximální hodnota 93,75, průměrná hodnota 33,14, medián 27,79, hodnota horního kvartilu 54,16, hodnota dolního kvartilu 7,88 a vynechaná data 19. Pro třetí rok léčby minimální hodnota vyšla 0,25, maximální hodnota 79,2, průměrná hodnota 26,38, medián 25,23, hodnota horního kvartilu 39,13, hodnota dolního kvartilu 4,625 a vynechaná data 28. Pro čtvrtý rok léčby minimální hodnota vyšla 1,12, maximální hodnota 46,65, průměrná hodnota 17,515, medián 12,415, hodnota horního kvartilu 21,363, hodnota dolního kvartilu 4,25 a vynechaná data 38. Pro poslední rok léčby vyšla minimální hodnota 1,02, maximální hodnota 45,45, průměrná hodnota 19,904, medián 13,84, hodnota horního kvartilu 32,053, hodnota dolního kvartilu 8,295 a vynechaná data 44. Data jsme zadali do tabulky.

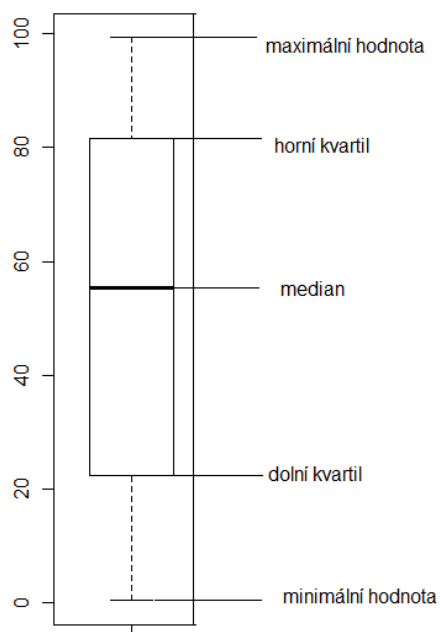
Tabulka 6 Data z programu R - alergie na včelí jed

R – PROGRAM						
Roky	0	1	2	3	4	5
Min.	0,45	0,7	1,78	0,25	1,12	1,02
1 st Qu.	24,93	9,3	7,88	10,29	4,625	8,295
Median	55,48	26,05	27,79	25,23	12,415	13,84
Mean	51,99	32,23	33,14	26,38	17,515	19,904
3 rd Qu.	81,25	52,19	54,16	39,13	21,363	32,053
Max.	99,5	90,3	93,75	79,2	46,65	45,45
NA's	2	10	19	28	38	44

