

ROZPRAWA DOKTORSKA

OCENA CZYNNIKÓW RYZYKA WYSTĘPOWANIA REAKCJI ALERGICZNYCH PO UŻĄDLENIU PRZEZ PSZCZOŁĘ U PSZCZELARZY I ICH RODZIN

Joanna Matysiak

Promotor pracy: prof. dr hab. Anna Bręborowicz

**Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej
Szpital Kliniczny im. K. Jonschera w Poznaniu
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu**

POZNAŃ 2012

Pani prof. dr hab. Annie Bręborowicz
Serdecznie Dziękuję
za przekazaną wiedzę, wskazówki
i pomoc przy realizacji pracy

Spis treści

1.	Wstęp.....	7
1.1.	Wprowadzenie.....	7
1.2.	Charakterystyka i taksonomia owadów błonkoskrzydłych (<i>Hymenoptera</i>)	8
1.3.	Częstość występowania alergii na jad owadów błonkoskrzydłych.....	9
1.4.	Czynniki ryzyka alergii na jad owadów błonkoskrzydłych	10
1.5.	Główne alergeny jadu pszczelego	11
1.6.	Mechanizmy powstawania alergii na jad pszczeleli	14
1.7.	Obraz kliniczny	17
1.7.1.	Reakcje miejscowe	17
1.7.2.	Reakcje ogólnoustrojowe.....	18
1.7.3.	Reakcje nietypowe.....	21
1.8.	Działanie toksyczne jadu pszczelego.....	21
1.9.	Diagnostyka alergii na jad pszczoły miodnej.....	22
1.9.1.	Testy skórne	23
1.9.2.	Testy <i>in vitro</i>	24
1.9.3.	Testy komórkowe	25
1.9.3.1.	Test uwalniania histaminy i sulfidoleukotrienów	25
1.9.3.2.	Test oceny aktywności bazofili.....	25
1.9.4.	Reakcje krzyżowe i test zahamowania	26
1.9.5.	Przeciwciała IgG4.....	28
1.9.6.	Tryptaza	28
1.9.7.	Karboksypeptydaza A3.....	29
1.10.	Postępowanie po użądleniu	30
1.11.	Leczenie lokalnych reakcji alergicznych.....	30
1.12.	Leczenie systemowych reakcji alergicznych.....	30
1.13.	Profilaktyka reakcji alergicznych	31
1.14.	Immunoterapia swoista jadem.....	32
1.14.1.	Wskazania i przeciwwskazania do immunoterapii.....	33
1.14.2.	Sposoby prowadzenia immunoterapii.....	34
1.14.3.	Czas trwania immunoterapii	34
1.14.4.	Efekty uboczne immunoterapii.....	35

1.14.5.	Czynniki ryzyka ciężkich reakcji anafilaktycznych w trakcie VIT	35
1.14.6.	Monitorowanie przebiegu immunoterapii	35
1.14.7.	Skuteczność immunoterapii	36
1.15.	Podsumowanie.....	36
3.	Grupa badana.....	39
4.	Metody.....	42
4.1.	Badania ankietowe	42
4.2.	Badania laboratoryjne	42
4.2.1.	Pobieranie próbek krwi przeznaczonych do badań.....	42
4.2.2.	Wykonywanie oznaczeń	42
4.2.2.1.	Odczynniki	43
4.2.2.2.	Zasady wykonywania oznaczeń.....	43
4.3.	Analizy statystyczne.....	44
5.	Wyniki	46
5.1.	Wyniki badań laboratoryjnych.....	46
5.2.	Analizy statystyczne.....	50
5.2.1.	Analiza porównawcza wyników badań w grupie użądlnionych.....	50
5.2.2.	Analiza porównawcza pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami.....	54
5.2.3.	Analiza korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu a wynikami badań laboratoryjnych	58
5.2.4.	Analiza korelacji objawów klinicznych po użądleniu z klasami sIgE jad i sIgE fosfolipaza A ₂	69
5.2.5.	Analiza czynników wpływających na stężenie IgG4	72
5.2.6.	Analiza korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę a wiekiem.....	77
6.	Dyskusja	79
6.1.	Ocena czynników wpływających na stężenia: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A ₂	79
6.1.1.	Ocena zależności stężenia: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A ₂ od czasu po użądleniu.....	80
6.1.2.	Porównanie stężeń: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A ₂ oraz klas: sIgE jad i sIgE fosfolipaza A ₂ pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami	81
6.1.3.	Ocena korelacji stężenia: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A ₂ z objawami klinicznymi występującymi po użądleniu przez pszczołę	82

6.1.4.	Ocena korelacji klas: sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A ₂ z objawami klinicznymi występującymi po użądleniu przez pszczołę.....	83
6.2.	Ocena czynników wpływających na stężenie tryptazy	84
6.2.1.	Ocena zależności stężenia tryptazy w surowicy od czasu po użądleniu przez pszczołę.....	86
6.2.2.	Porównanie podstawowych stężeń tryptazy (BST) pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami	87
6.2.3.	Ocena korelacji objawów klinicznych występujących po użądleniu przez pszczołę ze stężeniem tryptazy.....	88
6.3.	Ocena czynników wpływających na stężenie IgG4	90
6.3.1.	Ocena zależności stężenia IgG4 od czasu po użądleniu	90
6.3.2.	Porównanie stężeń IgG4 pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami.....	91
6.3.3.	Ocena dodatkowych czynników wpływających na stężenie IgG4 u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami	91
6.3.4.	Ocena korelacji stężenia IgG4 z objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę	92
6.3.5.	Porównanie stosunku sIgE jad/IgG4 pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami	93
6.4.	Ocena dodatkowych czynników ryzyka reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę	93
7.	Wnioski.....	98
8.	Streszczenie	99
9.	Summary.....	101
10.	Piśmiennictwo.....	103

WYKAZ SKRÓTÓW

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

ACEI	– (ang. <i>angiotensin converting enzyme inhibitors</i>) – inhibitory konwertazy angiotensyny
AlAT	– aminotransferaza alaninowa
AspAT	– aminotransferaza asparaginianowa
BAT	– (ang. <i>basophil activation test</i>) – test oceny aktywności bazofili
BST	– (ang. <i>baseline serum tryptase</i>) – podstawowe stężenie tryptazy
CAST	– (ang. <i>cellular allergosorbent test</i>) – test reaktywności komórek docelowych
CCDs	– (ang. <i>cross – reactive carbohydrate determinants</i>) – węglowodanowe epitopy odpowiedzialne za reakcje krzyżowe
CK	– (ang. <i>creatinine kinase</i>) – kinaza kreatynowa
CPA3	– (ang. <i>carboxypeptidase A3</i>) – karboksypeptydaza A3
DIC	– (ang. <i>disseminated intravascular coagulation</i>) – rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe
EDTA	– (ang. <i>ethylenodiaminetetraacetic acid</i>) – kwas etylenodiaminotetraoctowy
ELISA	– (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) – test immunoenzymatyczny
LD ₅₀	– (ang. <i>lethal dose</i>) – dawka śmiertelna
LLR	– (ang. <i>large local reaction</i>) – nadmierna reakcja miejscowa
MDI	– (ang. <i>metered dose inhaler</i>) – inhalator ciśnieniowy z dozownikiem
NR	– (ang. <i>normal reaction</i>) – normalna reakcja miejscowa
PAF	– (ang. <i>platelet activating factor</i>) – czynnik aktywujący płytki krwi
PWE	– płyn wieloelektrolitowy
RAST	– (ang. <i>radioallergosorbent test</i>) – test radioalergosorbpcji
SAR	– (ang. <i>systemic anaphylactic reaction</i>) – ogólnoustrojowa reakcja anafilaktyczna
sIgE fosfolipaza A ₂	– sIgE skierowane przeciwko fosfolipazie A ₂
sIgE jad	– sIgE skierowane przeciwko jadowi pszczelemu
sIgE	– (ang. <i>specific IgE</i>) – swoiste IgE
SYS	– (ang. <i>systemic reaction</i>) – reakcja systemowa
tIgE	– (ang. <i>total IgE</i>) – całkowite IgE
VIP	– (ang. <i>vasoactive intestinal peptid</i>) – wazoaktywny peptyd jelitowy
VIT	– (ang. <i>venom immunotherapy</i>) – immunoterapia jadem

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*) stanowi poważny problem w praktyce alergologicznej [1]. Użądlenia przez owady z rzędu *Hymenoptera* są jedną z głównych przyczyn anafilaksji zarówno u dorosłych, jak i u dzieci [2]. W Europie Środkowej większość poużądleniowych reakcji anafilaktycznych jest powodowanych przez pszczoły miodne (*Apis mellifera*) oraz rzadziej przez inne owady błonkoskrzydłe takie jak: osy (*Vespula vulgaris*, *Vespula germanica*), szerszenie (*Vespa crabro*) oraz trzmiele (*Bombus spp.*). W zależności od gatunku owada częstość występowania reakcji alergicznej po użądleniu i stopień jej nasilenia może być różny.

Użądlenie przez pszczołę zazwyczaj kończy się na wystąpieniu miejscowego rumienia i obrzęku połączonego z reakcją bólową, ale u osoby uczulonej na jad mogą pojawić się silne reakcje miejscowe i objawy ogólne do wstrząsu anafilaktycznego włącznie. Wystąpienie u pacjenta ciężkich objawów ogólnoustrojowych, zwłaszcza ze strony układu oddechowego, powoduje zazwyczaj znaczny poziom lęku przed kolejnym użądleniem i może znacząco wpływać na jakość życia. Dlatego istotna jest właściwa diagnostyka tych osób pod kątem alergii na jad i określenie, w jakim stopniu są oni w przyszłości narażeni na ciężkie objawy po użądleniu. Obecnie wykorzystywane w diagnostyce alergii na jad owadów błonkoskrzydłych testy skórne oraz oznaczanie stężenia swoistych przeciwciał w klasie IgE skierowanych przeciwko jadowi pszczelemu nie korelują z ciężkością objawów klinicznych, co jest wielokrotnie podkreślane w dostępnym piśmiennictwie [3-6]. Nie można zatem na ich podstawie wnioskować, który z uczulonych pacjentów jest najbardziej narażony na wystąpienie poważnych powikłań w przypadku następnego użądlenia. Dodatkowym testem oceniającym ryzyko ciężkiej anafilaksji po użądleniu jest oznaczenie stężenia tryptazy. W badaniach klinicznych wykazano, iż podwyższone stężenie tryptazy wiąże się z dużym ryzykiem ciężkiej reakcji systemowej po kolejnym użądleniu [5]. Nie przeprowadzono dotychczas badań oceniających poziom tryptazy u pszczelarzy. Kolejnym testem związanym z alergią na jad pszczeli jest oznaczanie stężenia przeciwciał IgG4. Miano tych przeciwciał rośnie w odpowiedzi na kolejne użądlenia i jest wysokie u osób często żądlnych – głównie u pszczelarzy. Jednakże stężenie IgG4 również nie koreluje z ciężkością objawów klinicznych. Oceniając ryzyko reakcji alergicznych występujących po użądleniu przez pszczołę ważne jest określenie dodatkowych czynników ryzyka wpływających na ciężkość

przebiegu tych reakcji – są to: wiek, płeć, choroby ogólnoustrojowe, alergia oraz zażywane leki.

Ze względu na wciąż niedoskonałą diagnostykę alergii na jad pszczoły konieczne są dalsze badania w celu oceny czynników ryzyka wystąpienia reakcji alergicznej spowodowanej użądleniem przez pszczołę miodną. Pszczelarze i ich rodziny są grupą osób wysoce ekspozowaną na użądlenia pszczoły miodnej i w związku z tym ryzyko uczulenia na jad jest u nich szczególnie duże. Z tego powodu są oni bardzo interesującą populacją do badania zależności pomiędzy objawami klinicznymi a wynikami testów diagnostycznych, a także do oceny dodatkowych czynników ryzyka reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę.

1.2. Charakterystyka i taksonomia owadów błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*)

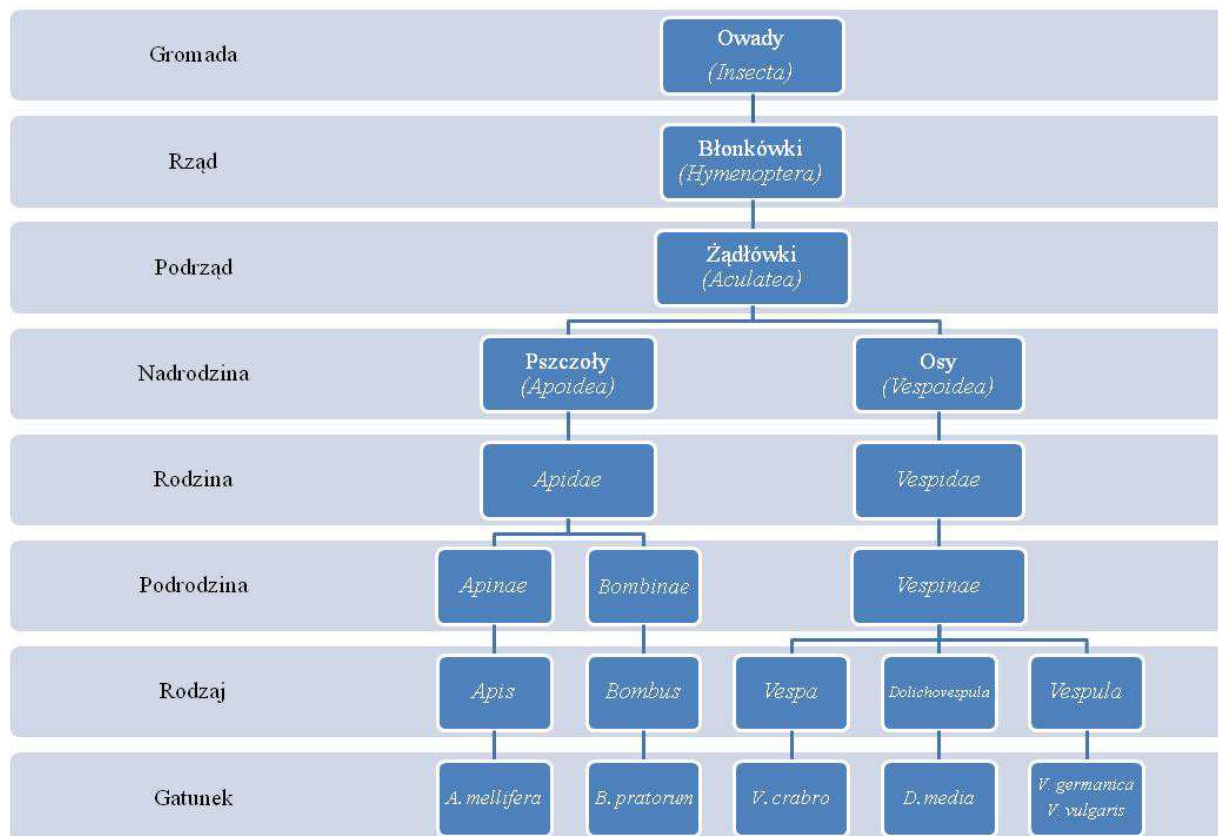
Z alergologicznego punktu widzenia w Polsce i Europie Środkowej największe znaczenie mają następujące owady błonkoskrzydłe (Ryc. 1): pszczoła miodna, osy, szerszenie oraz trzmiele.

Pszczoła miodna (*Apis mellifera*) – cechuje się prawie jednolitym ciemnobrązowym ubarwieniem. Po użądleniu pozostawia w skórze cały aparat żądłowy wraz z zawierającym jad woreczkiem jadowym, którego budowa i fizjologia powoduje dalsze zagłębianie się żądła w tkankach i stopniowe uwalnianie pozostałej porcji jadu. Dlatego tak ważne jest jak najszybsze (w ciągu pierwszych 30 sekund) usunięcie żądła ze skóry. Po około 1 minucie następuje uwolnienie całej ilości jadu zawartej w aparacie żądłowym. Uwalniana przez pszczołę dawka jadu wynosi 50-140 μg [7, 8]. Pszczoły żądla najczęściej w pobliżu pasiek, w sadach.

Osy (*Vespidae*) – mają barwę czarno – żółtą lub ciemnobrązowo – żółtą. Osy z rodzaju *Vespula* gniazdują w ziemi. Natomiast z rodzaju *Dolichovespula* zakładają gniazda przyklepione do gałęzi drzew, w altanach, na poddaszach. Osy po użądleniu nie zostawiają żądła w skórze i mogą żądlić wielokrotnie. Uwalniana dawka jadu jest dużo mniejsza niż u pszczoły i wynosi 1,7-3,1 μg [7, 8]. Najczęstsze są użądlenia związane ze spożywaniem słodkich pokarmów i napojów zwłaszcza na świeżym powietrzu. Jest to spowodowane faktem, iż osy żywią się cukrami i są wabione przez słodką żywność.

Szerszenie (*Vespa*) – budzą respekt z uwagi na swoje znaczne rozmiary, osiągając wielkość do 35 mm. Szerszenie zakładają gniazda w dziuplach drzew, na poddaszach i w altanach. Również nie zostawiają żądła w skórze ofiary.

Trzmiele (*Bombus spp.*) – charakteryzują się krępą budową ciała, obfitym owłosieniem oraz żółtymi, pomarańczowymi lub białymi paskami na tułowiu i odwłoku. Latają powoli, nisko nad ziemią, wydając głośne dźwięki. Są to bardzo spokojne owady, które żądają w niesłychanie rzadkich sytuacjach np. przy próbie zniszczenia ich gniazda.



Rycina 1. Skrócona taksonomia owadów błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*) wywołujących reakcje alergiczne w Polsce i Europie Środkowej.

1.3. Częstość występowania alergii na jad owadów błonkoskrzydłych

Reakcje alergiczne po użądleniu mogą wystąpić u osób w każdym wieku, jednakże częściej dotyczą dorosłych niż dzieci. W przypadku osób dorosłych narażenie na użądlenia jest większe u mężczyzn niż u kobiet, ponieważ częściej pracują oni na wolnym powietrzu [9]. W świetle aktualnego piśmiennictwa reakcje uczuleniowe o charakterze ogólnoustrojowym występują u 0,3-8,9% populacji [4, 9-15], w tym u dzieci są to wartości 0,15-0,3 %. Natomiast nasilone reakcje lokalne dotyczą 2,4-26,4% osób [11, 12], u dzieci do 19% [9]. Należy dodać, iż grupą osób szczególnie narażonych na użądlenia i alergię na jad pszczeleli z racji wykonywanej pracy są pszczelarze [16-18]. Przeprowadzone badania

sugerują, że 17-43% pszczelarzy jest uczulonych na jad pszczoły [19]. Według różnych źródeł odsetek reakcji systemowych w tej grupie waha się od 4,4% [19] do nawet 43% [20], natomiast częstość ciężkich reakcji miejscowych sięga nawet 38% [20, 21].

Śmiertelność z powodu anafilaksji po użądleniu przez owady błonkoskrzydłe jest niska i wynosi 0,03-0,48 zgonów na 1 milion mieszkańców na rok [22].

1.4. Czynniki ryzyka alergii na jad owadów błonkoskrzydłych

Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań klinicznych wiadomo, że istnieją pewne predyspozycje, które wpływają na ciężkość reakcji uczuleniowej na jad owadów błonkoskrzydłych [5, 6, 23, 24] (Tab. 1). Należą do nich m.in.:

- wiek – ryzyko wystąpienia ciężkiej reakcji anafilaktycznej (ang. *systemic anaphylactic reaction* – SAR) po użądleniu rośnie wraz z wiekiem;
- płeć – mężczyźni są obciążeni większym ryzykiem ciężkich reakcji alergicznych głównie z powodu większej ekspozycji na użądlenia;
- choroby układu krążenia – nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, zaburzenia rytmu serca;
- przyjmowane leki – głównie inhibitory konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin converting enzyme inhibitors* - ACEI) i β -blokery, ale również inne leki obniżające ciśnienie tętnicze krwi;
- mastocytoza – choroba spowodowana nadmiernym rozrostem komórek tucznych i charakteryzująca się występowaniem objawów związanych z uwolnieniem mediatorów tych komórek. Jady owadów błonkoskrzydłych są jednym z wielu czynników mogących wywołać ciężką reakcję anafilaktyczną u chorych na mastocytozę [25];
- podwyższony poziom tryptazy w surowicy;
- przeżyty epizod ciężkiej reakcji anafilaktycznej po użądleniu, a także narastający odczyn lokalny;
- krótki okres czasu od ostatniego użądlenia (również dobrze tolerowanego)

Piśmiennictwo podaje rozbieżne informacje odnośnie częstszego występowania nadwrażliwości na jad owadów błonkoskrzydłych u osób z chorobami atopowymi. Niektóre badania nie wykazują takiej korelacji [17, 26, 27], podczas gdy inne wyraźnie wskazują na związek powyższej alergii z atopią [16, 20, 28].

Dotychczas stwierdzonymi dodatkowymi czynnikami ryzyka u pszczelarzy są:

- objawy alergiczne ze strony górnych dróg oddechowych występujące podczas pracy w pasiece;
- astma;
- staż pracy w pasiece;
- liczba użądleń otrzymanych rocznie;
- sezonowość (bardziej nasilone reakcje na początku niż na końcu sezonu pszczelarskiego) [20, 21, 27-31].

Tabela 1. Czynniki zwiększające ryzyko użądlenia oraz wystąpienia reakcji anafilaktycznej.

Czynniki zwiększające ryzyko użądlenia	Czynniki zwiększające ryzyko wystąpienia reakcji anafilaktycznej
<ul style="list-style-type: none"> • pszczelarze i ich rodziny • zamieszkiwanie w pobliżu pasieki, sadów • wykonywanie takich zawodów jak: sprzedawca owoców i wyrobów cukierniczych, piekarz, cukiernik, strażak, rolnik, ogrodnik • spędzanie czasu na wolnym powietrzu • jazda na motocyklu, na rowerze 	<ul style="list-style-type: none"> • stwierdzenie w wywiadzie ciężkiej reakcji alergicznej (III lub IV stopień, silny skurcz oskrzeli) • wiek (osoby powyżej 40 roku życia) • choroby układu krążenia • astma • przyjmowanie niektórych leków (β-blokery łącznie z kroplami ocznymi, ACEI, niesteroidowe leki przeciwzapalne) • zmęczenie fizyczne, psychiczne • podwyższony poziom tryptazy • mastocytoza

1.5. Główne alergeny jadu pszczelego

Do głównych składników jadu pszczelego należą proteiny (melittyna, apamina, peptyd MCD) oraz enzymy (fosfolipaza A₂, hialuronidaza) [32-34]. Ponadto w skład jadu pszczelego wchodzi niewielkie ilości amin biogennych (histamina, dopamina, noradrenalina) [35], węglowodanów, fosfolipidów, aminokwasów i feromonów [36]. W ostatnich latach odkryto kolejne proteiny [37-41]. Działanie biologiczne oraz rola tych nowoodkrytych składników jest wciąż niejasna.

Dotychczas zidentyfikowano 10 alergenów obecnych w jadzie pszczelim [42], z których najważniejsze to: fosfolipaza A₂ oznaczana jako Api m1 (główny alergen jadu

pszczelego), hialuronidaza (Api m 2), kwaśna fosfataza (Api m 3) oraz melittyna (Api m 4) [42]. Wszystkie alergeny jadu pszczelego wymieniono w tabeli 2, a poniżej przedstawiono ich krótkie charakterystyki.

Tabela 2. Alergeny jadu pszczelego [42].

Alergen	Nazwa biochemiczna
Api m1	Fosfolipaza A ₂
Api m2	Hialuronidaza
Api m3	Kwaśna fosfataza
Api m4	Melittyna
Api m5	Dipeptydylopeptydaza IV
Api m6	–
Api m7	Proteaza serynowa CUB
Api m8	Karboksyloesteraza
Api m9	Karboksypeptydaza serynowa
Api m10	Ikarapina

- Api m1 – fosfolipaza A₂

Fosfolipaza A₂ jest głównym alergenem jadu pszczelego – aż 97 % uczulonych na jad pszczeli posiada swoiste przeciwciała skierowane przeciwko Api m1. Stanowi 10-12 % suchej masy jadu i jest najbardziej aktywną znaną fosfolipazą [38, 43]. Podobnie jak inne fosfolipazy jest aktywowana przez wapń i znacznie słabiej przez inne kationy dwuwartościowe. Posiada zdolność do penetracji błon komórkowych i do ich niszczenia. Fosfolipaza A₂ jadu pszczelego powoduje, że fosfolipidy błonowe przekształcają się w struktury o charakterze detergentów, co prowadzi do powstania porów w błonie komórkowej i w efekcie do jej zniszczenia. Produktami reakcji z udziałem fosfolipazy są lizofosfoglicerydy i długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Obie te grupy związków są również zdolne do interakcji z dwuwarstwową strukturą lipidową otaczającą komórkę. Fosfolipaza A₂ działa synergistycznie z melittyną [43].

- Api m 2 – hialuronidaza

Hialuronidaza jest drugim głównym alergenem jadu pszczoły miodnej, pomimo że stanowi zaledwie 1-2 % jego suchej masy [43]. Około połowa uczulonych na jad pszczeli posiada przeciwciała IgE przeciwko hialuronidazie. Api m2 jest enzymem zdolnym do hydrolizy kwasu hialuronowego, który jest naturalnym spoiwem międzykomórkowym w tkankach i dzięki właściwościom adhezyjnym umożliwia utrzymanie komórek w zwartej strukturze. W wyniku hydrolizy dochodzi do zwiększenia przepuszczalności tkanek i ścian naczyń, a w ten sposób do zniesienia bariery dla wolnej dyfuzji innych alergenów oraz toksycznych składników jadu. Z tego powodu hialuronidaza nazywana jest „czynnikiem rozprzestrzeniającym” (ang. *spreading factor*) [43, 44]. Ze względu na podobieństwo struktury hialuronidazy pszczoły i hialuronidazy osy, alergen ten jest główną przyczyną reakcji krzyżowych przeciwciał IgE skierowanych przeciwko jadom tych owadów.

- Api m3 – fosfataza kwaśna

Fosfataza kwaśna podobnie jak hialuronidaza występuje w jadzie pszczelim w ilości 1 - 2 % [43]. Przeciwciała przeciwko fosfatazie kwaśnej wykrywane są u 60 % uczulonych. Fosfataza kwaśna posiada zdolność do pobudzenia uczulonych bazofili do uwalniania histaminy, jednakże mechanizm jej działania nie jest dokładnie poznany [45].

- Api m4 – melittyna

Melittyna jest głównym składnikiem jadu pszczelego, stanowiącym około połowę (45 - 50 %) jego suchej masy [43]. Api m4 ma znacznie mniejsze właściwości alergizujące niż fosfolipaza A₂ czy hialuronidaza. Od 25-50 % pacjentów uczulonych na jad pszczeli ma przeciwciała skierowane przeciwko melittynie [45]. Melittyna działa na warstwę lipidową błon komórkowych i posiada silne właściwości lityczne. Peptyd ten działa synergistycznie z fosfolipazą A₂. Melittyna jest inkorporowana do dwuwarstwy lipidowej i zakłóca jej strukturę, przez co fosfolipidy błonowe stają się podatne na enzymatyczne działanie fosfolipazy A₂. Stwierdzono, że melittyna i fosfolipaza A₂ są toksyczne nawet wtedy, gdy działają oddzielnie. Jednakże ich aktywność zdecydowanie rośnie, gdy działają razem. Powodują wówczas lizę komórek (są m.in. odpowiedzialne za hemolizę erytrocytów) przy znacznie niższych stężeniach. Api m4 jest również głównym związkiem odpowiedzialnym za wywoływany ból [44, 45]. Ponadto melittyna jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za hamujący wpływ jadu pszczelego na produkcję wolnych rodników ponadtlenkowych [46].

Udowodniono również, że Api m4 posiada właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych, ponieważ jest silnym inhibitorem kalmoduliny [46].

- Api m5 – dipeptydylopeptydaza IV

Jest drugą obok hialuronidazy przyczyną reakcji krzyżowych ze względu na duże podobieństwo budowy tego enzymu do enzymu występującego w jadzie osy. Dipeptydylopeptydaza IV jest odpowiedzialna za przekształcanie promelittyny w melittynę w przewodzie jadowym pszczoły [45].

- Api m6

Jest to kolejne białko alergenowe stanowiące 1-2 % suchej masy jadu, przeciwko któremu 40 % pacjentów uczulonych na jad pszczeli posiada swoiste IgE [45]. Jak dotąd nie ustalono jego biologicznej funkcji.

- Api m7 – proteaza serynowa, Api m8 – karboksylolizaza, Api m9 – karboksypeptydaza serynowa – są to alergeny jadu pszczelego występujące w bardzo niewielkiej ilości – tj. < 1 %. Funkcja tych enzymów nie jest znana [45].

- Api m10 – ikarapina

Biologiczna funkcja również tego alergenu nie została dotychczas wyjaśniona [40]. Jednakże w ostatnio przeprowadzonych badaniach naukowych stwierdzono, że Api m10 jest alergenem jadu pszczelego o aktywności niezależnej od CCDs, co czyni go potencjalnie kluczowym elementem do wykorzystania w diagnostyce alergii na jad pszczeli [47].

Złożoność składu jadu pszczelego oraz mechanizmy jego dystrybucji powodują, że jad uwalniany przez pszczołę może być jedną z wielu, niezliczonych kombinacji różniących się nieznacznie swoją zawartością. Fakt ten dodatkowo utrudnia diagnostykę alergii na jad pszczeli, która oparta jest na wciąż niedoskonałych testach skórnych i serologicznych [18].

1.6. Mechanizmy powstawania alergii na jad pszczeli

Uczulenie na jad pszczeli rozwija się najczęściej po użądleniu przez pszczołę, ale może także pojawić się w wyniku wdychania rozpylonego suchego jadu (np. przez

pracowników laboratorium) lub innych substancji pochodzenia pszczelego przez pszczelarzy (kurz pochodzący z ula może zawierać fragmenty pszczoł, propolis oraz substancje żywiczne) [19]. Aktualnie brak jest jednoznacznych danych, czy spożywanie miodu pszczelego, zawierającego niewielkie ilości jadu, może doprowadzić do wyzwolenia reakcji alergicznej.

Najczęstszym mechanizmem powstania alergii na jad pszczoły miodnej jest reakcja nadwrażliwości typu I, w przebiegu której dochodzi do powstania przeciwciał w klasie IgE skierowanych przeciwko jadowi pszczelemu. Jednakże reakcja ta stanowi odmienny typ reakcji anafilaktycznej w porównaniu do chorób atopowych, ponieważ po jej ustąpieniu nie rozwija się w tkankach przewlekły proces zapalny, tak jak dzieje się to w astmie oskrzelowej czy alergicznym nieżycie nosa [8]. Do uczulenia dochodzi w wyniku kontaktu z jadem pszczelim. Komórki prezentujące antygen (przede wszystkim komórki Langerhansa skóry i makrofagi) pochłaniają jad na drodze fagocytozy lub pinocytozy. Następnie alergeny jadu ulegają enzymatycznej fragmentacji do peptydów, które z udziałem antygenów zgodności tkankowej MHC klasy II zostają zaprezentowane limfocytom pomocniczym Th0 (CD 4⁺). Prezentacja antygenów jadu odbywa się w regionalnych węzłach chłonnych. W wyniku tego procesu limfocyty Th0 zaczynają się przekształcać w limfocyty Th2 i wytwarzają cytokiny – głównie IL-4, IL-5 i IL-13 [48]. Powstające interleukiny powodują zjawisko przełączania klas syntetyzowanych immunoglobulin i stymulują limfocyty B do produkcji alergenowo swoistych przeciwciał IgE (sIgE). Przeciwciała te łączą się następnie z wykazującym do nich wysokie powinowactwo receptorem FcεRI obecnym na komórkach efektorowych – głównie na komórkach tucznych i bazofilach. Do wyzwolenia reakcji anafilaktycznej dochodzi, gdy uczulone komórki efektorowe zostają ponownie ekspozycjonowane na ten sam alergen (jad pszczeli). Połączenie antygeny z przeciwciałami IgE powoduje aktywację receptora FcεRI, co uruchamia kaskadę reakcji prowadzących do degranulacji mastocytów. Dochodzi do aktywacji cykazy adenylowej, pod wpływem której zwiększa się stężenie cyklicznego AMP, co aktywuje kinazę białkową A. Kinaza ta uczestniczy w reakcjach uwalniania kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych oraz powoduje uwolnienie wapnia wewnątrzkomórkowego. Pod wpływem wapnia dochodzi do aktywacji kinazy łańcucha lekkiego miozyny, czego bezpośrednim skutkiem jest degranulacja mastocyta. W wyniku degranulacji komórek tucznych zostają uwolnione liczne mediatory, które możemy podzielić na 3 grupy:

Grupa 1 – wcześniej wyprodukowane i zmagazynowane w komórkach – m.in. histamina, proteazy (tryptaza, chymaza), proteoglikany, niektóre cytokiny i czynniki wzrostu;

Grupa 2 – powstające *de novo* mediatory prozapalne: prostaglandyny i leukotrieny;

Grupa 3 – nowosyntetyzowane czynniki wzrostu, cytokiny i chemokiny [48].

Działanie kluczowych dla reakcji alergicznej mediatorów jest następujące:

- histamina – jest odpowiedzialna za większość wczesnych zmian patofizjologicznych podczas reakcji IgE – zależnej. Działa poprzez receptory związane z białkami G – H₁, H₂, H₃ i H₄. W wyniku pobudzenia receptora H₁ dochodzi do skurczu mięśniówki gładkiej oskrzeli, rozszerzenia naczyń krwionośnych i zwiększenia ich przepuszczalności oraz skurczu macicy i pobudzenia perystaltyki przewodu pokarmowego. Skutkiem obturacji oskrzeli może być duszność, wynikiem rozszerzenia naczyń jest rumień i spadek ciśnienia tętniczego, a wzrost przepuszczalności naczyń powoduje pojawienie się obrzęku;
- tryptaza – zapobiega zjawiskom krzepnięcia poprzez inaktywację fibrynogenu, zwiększa podatność mięśniówki gładkiej na działanie histaminy oraz powoduje degranulację wazoaktywnego peptydu jelitowego (ang. *vasoactive intestinal peptide* – VIP), który ma działanie bronchodilacyjne;
- chymaza – jest silnym aktywatorem angiotensyny I, natomiast unieczynnia bradykininę oraz neuropeptydy – m.in. VIP;
- karboksypeptydaza – aktywuje angiotensynę I;
- leukotrieny (LTB₄, LTC₄, LTD₄) – wywierają 1000 – krotnie większy wpływ na drogi oddechowe i naczynia krwionośne niż histamina, zwiększają również wydzielanie śluzu przez gruczoły dróg oddechowych, są czynnikiem chemotaktycznym dla eozynofiliów i neutrofilów;
- prostaglandyna D₂ – jest silnym czynnikiem kurczącym mięśniówkę gładką, zwiększa podatność oskrzeli na działanie innych mediatorów, działa wazodylatacyjnie oraz hamuje agregację płytek krwi [48].

Pacjenci z wysokim stężeniem sIgE, a przez to z dużą ekspresją receptora FcεRI na powierzchni komórek tucznych i bazofiliów mają komórki efektorowe zdolne do uwolnienia dużych ilości mediatorów w odpowiedzi na swoisty alergen. Jednakże część osób z wysokimi stężeniami swoistych IgE nie wykazuje klinicznej manifestacji tej alergii, a część pacjentów z bardzo niskimi lub wręcz nieoznaczalnymi poziomami sIgE doświadcza zagrażających życiu reakcji systemowych. Jest to dowodem na to, iż nadal inne, dotychczas słabo poznane czynniki mogą odgrywać istotną rolę w ujawnianiu się objawów klinicznych u osób produkujących sIgE [48].

Należy dodać, że nawet u 20 % pacjentów IgE – zależna reakcja nadwrażliwości może mieć charakter dwufazowy – druga faza rozwija się po 1-72 godzinach od użądlenia [8].

Inne możliwe mechanizmy powstania alergii na jad owadów to reakcje nadwrażliwości typu III (reakcja kompleksów immunologicznych) i typu IV (reakcja typu późnego). Odpowiedzią na użądlenia mogą być również reakcje nieimmunologiczne tj. toksyczne.

Reakcja typu III może przebiegać pod postacią różnych zespołów chorobowych w zależności od powstających przeciwciał. Wynikiem wytworzenia przeciwciał IgG skierowanych przeciwko antygenom jadu może być zespół przypominający chorobę posurowiczą oraz kłębuszkowe zapalenie nerek spowodowane odkładaniem się kompleksów immunologicznych zawierających IgG i antygeny jadu. Objawy choroby Schönleina-Henocha są wynikiem odkładania się kompleksów, w skład których wchodzi IgA. Natomiast zespoły chorobowe przypominające *miastenia gravis* i zespół Guillain-Barré są prawdopodobnie związane z wytwarzaniem przeciwciał przeciwko melittynie.

Reakcja typu IV związana z rekrutacją limfocytów T oraz makrofagów powoduje powstanie zmian o charakterze ziarniniakowym [49].

Mechanizm i objawy reakcji toksycznych omówiono w rozdziale 1.8.

1.7. Obraz kliniczny

Objawy występujące po użądleniu mogą się ograniczyć do miejscowego stanu zapalnego, ale może też pojawić się szerokie spektrum objawów ogólnych ze stanem bezpośredniego zagrożenia życia włącznie.

1.7.1. Reakcje miejscowe

Odczyny miejscowe dzielimy na: normalne reakcje miejscowe i nadmierne reakcje miejscowe.

- Normalna reakcja miejscowa (ang. *normal reaction* – NR) po użądleniu obejmuje takie objawy jak: niewielki obrzęk, zaczerwienienie i ból trwające od kilku minut do kilku godzin. Powyższe objawy są bardziej nasilone, jeżeli użądlenie dotyczy błony śluzowej (np. jamy ustnej) lub okolic bogatych w luźną tkankę łączną (powieki, opuszki palców, wargi) [50]. Zdarzają się również powikłania w postaci zakażenia

miejsca użądlenia przebiegające z gorączką i powiększeniem okolicznych węzłów chłonnych.

- Nadmierne reakcje miejscowe (ang. *large local reactions* – LLR) są spowodowane późną fazą reakcji alergicznej [51, 52] i definiowane są najczęściej jako obrzęk o średnicy powyżej 10 cm i trwający dłużej niż 24 godziny. Nasilający się obrzęk pojawia się po 6-12 godzinach od użądlenia i osiąga największe rozmiary po 24-48 godzinach. Następnie zmiany cofają się stopniowo przez 5 do 10 dni. Obrzękowi towarzyszy zazwyczaj rumień, miejscowy świąd i ból. Pomimo, że reakcja ma charakter miejscowy, to może stanowić zagrożenie życia w przypadku, gdy miejsce użądlenia znajduje się w okolicy górnych dróg oddechowych. Czasami w przebiegu nasilonego odczynu miejscowego występującego na kończynie pojawia się zaczerwienienie na przebiegu naczyń limfatycznych, biegnące w kierunku węzłów chłonnych pachowych lub pachwinowych. Objawy te mogą wystąpić zarówno w przebiegu nasilonego miejscowego odczynu alergicznego, jak i w przebiegu zakażenia [51, 52]. Zakażenie miejsca użądlenia należy podejrzewać, jeżeli obrzęk, zaczerwienienie i ból znacznie się nasilają po 3-5 dniach od użądlenia i towarzyszy im gorączka.

Nieco inny podział reakcji miejscowych przedstawił Nelson [53]. Według jego klasyfikacji normalna reakcja miejscowa może mieć średnicę nawet do 25 cm, ale musi występować nie dłużej niż przez 24 godziny. Z kolei nadmierna reakcja miejscowa ma powyżej 5 cm i trwa 2-7 dni.

1.7.2. Reakcje ogólnoustrojowe (ang. *systemic reactions* – SYS)

Objawy ogólne w przebiegu reakcji alergicznej po użądleniu przez pszczołę mogą dotyczyć skóry oraz układów: oddechowego, pokarmowego i krążenia [54]. Najczęściej stosowane klasyfikacje stopnia ciężkości reakcji systemowych według Muellera oraz Ringa i Messmera przedstawiono w tabeli 3 i 4.

- Objawy skórne obejmują pokrzywkę, świąd i obrzęk naczynioruchowy, często z towarzyszącą gorączką. Obrzęk naczynioruchowy Quincke'go przebiega pod postacią obrzęku twarzy z silnym obrzmieniem błon śluzowych np. jamy ustnej i oczu. Może również obejmować małżowinę uszną lub dłonie.

- Objawy ze strony układu oddechowego – największe zagrożenie stanowi obrzęk krtani, ponieważ może prowadzić do niedrożności górnych dróg oddechowych. Pojawia się wtedy duszność i „stridor” krtaniowy. Drugą przyczyną duszności i świszczącego oddechu jest skurcz oskrzeli, szczególnie trudny do opanowania u dzieci i stanowiący u nich główną przyczynę zgonów [49].
- Dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego to nudności, wymioty, biegunka i bóle brzucha.
- U kobiet mogą się pojawić bóle podbrzusza spowodowane skurczem macicy, co z kolei wiąże się z ryzykiem krwawienia z dróg rodnych, poronienia lub porodu przedwczesnego u ciężarnej.
- Objawy ze strony układu krążenia występują najrzadziej, ale są najbardziej niebezpieczne. W przebiegu odczynu alergicznego na użądlenie mogą wystąpić: spadek ciśnienia tętniczego, zamroczenie, utrata przytomności i, rzadko, zaburzenia rytmu serca, a nawet skurcz naczyń wieńcowych. Pomimo, że ból o charakterze dławicowym czy zawał mięśnia sercowego zdarzają się bardzo rzadko, to jednak pacjenci często skarżą się na ból w klatce piersiowej. Może to być spowodowane stanem dużego niepokoju lub paniki występującej u użądłonej osoby [3]. Dlatego tak ważne jest właściwe monitorowanie u pacjenta podstawowych funkcji życiowych tj. ciśnienia tętniczego, tętna, oddechu, co pozwoli na trafną interpretację obserwowanych objawów.

Najgroźniejszym powikłaniem uogólnionej reakcji alergicznej jest wstrząs anafilaktyczny, w przebiegu którego dochodzi do spadku ciśnienia tętniczego, utraty przytomności, a w końcu do zatrzymania akcji serca i oddechu.

Tabela 3. Stopnie ciężkości reakcji anafilaktycznej wg Muellera [23].

Stopień	Objawy			
	Skóra	Układ pokarmowy	Układ oddechowy	Układ krążenia
I	<ul style="list-style-type: none"> • świąd • zaczerwienienie • pokrzywka 	–	–	–
II	<ul style="list-style-type: none"> • świąd • zaczerwienienie • pokrzywka • obrzęk naczynioruchowy 	<ul style="list-style-type: none"> • nudności • ból brzucha 	<ul style="list-style-type: none"> • wyciek z nosa • chrypka • duszność 	<ul style="list-style-type: none"> • tachykardia (wzrost ≥ 20/min) • hipotensja (spadek ≥ 20 mmHg) • arytmia
III	<ul style="list-style-type: none"> • świąd • zaczerwienienie • pokrzywka • obrzęk naczynioruchowy 	<ul style="list-style-type: none"> • wymioty • biegunka 	<ul style="list-style-type: none"> • obrzęk krtani • skurcz oskrzeli • sinica 	<ul style="list-style-type: none"> • wstrząs
IV	<ul style="list-style-type: none"> • świąd • zaczerwienienie • pokrzywka • obrzęk naczynioruchowy 	<ul style="list-style-type: none"> • wymioty • biegunka 	<ul style="list-style-type: none"> • zatrzymanie oddechu 	<ul style="list-style-type: none"> • zatrzymanie krążenia

Tabela 4. Klasyfikacja według Ringa i Messmera

Stopień	Objawy
I	uogólnione objawy skórne: <ul style="list-style-type: none"> • rumień • uogólniona pokrzywka • obrzęk naczynioruchowy
II	łagodne i umiarkowane objawy ogólne ze strony: <ul style="list-style-type: none"> • układu oddechowego • układu krążenia • układu pokarmowego
III	<ul style="list-style-type: none"> • wstrząs anafilaktyczny • utrata przytomności
IV	<ul style="list-style-type: none"> • zatrzymanie czynności serca • bezdech

1.7.3. Reakcje nietypowe

Oprócz wyżej wymienionych „typowych” objawów reakcji alergicznej, czasami mogą wystąpić po kilku godzinach, a nawet kilku dniach lub tygodniach objawy nietypowe, związane najczęściej z odkładaniem się w tkankach kompleksów antygen – przeciwciała [51, 55]. Mogą one towarzyszyć klasycznym reakcjom alergicznym, zarówno miejscowym, jak i uogólnionym. Są to głównie objawy neurologiczne. Poza często występującymi zawrotami i bólami głowy, zdarzają się rzadkie przypadki zapalenia nerwów obwodowych, zespołu Guillain-Barré, napady drgawek. Ponadto może wystąpić zapalenie naczyń np. płamica Schönleina-Henocha, zapalenie mięśnia sercowego oraz choroba posurowicza [56].

1.8. Działanie toksyczne jadu pszczelego

W przypadku jednoczesnego użądlenia przez kilkadziesiąt lub więcej pszczół mogą pojawić się objawy reakcji toksycznej jako efekt bezpośredniego działania toksycznego dużej dawki jadu na komórki [57]. Zawarte w jadzie – fosfolipaza A₂ i melittyna – powodują hemolizę, martwicę rozplywną mięśni prążkowanych oraz trombocytopenię [22]. Przyjmuje się, że toksyczność jadu może pojawić się po minimum 50 użądleniach u człowieka dorosłego. Dla dzieci nie ma ściśle określonej ilości użądleń [46].

Reakcja toksyczna może być natychmiastowa lub opóźniona. Większość objawów reakcji natychmiastowej pokrywa się z objawami reakcji alergicznej, a stopień ich nasilenia zależy od liczby użądleń i osobniczej tolerancji na użądlenia. Najczęstsze objawy reakcji natychmiastowej to: zmęczenie, nudności, wymioty, biegunka, spadek ciśnienia tętniczego oraz wstrząs. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się objawy hemolizy, dysfunkcji wątroby (wzrost enzymów wątrobowych: AlAT, AspAT), trombocytopenię, wzrost stężenia kinazy kreatynowej (ang. *creatinine kinase* – CK) oraz wzrost stężenia enzymów sercowych (m.in. troponiny). Ponadto może dojść do ostrej niewydolności nerek na skutek rabdomiolizy, hemolizy lub epizodów hipotensji. Natomiast objawy opóźnionej reakcji toksycznej występują rzadko, ale mogą wystąpić nawet po 24 godzinach. Początkowo badany, poza bólem spowodowanym użądleniami, nie odczuwa żadnych innych objawów, a wyniki badań laboratoryjnych są w normie. Dopiero po kilku lub kilkunastu godzinach zaczynają się rozwijać objawy dysfunkcji wielonarządowej. Do charakterystycznych objawów odczynu toksycznego opóźnionego należą: hemoliza, hemoglobinuria, rabdomioliza i trombocytopenia. Kolejne możliwe objawy to: martwica cewek nerkowych, rozsiane

wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (ang. *disseminated intravascular coagulation* – DIC) oraz uszkodzenie wątroby i ośrodkowego układu nerwowego, najczęściej pod postacią uszkodzenia wzroku i objawów psychiatrycznych. Wczesna interwencja i intensywna terapia obejmująca agresywne nawadnianie dożylne, przetoczenia krwi, a w razie potrzeby dializoterapia mogą zapobiec rozwojowi tych trwałych powikłań. Ze względu na możliwość wystąpienia opóźnionej reakcji toksycznej wskazane jest, aby wszyscy, którzy zostali użądleni przez więcej niż 50 pszczoł w przypadku osoby dorosłej lub 1 użądlenie/kg masy ciała w przypadku dziecka, zostali poddani obserwacji szpitalnej przez 24 godziny, nawet jeśli w pierwszych godzinach po użądleniu nie występują u nich żadne objawy poza bólem i wyniki badań laboratoryjnych są w normie. Natomiast w przypadku wystąpienia reakcji natychmiastowej zalecana jest minimum 6 godzinna hospitalizacja [58, 59].

Mnogie użądlenia są lepiej tolerowane przez pszczelarzy, gdyż są oni permanentnie narażeni na wielokrotne żądlenie przez pszczoły. Przyjmuje się, że 500 użądleń jest śmiertelnych dla dziecka, natomiast w przypadku osób dorosłych liczby te wynoszą odpowiednio: 1100 dla kobiet i 1400 dla mężczyzn. W badaniach przeprowadzonych na myszach wyznaczono dawkę śmiertelną jadu pszczelego LD₅₀ na 3 mg/kg m.c. [44].

1.9. Diagnostyka alergii na jad pszczoły miodnej

U osób z objawami ogólnymi po użądleniu w wywiadzie należy wykonać dodatkowe badania diagnostyczne [55, 60]. Nie zaleca się dodatkowej diagnostyki u pacjentów bez ogólnej reakcji alergicznej w wywiadzie, gdyż dodatkowo wyniki testów stwierdza się u 20-30% populacji osób dorosłych przy stosunkowo niskim prawdopodobieństwie reakcji systemowej (17%) przy kolejnym użądleniu [3, 4]. Dodatkowo wyniki testów skórnych lub obecność swoistych IgE obserwowane są nawet u 50 % dzieci i do 60 % u pszczelarzy [61].

Obecnie podstawowe testy wykorzystywane w diagnostyce alergii na jad owadów błonkoskrzydłych to testy skórne oraz oznaczanie stężenia swoistych przeciwciał w klasie IgE skierowanych przeciwko jadowi. W praktyce wykonuje się zazwyczaj oba powyższe testy, które w połączeniu z wywiadem pozwalają w przybliżeniu określić stopień ryzyka wystąpienia reakcji ogólnoustrojowej po następnym użądleniu (tabela 5). Jeżeli na podstawie tych badań nie jest możliwe postawienie diagnozy, można skorzystać z bardziej specjalistycznych metod diagnostycznych takich jak: testy komórkowe, test zahamowania, oznaczanie tryptazy i karboksypeptydazy.

Tabela 5. Ryzyko wystąpienia reakcji anafilaktycznej oraz zalecenia postępowania oparte na reakcji organizmu na ostatnie użądlenie i wynikach testów skórnych lub RAST [3].

Reakcja na ostatnie użądlenie	Wyniki testów skórnych lub RAST	Ryzyko wystąpienia reakcji anafilaktycznej	Zalecenia
• brak	• pozytywny	10% – 20%	• unikanie kontaktu z alergenem
• nasilona miejscowa	• pozytywny	5% – 10%	• unikanie kontaktu z alergenem
• skórna systemowa	• pozytywny (dziecko)	1% – 10%	• unikanie kontaktu z alergenem
	• pozytywny (dorosły)	10% – 20%	• immunoterapia
• reakcja anafilaktyczna	• pozytywny	30% – 70%	• immunoterapia
	• negatywny	5% – 10%	• powtórzenie badań diagnostycznych

1.9.1. Testy skórne

Testy skórne mogą być wykonywane metodą punktową (*prick test*) lub śródskórnymi. Testy punktowe rozpoczyna się używając jadu o stężeniu 0,01 µg/ml i wynik odczytuje się po 15 minutach. Jeżeli wynik jest ujemny, stężenie zwiększa się 10-krotnie. Test przerywamy w momencie uzyskania dodatniego wyniku lub osiągnięcia stężenia 100 µg/ml. Kolejne stężenia należy nakładać co 30 minut. W przypadku ujemnego wyniku testów punktowych, wskazane jest przeprowadzenie testów śródskórnych. Do prób śródskórnych używa się jadu o wzrastających stężeniach od 0,001 µg/ml do 1,0 µg/ml [3, 23]. Dodatni wynik testów skórnych uzyskuje się u 70-90% osób z reakcją ogólną po użądleniu [62, 63]. Należy dodać, iż testy skórne mogą być ujemne nawet u 50% pacjentów w pierwszych tygodniach po użądleniu [64], dlatego należy je wykonywać najwcześniej po 3-6 tygodniach od reakcji alergicznej po użądleniu [54, 64]. Gdy wynik testu jest negatywny u pacjenta z dodatnim wywiadem, testy skórne można powtórzyć po 6-12 tygodniach [62, 65, 66].

W badaniach pszczelarzy dodatnie testy skórne uzyskano u 30-60 % badanych [16].

1.9.2. Testy *in vitro*

Testy *in vitro* są drugą metodą używaną do diagnostyki alergii na jad owadów błonkoskrzydłych i polegają na oznaczeniu w surowicy stężenia swoistych przeciwciał IgE skierowanych przeciwko jadowi. Zalecane jest ich wykonanie u wszystkich pacjentów z negatywnym wynikiem testu skórniego oraz pacjentów, u których testy skórne nie mogą być wykonane np. z powodu aktywnej choroby skóry lub przyjmujących leki zmniejszające reaktywność skórną (m.in. trójcykliczne leki antydepresyjne) [65, 66]. Również w przypadku tych oznaczeń zdarza się (u 15-20 % badanych), że wynik jest ujemny, pomimo obciążonego wywiadu i dodatnich testów skórnych. Ponadto wyniki tych testów nie korelują z ciężkością objawów klinicznych, co jest wielokrotnie podkreślane w dostępnym piśmiennictwie [3-6].