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

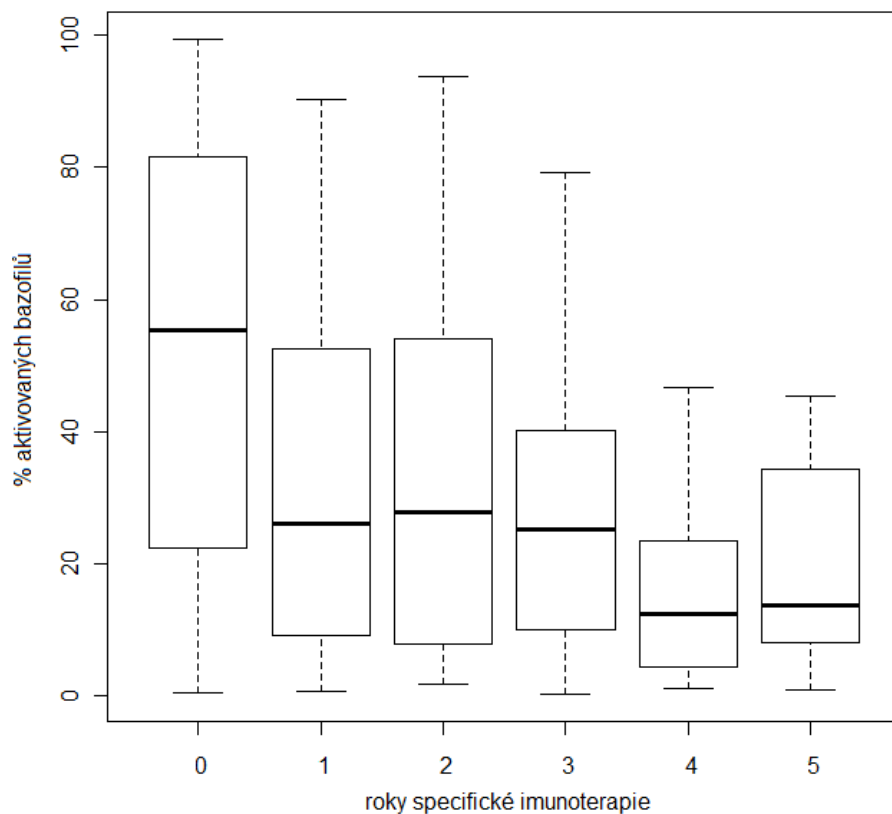
Průměrná hodnota v tomto testu je zanedbatelná jelikož se jedná o metodu neparametrickou, která používá pro zhodnocení medián. Z těchto dat program R sestavil graf. Graf je tvořen boxploty pro data získaná před specifickou imunoterapií a pro jednotlivé roky specifické imunoterapie. Každý jednotlivý boxplot ukazuje minimální hodnotu, maximální hodnotu, medián, hodnotu dolního kvartilu a hodnotu horního kvartilu.

Obrázek 5 Boxplot



Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Graf 1 Alergie na včelí jed



Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Z grafu lze vyčíst pokles hodnot aktivovaných bazofilů v průběhu specifické imunoterapie a navození tolerance na včelí jed.

10.2 Hodnocení alergie na vosí jed pomocí metody test aktivace bazofilů

V hodnocení jsme postupovali úplně stejně jako u alergie na včelí jed. Celkem jsme hodnotili 58 pacientů. Z toho 22 mužů, což odpovídá 38% a 36 žen, což odpovídá 62%. To je přesně naopak než u alergie na včelí jed.

Tabulka 7 Celkový počet pacientů - alergie na vosí jed

BAZOTEST	počet	%
MUŽI	22	37,93103
ŽENY	36	62,06897
CELKEM	58	

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Pacienti byli rozděleni podle roku začátku imunoterapie. V roce 2006 se vyšetřoval pouze 1 pacient a to žena. V roce 2007 přibyli 2 noví pacienti a opět dvě ženy. V roce 2008 znovu přibyli pouze 2 noví pacienti, ale již 1 žena a 1 muž. V roce 2009 již 7 nových pacientů, z toho 4 ženy a 3 muži. V roce 2010 16 nových pacientů, z toho 9 žen a mužů. V roce 2011 20 nových pacientů 13 žen a 7 mužů. V roce 2012 10 nových pacientů 6 žen a 4 muži. Tyto údaje jsme zanesli do tabulky.

Tabulka 8 Počty pacientů podle nastoupení léčby – alergie na vosí jed

BAZOTEST	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
MUŽI	0	0	1	3	7	7	4
ŽENY	1	2	1	4	9	13	6
CELKEM	1	2	2	7	16	20	10

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Z dat získaných metodou bazotestu jsme vypočítali průměrnou hodnotu a medián. Hodnoty jsou udány v procentech aktivovaných bazofilů. Data jsme hodnotili před nasazením léčby a po jednotlivých rocích léčby specifickou imunoterapií. Před nasazením léčby vyšla průměrná hodnota 32,13, medián vyšel 31,10. Pro první rok léčby vyšla průměrná hodnota 18,54 a medián 11,27. Pro druhý rok průměrná hodnota vyšla 16,97, medián 9,61. Třetí rok specifické imunoterapie vyšla průměrná hodnota bazotestu 15,30, medián 7,48. Pro čtvrtý a poslední rok vyšla průměrná hodnota 10,42, medián 7,48. Dále jsme si vypočítali rozdíl mezi mediánem před nasazením specifické imunoterapie a mediánem

z každého roku specifické imunoterapie. Rozdíl mediánu z prvního roku léčby vyšel 19,84, z druhého roku 21,50, z třetího roku 23,31 a ze čtvrtého roku 23,62. Vše jsme zanesli do tabulky.