Obecnie dostępne są różne testy oparte na metodzie radioalergosorpcji (ang. *radioallergosorbent test* – RAST) lub jego nowszej modyfikacji CAP. Technika CAP jest przykładem testu immunoenzymatycznego (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA). Przy użyciu testów CAP możemy aktualnie oznaczać swoiste przeciwciała nie tylko przeciwko „całemu” jadowi, ale również przeciwko poszczególnym składnikom jadu pszczelego np. przeciw fosfolipazie A₂ (Api m1), która jest głównym alergenem tego jadu [67].

Przykładem testu opartego na metodzie CAP jest test ImmunoCAP (Phadia [68]) wykorzystujący rekombinowaną postać Api m1. Zasada jego wykonania polega na tym, że wybrany do testu antygen, w tym przypadku rekombinowana postać Api m 1, reaguje ze swoistymi przeciwciałami przeciwko Api m1 obecnymi w surowicy pacjenta. Następnie dodaje się przeciwciała skierowane przeciwko swoistym IgE oznakowane enzymem i mierzony jest stopień fluorescencji, który jest wprost proporcjonalny do ilości swoistych przeciwciał IgE.

Technika RAST różni się tym, że dodaje się przeciwciała anty-IgE wyznakowane izotopowo i dokonuje się pomiaru radioaktywności próbek.

Należy podkreślić, że do powyższych testów stosuje się obecnie rekombinowane alergeny, co znacznie zwiększyło ich specyficzność. Wykazano, że 15% pacjentów bez reakcji alergicznej w wywiadzie miało dodatni wynik testu na jad pszczeli, podczas gdy u żadnej z tych osób nie uzyskano dodatniego wyniku w teście z rekombinowanymi alergenami jadu (fosfolipaza A₂, hialuronidaza) stosowanymi oddzielnie lub w panelu razem z melittyną [69].

W przypadku ujemnych wyników zarówno testów skórnych, jak i oznaczeń swoistych przeciwciał IgE wskazane jest powtórzenie powyższej diagnostyki po 3-6 miesiącach. Na

podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono bowiem, iż stężenie swoistych IgE jest najwyższe po 6 miesiącach od reakcji poużądleniowej i można je wówczas wykryć u 96 % osób uczulonych na jad pszczoły [25].

1.9.3. Testy komórkowe

Jeżeli nawet po dwukrotnym wykonaniu rutynowych testów nie udaje się wykryć alergenowo swoistych IgE, można podejrzewać reakcję IgE niezależną. Wówczas alternatywną metodą diagnostyczną jest test uwalniania histaminy lub test reaktywności komórek docelowych (ang. *cellular allergosorbent test* – CAST) [3, 23] oraz test oceny aktywności bazofili (ang. *basophil activation test* – BAT). Powyższe testy określane jako testy komórkowe są wykorzystywane również w przypadkach rozbieżnych wyników testów skórných i pomiarów swoistych IgE. Ważną ich cechą jest duża czułość i specyficzność [70]. Nie są to jednak metody powszechnie stosowane [25].

1.9.3.1. Test uwalniania histaminy i sulfidoleukotrienów

Przy użyciu metod RAST lub ELISA w supernatancie komórkowym można dokonać pomiaru mediatorów takich jak histamina i sulfidoleukotrieny, które uwalniane są przez bazofile po przyłączeniu się do nich przeciwciał IgE (zwłaszcza po uprzednim dodaniu cytokin takich jak IL-3). Stwierdzono, że bardziej czuły jest test uwalniania sulfidoleukotrienów niż test uwalniania histaminy [71].

Test uwalniania sulfidoleukotrienu C4 standaryzowany i używany komercyjnie nosi nazwę CAST i jest oparty na metodzie ELISA [72]. Na podstawie badań osób z dodatnim wywiadem określono jego czułość na 88,5% i 94% odpowiednio dla jadu osy i pszczoły [71].

1.9.3.2. Test oceny aktywności bazofili

Powyższy test wykonywany jest metodą cytometrii przepływową, która pozwala badać komórki w ich naturalnym środowisku tj. w próbce krwi pełnej bez uprzedniego jej „wzbogacania”, które mogłoby wpłynąć na aktywność bazofili i tym samym na wynik badania. Przy użyciu cytometrii przepływową stwierdzono, że bazofile stymulowane *in vitro* alergenem zmieniają swój immunofenotyp. Objawia się to zwiększeniem ekspresji (*upregulation*) specyficznych białek (markerów) na ich powierzchni. W diagnostyce alergii na

jad owadów błonkoskrzydłych znaczenie mają dwa rodzaje tych białek: CD63 i CD203c. Bazofile w stanie spoczynku wykazują średnią ekspresję CD203c i bardzo niewielką ekspresję CD63 na swojej powierzchni, podczas gdy wewnątrz komórki stwierdza się bardzo wysokie stężenia tych markerów. W odpowiedzi na swoisty alergen, anty-IgE lub inny stymulant, bazofile wykazują typowy dla nich wzór aktywacji. Początkowo obserwuje się gwałtowne zwiększenie ekspresji markerów CD203c, któremu może towarzyszyć zwiększona ekspresja CD63. Następnie bazofile utrzymują (lub nie) silną ekspresję CD63 bez równoczesnej ekspresji CD203c. Test BAT polega na pomiarach aktywności markerów CD63 i CD203c po inkubacji z jadem w różnych stężeniach [73].

Czułość testu BAT wynosi 77-100 %, a specyficzność 70-100 % [71]. Tylko w jednym badaniu przeprowadzonym u dzieci oceniono czułość BAT na 67-75 % [74]. Wartość diagnostyczna BAT jest największa, jeżeli jest on wykonywany łącznie z testami skórnymi i oznaczeniami specyficznych IgE w surowicy. W przypadku ujemnych wyników testów skórných i swoistych IgE lub rozbieżności w tych wynikach BAT pozwala na identyfikację owada odpowiedzialnego za reakcję alergiczną u większości pacjentów. Ponadto prowadzone są badania nad użytecznością tego testu w monitorowaniu przebiegu immunoterapii.

1.9.4. Reakcje krzyżowe i test zahamowania

W Europie Środkowej u 30-40 % pacjentów uczulonych na jad owadów błonkoskrzydłych stwierdza się dodatnie wyniki zarówno w kierunku alergii na jad pszczoły, jak i jad osy [67]. Odsetek ten różni się znacznie w zależności od stosowanych metod diagnostycznych. W przypadku metod *in vitro* wynosi nawet do 64%, testów skórných do 48%, a jest najmniejszy w metodzie BAT – 17% [75]. Podwójne uczulenie (ang. *double sensitization* – DS) może być spowodowane 3 przyczynami, które występują oddzielnie lub w kombinacji. Są to:

- niezależne od siebie faktyczne uczulenie na obydwaj jady (zdarza się rzadko);
- reakcje krzyżowe między hialuronidazą pszczoły (Api m2) a hialuronidazą osy (Ves v2) lub między dipeptydylopeptydazą pszczoły (Api m5) a dipeptydylopeptydazą osy (Ves v3);
- reakcje krzyżowe z węglowodanowymi epitopami CCDs (ang. *cross-reactive carbohydrate determinants*) [67, 76, 77].

Reakcje krzyżowe są spowodowane faktem, iż swoiste przeciwciała IgE mogą „rozpoznawać” podobne do siebie epitopy różnych alergenów. Główne alergeny jadów owadów błonkoskrzydłych wykazują wiele podobieństw w swojej strukturze. Za reakcje krzyżowe w przypadku pszczoły i osy odpowiedzialna jest hialuronidaza, która w 50% wykazuje identyczną strukturę w jadzie pszczoły i w jadzie osy. Natomiast fosfolipaza A₂ jadu pszczelego jest w 53% identyczna z fosfolipazą A₂ jadu trzmiela [6]. Za reakcje krzyżowe związane z hialuronidazą rzadko odpowiada podobieństwo w sekwencji reszt peptydowych. Znacznie częściej powodem reakcji krzyżowych są CCDs [75]. Zarówno hialuronidazy jak i fosfolipaza A₁ oraz fosfolipaza A₂ są glikoproteinami bogatymi w CCDs i w związku z tym mogą indukować powstanie IgE anty – CCDs po użądleniu przez owada. Należy dodać, iż powodem reakcji krzyżowych mogą być również CCDs pochodzące z innych źródeł. Są to bowiem alergeny bardzo rozpowszechnione i występują m.in. w pyłkach traw i w niektórych pokarmach np. mięczakach [67].

W przypadku pacjenta, u którego stwierdza się podwójne uczulenie na obydwa jady można wykonać dodatkowe badanie tj. test zahamowania. Ma on na celu rozróżnienie, czy jest to faktycznie uczulenie na obydwa jady, czy dodanie wyniki były spowodowane reakcją krzyżową przeciwciał IgE [23]. Test zahamowania może być wykonany metodą RAST lub Western Blot po zmodyfikowaniu poprzez dodanie etapu wstępnego [75, 78]. We wstępnej fazie nazywanej fazą inhibicji, surowica pacjenta jest inkubowana oddzielnie z obydwojma jadami lub tylko z odpowiednimi epitopami tych alergenów. Związkiem wykorzystywanym jako kompetywny inhibitor łączenia się CCDs z IgE anty – CCDs jest bromelaina (glikoproteina bogata w reszty CCDs). Wykonanie testu zahamowania pozwala zdecydować o podjęciu immunoterapii z użyciem właściwego jadu – pszczoły czy osy lub obu jednocześnie. W zależności od wyników testu zahamowania zaleca się następujące postępowanie terapeutyczne:

- brak wzajemnej inhibicji – jeżeli nie znany jest owad wywołujący anafilaksję, konieczna jest immunoterapia z użyciem obu jadów;
- częściowa lub zmienna inhibicja – jeżeli nie znany jest owad wywołujący anafilaksję, konieczna jest immunoterapia z użyciem obu jadów;
- całkowita jednostronna inhibicja – wskazana immunoterapia z użyciem jadu, który powodował inhibicję.

Przyszłością w rozwiązaniu problematyki reakcji krzyżowych mogą być rekombinowane alergeny wyprodukowane w ten sposób, aby pozbawić je CCDs [67].

1.9.5. Przeciwciała IgG4

Kolejnym testem wykorzystywanym w diagnostyce alergii na jad pszczeleli jest pomiar stężenia swoistych przeciwciał w klasie IgG4, których stężenie odzwierciedla ekspozycję na użądlenie [5]. Podkreślana jest ochronna rola tych alergenowo swoistych przeciwciał u pszczelarzy [79]. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań wiadomo, że ich stężenie koreluje z liczbą użądleń i liczbą lat pracy w pasiece [6, 16, 29, 79]. Stwierdzono, że na początku zwiększonej ekspozycji na użądlenia rośnie miano swoistych dla jadu przeciwciał IgG1, IgG2 i IgG4. Natomiast podczas dłuższej trwającego narażenia na żądlenie (w kolejnych latach pracy w pasiece) zdecydowanie dominuje wysokie stężenie IgG4. Ponadto stwierdzono wyraźną sezonowość w stężeniach IgG4 u pszczelarzy. Okazuje się, że zimą czyli w sezonie wolnym od użądleń poziom tych przeciwciał spada, by ponownie gwałtownie wzrosnąć wiosną po pierwszych kontaktach z pszczołami. Podobnie obserwuje się wzrost miana przeciwciał IgG4 w trakcie swoistej immunoterapii, jednakże ani ich stężenie ani stosunek swoistych IgE/IgG4 nie korelują z kliniczną odpowiedzią na prowadzoną immunoterapię [6, 16, 29]. Nie wykazano również związku z obrazem klinicznym po użądleniu, dlatego obecnie pomiar ich stężenia nie jest zalecany w rutynowej diagnostyce [67].

1.9.6. Tryptaza

W ocenie ryzyka ciężkich reakcji alergicznych w przypadku kolejnego użądlenia stosuje się dodatkowo oznaczenia tryptazy w surowicy [80-83]. W świetle aktualnych badań wykazano, że podwyższony poziom tryptazy w surowicy łączy się z dużym ryzykiem bardzo poważnej anafilaksji po kolejnym użądleniu [5, 6, 23, 84]. Według najnowszych rekomendacji zalecany jest pomiar stężenia tryptazy u pacjentów z ciężkimi reakcjami anafilaktycznymi po użądleniu [84]. W dostępnym piśmiennictwie brak jest doniesień na temat badań stężenia tryptazy u pszczelarzy.

Test ocenia pobudzenie mastocytów, ponieważ tryptaza jest enzymem występującym w ziarnistościach komórek tucznych oraz w dużo mniejszej ilości (ok. 500 razy mniej) w bazofilach [85]. W przebiegu degranulacji komórek tucznych wydzielana jest razem z histaminą, jednak jej dyfuzja do tkanek jest znacznie wolniejsza od histaminy i w związku z tym tryptaza osiąga największe stężenia w surowicy między 60 a 120 minutą od reakcji anafilaktycznej. Dlatego też należy oznaczać jej stężenie w okresie od 15 minut do 3 godzin od początku reakcji. Pomiarów dokonuje się zazwyczaj metodą CAP [68].

Tryptaza produkowana jest w komórkach tucznych w postaci dwóch niedojrzałych izoenzymów jako α -protryptaza i β -protryptaza, które wydzielane są w sposób spontaniczny. Natomiast powstająca pod wpływem dipeptydylopeptydazy I postać dojrzała β uwalniana jest przede wszystkim podczas degranulacji komórek tucznych [85]. Zatem za wzrost poziomu tryptazy całkowitej podczas anafilaksji odpowiedzialna jest dojrzała forma β -tryptazy [86]. Komercyjne testy do oznaczania stężenia tryptazy oznaczają tryptazę całkowitą czyli postacie niedojrzałe i dojrzałe α i β lub tylko postacie dojrzałe α i β [87]. W różnicowaniu reakcji anafilaktycznej i mastocytozy przydatne jest oznaczanie izoenzymów tryptazy: α i β oddzielnie. Chorzy na mastocytozę mają bowiem wyjściowo duże stężenie obu izoenzymów, a pacjenci po reakcji anafilaktycznej mają wyjściowo prawidłowe stężenie α -tryptazy. Stosunek stężenia tryptazy całkowitej (α i β) do β -tryptazy ≤ 10 wskazuje na reakcję anafilaktyczną, a ≥ 20 na mastocytozę [88].

Należy dodać, iż podwyższone stężenie tryptazy w surowicy jest charakterystyczne dla anafilaksji spowodowanej użądleniem przez owada lub lekiem podanym parenteralnie oraz jeżeli w przebiegu reakcji alergicznej wystąpił spadek ciśnienia tętniczego. Natomiast w przypadku anafilaksji wywołanej alergenem podanym drogą doustną (najczęściej pokarm) lub anafilaksji przebiegającej bez obniżenia ciśnienia tętniczego poziom tryptazy może nie być podwyższony [73, 87].

1.9.7. Karboksypeptydaza A3 (ang. *carboxypeptidase A3* – CPA3)

Najnowsze badania w kierunku poszukiwania nowych markerów anafilaksji wykazały przydatność oznaczania stężenia karboksypeptydazy A3 w surowicy. CPA3 jest obok histaminy i tryptazy kolejnym mediatorem uwalnianym przez komórki tuczne podczas ich degranulacji spowodowanej reakcją anafilaktyczną [73, 78, 89]. Stwierdzono, iż u pacjentów z klinicznymi objawami anafilaksji stężenie karboksypeptydazy A3 przekracza 14 ng/ml. Ponadto stężenie CPA3 w surowicy utrzymuje się dłużej niż stężenie tryptazy, a poziomy tych dwóch markerów nie korelują ze sobą. Wykazano, że u pacjentów, u których wystąpiły kliniczne objawy anafilaksji, a poziom tryptazy nie był podwyższony, podwyższone było stężenie karboksypeptydazy A3 [78].

Zatem najbardziej przydatne może okazać się oznaczanie całego panelu mediatorów komórek tucznych, takich jak: histamina, tryptaza, karboksypeptydaza A3, chymaza, czynnik aktywujący płytki krwi (ang. *platelet activating factor* – PAF) i inne. Wymaga to jednak dalszych badań klinicznych.

1.10. Postępowanie po użądleniu

W przypadku każdego użądlenia należy jak najszybciej usunąć żądło, podważając je a nie ściskając (tak aby nie doszło do dalszego przedostawania się jadu do organizmu). Średnica bąbla w miejscu użądlenia jest bowiem liniowo zależna od uwolnionej dawki jadu [22]. Następnie wskazane jest wykonanie zimnego okładu np. poprzez przyłożenie lodu. Należy również pamiętać o odkażeniu miejsca użądlenia w celu zapobiegania nadkażeniom bakteryjnym.

1.11. Leczenie lokalnych reakcji alergicznych

Natychmiast po użądleniu (najlepiej w pierwszych 2 godzinach od użądlenia) należy zastosować miejscowo maść, żel lub aerozol z kortykosteroidem. Lek należy aplikować 2-3 razy dziennie przez kilka dni [51, 52]. W przypadku nasilonej reakcji lokalnej konieczne jest zastosowanie również leków antyhistaminowych doustnie [51, 52].

1.12. Leczenie systemowych reakcji alergicznych

Leczenie objawów ogólnych reakcji alergicznej po użądleniu przez pszczołę jest analogiczne do innych przypadków anafilaksji [3].

W łagodnie przebiegających objawach ogólnych np. pokrzywka o niewielkim nasileniu stosuje się doustnie lek przeciwhistaminowy oraz kortykosteroid. Jeżeli to konieczne powyższe leki stosowane są parenteralnie.

W przypadku cięższych lub narastających objawów leczeniem z wyboru jest adrenalina w iniekcji domięśniowej. Zalecane dawki to: 0,3 – 0,5 mg dla osoby dorosłej i 0,01 mg/kg m.c. dla dziecka [7]. Adrenalina dostępna jest w postaci ampułkostrzykawek do samodzielnego użycia przez pacjenta. Nie należy zwlekać z podaniem adrenaliny, gdyż opóźnienie jej zastosowania może spowodować rozwój trudnego do opanowania wstrząsu anafilaktycznego [90]. Poza podaniem adrenaliny należy zawsze zabezpieczyć dostęp do żyły obwodowej i postępować wg schematu VIP, co oznacza:

- V – *ventilate* – obejmuje czynności zapewniające drożność dróg oddechowych oraz właściwą wentylację i utlenowanie krwi:
 - odgięcie głowy i uniesienie żuchwy,

- zastosowanie tlenoterapii biernej,
- zastosowanie leków rozszerzających oskrzela z inhalatora MDI lub w nebulizacji tlenowej;
- I – *infusate* – stosowanie płynów; należy szybko przetoczyć dużą objętość płynów, takich jak: 0,9% NaCl, płyn wieloelektrolitowy (PWE), dekstran lub 5% albuminy;
- P – *pressure suport* – oznacza utrzymanie ciśnienia tętniczego poprzez:
 - właściwe ułożenie pacjenta – w pozycji leżącej z uniesionymi nogami,
 - domięśniowe podawanie adrenaliny, a u osób leczonych β -blokerami lub niereagujących na podanie adrenaliny zastosowanie glukagonu parenteralnie,
 - użycie dopaminy, dobutaminy lub dopeksaminy we wlewie ciągłym – jeżeli objawy narastają i nie można opanować utrzymującej się hipotensji, a w ostateczności w uzasadnionych przypadkach można podać adrenalinę dożylnie.

Ponadto we wstrząsie anafilaktycznym należy stosować dożylnie preparaty leków przeciwhistaminowych i kortykosteroidów oraz dożylnie ranitydynę.

1.13. Profilaktyka reakcji alergicznych

Naczelną zasadą profilaktyki alergii jest unikanie alergenu, czyli w tym przypadku zapobieganie użądleniom. Osoba z dodatnim wywiadem anafilaksji powinna [91, 92]:

- unikać jedzenia i picia na wolnym powietrzu;
- unikać spacerów w pobliżu pasiek lub gniazd owadów, przede wszystkim w upalne i wilgotne dni, gdy owady są szczególnie rozdrażnione;
- unikać ubiorów i perfum przyciągających owady – wbrew powszechnym opiniom na temat jaskrawych kolorów, pszczoły najlepiej rozpoznają kolor niebieski, fioletowy i zielony, natomiast są bardzo mało wrażliwe na pomarańczowy czy czerwony;
- unikać chodzenia boso;
- unikać przebywania w sadach;
- ograniczyć uprawianie sportu na wolnym powietrzu.

W zapobieganiu użądleniom przez owady błonkoskrzydłe nie są skuteczne dostępne środki odstrasżające owady. Człowiek zaatakowany przez owada powinien zachować spokój i powoli odejść. Nagłe, nerwowe ruchy prowokują owady do samoobrony i w efekcie do żądlenia. Dodatkowo należy zasłonić nos i usta oraz w miarę możliwości oczy, ponieważ owady są szczególnie przyciągane przez ciemne kolory i błyszczące elementy.

Każdy pacjent, u którego w przeszłości wystąpiła reakcja systemowa na użądlenie musi zostać zaopatrzony w zestaw leków niezbędnych do użycia w przypadku kolejnego użądlenia. Taki zestaw musi zawierać:

- adrenalinę w ampułkostrzykawce;
- doustny kortykosteroid;
- doustny lek antyhistaminowy;
- wziewny β 2-mimetyk krótkodziałający.

Według niektórych zaleceń powyższy zestaw leków łącznie z ampułkostrzykawką powinien być zalecony również pacjentom, którzy przeżyli epizod nasilonej reakcji lokalnej (LLR), ponieważ 10-15 % z nich będzie miała w przyszłości reakcję systemową [52, 93]. Lekarz ordynujący powyższe leki powinien przeszkolić pacjenta (w przypadku dziecka – jego rodziców) w zakresie właściwej obsługi ampułkostrzykawki z adrenaliną. Dodatkowo po epizodzie reakcji systemowej po użądleniu należy wykonać badania diagnostyczne i ocenić ryzyko nawrotu takiej reakcji w przyszłości [24].

1.14. Immunoterapia swoista jadem (ang. *venom immunotherapy* – VIT)

Immunoterapia swoista polega na wielokrotnym podawaniu rosnących dawek alergenu (w tym przypadku jadu pszczelego) w celu uzyskania tolerancji na ten alergen. Wykorzystano tu zjawisko zahamowania syntezy przeciwciał IgE przez limfocyty B z powodu ekspozycji na duże dawki alergenu. Wysokie stężenia antygenów są bowiem przyczyną wytwarzania IL-12 przez komórki Langerhansa i makrofagi. Następnie IL-12 hamuje produkcję cytokin typu Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), a pobudza syntezę cytokin typu Th1 (m.in. IFN- γ). W wyniku tych procesów zahamowana zostaje produkcja IgE. Ważną rolę w mechanizmach immunoterapii odgrywa również interleukina 10, która silnie hamuje wytwarzanie swoistych IgE, natomiast zwiększa poziom swoistych IgG4. IL-10 hamuje pobudzenie mastocytów i eozynofili oraz odpowiada za wytworzenie stanu anergii limfocytów T. Klinicznym efektem immunoterapii jest zmniejszenie lub nawet całkowite ustąpienie objawów chorobowych występujących po ekspozycji na alergen. Natomiast w testach diagnostycznych skuteczność VIT może objawiać się istotnym zmniejszeniem lub negatywizacją reaktywności skórnej oraz zmniejszeniem stężenia swoistych IgE, a także ujemnym wynikiem testu prowokacyjnego [94, 95]. Kolejne dawki szczepionki podawane są drogą wstrzyknięć podskórnych. Aktualnie prowadzone są badania odnośnie alternatywnych sposobów aplikacji preparatów alergenowych tj. drogą

podjęzykową i dowęzłową. Jednakże nie ma jeszcze wystarczających danych potwierdzających możliwość zastosowania tych metod immunoterapii [12, 96].

1.14.1. Wskazania i przeciwwskazania do immunoterapii

Do immunoterapii swoistej kwalifikowani są pacjenci z ciężką reakcją systemową po użądleniu w wywiadzie i dodatnimi wynikami testów diagnostycznych (dodatnie testy skórne i/lub dodatnie testy na obecność swoistych IgE) [97]. Immunoterapia może być również wskazana po epizodzie łagodnie przebiegających objawów ogólnych, jeżeli u pacjenta występują dodatkowe czynniki ryzyka np. duże narażenie na użądlenia lub duży stopień lęku znacznie obniżający jakość życia [23]. Według najnowszych rekomendacji w Stanach Zjednoczonych kandydatami do immunoterapii swoistej są wszyscy pacjenci powyżej 16 roku życia, u których wystąpiła reakcja ogólna ograniczona do objawów skórnych [98]. Dzieci poniżej 16 roku życia po epizodzie takiej reakcji nie są kwalifikowane do immunoterapii, gdyż ryzyko kolejnej reakcji systemowej jest u nich niższe niż 20% i nawet jeśli ta reakcja wystąpi to nie jest cięższa od poprzedniej [4, 99, 100]. Nasilone reakcje lokalne i odczynny nietypowe aktualnie nie są wskazaniem do prowadzenia VIT, jednakże obserwowano, iż wielkość i czas trwania nasilonych reakcji miejscowych są znacząco niższe u pacjentów poddanych swoistej immunoterapii [101]. Nie powinno się również rozpoczynać immunoterapii u dzieci poniżej 5 roku życia, u kobiet w ciąży oraz u osób z poważnymi chorobami ogólnoustrojowymi (choroby nowotworowe, autoimmunizacyjne). Szczególną ostrożność należy zachować przy podejmowaniu decyzji o immunoterapii u osób w podeszłym wieku, gdyż ryzyko powikłań jest u nich większe niż u osób młodszych. Pacjentom leczonym β -blokerami lub lekami z grupy ACEI należy zalecić zmianę leków [16, 102-104]. W przeciwieństwie do ACEI, które zazwyczaj mogą być zamienione na inne leki, w przypadku β -blokerów nie zawsze jest to możliwe. Należy dążyć do tego, aby przynajmniej na czas fazy indukcji zastąpić je innymi preparatami lub chwilowo odstawić. Jeżeli jest to niemożliwe, to faza wstępna musi być prowadzona pod intensywnym nadzorem medycznym [51].

1.14.2. Sposoby prowadzenia immunoterapii

Immunoterapia może być prowadzona według 3 różnych protokołów różniących się okresem, w jakim osiągnana jest pełna dawka podtrzymująca. W zależności od czasu trwania fazy wstępnej nazywanej fazą indukcji, wyróżniamy następujące metody:

- ultraszybką (*ultra-rush*) - dawka podtrzymująca osiągnana jest po 3-5 godzinach [105];
- szybką (*rush*) - dawka podtrzymująca osiągnana jest po kilku dniach [106];
- konwencjonalną - faza indukcji trwa kilkanaście tygodni [107].

Faza indukcji szczepień wg protokołu ultraszybkiego i szybkiego musi być prowadzona w warunkach szpitalnych, ponieważ częściej niż w metodzie konwencjonalnej występują objawy uboczne. Wybór odpowiedniej dla danego pacjenta metody szczepień zależy przede wszystkim od pory roku i dostępności ośrodka specjalistycznego prowadzącego immunoterapię. Każdy z powyższych protokołów rozpoczyna się od dawki 0,001-0,1 µg jadu. Następnie stopniowo zwiększa się podawane dawki aż do osiągnięcia dawki podtrzymującej, która najczęściej wynosi 100 µg. U osób szczególnie narażonych na kolejne użądlenia (np. u pszczelarzy), u chorych na mastocytozę, u chorych z ciężką chorobą układu krążenia oraz u osób, u których w trakcie immunoterapii wystąpił uogólniony odczyn alergiczny (w wyniku użądlenia polnego lub w teście prowokacji z żywym owadem), stosuje się wyższe dawki tj. 200 µg [67, 108]. Dawki podtrzymujące podaje się co 4 tygodnie w pierwszym roku immunoterapii i jeżeli pacjent dobrze je toleruje, to przerwy między nimi można wydłużyć do 6-8 tygodni w kolejnych latach VIT [51, 109].

1.14.3. Czas trwania immunoterapii

Czas trwania immunoterapii określa się indywidualnie, ale zazwyczaj wynosi on co najmniej 3-5 lat. Należy zaznaczyć, że „odczulanie” na jad pszczoły trwa dłużej niż na jad osy i jest mniej skuteczne [69, 96, 110]. Dłużej należy też prowadzić szczepienia u osób z podwyższonym poziomem tryptazy w surowicy oraz u osób, u których w trakcie trwania immunoterapii występowały odczyny alergiczne ogólnoustrojowe [109]. Według najnowszych zaleceń immunoterapię u chorych na mastocytozę z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych trzeba prowadzić przez całe życie [111, 112]. Natomiast u pszczelarzy immunoterapia musi trwać dopóty, dopóki pszczelarz chce kontynuować swój zawód. Dopuszcza się przerwy w sezonie letnim, jeżeli pszczelarz jest regularnie żądłony (1-2 razy

tygodniowo) i dobrze znosi te użądlenia. Jednak w sezonie zimowym musi ponownie otrzymywać szczepienia według wcześniejszego schematu [16].

1.14.4. Efekty uboczne immunoterapii

Efekty uboczne, zarówno w postaci reakcji lokalnych, jak i objawów ogólnych, występują głównie w fazie indukcji. Stwierdzono, że 25% dzieci i 50% dorosłych ma duże odczyny lokalne na początku VIT, najczęściej przy dawkach 20-30 µg jadu i nie pojawiają się one ponownie przy większych dawkach. Ponadto wiele osób skarży się na bóle głowy, uczucie zmęczenia lub wręcz wyczerpania [23]. Właściwe postępowanie obejmuje podanie leków przeciwhistaminowych i zastosowanie maści z kortykosteroidem [113, 114].

Częstość alergicznych odczynów systemowych w trakcie trwania VIT oceniana jest na 10-15 %, według niektórych źródeł nawet do 25 % [115], z czego większość to reakcje łagodne nie wymagające podawania adrenaliny [116, 117].

1.14.5. Czynniki ryzyka ciężkich reakcji anafilaktycznych w trakcie VIT

Częstość systemowych reakcji anafilaktycznych (SAR) jest większa w trakcie immunoterapii z jadem pszczelim w porównaniu do jadu osy i z tego powodu immunoterapia z użyciem jadu pszczelego uznana jest za główny czynnik ryzyka objawów ubocznych [115]. Dodatkowymi czynnikami ryzyka wystąpienia SAR w trakcie immunoterapii są: podwyższony poziom tryptazy, przyjmowanie leków przeciw nadciśnieniowych w czasie trwania terapii oraz prowadzenie VIT wg protokołu ultraszybkiego. Efekt leków przeciw nadciśnieniowych zwiększający ryzyko SAR podczas immunoterapii nie jest związany z konkretnym lekiem, ale najprawdopodobniej z leżącą u podłoża stosowania tego leku przyczyną tj. chorobą układu krążenia [61].

W przypadku niepożądanych reakcji ogólnoustrojowych immunoterapia jest kontynuowana najwcześniej po 12 godzinach z użyciem dawki zredukowanej o dwa poziomy, a następnie dalej kontynuowana według odpowiedniego protokołu [23].

1.14.6. Monitorowanie przebiegu immunoterapii

Monitorowanie przebiegu immunoterapii polega na powtarzaniu testów skórnych i oznaczeń swoistych IgE w surowicy co 2-3 lata [118]. Stwierdzono, że po 5 latach

prowadzenia VIT testy skórne są ujemne u mniej niż 20% pacjentów, natomiast po 7-10 latach ujemne wyniki ma już 50-60% osób [116]. Mimo to immunoterapia może być zakończona zazwyczaj po 5 latach. Na podstawie obserwacji stwierdzono bowiem, że po 5-8-letniej VIT istnieje 5-10% ryzyko objawów ogólnych po użądleniu, z czego tylko 2% wymaga podania adrenaliny [116, 117, 119]. Ocena stężeń swoistych IgE również nie stanowi podstawy do kontynuacji czy zaprzestania immunoterapii. W badaniach klinicznych wykazano, że stężenie swoistych IgE początkowo rośnie, osiągając maksimum po 8-12 tygodniach, a następnie powoli obniża się w ciągu 3-5 lat trwania VIT. W efekcie po kilku latach szczepień wartości sIgE są zbliżone lub niższe niż przed leczeniem. Dodatkowo można też oznaczać miano przeciwciał IgG4, ale także to badanie nie jest uznane za decydujące o zaprzestaniu terapii. Decyzję o zakończeniu immunoterapii podejmuje się zawsze indywidualnie u każdego pacjenta, biorąc pod uwagę przede wszystkim przebieg VIT, dodatkowe czynniki ryzyka oraz wyniki testów dodatkowych.

1.14.7. Skuteczność immunoterapii

Niepowodzenia immunoterapii szacowane są według różnych autorów na 5-20% [110, 114]. Skuteczność zależy w dużym stopniu od rodzaju owada i niestety w przypadku uczulenia na jad pszczoły immunoterapia jest mniej efektywna niż w przypadku odczulania na jad osy [108, 119, 120]. Natomiast skuteczność VIT u pszczelarzy jest bardzo wysoka. Na podstawie badań stwierdzono, że w większości przypadków w pełni chroni przed wystąpieniem objawów po kolejnych użądleniach [121].

1.15. Podsumowanie

Na podstawie powyższych rozważań oraz analizy dostępnej literatury naukowej można stwierdzić, że konieczne są dalsze badania w celu dokładnego poznania markerów ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznej spowodowanej użądleniem przez pszczołę miodną. Ponieważ pszczelarze i ich rodziny są grupą osób szczególnie narażonych na użądlenia, celowe jest włączenie ich do grupy osób objętych badaniami w kierunku alergii na jad pszczoły miodnej. W związku z brakiem danych literaturowych odnośnie badań diagnostycznych u pszczelarzy wykonanych bezpośrednio po użądleniu przez pszczołę, przeprowadzenie takich badań może pozwolić na lepsze zrozumienie zależności pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu a wynikami testów diagnostycznych. Porównanie

wyników badań pszczelarzy z wynikami osób nie mających kontaktu z pszczołami może przyczynić się do poszerzenia wiedzy odnośnie czynników ryzyka wystąpienia ciężkiej reakcji alergicznej po użądleniu.

2. Cele pracy

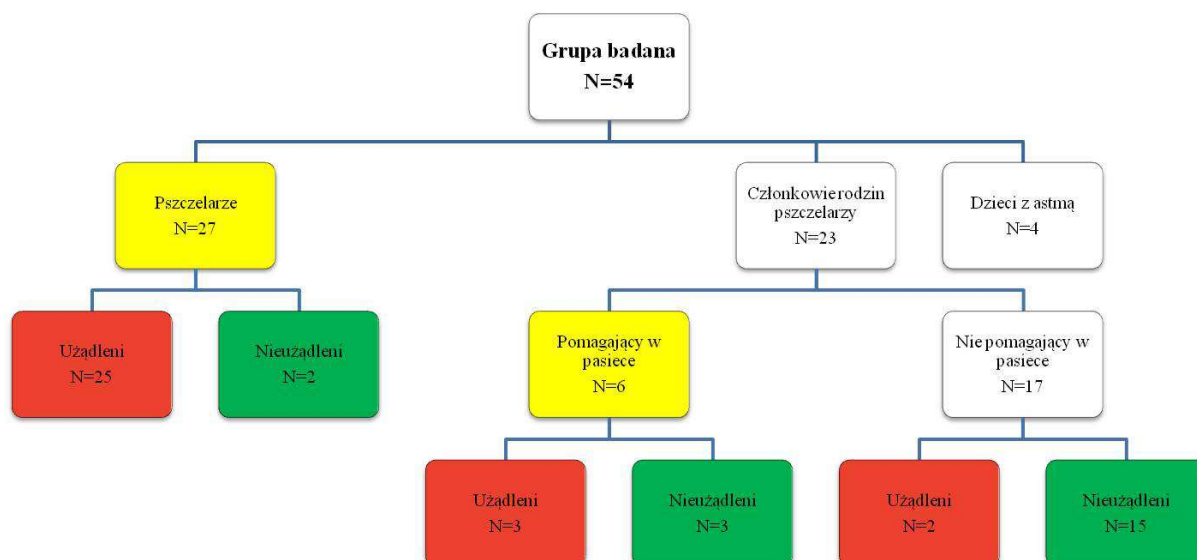
1. Oznaczenie w surowicy stężeń: całkowitych przeciwciał IgE, swoistych przeciwciał IgE przeciwko jadowi pszczelemu i przeciwko fosfolipazie A₂, tryptazy oraz swoistych przeciwciał IgG4 bezpośrednio po użądleniu przez pszczołę oraz po minimum 6 tygodniach od użądlenia i porównanie otrzymanych wyników.
2. Porównanie stężeń wyżej wymienionych przeciwciał IgE, tryptazy oraz przeciwciał IgG4 oznaczonych u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami oraz u osób bez zwiększonego kontaktu z pszczołami.
3. Ocena korelacji objawów klinicznych występujących po użądleniu przez pszczołę ze stężeniem: całkowitych przeciwciał IgE, swoistych przeciwciał IgE przeciwko jadowi pszczelemu i przeciwko fosfolipazie A₂, tryptazy oraz swoistych przeciwciał IgG4.
4. Ocena zależności stężenia swoistych IgG4 w surowicy u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami od czynników mających wpływ na poziom tych przeciwciał.
5. Ocena czynników ryzyka reakcji anafilaktycznych u wszystkich osób objętych badaniem oraz dodatkowych czynników ryzyka występujących u pszczelarzy na podstawie analizy retrospektywnej.

3. Grupa badana

Wszystkie osoby biorące udział w badaniu są rasy kaukaskiej, narodowości polskiej, zamieszkują teren Wielkopolski. Wszyscy badani, a w przypadku dzieci – ich prawni opiekunowie, wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Badanie zostało przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 324/11).

W badaniu uczestniczyły 54 osoby w wieku od 4 do 85 lat (Ryc. 2). Grupy wiekowe osób badanych przedstawiono w tabeli 6. Badani byli rekrutowani w okresie od czerwca do października 2011 roku na zebraniach kół pszczelarskich w Kaliszu (2 koła pszczelarskie), Koźminku (powiat kaliski, gmina Koźminek) i Skalmierzycach (powiat ostrowski, gmina Nowe Skalmierzyce) oraz w Klinice Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej UM w Poznaniu. Badani zgłaszali się na pobranie krwi bezpośrednio po użądleniu przez pszczołę (30 osób) lub bez użądlenia (24 osoby). Na podstawie analizy retrospektywnej (badanie ankietowe) zebrano dane kliniczne badanych osób odnośnie występujących w przeszłości reakcji po użądleniu przez pszczołę oraz czynników ryzyka – wszystkie dane opisano w tabeli 6.

Rycina 2. Schemat charakteryzujący grupę badaną.



GRUPA BADANA

Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej (N=54) z podziałem na grupy: użądleni (N=30) i nieużądleni (N=24).

Cecha		Grupa badana N=54		Użądleni N=30		Nieużądleni N=24	
		N	%	N	%	N	%
Płeć	Męska (M)	33	61,1	25	83,3	8	33,3
	Żeńska (K)	21	38,9	5	16,7	16	66,7
Grupa wiekowa [lata]	1 do 10	3	5,6	–	–	3	12,5
	11 do 20	2	3,7	–	–	2	8,3
	21 do 30	6	11,1	2	6,7	4	16,7
	31 do 40	10	18,5	7	23,3	3	12,5
	41 do 50	5	9,2	2	6,7	3	12,5
	51 do 60	10	18,5	7	23,3	3	12,5
	61 do 70	10	18,5	7	23,3	3	12,5
	71 do 80	5	9,3	3	10,0	2	8,3
	Powyżej 80	3	5,6	2	6,7	1	4,2
Choroby atopowe	Tak	13	24,1	3	10,0	10	41,7
	Nie	41	75,9	27	90,0	14	58,3
Choroby układu krążenia	Tak	19	35,2	13	43,3	6	25,0
	Nie	35	64,8	17	56,7	18	75,0
Terapia β-blokerami	Tak	7	13,0	5	16,7	2	8,3
	Nie	47	87,0	25	83,3	22	91,7
Terapia ACEI	Tak	9	16,7	7	23,3	2	8,3
	Nie	45	83,3	23	76,7	22	91,7
Objawy po użądleniu z wywiadu	NR	38	70,4	23	76,6	15	62,5
	LLR	11	20,4	5	16,7	6	25,0
	SYS	5	9,2	2	6,7	3	12,5
Objawy po użądleniu „świeżym”	NR	–	–	25	83,3	–	–
	LLR	–	–	3	10,0	–	–
	SYS	–	–	2	6,7	–	–

GRUPA BADANA

Na podstawie danych ankietowych wszystkich badanych podzielono na dwie grupy: osoby mające zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie ich rodzin pomagający w pasiece) oraz osoby bez zwiększonego kontaktu z pszczołami (członkowie rodzin nie pomagający w pasiece i dzieci chore na astmę). Dane charakteryzujące osoby należące do pierwszej grupy (liczba rodzin pszczelich w pasiece, staż pracy w pasiece, liczba otrzymywanych użądleń dziennie, liczba przepracowanych dni tygodniowo, używanie odzieży ochronnej) podano w tabeli 7.

Tabela 7. Charakterystyka grupy osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie rodzin pomagający w pasiece), N=33.

Cecha		N	%
Liczba rodzin pszczelich w pasiece	1 do 20	8	24,2
	21 do 40	18	54,6
	Powyżej 40	7	21,2
Staż pracy w pasiece [lata]	1 do 10	10	30,3
	11 do 20	11	33,3
	Powyżej 20	12	36,4
Liczba otrzymywanych użądleń dziennie	Poniżej 1	18	54,6
	1 do 5	7	21,2
	6 do 10	4	12,1
	Powyżej 10	4	12,1
Liczba przepracowanych dni tygodniowo w pasiece	1 do 2	19	57,6
	3 do 4	10	30,3
	5 do 6	4	12,1
Używanie odzieży ochronnej	Niektóre elementy	14	42,4
	Cały strój	19	57,6
Silniejsze objawy wiosną niż latem	Tak	12	36,4
	Nie	21	63,6
Objawy alergiczne podczas pracy w pasiece	Tak	3	9,1
	Nie	30	90,9

4. Metody

4.1. Badania ankietowe

Informacje dotyczące objawów klinicznych występujących po użądleniu przez pszczołę uzyskano na podstawie przeprowadzonych ankiet. Zebrano również informacje na temat czynników ryzyka reakcji alergicznych (wiek, choroby ogólnoustrojowe, choroby atopowe oraz przyjmowane leki). Dodatkowo pszczelarze wypełniali także część ankiety dotyczącą pracy w pasiece – staż pracy, liczba uli, częstotliwość użądleń oraz używanie odzieży ochronnej. Ponadto osoby, które zgłaszały się na pobranie krwi bezpośrednio po użądleniu zaznaczały na dodatkowym druku objawy występujące u nich po tymże użądleniu.

4.2. Badania laboratoryjne

4.2.1. Pobieranie próbek krwi przeznaczonych do badań

Próbki do badań pozyskano od badanych osób w okresie od czerwca do listopada 2011 roku.

Po zapoznaniu badanego /rodziców badanego z charakterem prowadzonych badań i wyrażeniu przez nich zgody na uczestnictwo w tym badaniu pobierano od badanej osoby krew żylną do specjalnych fiolek z roztworem EDTA. Krew pobierano w Kaliskim Centrum Laboratoryjnym „CENTROLAB” w Kaliszu oraz w Klinice Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej w Poznaniu. Następnie krew odwirowywano w celu uzyskania surowicy, którą porcjowano na 6 próbek o objętości min. 250 µl każda. Otrzymane próbki były przechowywane w temperaturze -20° C.

4.2.2. Wykonywanie oznaczeń

Wszystkie próbki były analizowane w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera w Poznaniu w okresie od grudnia 2011 roku do stycznia 2012 roku. Do wykonania oznaczeń użyto analizatora immunochemicznego UniCap 100 firmy Phadia, numer fabryczny 4635. Wykorzystane do badań odczynniki oraz procedury oznaczeń przedstawiono w rozdziałach: 4.2.2.1. i 4.2.2.2.

4.2.2.1. Odczynniki

- ImmunoCAP Total IgE
- ImmunoCAP Total IgE Calibrators
- i1 Apis mellifera, Honey bee
- i208 rApi m 1 Phospholipase A₂, Honey bee
- ImmunoCAP Specific IgE Calibrator 0-100
- ImmunoCAP Specific IgE 0-100
- Anti-IgE ImmunoCAP's f. ImmunoCAP100
- IgG4 Calibrators
- IgG4 Conjugate
- IgG4 Curve Controls
- IgA/IgG Calibrator ImmunoCAP's
- Specific IgA/IgG Sample Diluent
- Gi1 Apis mellifera
- ImmunoCAP Tryptase
- ImmunoCAP Tryptase Calibrator
- ImmunoCAP Development Solution
- ImmunoCAP Stop Solution
- ImmunoCAP Washing Solution Kit

4.2.2.2. Zasady wykonywania oznaczeń

- Oznaczenie stężenia swoistych przeciwciał w klasie IgE (sIgE) skierowanych przeciwko całemu jadowi pszczelemu oraz przeciwko fosfolipazie A₂ jadu pszczelego wykonano metodą ImmunoCAP z wykorzystaniem rekombinowanej postaci Api m 1.

Wybrany do testu antygen (jad pszczeli lub rekombinowana postać Api m 1) umieszczony był na fazie stałej zbudowanej z polimeru celulozy 3D. Antygen ten reagował ze swoistymi przeciwciałami IgE obecnymi w surowicy badanego. Po wypłukaniu wolnych przeciwciał IgE dodawano przeciwciała skierowane przeciwko swoistym IgE oznakowane enzymem. Po inkubacji wypłukiwane były niezwiązane przeciwciała p-IgE. Ponownie inkubowano – tym razem z odpowiednim substratem dla znakującego enzymu. Po

zakończeniu reakcji mierzony był stopień fluorescencji powstałego związku, co jest wprost proporcjonalne do ilości swoistych przeciwciał IgE. W celu oceny wyników otrzymane wartości były przeliczane na stężenia przy użyciu krzywej kalibracyjnej.

- Oznaczenie stężenia całkowitych przeciwciał IgE (tIgE).

Zasady wykonywania testów były takie same jak w przypadku oznaczania stężeń swoistych IgE. Różnica polegała na tym, że z fazą stałą ImmunoCap były związane kowalencyjnie anty-IgE, które reagowały z przeciwciałami IgE obecnymi w surowicy badanej osoby.

- Oznaczenie stężenia tryptazy metodą ImmunoCAP.

Badania przeprowadzono analogicznie do powyższych z tą różnicą, że na fazie stałej umieszczone były przeciwciała skierowane przeciwko tryptazie obecnej w surowicy badanego.

- Oznaczenie stężenia swoistych przeciwciał IgG4 metodą ImmunoCAP.

Badania przeprowadzono analogicznie do powyższych.

4.3. Analizy statystyczne

Do przeprowadzenia analiz statystycznych wykorzystano pakiet statystyczny Statistica 10.0. We wszystkich analizach przyjęto jako istotny statystycznie poziom istotności (p) poniżej wartości 0,050.

Do sprawdzenia normalności rozkładu analizowanych danych wykorzystano test W Shapiro-Wilka. Jest to preferowany test normalności, ponieważ cechuje go duża moc w porównaniu do innych testów. Zgodnie z jego zasadą hipotezę o zgodności z rozkładem normalnym należy odrzucić, jeżeli wartość statystyki W jest istotna.

Porównanie wyników badań wykonanych w ciągu 3 godzin po użądleniu oraz po minimum 6 tygodniach od użądlenia przeprowadzono przy użyciu testu kolejności par Wilcoxon (test istotności różnic dla prób zależnych). Test ten jest nieparametryczną alternatywą dla testu t dla prób zależnych. Pozwala on testować hipotezy o położeniu

rozkładu (medianie) analizowanych danych. Test Wilcoxona zakłada, że testowana zmienna jest mierzona na skali porządkowej, co pozwala na rangowanie różnic.

Dla porównania wyników uzyskanych w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie rodzin pomagający w pasiece) z grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami wykorzystano test U Manna-Whitney'a (test istotności różnic dla prób niezależnych). Test ten jest najmocniejszą nieparametryczną alternatywą dla testu t dla próbek niezależnych. Obliczenia są wykonywane w oparciu o sumę rang, a nie o średnie.

W celu oceny korelacji w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami pomiędzy stażem pracy w pasiece, liczbą otrzymywanych użądleń dziennie, liczbą przepracowanych dni tygodniowo w pasiece oraz używaniem odzieży ochronnej a poziomem IgG4 zastosowano test Kruskala-Wallisa dla prób niezależnych. Jest to nieparametryczna alternatywa dla jednoczynnikowej analizy wariancji. Hipoteza zerowa zakłada, że wszystkie próby pochodzą z populacji o tej samej medianie. Test ten również jest oparty na rangach, a nie na średnich. Test ANOVA rang Kruskala-Wallisa wykorzystano również do oceny korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu a wynikami wykonanych badań laboratoryjnych.

Współzależność pomiędzy zmiennymi: klasy sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂ zbadano testem χ^2 Pearsona. Służy on do analizy cech niemierzalnych (zmiennych jakościowych). Test χ^2 wykorzystano także do analizy współzależności pomiędzy klasami sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ a objawami klinicznymi po użądleniu z wywiadu.

5. Wyniki

5.1. Wyniki badań laboratoryjnych

W tabelach 8 – 10 przedstawiono wyniki badań laboratoryjnych osób uządlonych. W tabeli 11 zamieszczono wyniki osób, które nie zostały uządlone w okresie prowadzonej obserwacji.