Tabulka 9 Průměry, mediány, změny mezi mediány po jednotlivých rocích léčby - alergie na vosí jed

BAZOTEST					
ROKY	0	1	2	3	4
PRŮMĚR	32,13	18,54	16,97	15,30	10,42
MEDIAN	31,10	11,27	9,61	7,79	7,48
ROZDÍL		19,84	21,50	23,31	23,62

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Ke zhodnocení významnosti těchto dat jsme použili Wilcoxonův statistický test v programu R. Opět musela být hodnota p nižší než 0,05, aby byly data statisticky významná. Hodnota p z první změny vyšla 0,001527, z druhé změny 0,006199, z třetí změny 0,02322, ze čtvrté změny 0,03008. Hodnoty z programu R jsme zanesli do tabulky.

Tabulka 10 Wilcoxonův statistický test - alergie na vosí jed

WILCOXONŮV STATISTICKÝ TEST				
roky specifické imunoterapie	1	2	3	4
P	p-value = 0,001527	p-value = 0,006199	p-value = 0,02322	p-value = 0,03008

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Všechny hodnoty vyšly nižší než 0,05, tudíž data, které jsme zpracovávali jsou statisticky významná.

Jako další krok jsme získaná data z bazotestu od pacientů před nasazením léčby a po jednotlivých letech léčby zadali do programu R. Program R vypočítal minimální hodnotu, maximální hodnotu, průměr, medián, hodnotu dolního kvartilu, hodnotu horního kvartilu a vynechané hodnoty pro jednotlivé roky. Před nasazením léčby byla minimální hodnota 0,2, maximální hodnota 78,880, průměrná hodnota 32,13, medián 31,1, hodnota horního kvartilu 47,62, hodnota dolního kvartilu 12,94 a vynechaná data 2. Pro první rok léčby minimální hodnota vyšla 0,205, maximální hodnota 74,03, průměrná hodnota 18,54, medián 11,265, hodnota horního kvartilu 30,032, hodnota dolního kvartilu 3,1 a vynechaná data 18. Pro druhý rok léčby minimální hodnota vyšla 0,47, maximální hodnota 50,

průměrná hodnota 16,969, medián 9,605, hodnota horního kvartilu 30,277, hodnota dolního kvartilu 4,705 a vynechaná data 36. Pro třetí rok léčby minimální hodnota vyšla 1, maximální hodnota 51, průměrná hodnota 15,3, medián 7,79, hodnota horního kvartilu 29,45, hodnota dolního kvartilu 2,43 a vynechaná data 49. Pro čtvrtý a poslední rok léčby minimální hodnota vyšla 4, maximální hodnota 20,51, průměrná hodnota 10,42, medián 7,48, hodnota horního kvartilu 12,94, hodnota dolního kvartilu 7,15 a vynechaná data 53. Data jsme zadali do tabulky.