Tabela 8. Grupa osób uządlonych: stężenia całkowite IgE (tIgE) oraz swoiste IgE przeciw jadowi pszczelemu (sIgE jad) oznaczone w ciągu 3 godzin po uządleniu (1*) oraz po minimum 6 tygodniach od uządlenia (2**).

	tIgE		sIgE jad 1		sIgE jad 2	
	stężenie 1* [kU/l]	stężenie 2** [kU/l]	stężenie [kUA/l]	klasa	stężenie [kUA/l]	klasa
Badany 1	10,3	10,9	0,31	0	0,26	0
Badany 2	46,7	29,8	0,13	0	0,13	0
Badany 3	35,4	–	0,04	0	–	–
Badany 4	19,1	16,6	0,23	0	0,22	0
Badany 5	318	350	1,56	2	2,13	2
Badany 6	9,74	10,6	0,23	0	0,33	0
Badany 7	69,9	48,9	3,53	3	2,91	2
Badany 8	26,8	19,1	0,83	2	0,82	2
Badany 9	28,4	22,4	2,71	2	2,38	2
Badany 10	18,6	19,6	0,09	0	0,11	0
Badany 11	28,9	31,4	1,29	2	1,4	2
Badany 12	50,5	–	0,88	2	–	–
Badany 13	12,2	–	0,16	0	–	–
Badany 14	68,2	64	0,72	2	0,34	0
Badany 15	18,1	16,3	0,23	0	0,19	0
Badany 16	44,9	42,8	0,08	0	0,08	0
Badany 17	13,9	14,6	0,33	0	0,31	0
Badany 18	466	525	46,6	4	52,6	5
Badany 19	7,79	7,94	0,18	0	0,2	0
Badany 20	78	86,4	5,24	3	6,75	3
Badany 21	38,8	39,3	0,45	1	0,45	1
Badany 22	15,3	13,3	0,3	0	0,33	0
Badany 23	0,1	0,1	0,04	0	0,03	0
Badany 24	57	50,2	0,07	0	0,06	0
Badany 25	17,6	18	3,54	3	2,49	2
Badany 26	122	113	2,86	2	2,7	2
Badany 27	76,5	82,9	3,13	2	2,3	2
Badany 28	44,3	39,6	0,4	1	0,47	1
Badany 29	17,3	22,8	0,56	1	0,55	1
Badany 30	0,1	0,1	0,03	0	0,02	0

WYNIKI

Tabela 9. Grupa osób uządłonych: stężenia swoistych przeciwciał IgE przeciw fosfolipazie A₂ (sIgE fosfolipaza A₂) oznaczone w ciągu 3 godzin po uządłeniu (1*) oraz po minimum 6 tygodniach od uządłenia (2**).

	sIgE fosfolipaza A ₂ 1*		sIgE fosfolipaza A ₂ 2**	
	stężenie [kUA/l]	klasa	stężenie [kUA/l]	klasa
Badany 1	0,11	0	0,07	0
Badany 2	0,02	0	0,02	0
Badany 3	0	0	–	–
Badany 4	0,07	0	0,05	0
Badany 5	0,17	0	0,21	0
Badany 6	0,07	0	0,08	0
Badany 7	0,28	0	0,13	0
Badany 8	0,07	0	0,06	0
Badany 9	1,03	2	0,86	2
Badany 10	0,01	0	0,01	0
Badany 11	0,19	0	0,19	0
Badany 12	0,04	0	–	–
Badany 13	0,09	0	–	–
Badany 14	0,23	0	0,11	0
Badany 15	0,16	0	0,1	0
Badany 16	0,01	0	0,01	0
Badany 17	0,11	0	0,17	0
Badany 18	31,8	4	27,6	4
Badany 19	0,07	0	0,08	0
Badany 20	0,2	0	0,5	0
Badany 21	0,24	0	0,21	0
Badany 22	0,06	0	0,07	0
Badany 23	0	0	0	0
Badany 24	0	0	0	0
Badany 25	0,33	0	0,21	0
Badany 26	0,3	0	0,23	0
Badany 27	0,32	0	0,11	0
Badany 28	0,17	0	0,16	0
Badany 29	0,2	0	0,22	0
Badany 30	0	0	0	0

WYNIKI

Tabela 10. Grupa osób uzależnionych: stężenia tryptazy i swoistych przeciwciał IgG4 oznaczone w ciągu 3 godzin po uzależnieniu (1*), po minimum 6 tygodniach od uzależnienia (2**) oraz wartość 135% stężenia tryptazy 2.

	tryptaza 1* [μg/l]	tryptaza 2** [μg/l]	135 % tryptazy 2 [μg/l]	IgG4 1 [mgA/l]	IgG4 2 [mgA/l]
Badany 1	2,56	2,71	3,66	21,4	13,5
Badany 2	4,94	2,1	2,84	38,86	37,2
Badany 3	4,48	–	–	0,09	–
Badany 4	4,34	5,17	6,98	7,87	3,75
Badany 5	4,71	6,58	8,88	17,5	30,57
Badany 6	2,86	3,48	4,70	39,17	–
Badany 7	1,59	1,29	1,74	5,27	6,43
Badany 8	2,54	2,59	3,50	29,61	31,12
Badany 9	11,5	7,19	9,71	29,1	28,68
Badany 10	5,24	6,15	8,30	32,76	30,19
Badany 11	4,84	7,1	9,59	24,5	18,4
Badany 12	5,31	–	–	12,8	–
Badany 13	4,62	–	–	30,47	–
Badany 14	2,43	1,24	1,67	25,8	12,9
Badany 15	4,06	3,41	4,60	32,58	30,83
Badany 16	2,49	1,84	2,48	38,68	39,17
Badany 17	2,85	2,9	3,92	3,43	10,3
Badany 18	15,9	2,42	3,27	5,77	11
Badany 19	3,63	4,32	5,83	19	16
Badany 20	3,69	3,02	4,08	1,89	4,95
Badany 21	5,07	5,35	7,22	28,4	28,2
Badany 22	15,3	15,4	20,79	38,97	32,16
Badany 23	4,45	4,18	5,64	28,98	25,8
Badany 24	3,2	2,98	4,02	0,31	0,22
Badany 25	1,73	2,23	3,01	11,7	5,1
Badany 26	17,9	13,8	18,63	8,68	6,05
Badany 27	6,56	6,05	8,17	28,4	24
Badany 28	5,02	5,45	7,36	36,31	38,32
Badany 29	3,38	3,21	4,33	0,65	5,07
Badany 30	17,8	20,5	27,68	20,4	30,67

WYNIKI

Tabela 11. Grupa osób nieuzdłonych: stężenia całkowite IgE (tIgE), swoiste IgE przeciw jadowi pszczelemu (sIgE jad), swoiste IgE przeciw fosfolipazie A₂ (sIgE fosfolipaza A₂), tryptazy oraz IgG4.

	tIgE [kU/l]	sIgE jad		sIgE fosfolipaza A ₂		tryptaza [μg/l]	IgG4 [mgA/l]
		stężenie [kUA/l]	klasa	stężenie [kUA/l]	klasa		
Badany 31	53,9	0,81	2	0,28	0	2,73	19,3
Badany 32	78,9	0,13	0	0,07	0	4,39	13
Badany 33	25,8	1,75	2	0	0	2,74	0,13
Badany 34	131	11,9	3	3,05	2	4,4	15,8
Badany 35	9,74	0,65	1	0,29	0	6,51	0,14
Badany 36	15,4	0,2	0	0	0	8,58	0,02
Badany 37	1705	7,75	3	1,46	2	2,52	0,37
Badany 38	13	0,04	0	0	0	1,89	0,09
Badany 39	283	6,89	3	0,4	1	2,69	0,33
Badany 40	7,63	0,02	0	–	–	1,98	–
Badany 41	207	12,9	3	0,71	2	5,8	2,88
Badany 42	10,9	0,02	0	0	0	3,9	0,04
Badany 43	121	0,14	0	0,01	0	4,2	0,25
Badany 44	418	0,5	1	0,08	0	2,11	0,02
Badany 45	80,1	0,25	0	0,1	0	6,8	39
Badany 46	13,8	0,62	1	0,16	0	2,94	0,93
Badany 47	204	0,04	0	0,003	0	5,15	0,04
Badany 48	173	0,03	0	0	0	1,86	0,01
Badany 49	264	0,03	0	0	0	0,1	0,02
Badany 50	28,1	0,36	1	0,24	0	2,98	0,14
Badany 51	3348	0,08	0	0,05	0	–	0,03
Badany 52	5000	1,29	2	0,26	0	2,3	0,3
Badany 53	884	0,09	0	0,04	0	1,88	0,12
Badany 54	3950	0,32	0	0,17	0	2,42	0,15

5.2. Analizy statystyczne

Ponieważ analizowane wyniki badań nie wykazywały normalności rozkładu, na wszystkich przedstawionych wykresach obrazujących zależności pomiędzy zmiennymi nie posługiwano się średnimi, ale medianami.

5.2.1. Analiza porównawcza wyników badań w grupie uządlonych

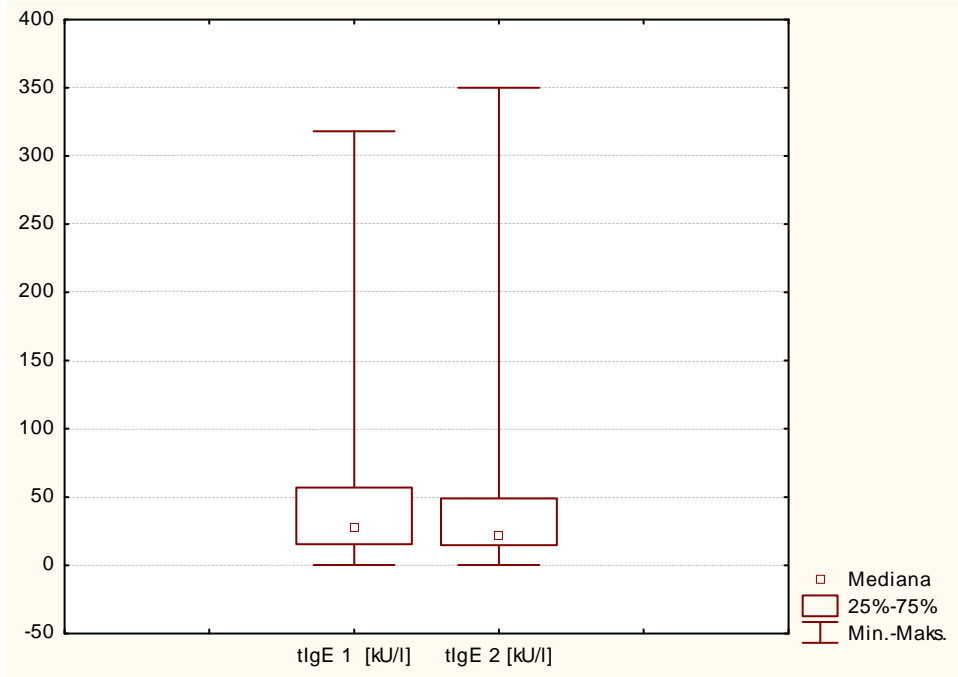
Do analiz porównawczych wyników badań wykonanych w ciągu 3 godzin po uządleniu oraz po minimum 6 tygodniach od uządlenia wykorzystano następujące zmienne: tIgE, sIgE jad, sIgE fosfolipaza A₂, tryptaza, IgG4. Z analiz tych wyłączono przypadek: „Badany 18” z uwagi na odbiegające wyniki badań w porównaniu z grupą badaną.

Do sprawdzenia normalności rozkładu wykorzystano test Shapiro-Wilka. Przeprowadzone testy wykazały, że rozkłady analizowanych zmiennych nie są rozkładami normalnymi ($p \ll 0,050$). W związku z tym w celu porównania wyników uzyskanych w obu grupach przeprowadzono test kolejności par Wilcoxona. Badania wykazały brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi grupami (tabela 12, ryciny 3-7).

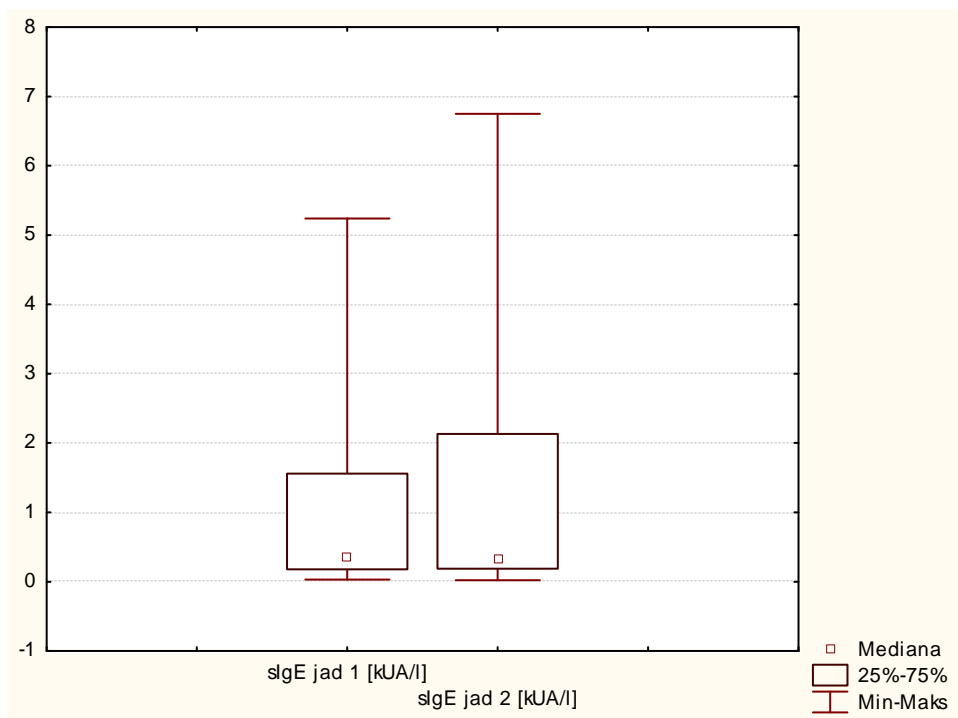
Tabela 12. Porównanie zmiennych (tIgE, sIgE jad, sIgE fosfolipaza A₂, tryptaza, IgG4) oznaczonych w ciągu 3 godzin po uządleniu (1^{*}) ze zmiennymi oznaczonymi po minimum 6 tygodniach od uządlenia (2^{**}). Test kolejności par Wilcoxona.

Para zmiennych	N ważnych	Poziom istotności p
tIgE 1 [*] & tIgE 2 ^{**}	26	0,324
sIgE jad 1 & sIgE jad 2	26	0,386
sIgE fosfolipaza A ₂ 1 & sIgE fosfolipaza A ₂ 2	26	0,099
tryptaza 1 & tryptaza 2	26	0,929
IgG4 1 & IgG4 2	25	0,288

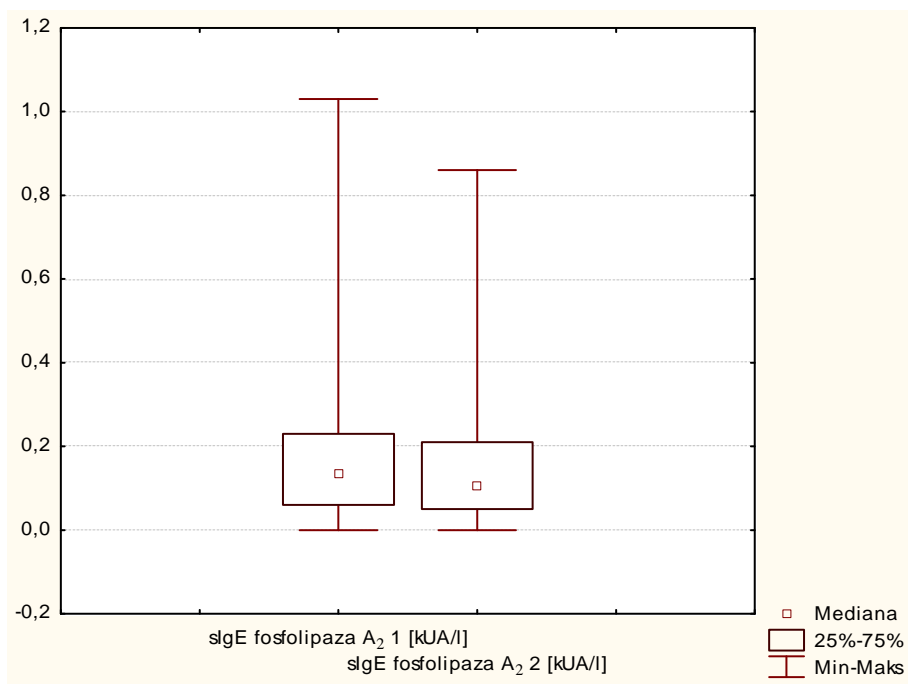
WYNIKI



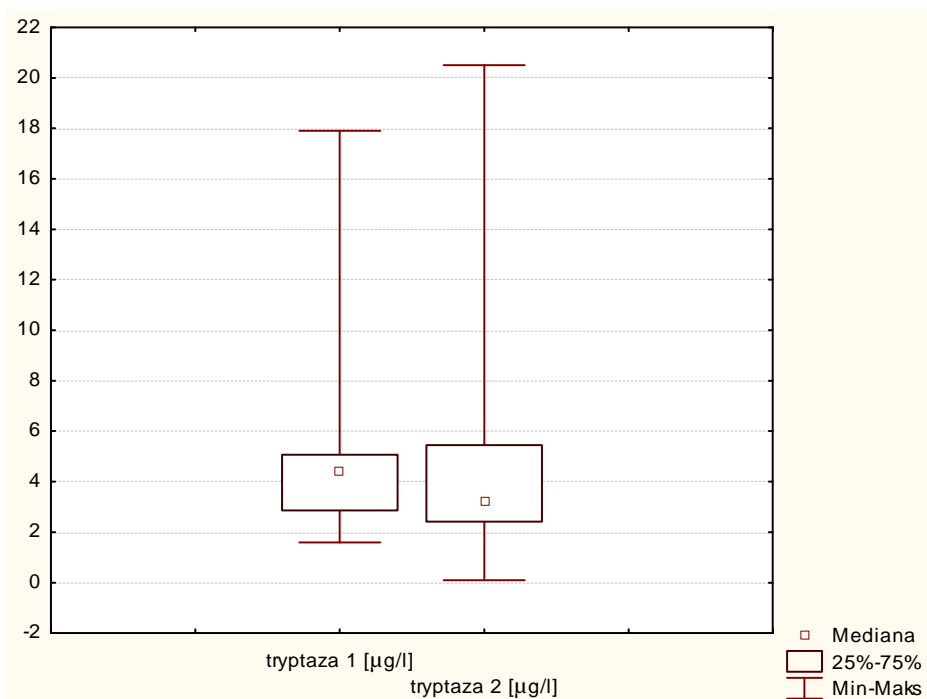
Rycina 3. Porównanie wartości tIgE 1 (oznaczone w ciągu 3 godzin po użądleniu) z tIgE 2 (oznaczone po minimum 6 tygodniach od użądlenia) w grupie osób użądlnych.



Rycina 4. Porównanie wartości sIgE jad 1 (oznaczone w ciągu 3 godzin po użądleniu) z sIgE jad 2 (oznaczone po minimum 6 tygodniach od użądlenia) w grupie osób użądlnych.

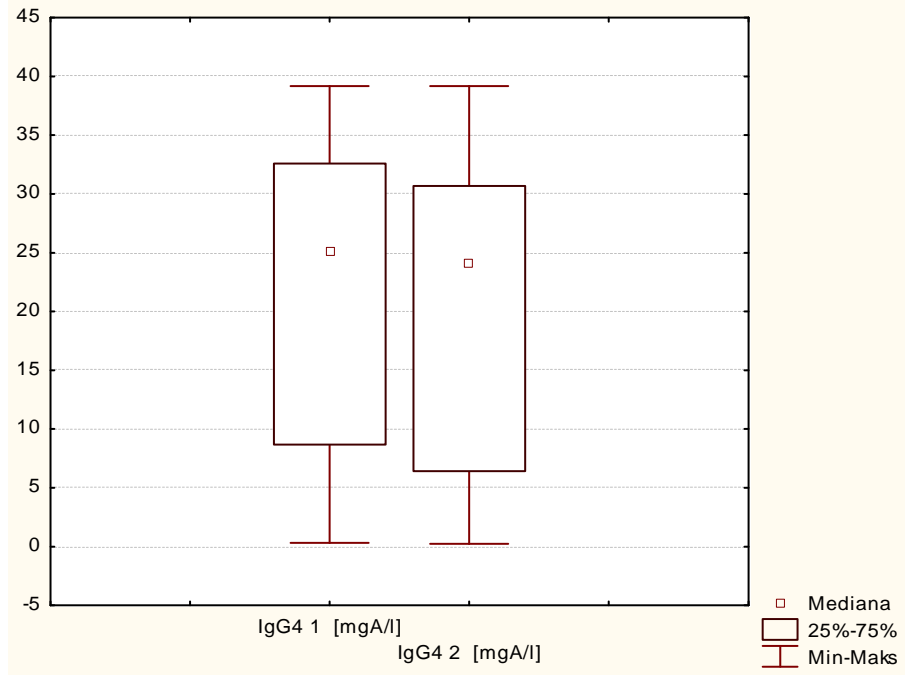


Rycina 5. Porównanie wartości sIgE fosfolipaza A₂ 1 (oznaczone w ciągu 3 godzin po użądleniu) z sIgE fosfolipaza A₂ 2 (oznaczone po minimum 6 tygodniach od użądlenia) w grupie osób użądlnionych.



Rycina 6. Porównanie wartości tryptaza 1 (oznaczone w ciągu 3 godzin po użądleniu) z tryptaza 2 (oznaczone po minimum 6 tygodniach od użądlenia) w grupie osób użądlnionych.

WYNIKI



Rycina 7. Porównanie wartości IgG4 1 (oznaczone w ciągu 3 godzin po uządleniu) z IgG4 2 (oznaczone po minimum 6 tygodniach od uządlenia) w grupie osób uządlnych.

5.2.2. Analiza porównawcza pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami

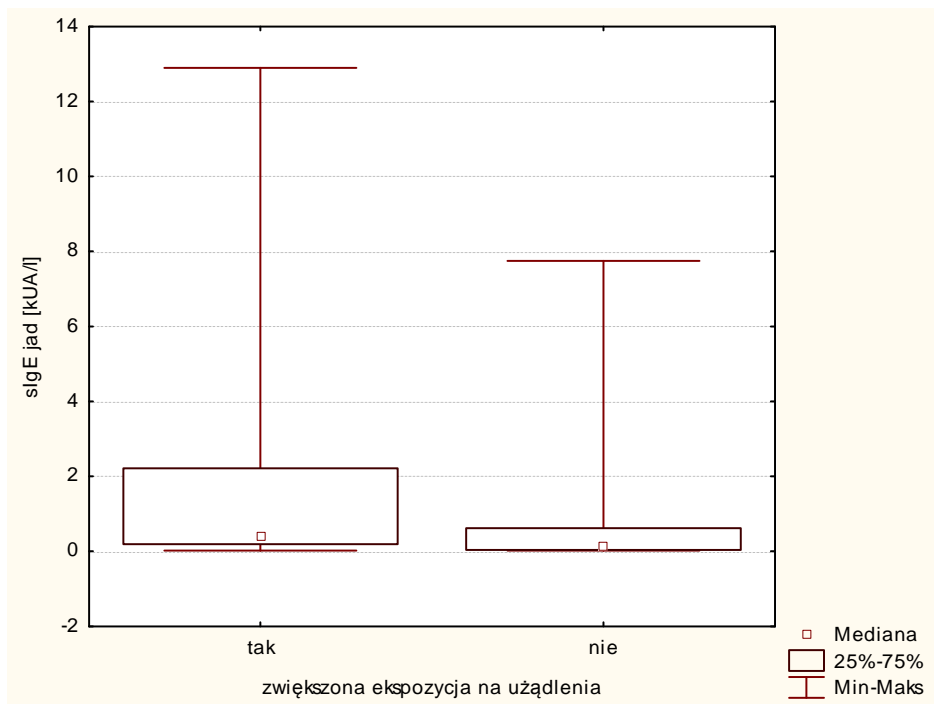
Do analiz porównawczych wykorzystano następujące zmienne: tIgE, sIgE jad, sIgE jad-klasa, sIgE fosfolipaza A₂, sIgE fosfolipaza A₂-klasa, tryptaza, IgG4, stosunek: sIgE jad/IgG4 (zmienne zależne). W przypadku osób użądzonych wykorzystano wyniki otrzymane po min. 6 tygodniach od użądlenia. Z analiz tych wyłączono przypadek: „Badany 18” z uwagi na odbiegające wyniki badań w porównaniu z grupą badaną. Dodatkowo z analiz dla zmiennej zależnej – tIgE wyłączono przypadki: „Badany 51, 52, 53 i 54” ze względu na zawyżone wyniki badań spowodowane współistnieniem astmy o podłożu alergicznym.

Do sprawdzenia normalności rozkładu wykorzystano test Shapiro-Wilka. Przeprowadzone testy wykazały, że rozkłady analizowanych zmiennych nie są rozkładami normalnymi ($p < 0,050$). W związku z tym w celu porównania wyników uzyskanych w obu grupach przeprowadzono test U Manna-Whitney’a. Testy wykazały brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi grupami dla zmiennych zależnych: tIgE, sIgE jad-klasa oraz sIgE fosfolipaza A₂-klasa względem zmiennej grupującej (zwiększona ekspozycja na użądlenia). Natomiast wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy analizowanymi grupami dla zmiennych zależnych: sIgE jad, sIgE fosfolipaza A₂, tryptaza, IgG4 oraz stosunek: sIgE jad/IgG4. Na rycinach 8-12 przedstawiono tylko analizy, które wykazały istotne statystycznie różnice.

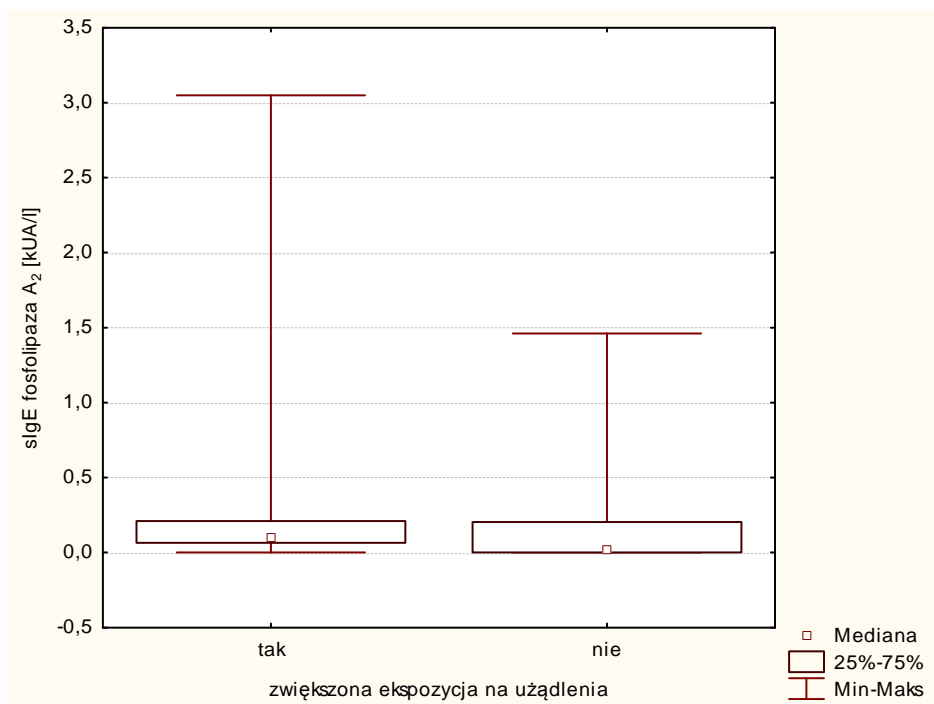
Tabela 13. Porównanie wyników badań. Zmienna grupująca: zwiększony kontakt z pszczołami. Zmienne zależne: tIgE, sIgE jad, sIgE jad-klasa, sIgE fosfolipaza A₂, sIgE fosfolipaza A₂-klasa, tryptaza, IgG4, stosunek: sIgE jad/IgG4. Test U Manna-Whitneya.