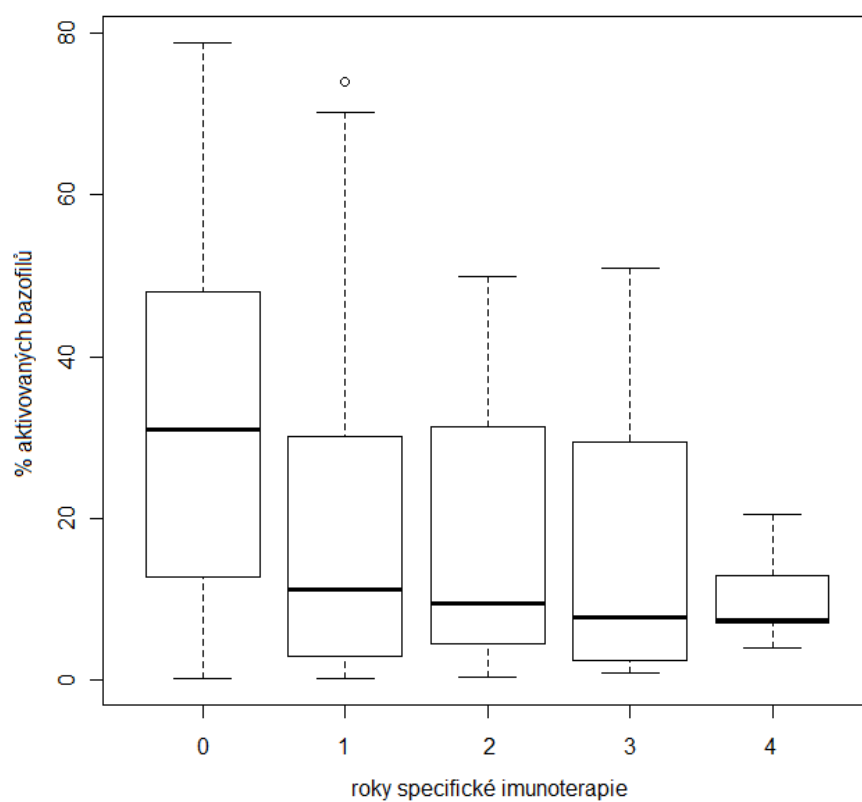
Tabulka 11 Data z programu R - alergie na vosí jed

R – PROGRAM					
Roky	0	1	2	3	4
Min.	0,2	0,205	0,47	1	4
1 st Qu.	12,94	3,1	4,705	2,43	7,15
Median	31,1	11,265	9,605	7,79	7,48
Mean	32,13	18,54	16,969	15,3	10,42
3 rd Qu.	47,62	30,032	30,277	29,45	12,94
Max.	78,88	74,03	50	51	20,51
NA's	2	18	36	49	53

Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Průměrná hodnota v tomto testu je zanedbatelná jelikož se jedná o metodu neparametrickou, která používá pro zhodnocení medián. Z těchto dat program R sestavil graf. Graf je tvořen boxploty pro data získaná před specifickou imunoterapií a pro jednotlivé roky specifické imunoterapie. Každý jednotlivý boxplot ukazuje minimální hodnotu, maximální hodnotu, medián, hodnotu dolního kvartilu a hodnotu horního kvartilu.

Graf 2 Alergie na vosí jed



Zdroj: vlastní zpracování z dat získaných z ústavu imunologie a alergologie

Z grafu lze opět vyčíst pokles aktivovaných bazofilů v průběhu specifické imunoterapie a navození tolerance na vosí jed.

Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit zda se v průběhu specifické imunoterapie hmyzím jedem mění hodnoty testu bazofilů. Výsledky testu jsme hodnotili s použitím odborných článků s podobnou tematikou.

V první řadě je nutné mít reprezentativní vzorek dat, aby výsledky testu byly statisticky významné. Jelikož jsme použili menší počet dat nemáme normální Gaussovo rozložení, což jsme zjistili Saphiro-Wilkovo testem, který je určen pouze pro parametrické testy, což test aktivace bazofilů není. Proto jsme použili Wilkoxonův statistický test, který hodnotí právě metody, které nemají Gaussovo normální rozložení, tedy metody neparametrické. Wilkoxonův test pracuje na principu počet dat ku změně mezi skupinami. Pokud test obsahuje menší počet dat, ale rozdíly mezi nimi jsou velké, vyjde tento test jako statisticky významný.

Nejdůležitějším bodem testu aktivace bazofilů je stanovení prahu citlivosti. K tomu je zapotřebí si připravit kalibrační křivku. Kalibrační křivka se sestaví z hymzích jedů o vzestupné koncentraci. Z této kalibrační křivky bychom usoudili minimální koncentraci jedu nutnou k aktivaci bazofilů. Sice by byl tento postup nejpřesnější, avšak časově i finančně náročný. Proto se často test aktivace bazofilů vyšetřuje při použití dvou koncentrací jedu. Bohužel i tento postup jsme nemohli použít. Důvodem je, že zdravotní pojišťovna proplácí pouze jednu koncentraci jedu, tudíž jsme test aktivace bazofilů vyšetřovali s použitím jedné koncentrace. I přes použití pouze jedné koncentrace jedu je viditelný pokles aktivovaných bazofilů a výsledky tohoto poklesu se shodují s odbornou literaturou. (6; 20; 21; 22; 23; 27; 28)

Z toho vyplývá, že stanovení aktivace bazofilů s použitím jedné koncentrace je dostačující pro správné výsledky stanovení a stačí ke zhodnocení správnosti léčby.

Naše výsledky tedy ukazují, že v průběhu specifické imunoterapie dochází k poklesu aktivovaných bazofilů. Tento výsledek se shoduje s odbornými články zaměřenými na stejnou problematiku. Jako další parametry hodnocení správného průběhu léčby je pokles specifických IgE protilátek a vzestup IgG4 protilátek.

Pokles aktivovaných bazofilů v průběhu léčby je jedna z částí hodnocení specifické imunoterapie a může položit základ pro další odbornou práci na podobné téma.

Závěr

Tato bakalářská práce s názvem "Změny v hodnotách testu bazofilů v průběhu specifické imunoterapie na jed blanokřídleho hmyzu" se člení na teoretickou a praktickou část.

V teoretické části rozebírám vlastní alergii na blanokřídleho hmyz, její patogenezi, klinické příznaky, složení jedu blanokřídleho hmyzu, diagnostiku a vlastní léčbu alergie. V praktické části se zaměřuji na zodpovězení cíle práce. Nejprve popisuji vlastní specifickou imunoterapii a vyšetřovací metodu, pomocí které jsem získala data ke zpracování. Dále se zabývám statistickým zhodnocením dat pro zodpovězení cíle práce.

Cílem práce je tedy zjištění zda získaná data z testu aktivace bazofilů jsou statisticky významná a zda vypovídají o správném průběhu léčby. Významnost dat jsem zhodnotila pomocí Wilcoxonova statistického testu. Tento test ukázal, že data použitá v této práci jsou statisticky významná. Pomocí programu R jsem data zhodnotila a podle nich sestavila graf, který ukázal pokles aktivovaných bazofilů v průběhu specifické imunoterapie. Léčba alergie na jed blanokřídleho hmyzu pomocí jedové imunoterapie vykazuje dobré výsledky a je účinná.

Výsledkem této bakalářské práce je tedy potvrzení, že specifická imunoterapie mění hodnoty aktivovaných bazofilů. Dochází k jejich snižování a tím by mělo docházet ke snižování reaktivity organismu na jed blanokřídleho hmyzu. Jelikož je tato práce postavena pouze na aktivaci bazofilů a k celkovému hodnocení specifické imunoterapie je nutno zhodnotit ještě specifické IgE protilátky a IgG4 protilátky, může tato práce položit základ pro další odbornou práci na podobné téma