Zmienne zależne	Suma rang: zwiększona ekspozycja na użądlenia - tak	Suma rang: zwiększona ekspozycja na użądlenia - nie	U	Poziom istotności p	N ważnych: zwiększona ekspozycja na użądlenia - tak	N ważnych: zwiększona ekspozycja na użądlenia - nie
tIgE	758,5	466,5	230,5	0,383	32	17
sIgE jad	978,0	453,0	222,0	0,038	32	21
sIgE jad - klasa	917,0	514,0	283,0	0,292	32	21
sIgE fosfolipaza A ₂	950,0	428,0	218,0	0,055	32	20
sIgE fosfolipaza A ₂ - klasa	847,5	530,5	319,5	1,000	32	20
tryptaza	980,0	398,0	188,0	0,013	32	20
IgG4	1116,0	210,0	0,0	<<0,05	31	20
stosunek: sIgE jad/IgG4	566,0	812,0	38,0	<<0,05	32	20

WYNIKI

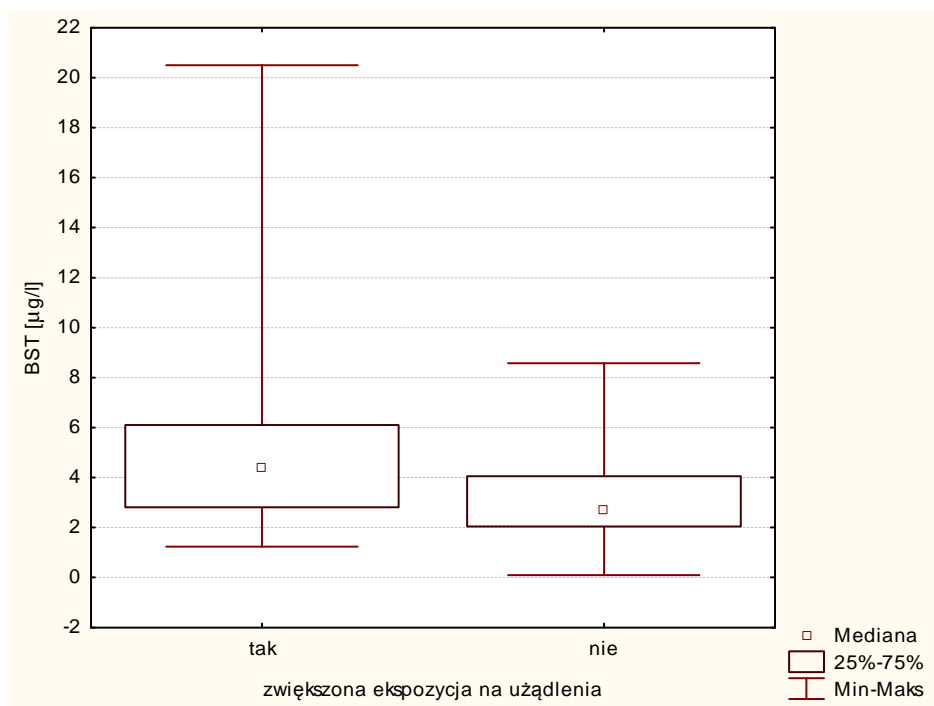


Rycina 8. Porównanie wartości – sIgE jad pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie rodzin pomagający w pasiece) a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami.

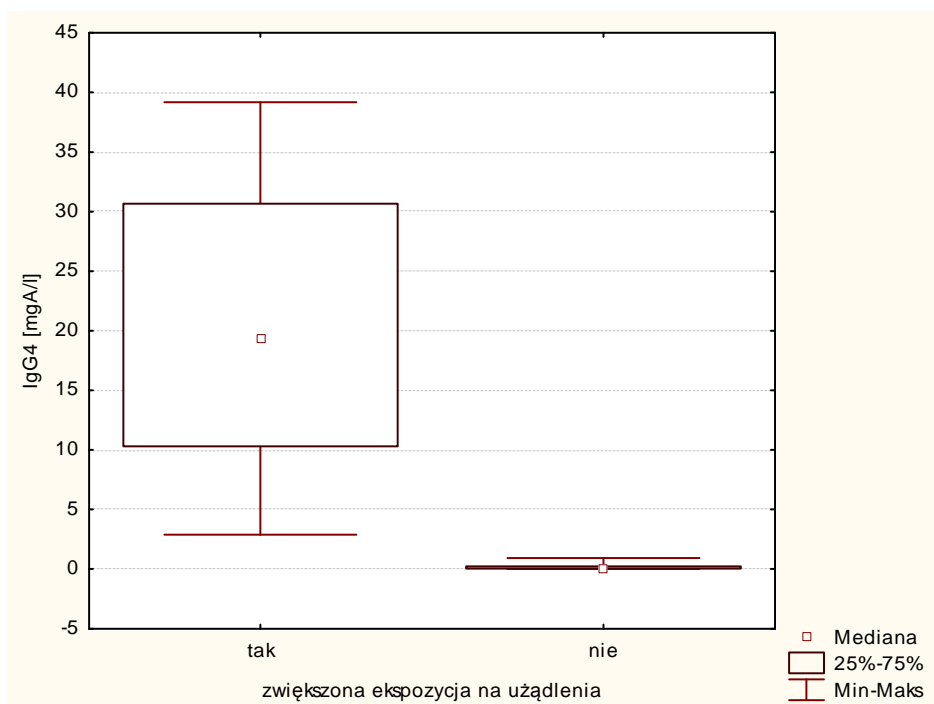


Rycina 9. Porównanie wartości – sIgE fosfolipaza A₂ pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie rodzin pomagający w pasiece) a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami.

WYNIKI

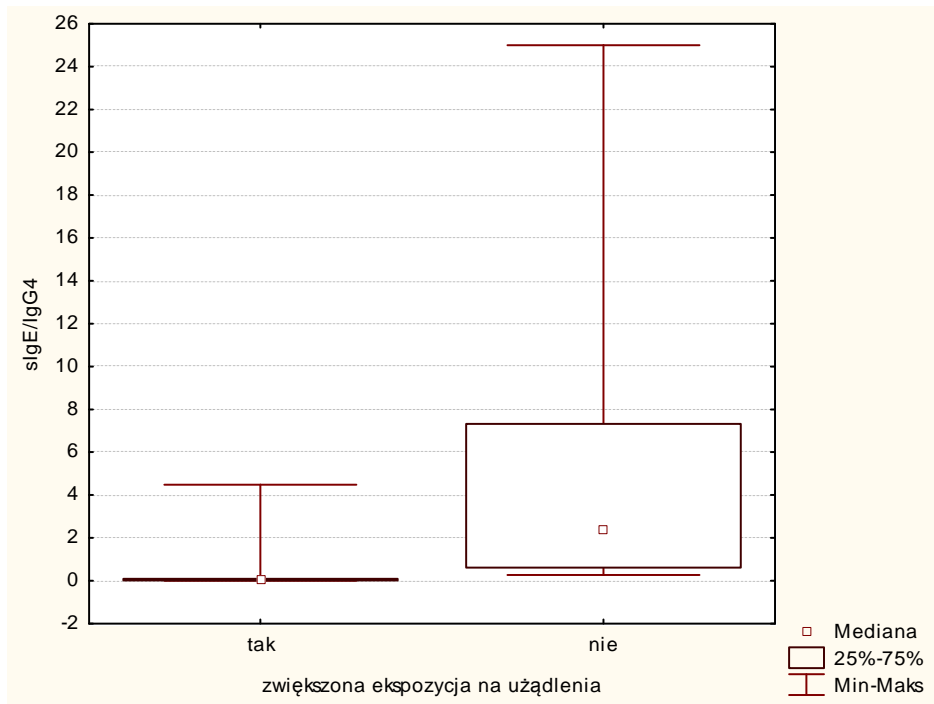


Rycina 10. Porównanie wartości – podstawowe stężenie tryptazy (BST) pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie rodzin pomagający w pasiece) a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami.



Rycina 11. Porównanie wartości – IgG4 pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie rodzin pomagający w pasiece) a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami.

WYNIKI



Rycina 12. Porównanie stosunków – sIgE jad/IgG4 pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie rodzin pomagający w pasiece) a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami.

5.2.3. Analiza korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu a wynikami badań laboratoryjnych

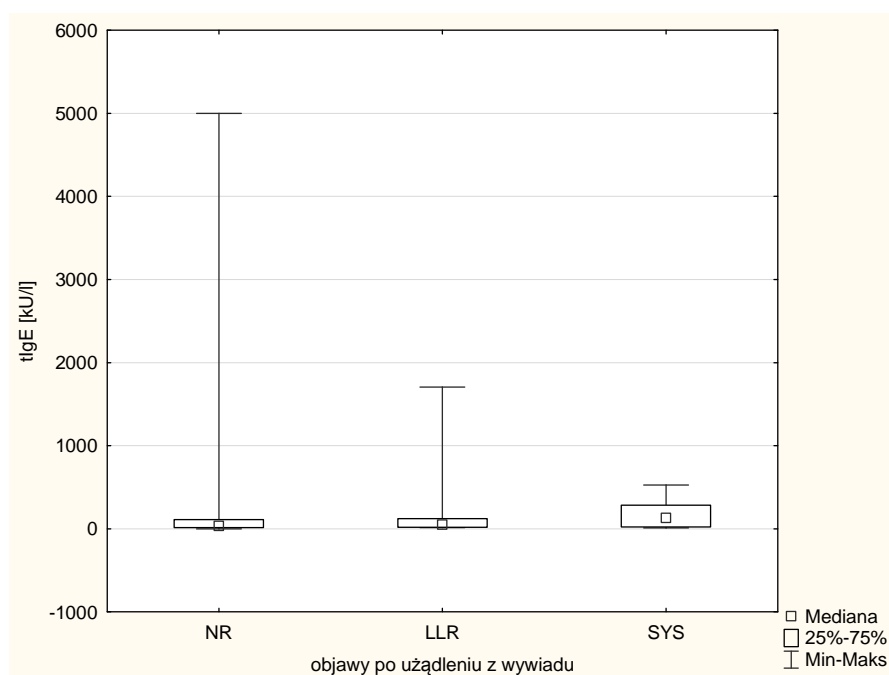
Do oceny korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu (dane z wywiadu) a stężeniem tIgE, sIgE przeciw jadowi pszczelemu (sIgE jad), sIgE przeciw fosfolipazie A₂ (sIgE fosfolipaza A₂), stężeniem tryptazy oraz IgG4 wykorzystano test ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Dokonano również oceny korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu świeżym a stężeniem tryptazy oznaczonym w ciągu trzech godzin od użądlenia. Ze względu na uzyskane we wcześniejszych testach istotne statystycznie różnice w stężeniach sIgE jad, sIgE fosfolipaza A₂, tryptazy oraz IgG4 pomiędzy grupą osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami, analizy oceniające korelacje ww. wyników badań laboratoryjnych z objawami klinicznymi po użądleniu (dane z wywiadu) wykonano oddzielnie do obu badanych grup. Tylko w przypadku oceny zależności objawów klinicznych ze stężeniem tIgE przeprowadzono jeden test dla wszystkich badanych, ponieważ nie było statystycznie istotnych różnic w stężeniach tIgE pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami.

Na podstawie przeprowadzonych testów nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji pomiędzy zmiennymi zależnymi (stężenie tIgE oraz sIgE jad) a zmienną grupującą (objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu) w obu badanych grupach. Analiza wykazała statystycznie istotną korelację pomiędzy zmienną zależną sIgE fosfolipaza A₂ a objawami klinicznymi po użądleniu z wywiadu w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami, natomiast nie stwierdzono takiej korelacji w grupie nie mającej kontaktu z pszczołami. Nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji pomiędzy zmienną zależną (stężenie tryptazy) a zmienną grupującą (objawy po użądleniu z wywiadu oraz objawy po użądleniu świeżym) w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami. Nie uzyskano również istotnej korelacji pomiędzy stężeniem tryptazy a objawami klinicznymi po użądleniu z wywiadu w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami. Natomiast w przypadku sprawdzania zależności stężenia IgG4 z objawami klinicznymi otrzymano graniczny poziom istotności w grupie ze zwiększonym kontaktem z pszczołami. Nie uzyskano korelacji stężenia IgG4 z objawami klinicznymi u osób nie mających kontaktu z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 14. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem tIgE. Zmienna zależna: tIgE. Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa); $p=0,582$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	38	992,0
LLR	11	331,0
SYS	5	162,0

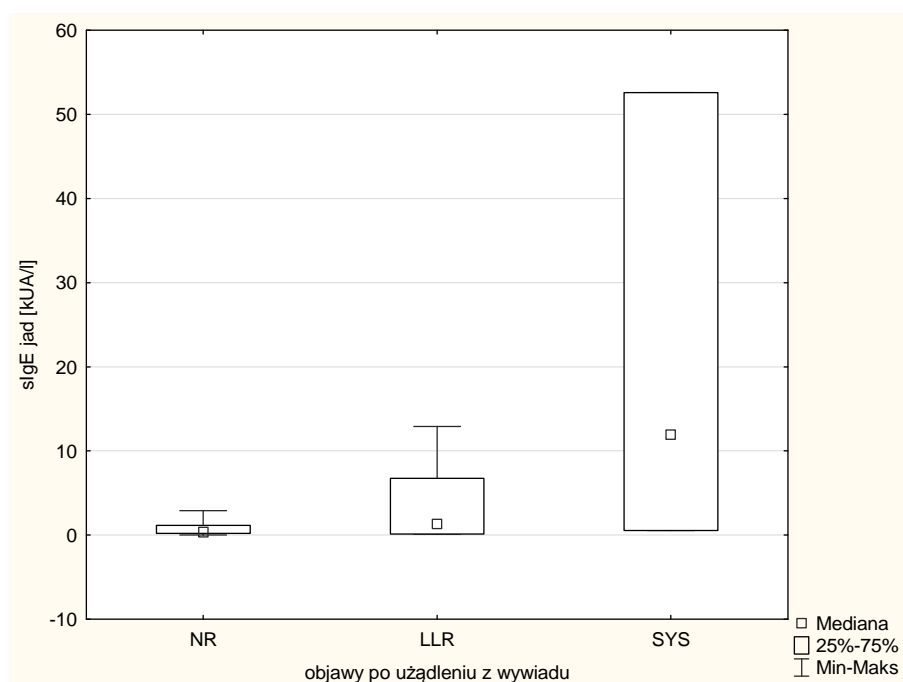


Rycina 13. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości tIgE.

WYNIKI

Tabela 15. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem sIgE jad w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami. Zmienna zależna: sIgE jad. Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa); $p=0,124$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	24	374,0
LLR	6	104,0
SYS	3	83,0

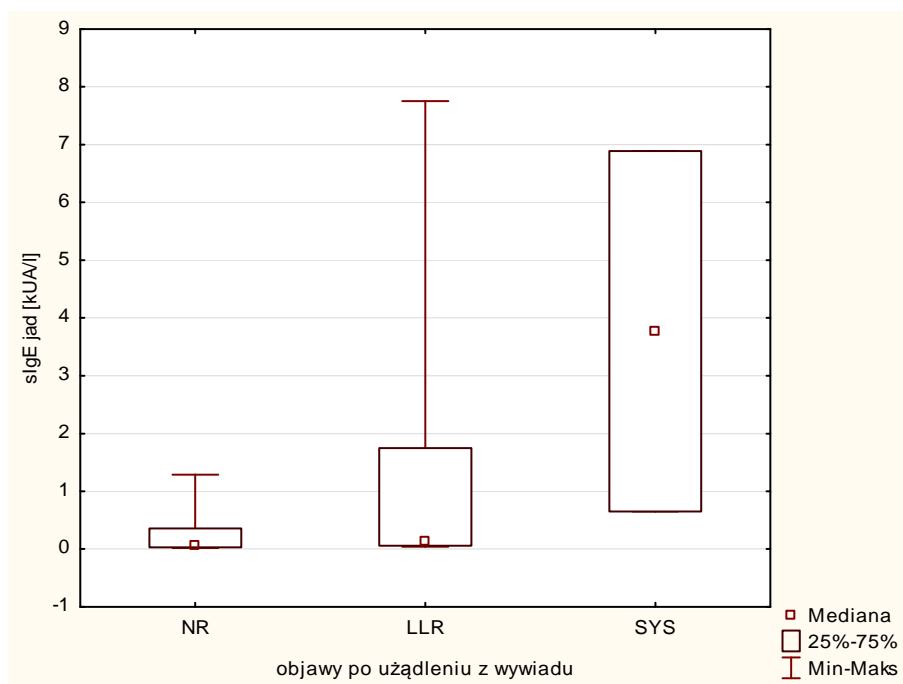


Rycina 14. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości sIgE jad w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 16. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem sIgE jad w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami. Zmienna zależna: sIgE jad. Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa); $p=0,099$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	14	125,0
LLR	5	65,0
SYS	2	37,0

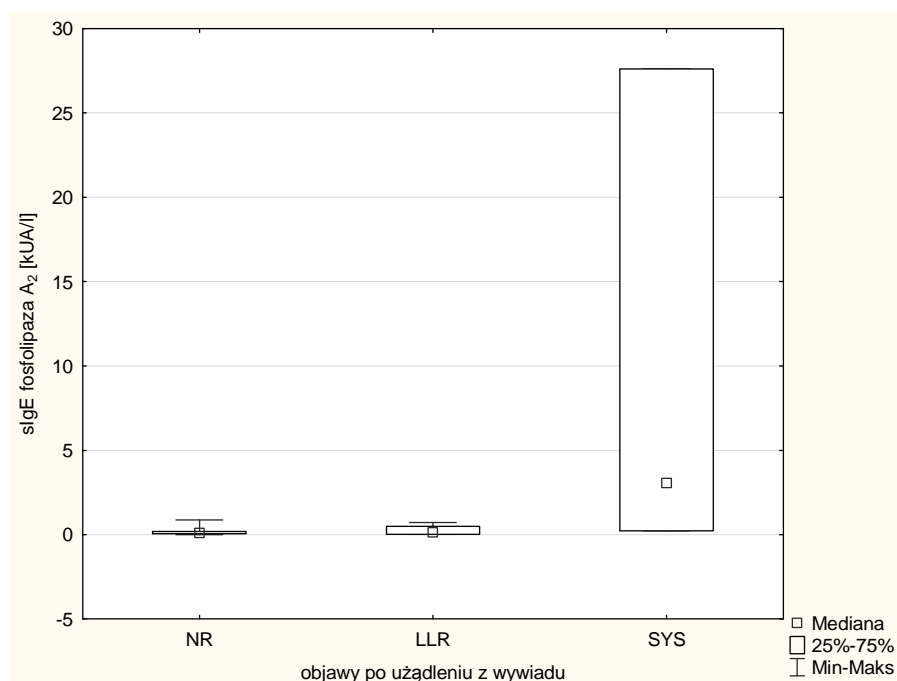


Rycina 15. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości sIgE jad w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 17. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem sIgE fosfolipaza A₂ w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami. Zmienna zależna: sIgE fosfolipaza A₂. Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa); p=0,040. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	24	368,5
LLR	6	101,5
SYS	3	91,0

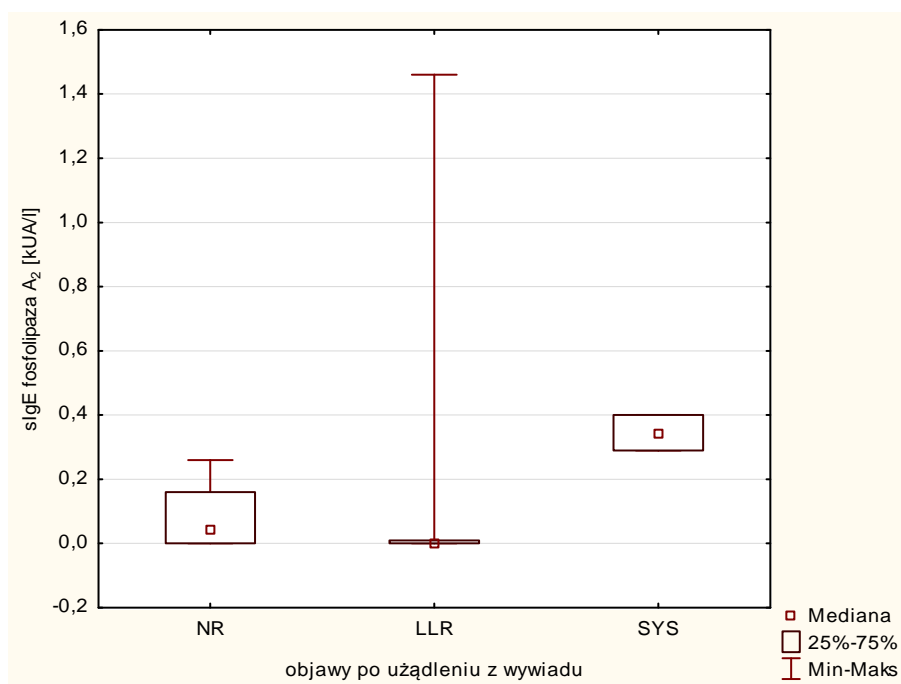


Rycina 16. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości sIgE fosfolipaza A₂ w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 18. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem sIgE fosfolipaza A₂ w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami. Zmienna zależna: sIgE fosfolipaza A₂. Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa); p=0,105. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	13	368,5
LLR	5	101,5
SYS	2	91,0

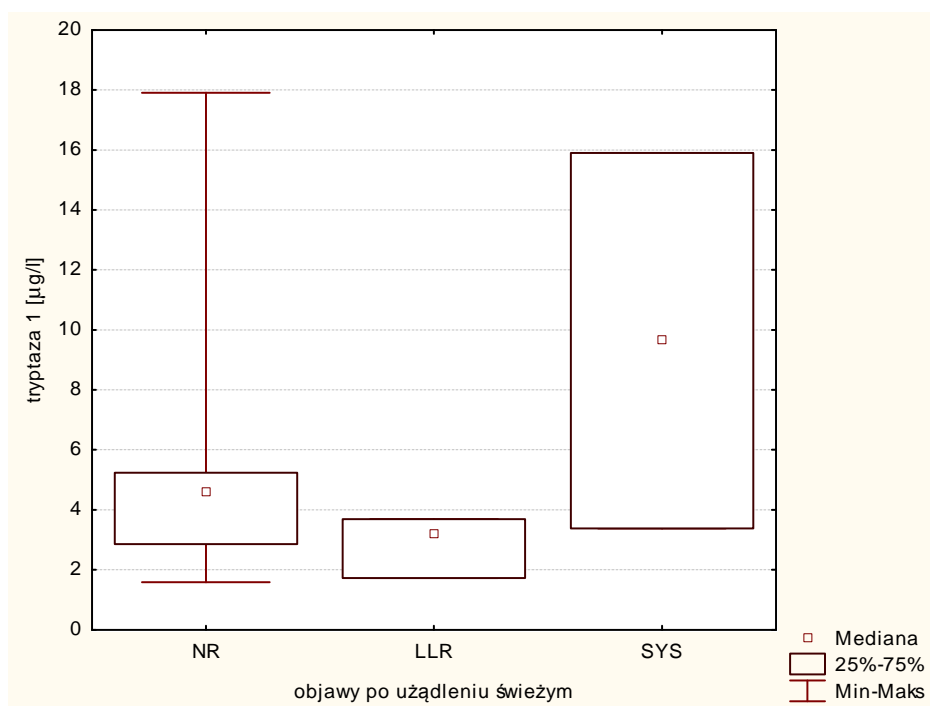


Rycina 17. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości sIgE fosfolipaza A₂ w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 19. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem tryptazy 1. Zmienna zależna: tryptaza 1 (badania wykonane w ciągu 3 godzin od użądlenia). Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu świeżym; $p=0,243$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu świeżym	N ważnych	Suma rang
NR	25	404,0
LLR	3	23,0
SYS	2	38,0

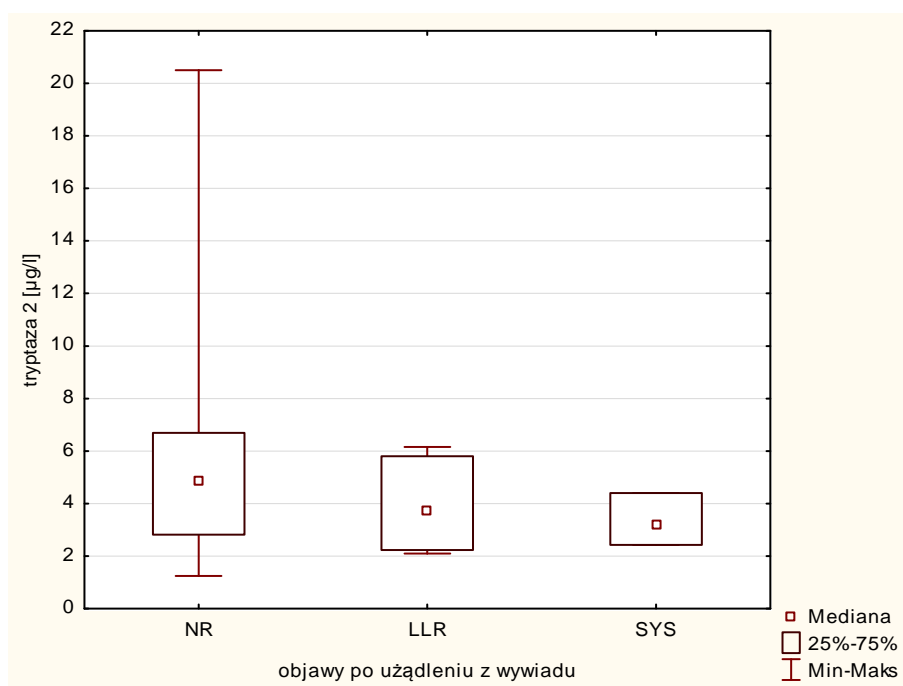


Rycina 18. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu świeżym od wartości tryptaza 1 (oznaczenia wykonane w ciągu 3 godzin od użądlenia).

WYNIKI

Tabela 20. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem tryptazy 2 w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami. Zmienna zależna: tryptaza 2 (oznaczenia wykonane bez użądlenia – podstawowe stężenie tryptazy). Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu; $p=0,448$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	24	438,0
LLR	6	87,0
SYS	3	36,0

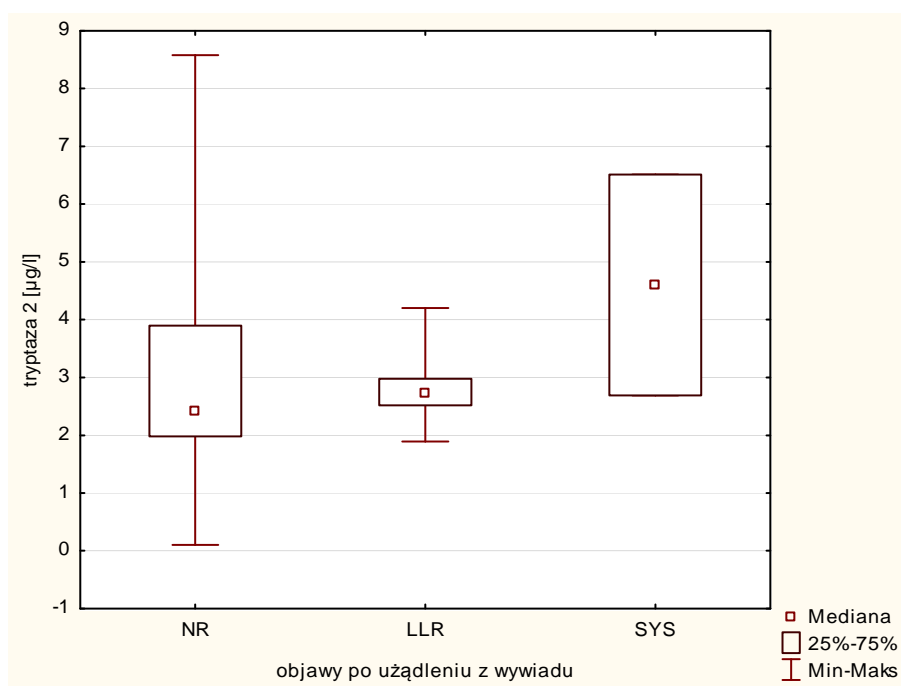


Rycina 19. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości tryptaza 2 (oznaczenia wykonane bez użądlenia) w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 21. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem tryptazy 2 w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami. Zmienna zależna: tryptaza 2 (oznaczenia wykonane bez użądlenia – podstawowe stężenie tryptazy). Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu; $p=0,577$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	13	127,5
LLR	5	53,5
SYS	2	29,0

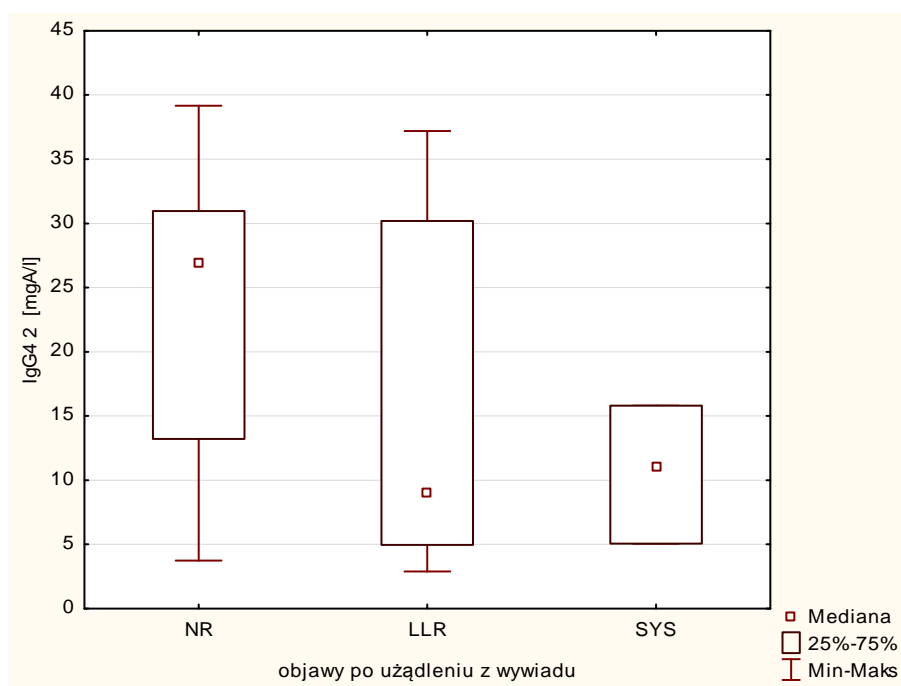


Rycina 20. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości tryptaza 2 (oznaczenia wykonane bez użądlenia) w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 22. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem IgG4 2 w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami. Zmienna zależna: IgG4 2 (oznaczenia wykonane bez użądlenia). Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu; $p=0,084$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	24	462,0
LLR	6	72,0
SYS	3	27,0

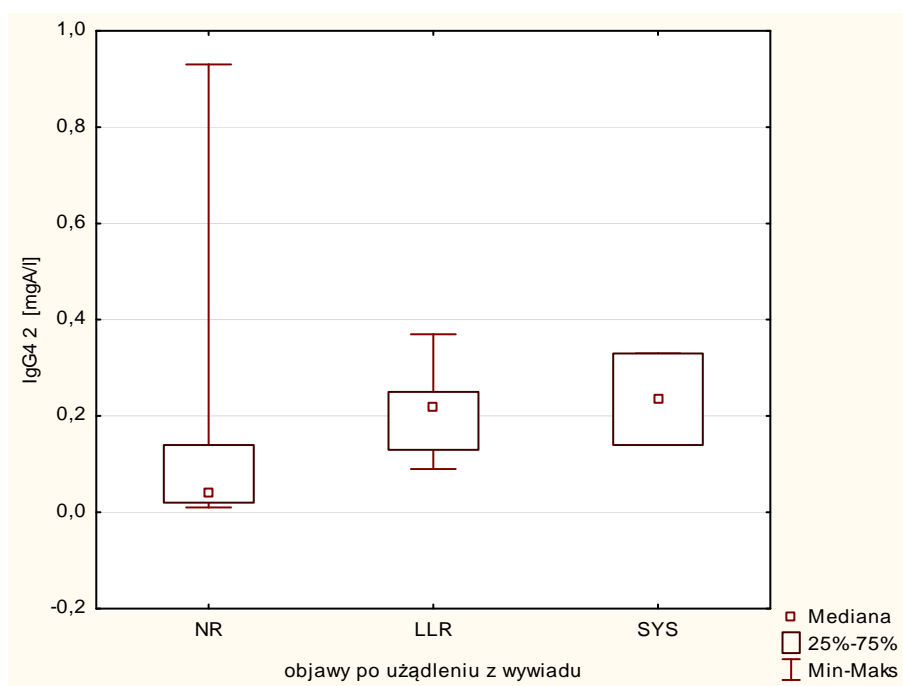


Rycina 21. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości IgG4 2 (oznaczenia wykonane bez użądlenia) w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 23. Korelacja objawów klinicznych ze stężeniem IgG4 2 w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami. Zmienna zależna: IgG4 2 (oznaczenia wykonane bez użądlenia). Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu; $p=0,105$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	13	110,0
LLR	5	69,5
SYS	2	30,5



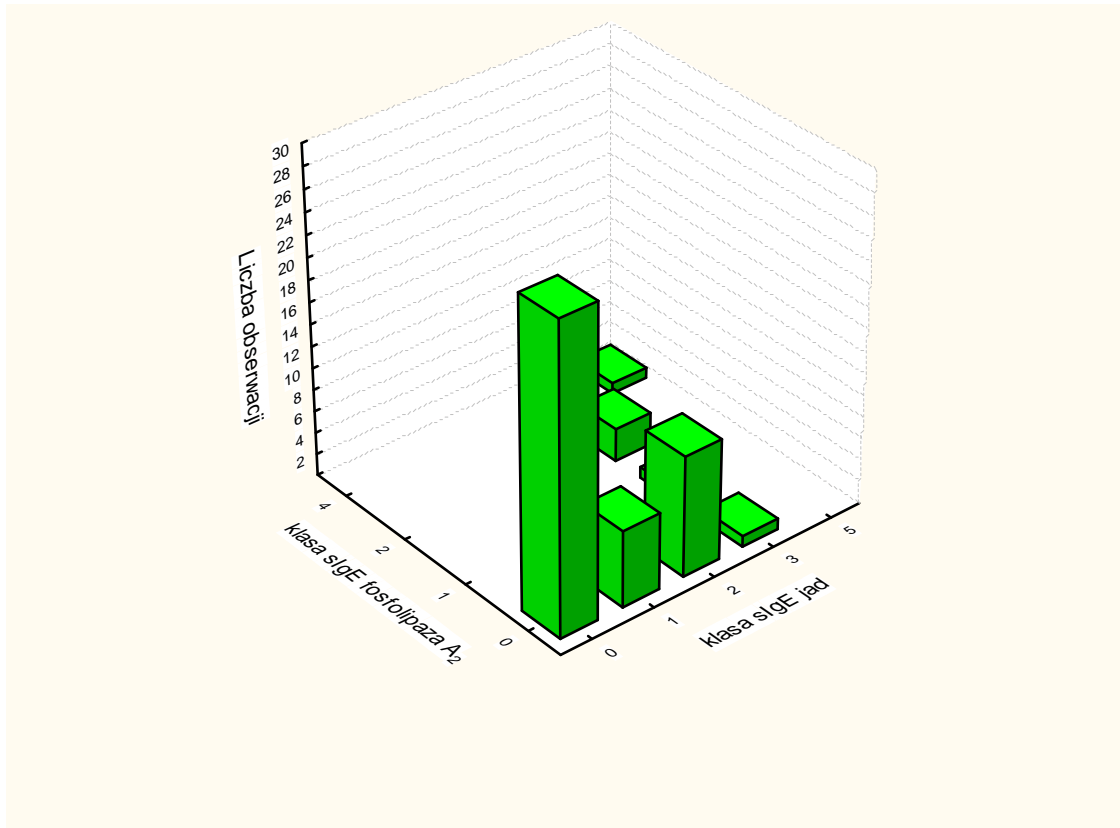
Rycina 22. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wartości IgG4 2 (oznaczenia wykonane bez użądlenia) w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami.

5.2.4. Analiza korelacji objawów klinicznych po użądleniu z klasami sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂

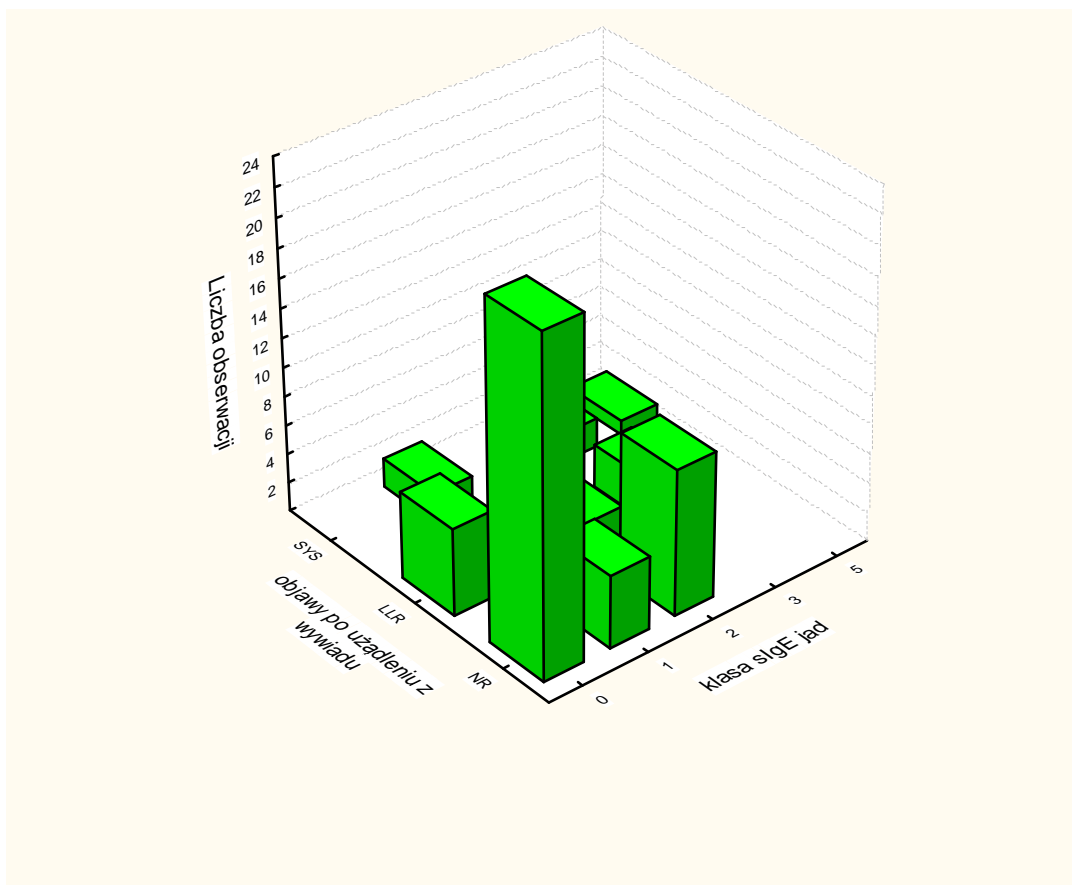
Do oceny współzależności pomiędzy zmiennymi (klasy: sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂) wykorzystano test χ^2 Pearsona. Test ten wykorzystano także do oceny współzależności pomiędzy klasami: sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ a objawami klinicznymi po użądleniu z wywiadu. Analizy przeprowadzono u wszystkich osób badanych ze względu na otrzymany we wcześniejszych testach (rozdział 5.2.2.) brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy klasami: sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ grupy osób mających zwiększony kontakt z pszczołami i grupy osób nie mających kontaktu z pszczołami. Przeprowadzone testy wykazały statystycznie istotne korelacje pomiędzy analizowanymi zmiennymi.

Tabela 24. Korelacje pomiędzy zmiennymi: klasa sIgE fosfolipaza A₂ & klasa sIgE jad, objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu & klasa sIgE jad, objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu & klasa sIgE fosfolipaza A₂. Test χ^2 Pearsona.

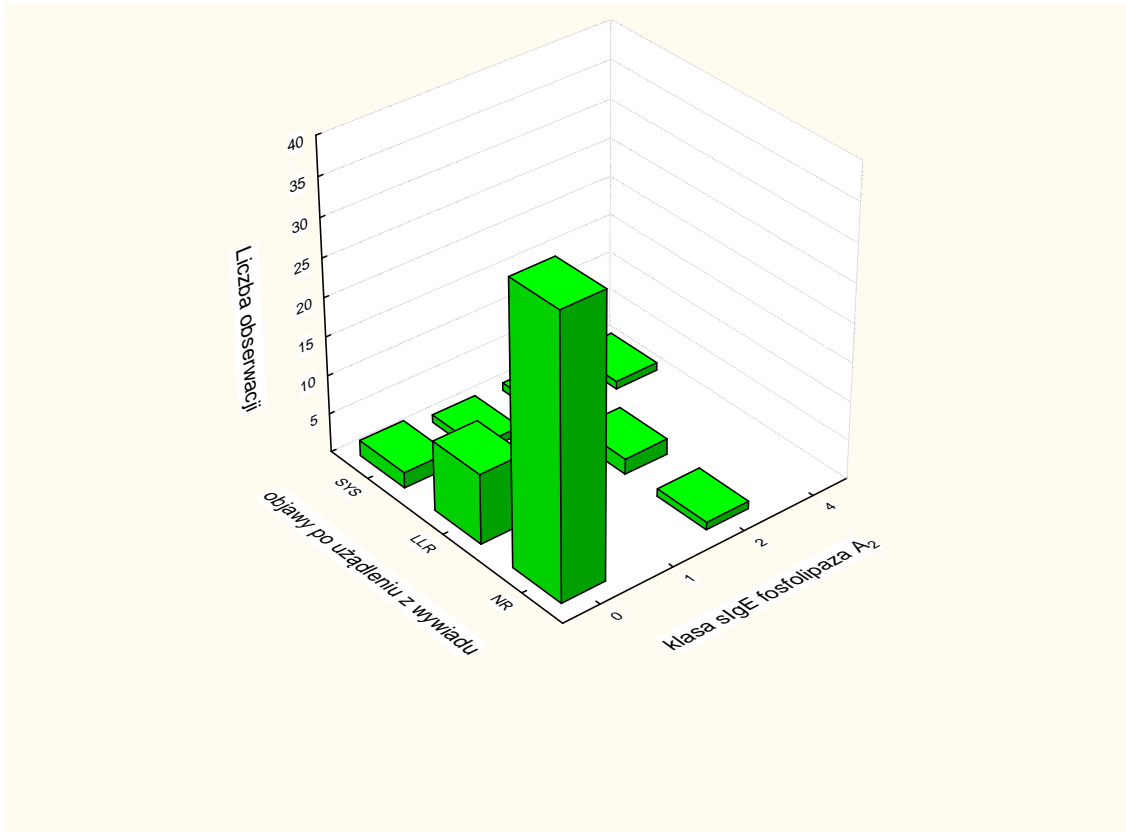
Statystyki	df	χ^2	Poziom istotności p
sIgE fosfolipaza A ₂ -klasa & sIgE jad-klasa	12	86,62	<<0,050
objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu & sIgE jad-klasa	8	31,02	<<0,050
objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu & sIgE fosfolipaza A ₂ -klasa	6	24,73	<<0,050



Rycina 23. Zależność pomiędzy klasami: sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂.



Rycina 24. Zależność pomiędzy objawami klinicznymi po uzadleniu z wywiadu a klasą sIgE jad.



Rycina 25. Zależność pomiędzy objawami klinicznymi po uzadleniu z wywiadu a klasą sIgE fosfolipaza A₂.

5.2.5. Analiza czynników wpływających na stężenie IgG4

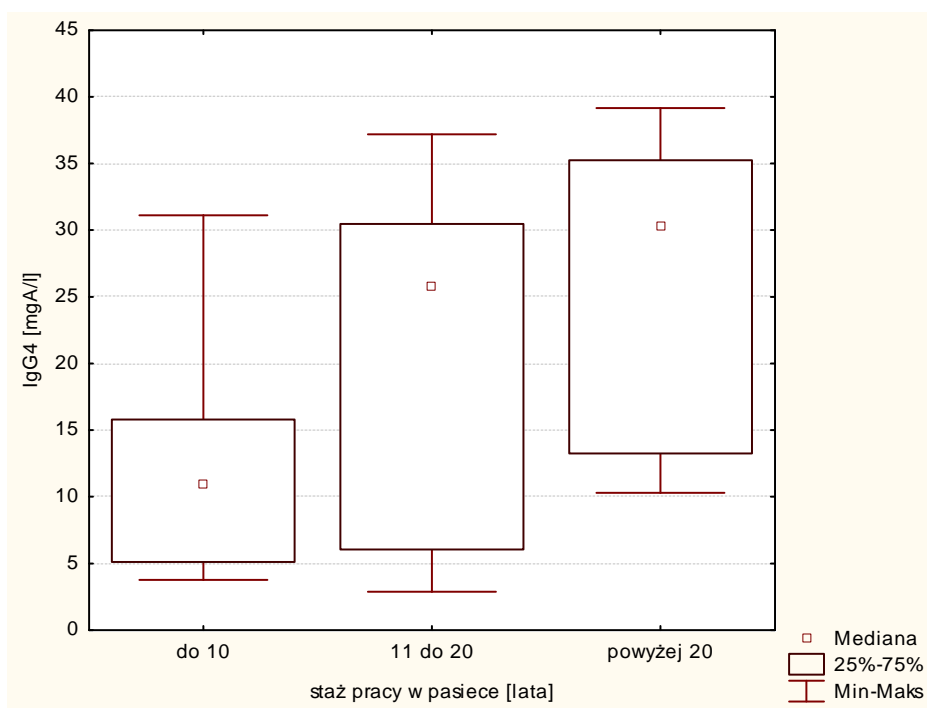
W grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie ich rodzin pomagający w pasiece) dla określenia korelacji pomiędzy stażem pracy w pasiece, liczbą otrzymywanych użądleń dziennie, liczbą przepracowanych dni tygodniowo w pasiece oraz używaniem odzieży ochronnej a poziomem IgG4 wykorzystano analizę wariancji (ANOVA).

Do sprawdzenia normalności rozkładu wykorzystano test Shapiro-Wilka. Przeprowadzone testy wykazały, że rozkłady analizowanych zmiennych nie są rozkładami normalnymi. W związku z tym zastosowano test Kruskala-Wallisa. Analiza wykazała statystycznie istotne korelacje pomiędzy zmienną zależną (IgG4) a zmiennymi grupującymi (staż pracy w pasiece, liczba otrzymywanych użądleń dziennie, liczba przepracowanych dni tygodniowo w pasiece, używanie odzieży ochronnej).

WYNIKI

Tabela 25. Korelacja stażu pracy w pasiece ze stężeniem IgG4. Zmienna zależna: IgG4. Zmienna niezależna (grupująca): staż pracy w pasiece; $p=0,041$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Staż pracy (lata)	N ważnych	Suma rang
do 10	10	95,0
11 do 20	11	181,0
powyżej 20	12	252,0

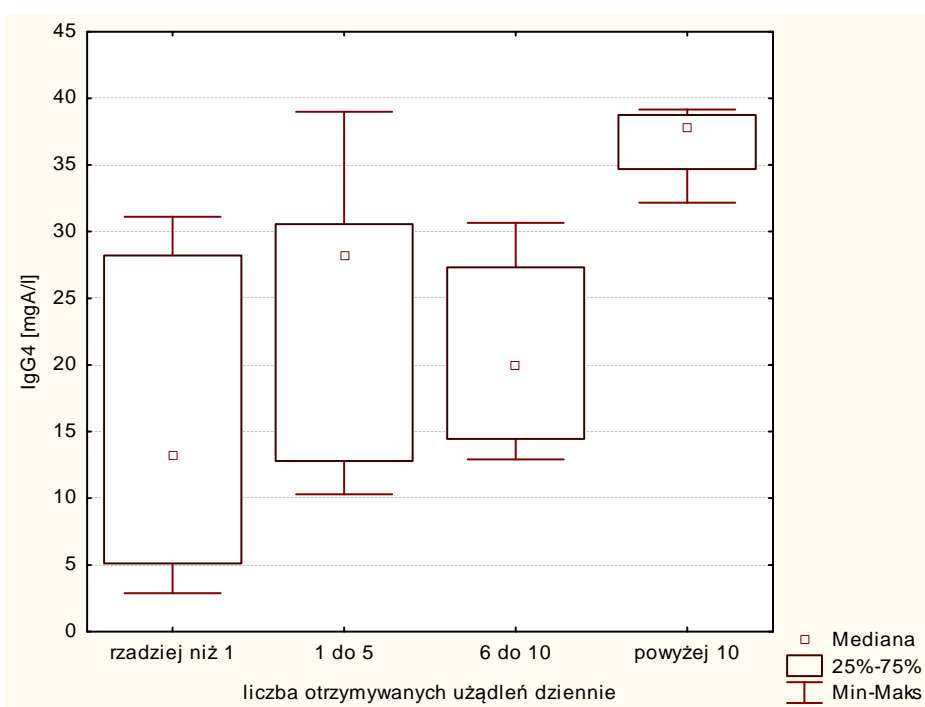


Rycina 26. Porównanie wartości IgG4 w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie ich rodzin pomagający w pasiece) w zależności od stażu pracy w pasiece.

WYNIKI

Tabela 26. Korelacja liczby otrzymywanych użądleń dziennie ze stężeniem IgG4. Zmienna zależna: IgG4. Zmienna niezależna (grupująca): liczba otrzymywanych użądleń dziennie; $p=0,008$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Liczba otrzymywanych użądleń dziennie	N ważnych	Suma rang
< 1	18	225,0
1 do 5	7	115,0
6 do 10	4	69,0
powyżej 10	4	119,0

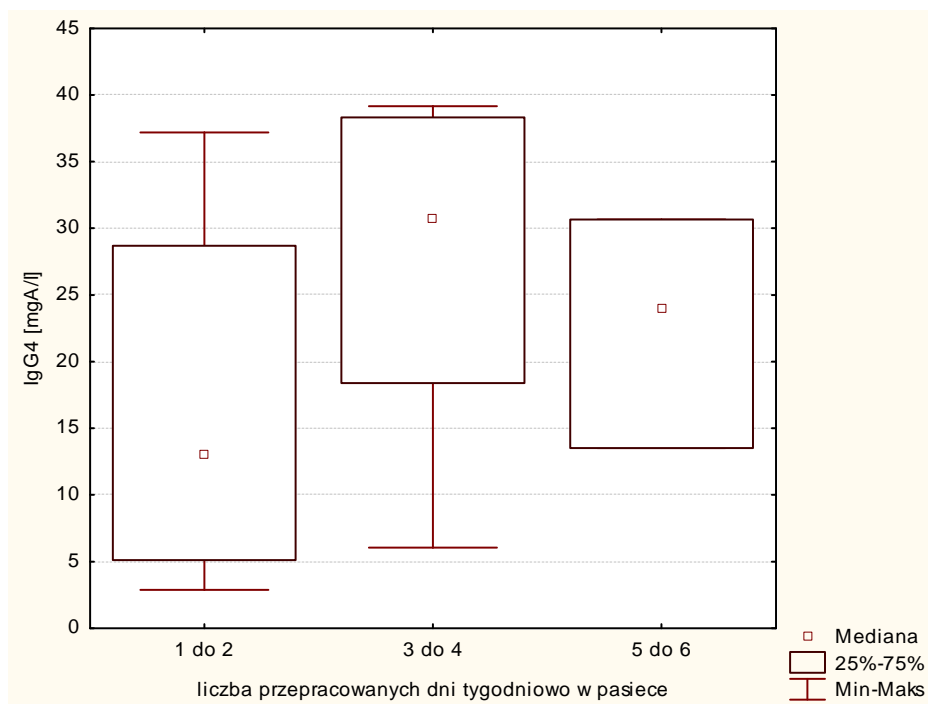


Rycina 27. Porównanie wartości IgG4 w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie ich rodzin pomagający w pasiece) w zależności od liczby otrzymywanych użądleń dziennie.

WYNIKI

Tabela 27. Korelacja liczby przepracowanych dni tygodniowo w pasiece ze stężeniem IgG4. Zmienna zależna: IgG4. Zmienna niezależna (grupująca): liczba przepracowanych dni tygodniowo w pasiece; $p=0,039$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Liczba przepracowanych dni tygodniowo	N ważnych	Suma rang
1 do 2	19	249,0
3 do 4	10	223,0
5 do 6	4	56,0

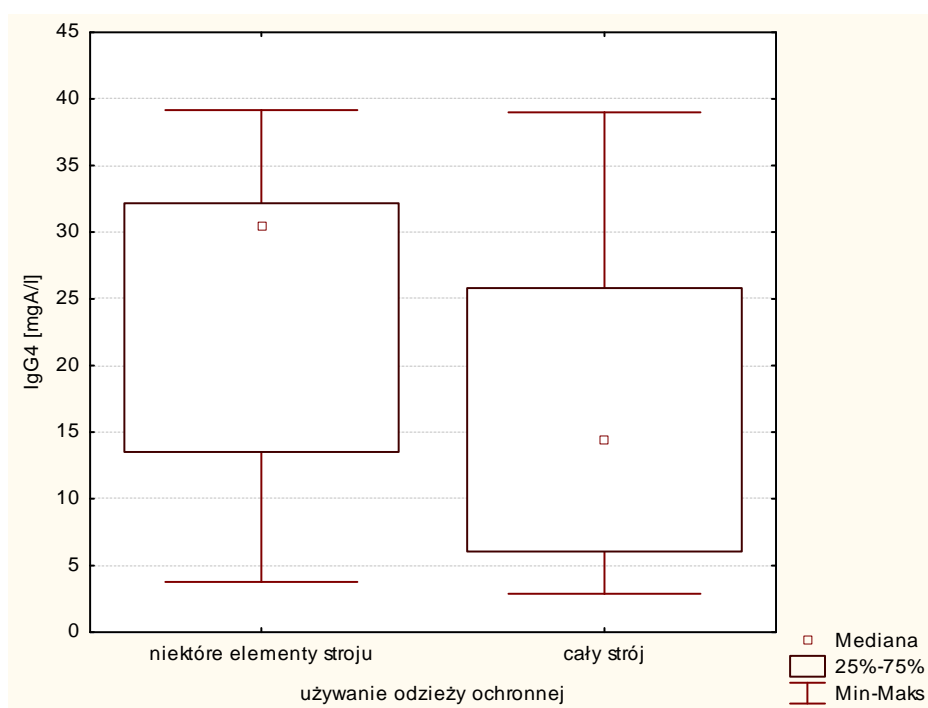


Rycina 28. Porównanie wartości IgG4 w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczołarzy i członkowie ich rodzin pomagający w pasiece) w zależności od liczby przepracowanych dni tygodniowo w pasiece.