Použité zdroje

1. **BARTŮŇKOVÁ, J. a kol.** *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha : Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
2. **ŠPIČÁK, V a PANZNER, P.** *Alergologie*. Praha : Galén, 2004. ISBN 80-7262-265-X.
3. **GAMLIN, L.** *Alergie od A do Z : příčiny obtíží, diagnostika, léčba alergií a intolerancí*. Praha : Reader's Digest Výběr, 2003. ISBN 80-86196-44-5.
4. **ČÁP, P. a PRŮCHA, M.** *Alergologie v kostce*. Praha : Triton, 2006. ISBN 80-7254-779-8.
5. **BRAUNOVÁ, J.** Alergie na hmyzí bodnutí. *Interní medicína pro praxi*. 2001, 4, 153-154, ISSN 1803-5256.
6. **HASCHOVÁ, M., a další, a další.** Vyšetřování specifických protilátek v průběhu specifické alergenové imunoterapie u pacientů s přecitlivělostí na včelí jed. *Alergie časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2005, 2, 97-103, ISSN 1212-3536.
7. **PETRŮ, V. a KRČMOVÁ, I.** *Anafylaxe život ohrožující alergie*. Praha : MAXDORF, 2011. 978-80-7345-211-7.
8. **STRURM, G., J., a další, a další.** Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and wasp venom allergy. *PLoS ONE*. 2011, 6, 1-8, ISSN 1932-6203.
9. **VYCHOVÁ, M., PANZNER, P. a VLAS, T.** Diagnostické postupy u pacientů s alergií na včelí a vosí jed. *ALERGIE časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2012, 3, 223-229, ISSN 1212-3536.
10. **PETRŮ, V. a ŠPIČÁK, v.** Test aktivace bazofilů. *ALERGIE časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2014, 2, 24-25, ISSN 1212-3536.
11. **ALK.** Pharmalgen Venom. Denmark : ALK Abelló, 2009. ISSN 1004050.
12. **KOPECKÝ, O., a další, a další.** *Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii*. Hradec Králové : GARAMON, 2004. ISBN 80-86472-17-5.
13. **ZIMA, T.** *Laboratorní diagnostika*. Praha : Galén, 2013. ISBN 978-80-7492-062-2.

14. **VACHOVÁ, M.** Současné možnosti diagnostiky alergie na hmyzí jed. *ALERGIE časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2014, 2, 24-25, ISSN 1212-3536.
15. **HONZOVÁ, S. a HAVRANOVÁ, M.** Test aktivace bazofilů, jeho přínos pro klinickou praxi. *Alergie časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2003, 4, 1-10, ISSN 1212-3536.
16. **MACGLASHAN, D., W.** Basophil activation testing. *Allergy and Clinical Immunology and Dermatological Science*. 2013, 4, 777-787, ISSN 0091-6749, 0923-1811.
17. **HOŘEJŠÍ, V. a BARTUŇKOVÁ, J.** *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha : Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-280-9.
18. **OZDEMIR, C., a další, a další.** Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clin Exp Allergy*. 2011, 41(9), 1226-1234, ISSN 1365-2222.
19. **LIŠKA, M., a další, a další.** Statistické zhodnocení souboru pacientů léčených specifickou alergenovou imunoterapií (SIT) na našem pracovišti v letech 1991 - 2003. *Alergie časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2006,1, 32-36, ISSN 1212-3536.
20. **BURIANOVÁ, M., a další, a další.** Metody diagnostiky alergie na hmyzí jed a změny laboratorních parametrů po roce specifické imunoterapie. *ALERGIE časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. Supplementum 2, 83, ISSN 1212-3536, 2008.
21. **BURIANOVÁ, M., a další, a další.** Basophil response to stimulation with bee venom at different concentration during the course of venom immunotherapy. *Allergy*. Supplementum 65 (92), 647, ISSN 1398-9995, 2010.
22. **HRAŠKO, V., KRÝSLOVÁ, S. a PANZNER, P.** Změny laboratorních parametrů u pacientů s alergií na včelí jed v průběhu léčby specifickou alergenovou imunoterapií. 2006, Supplementum 2, 65-66, ISSN 1212-3536.
23. **VACHOVÁ, M., a další, a další.** 4-years observational study of patients with honey bee venom allergy treated by venom immunotherapy. *Allergy*. 2011, Supplementum 66 (94), 435, ISSN 1398-9995.
24. **VLAS, T., a další, a další.** BAZOTEST - dlouhodobé zkušenosti. *ALERGIE časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2010, Supplementum 1, 55-56, ISSN 1212-3536.
25. **ŠETINOVÁ, I. a HAVRANOVÁ, M.** Test aktivace bazofilů a jeho místo v diagnostice alergií. *ALERGIE časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2014, 2, 24, ISSN 1212-3536.

26. **BECTON, DICKINSON.** BD FastImmune CD63 FITC/CD123 PE/Anti-HLA-DR PerCP. San Jose : BECTON DICKINSON. ISSN 236584.

27. **BRANDSTRÖM, J., et al., et al.** Basophil allergen threshold sensitivity, CD-sens, is a useful tool to optimize omalizumab dosage in food allergic patients.

EAACI Online Library. [Online] MULTIEPORTAL, June 6, 2015. [Cited: 3 22, 2016.]

<http://eaaci.multilearning.com/eaaci/2015/barcelona/103799/josef.brandstrm.basophil.allergen.threshold.sensitivity.cd-sens.is.a.useful.html?f=p6m3e814o10433>. ISSN 103799.

28. **HRASKO, V., HANZLÍKOVÁ, J. and PANZNER, P.** Changes of laboratory parameters in patients treated by venom immunotherapy. [Online] [Cited: 3 22, 2016.] <https://web.lfp.cuni.cz/imunologie/a9.html>.

29. **ŠPIČÁK, V. and PETRŮ, V.** Diagnostika alergie na jed blanokřídlého hmyzu.

ALERGIE časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii.

2014, 2.

Seznam zkratek

Ig – imunoglobulin

CNS – centrální nervový systém

Např. – například

Atd. – a tak dále

FcεRI – vysokoafinitní receptor pro protilátku třídy IgE

TNF – tumor nekrotizující faktor

TGF-β – transformující růstový faktor β

IL – interleukin

Th – pomocný T-lymfocyt

Treg – regulační T-lymfocyt

Anti- protilátka

EDTA – protisrážlivé činidlo, kyselina ethylendiamintetraoctová

GM-CSF – faktor stimulující kolonie

rVes v5 – složka jedu antigen 5

rVes v1 – složka jedu fosfolipáza A1

rApi m1 – složka jedu fosfolipáza A2

rApi m2 – složka jedu hyarluronidáza

rApi m4 – složka jedu mellitin

Min – minimální hodnota

1st Qu – hodnota dolního kvartilu

Median – medián

Mean – průměrná hodnota

3rd Qu – hodnota horního kvartilu

Max – maximální hodnota

NA´s – vynechaná data

Seznam tabulek

Tabulka 1 Tabulka klasifikace dle H.L.Müllera	16
Tabulka 2 Celkový počet pacientů - alergie na včelí jed.....	36
Tabulka 3 Počty pacientů podle roku nastoupení léčby - alergie na včelí jed	36
Tabulka 4 Průměry, mediány, změny mezi mediány v jednotlivých rocích léčby - alergie na včelí jed	37
Tabulka 5 Wilcoxonův statistický test - alergie na včelí jed	37
Tabulka 6 Data z programu R - alergie na včelí jed	38
Tabulka 7 Celkový počet pacientů - alergie na vosí jed	41
Tabulka 8 Počty pacientů podle nastoupení léčby – alergie na vosí jed	41
Tabulka 9 Průměry, mediány, změny mezi mediány po jednotlivých rocích léčby - alergie na vosí jed	42
Tabulka 10 Wilcoxonův statistický test - alergie na vosí jed	42
Tabulka 11 Data z programu R - alergie na vosí jed	43

Seznam grafů

Graf 1 Alergie na včelí jed	40
Graf 2 Alergie na vosí jed	44

Seznam obrázků

Obrázek 1 Výběr bazofilů pomocí znaku CD123 a bočního rozptylu SSC	33
Obrázek 2 Výběr bazofilů na základě znaku CD123 pozitivní a HLA-DR negativní	34
Obrázek 3 Aktivované bazofily CD63 pozitivní a CD123 pozitivní	35
Obrázek 4 Negativní výsledek aktivace bazofilů buňky CD63 negativní CD123 pozitivní	35
Obrázek 5 Boxplot.....	39