WYNIKI

Tabela 28. Korelacja używania odzieży ochronnej ze stężeniem IgG4. Zmienna zależna: IgG4. Zmienna niezależna (grupująca): używanie odzieży ochronnej; $p=0,028$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Odzież ochronna	N ważnych	Suma rang
niektóre elementy stroju	14	216,0
cały strój	19	135,0

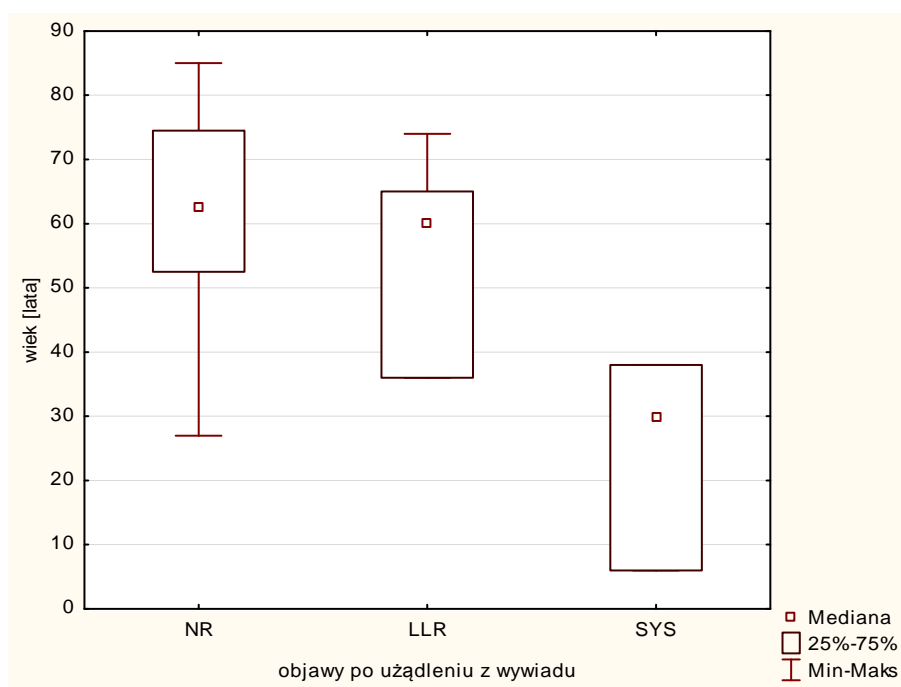


Rycina 29. Porównanie wartości IgG4 w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie ich rodzin pomagający w pasiece) w zależności od używania odzieży ochronnej.

5.2.6. Analiza korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę a wiekiem

Tabela 29. Korelacja objawów klinicznych z wiekiem w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami. Zmienna zależna: wiek (oznaczenia wykonane bez użądlenia). Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu; $p=0,029$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	24	458,5
LLR	6	91,5
SYS	3	11,0

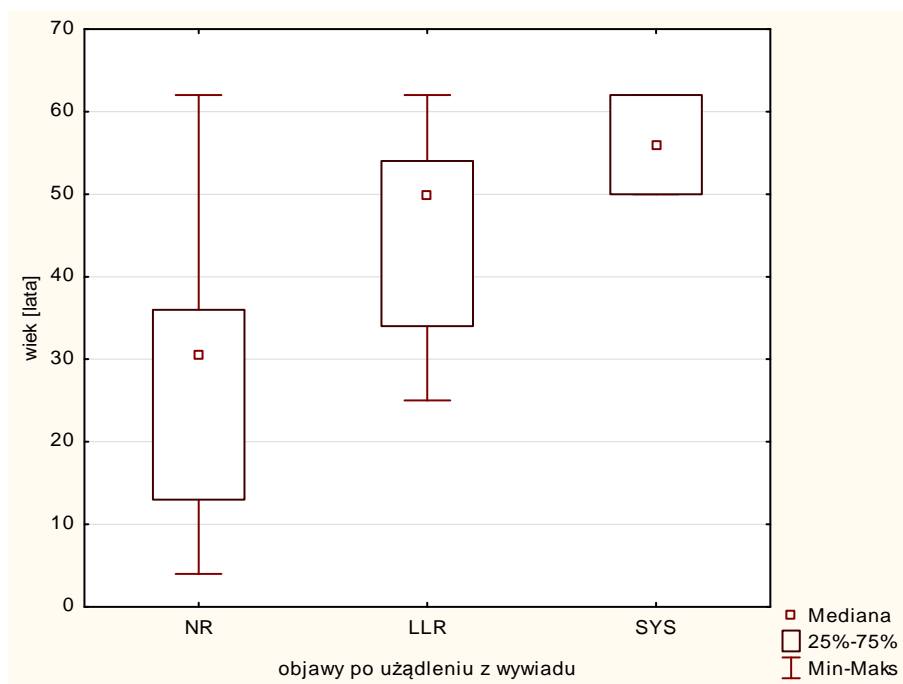


Rycina 30. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wieku w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami.

WYNIKI

Tabela 30. Korelacja objawów klinicznych z wiekiem w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami. Zmienna zależna: wiek (oznaczenia wykonane bez użądlenia). Zmienna niezależna (grupująca): objawy po użądleniu z wywiadu; $p=0,102$. ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Objawy kliniczne po użądleniu z wywiadu	N ważnych	Suma rang
NR	14	127,5
LLR	5	68,0
SYS	2	35,5



Rycina 31. Zależność wystąpienia objawów klinicznych (NR – normalna reakcja miejscowa; LLR – nadmierna reakcja miejscowa; SYS – reakcja systemowa) po użądleniu z wywiadu od wieku w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami.

6. Dyskusja

6.1. Ocena czynników wpływających na stężenia: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂

Oznaczanie całkowitego stężenia przeciwciał IgE (tIgE) jest podstawowym badaniem wykonywanym u osób z podejrzeniem alergii. Jednakże jest to test mało swoisty i tylko w ograniczonym stopniu określa podłoże alergiczne choroby [122, 123]. W diagnostyce alergii na jad owadów błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*) rutynowo wykonywane badania to oznaczanie stężenia swoistych przeciwciał IgE skierowanych przeciwko jadowi owada (sIgE jad) oraz testy skórne [3, 6, 23, 72]. W przypadku podejrzenia alergii na jad pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) można dodatkowo oceniać stężenia przeciwciał skierowanych przeciwko jego poszczególnym składnikom, w tym przeciwko fosfolipazie A₂ (Api m1), która jest głównym alergenem [38]. Na podstawie dotychczas wykonanych badań wiadomo, że u 97 % osób posiadających swoiste przeciwciała w klasie IgE przeciwko całemu jadowi, występują również przeciwciała skierowane przeciwko Api m1 [32]. Nie jest to jednak badanie wykorzystywane w rutynowej diagnostyce. Tymczasem oznaczanie stężenia swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko fosfolipazie A₂ (sIgE fosfolipaza A₂) zmniejsza częstość wyników fałszywie dodatnich. Wprowadzenie rekombinowanych postaci alergenów, takich jak rekombinowana fosfolipaza A₂, dodatkowo zwiększyło swoistość wykonywanych testów diagnostycznych. W dotychczasowych badaniach klinicznych wykazano, że 15% osób bez reakcji alergicznej miało dodatnie wyniki badań wskazujące na alergię na jad pszczele, podczas gdy żadna z tych osób nie wykazywała reakcji na rekombinowane alergeny jadu, w tym fosfolipazę A₂ [69].

W niniejszej pracy oceniono parametry związane z odpowiedzią immunologiczną na jad pszczele (tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂) w grupie 54 osób o różnym stopniu ekspozycji na użądlenia, w tym u 30 osób dwukrotnie tj. bezpośrednio po użądleniu i po upływie co najmniej 6 tygodni od użądlenia. Wyniki przeprowadzonych badań zamieszczono w tabelach 8, 9 i 11.

6.1.1. Ocena zależności stężenia: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ od czasu po użądleniu

Według aktualnych zaleceń diagnostyka w kierunku alergii na jad pszczoły powinna być przeprowadzona po 4-6 tygodniach od wystąpienia reakcji alergicznej w celu uniknięcia wyników fałszywie ujemnych. Poziom swoistych przeciwciał IgE skierowanych przeciwko jadowi pszczelemu (sIgE jad) może być bardzo niski lub nieoznaczalny w pierwszych dniach po użądleniu i stopniowo rośnie przez kolejne dni i tygodnie. Po tej fazie wstępnej stężenie sIgE jad powoli spada z indywidualnie różną szybkością [6]. Dlatego zazwyczaj oznacza się stężenia sIgE jad po 4-6 tygodniach od użądlenia. Niektóre badania dowodzą celowość wykonywania tych oznaczeń już po 2 tygodniach, ale jeżeli wypadną one ujemnie to należy je powtórzyć po kolejnych 2-4 tygodniach [67, 124]. Brak jest danych w literaturze fachowej odnośnie zależności stężeń tIgE oraz sIgE fosfolipaza A₂ od czasu jaki upłynął od reakcji alergicznej po użądleniu oraz nie wiadomo jakie są stężenia tych przeciwciał bezpośrednio po użądleniu przez pszczołę.

W celu sprawdzenia zależności stężeń: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ od czasu po użądleniu, u 30 osób użądlnych powyższe stężenia oznaczono dwukrotnie – w ciągu 3 godzin od użądlenia przez pszczołę oraz, zgodnie z obowiązującymi dotąd zaleceniami, po minimum 6 tygodniach od tego użądlenia. Przeprowadzone analizy nie wykazały istotnych statystycznie różnic w stężeniach: tIgE ($p = 0,324$), sIgE jad ($p = 0,386$) oraz sIgE fosfolipaza A₂ ($p = 0,099$) w zależności od czasu jaki upłynął od użądlenia przez pszczołę (tabela 12, rycina 3,4 i 5). Wyników dotyczących stężeń tIgE oraz sIgE fosfolipaza A₂ nie można odnieść do piśmiennictwa, ponieważ dotychczas nie przeprowadzono podobnych badań. Natomiast w przypadku sIgE jad otrzymano odmienne wyniki badań w porównaniu do danych z literatury. Należy jednak zauważyć, iż w grupie 30 użądlnych 25 osób to pszczelarze, 3 osoby pomagające w pasiece i tylko 2 osoby nie mające kontaktu z pszczołami. W dostępnej literaturze brak jest podobnych badań wśród pszczelarzy oceniających stężenia tIgE, sIgE jad czy sIgE fosfolipaza A₂ w zależności od czasu jaki upłynął od użądlenia. Wyniki moich badań wskazują, że w tej grupie nie występuje obserwowana w populacji ogólnej zmienność.

6.1.2. Porównanie stężeń: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ oraz klas: sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂ pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami

Na podstawie dotychczasowych badań przeprowadzonych wśród pszczelarzy wiadomo, iż jest to grupa osób szczególnie narażona na występowanie alergii na jad pszczeli ze względu na zwiększoną ekspozycję na użądlenia [19, 67]. Dodatkowo wyniki testów diagnostycznych obejmujące testy skórne oraz oznaczenia sIgE jad stwierdza się u 30-60 % osób w tej grupie zawodowej [102]. W dostępnym piśmiennictwie nie ma doniesień odnośnie różnic w stężeniu tIgE pomiędzy pszczelarzami a populacją ogólną. Nie ma także danych odnośnie oznaczeń sIgE fosfolipaza A₂ u pszczelarzy.

Z tego powodu dokonano oznaczeń stężeń: tIgE, sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂ oraz klas: sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂ w 2 grupach: osób mających zwiększony kontakt z pszczołami oraz osób nie mających zwiększonego kontaktu z pszczołami. Następnie otrzymane wyniki badań poddano analizie porównawczej (tabela 13). W przypadku osób użądlnionych, u których badania były wykonywane dwukrotnie, do analiz statystycznych wykorzystano wyniki otrzymane po 6 tygodniach od użądlenia. Wykazano brak statystycznie istotnych różnic w stężeniach tIgE w obu badanych grupach ($p = 0,383$). Również w przypadku analiz porównujących klasy IgE pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami nie odnotowano statystycznie istotnych różnic ani w klasach sIgE jad ($p = 0,292$), ani w klasach sIgE fosfolipaza A₂ ($p = 1,000$). Przeprowadzone testy wykazały natomiast istotne statystycznie różnice w stężeniach sIgE jad ($p = 0,038$) z wyraźnie wyższymi stężeniami w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami w porównaniu do osób nie mających zwiększonego kontaktu z pszczołami (rycina 8). W przypadku sIgE fosfolipaza A₂ otrzymano graniczny poziom istotności p ($p = 0,055$), co wskazuje na tendencję do wyższych wartości w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami niż w grupie osób bez zwiększonego kontaktu z pszczołami (rycina 9).

Wyniki przeprowadzonych badań mogą być przydatne w interpretacji testów diagnostycznych w kierunku alergii na jad pszczeli wykonywanych u pszczelarzy.

6.1.3. Ocena korelacji stężenia: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ z objawami klinicznymi występującymi po użądleniu przez pszczołę

Zależność objawów klinicznych po użądleniu od wykładników atopii, a w tym stężenia całkowitego przeciwciał IgE (tIgE) jest niejednoznaczna i stale dyskutowana. W dostępnym piśmiennictwie istnieją doniesienia, iż ciężkie objawy ogólnoustrojowe po użądleniu występują częściej u pacjentów z niskim stężeniem tIgE. Zaobserwowano, że utrata przytomności występowała u chorych z niskimi (<50 kU/l) lub średnimi (50-250 kU/l) poziomami tIgE. Natomiast łagodne objawy po użądleniu dotyczyły osób z wysokimi wartościami stężeń tIgE (>250 kU/l) [75]. W innych badaniach nie wykazano wprawdzie wpływu stężenia tIgE na ciężkość reakcji anafilaktycznej po użądleniu, jednakże zwrócono uwagę na fakt, iż ciężkie reakcje poużądleniowe obserwuje się częściej w starszym wieku, kiedy to fizjologicznie obniża się stężenie tIgE [5].

W niniejszym badaniu oceniono korelację stężenia tIgE z objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę u wszystkich badanych osób (tabela 14, rycina 13). Dane dotyczące objawów klinicznych obserwowanych po użądleniu w przeszłości pochodziły z ankiety, którą przeprowadzono na początku badania (tabela 6). W przypadku osób użądlnych, u których oznaczenia tIgE były wykonywane dwukrotnie, do analiz statystycznych wykorzystano wyniki badań uzyskane po min. 6 tygodniach od użądlenia ze względu na brak statystycznie istotnych różnic z wynikami bezpośrednio po użądleniu. Analiza wykazała brak statystycznie istotnej korelacji pomiędzy stężeniem tIgE a objawami klinicznymi po użądleniu z wywiadu ($p = 0,582$), co potwierdza dane z literatury.

Wielokrotnie w piśmiennictwie podkreślany jest brak korelacji stężenia swoistych przeciwciał IgE (sIgE jad) z ciężkością objawów klinicznych występujących po użądleniu. Jednakże w badaniach z prowokowanym użądleniem u osób ze zwiększoną ekspozycją na użądlenia, ale bez ciężkiej reakcji anafilaktycznej w wywiadzie wykazano, że podwyższone stężenie swoistych IgE jest czynnikiem ryzyka SAR [61].

W dostępnej literaturze brak jest natomiast danych na temat zależności objawów klinicznych od stężenia sIgE fosfolipaza A₂. Dlatego w niniejszym badaniu sprawdzono korelacje stężeń sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ z objawami klinicznymi, które występowały u badanych osób po użądleniu przez pszczołę. Analizy wykonano u wszystkich osób objętych badaniem, ale z podziałem na dwie grupy: osób mających zwiększony kontakt z pszczołami oraz osób, które nie mają kontaktu z pszczołami. Testy wykonano oddzielnie dla osób mających zwiększony kontakt z pszczołami i dla osób nie mających kontaktu

z pszczołami, ponieważ we wcześniejszych analizach (rozdział 5.2.2.) uzyskano istotne statystycznie różnice w stężeniach sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ pomiędzy ww. grupami. Podobnie jak w analizie z tIgE, również do wykonania tych testów statystycznych wykorzystano dane ankietowe dotyczące objawów klinicznych po użądleniu z wywiadu (tabela 6). Analizy oceniające korelacje stężenia sIgE jad z objawami klinicznymi po użądleniu nie wykazały istotnych statystycznie zależności pomiędzy tymi zmiennymi zarówno w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami ($p = 0,124$), jak i w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami ($p = 0,099$). Jednakże na wykresach ilustrujących ww. zależności widoczny jest wyraźny trend wzrastania stężenia sIgE jad w miarę narastania ciężkości objawów klinicznych w obu grupach (tabele 15 i 16, ryciny 14 i 15).

Analiza zależności objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę od stężenia sIgE fosfolipaza A₂ wykazała istotną statystycznie korelację w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami ($p = 0,040$). Natomiast brak jest korelacji stężenia sIgE fosfolipaza A₂ z objawami klinicznymi po użądleniu w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami ($p = 0,105$). Dane opisujące wykonane testy zawarte są w tabelach 17 i 18 oraz rycinach 16 i 17.

Powyższe analizy potwierdziły, opisywany w aktualnym piśmiennictwie, brak korelacji pomiędzy stężeniem swoistych przeciwciał sIgE jad a objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę [3-6]. Natomiast wykazano zależność stężenia swoistych przeciwciał sIgE fosfolipaza A₂ z obrazem klinicznym, jednakże tylko u osób zajmujących się pszczelarstwem. Może to świadczyć o większej przydatności klinicznej oznaczeń sIgE fosfolipaza A₂ w porównaniu do sIgE jad w tej grupie.

6.1.4. Ocena korelacji klas: sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ z objawami klinicznymi występującymi po użądleniu przez pszczołę

Oprócz opisanych powyżej analiz oceniających zależności pomiędzy objawami klinicznymi a stężeniami: tIgE, sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂, wykonano również testy statystyczne sprawdzające korelacje pomiędzy objawami klinicznymi występującymi po użądleniu a klasami: sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂. Nie ma doniesień w aktualnym piśmiennictwie na temat badań sprawdzających te zależności. Analizy przeprowadzono w całej grupie badanej, ponieważ wykonane wcześniej testy wykazały brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy klasami sIgE jad w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami i w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami ($p = 0,292$) oraz pomiędzy

klasami sIgE fosfolipaza A₂ w obu powyższych grupach ($p = 1,000$). W przypadku osób użądlnych do analiz wykorzystano tylko wyniki uzyskane po min. 6 tygodniach od użądlenia. Dane dotyczące objawów klinicznych po użądleniu uzyskano na podstawie badań ankietowych (tabela 6).

Przeprowadzone analizy (tabela 24) wykazały istotne statystycznie korelacje pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu a klasą sIgE jad ($p \ll 0,050$) oraz pomiędzy objawami klinicznymi a klasą sIgE fosfolipaza A₂ ($p \ll 0,050$). Zatem ciężkość objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę jest większa u osób z wyższymi klasami zarówno sIgE jad, jak i sIgE fosfolipaza A₂ (rycina 24 i 25).

Dodatkowo wykonano test sprawdzający korelację pomiędzy klasami: sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂ (tabela 24). Również ta analiza wykazała istotną statystycznie zależność ($p \ll 0,050$). Na tej podstawie można stwierdzić, że osoba posiadająca swoiste przeciwciała sIgE jad w określonej klasie posiada również przeciwciała sIgE fosfolipaza A₂ w tej samej lub zbliżonej klasie (rycina 23).

Wnioski te mogą być szczególnie przydatne dla lekarza w codziennej praktyce alergologicznej, ponieważ klasy swoistych przeciwciał są łatwiejsze w interpretacji wyników niż stężenia.

6.2. Ocena czynników wpływających na stężenie tryptazy

Oznaczanie stężenia tryptazy jest najczęściej wykonywanym badaniem w diagnostyce, różnicowaniu i prognozowaniu anafilaksji po użądleniu. Udowodniono, iż podwyższony poziom tryptazy wiąże się z większym ryzykiem ciężkich reakcji alergicznych po użądleniu [5, 6, 15, 23, 81, 125, 126]. Obecnie przyjmuje się, że stężenie tryptazy jest w granicach normy, jeżeli wartości mieszczą się w zakresie 1-11,4 $\mu\text{g/l}$. W przebiegu reakcji anafilaktycznej stężenie może być podwyższone nieznacznie, tj. do wartości niewiele przekraczających normę lub osiągać wartości powyżej 100 $\mu\text{g/l}$ [73, 78]. Zaleca się wykonanie pomiaru stężenia tryptazy w surowicy u wszystkich osób z epizodem anafilaksji po użądleniu, najpóźniej w ciągu 3 godzin od początku reakcji [127]. Podwyższone stężenie tryptazy pozwala na różnicowanie anafilaksji z innymi jednostkami chorobowymi, które mogą mieć podobnym przebieg kliniczny – m.in. reakcja wazo-wagalna, wstrząs septyczny, zawał mięśnia sercowego, łagodna pokrzywka czy zespół rakowiaka. W wymienionych chorobach nie stwierdza się bowiem wzrostu stężenia tryptazy [83].

Według najnowszych badań stwierdzono, że największą wartość diagnostyczną w ocenie reakcji nadwrażliwości z udziałem komórek tucznych ma oznaczenie stężenia tryptazy nie tylko bezpośrednio po reakcji anafilaktycznej, ale również oznaczenie jej stężenia podstawowego (ang. *baseline serum tryptase* – BST) tj. wykonanego przed reakcją lub co najmniej po 72 godzinach od reakcji alergicznej oraz porównanie tych dwóch wyników. Jeżeli stężenie tryptazy oznaczone w pierwszych 3 godzinach od reakcji anafilaktycznej jest większe lub równe 135 % stężenia podstawowego, to świadczy to o aktywacji mastocytów, nawet jeśli stężenie oznaczone bezpośrednio po uządleniu nie przekroczyło wartości 11,4 µg/l [128]. Oznaczenie podstawowego stężenia tryptazy powinno być wykonane u osób z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych, ponieważ stężenie BST > 11,4 µg/l jest czynnikiem ryzyka ciężkiej reakcji alergicznej po kolejnym uządleniu [86]. Ponadto podstawowe stężenie tryptazy może być również wykorzystywane do monitorowania przebiegu swoistej immunoterapii. W najnowszym piśmiennictwie istnieją doniesienia, że stężenie tego enzymu w niewielkim stopniu, ale w sposób ciągły spada w kolejnych latach VIT – około 2,5 % rocznie [129]. Natomiast w badaniu polskim obejmującym grupę 5 dzieci stwierdzono, że zmiany w stężeniu tryptazy w trakcie terapii są statystycznie nieistotne [130]. Wykazano również, że podwyższony poziom tryptazy w surowicy stanowi czynnik prognostyczny ciężkich reakcji ogólnych w przypadku szczepień z jadem osy, natomiast nie uzyskano takiej korelacji z jadem pszczelim [61, 67]. Jednakże w badaniu klinicznym przeprowadzonym w Polsce stwierdzono, że ryzyko ciężkich reakcji ogólnoustrojowych w trakcie VIT z jadem pszczelim jest większe u dzieci, u których podstawowe stężenie tryptazy przed rozpoczęciem immunoterapii jest powyżej 7,75 µg/l. Ponadto u dzieci, u których doszło do rozwoju objawów ogólnych w trakcie terapii, stężenia tryptazy były wyższe nie tylko przed, ale również w trakcie i po zakończeniu VIT [130].

Ważnym spostrzeżeniem jest to, iż stężenie tryptazy wyraźnie koreluje ze stopniem ciężkości objawów klinicznych [5], a w największym stopniu ze spadkiem ciśnienia tętniczego w tętnicach głównych [78, 83, 131]. Ponadto podwyższone stężenie tego enzymu jest obserwowane u pacjentów z mastocytozą (wartości powyżej 20 µg/l) [125, 132] oraz u chorych na ostrą białaczkę szpikową, zespół mielodysplastyczny i schyłkową niewydolność nerek [133-135]. Udowodniono również dodatni związek pomiędzy poziomem tryptazy a wiekiem. Na podstawie badań wykazano, że stężenie tego enzymu rośnie w sposób ciągły wraz z wiekiem i częściowo może być odpowiedzialne za obserwowaną u starszych osób zwiększoną częstość reakcji anafilaktycznych [135]. Jednocześnie jednak w jednym badaniu stwierdzono, że stężenie tryptazy jest wyższe w trzech pierwszych miesiącach życia dziecka.

Po tym okresie obniża się stopniowo do wartości opisywanych u starszych dzieci i dorosłych [136]. Zaobserwowano również różnice w stężeniach w zależności od płci. U kobiet stężenie tryptazy jest o ok. 0,2 $\mu\text{g/l}$ wyższe niż u mężczyzn. Natomiast nie wykazano korelacji z atopią [5].

Biorąc pod uwagę powyższe dane z literatury oraz brak doniesień na temat badań stężenia tryptazy w grupie osób najbardziej narażonych na użądlenia, czyli u pszczelarzy, zdecydowano o oznaczeniu stężeń tryptazy u wszystkich badanych. W grupie użądlnych oznaczenia wykonano dwukrotnie tj. w ciągu 3 godzin od użądlenia oraz po min. 6 tygodniach od użądlenia. Wyniki badań zamieszczono w tabelach: 10 i 11.

6.2.1. Ocena zależności stężenia tryptazy w surowicy od czasu po użądleniu przez pszczołę

Stężenie tryptazy rośnie jako efekt degranulacji komórek tucznych w przebiegu reakcji alergicznej [85]. Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo, iż podwyższony poziom tryptazy stanowi czynnik ryzyka ciężkiej reakcji alergicznej po użądleniu. Uwzględniając fakt, że osoby narażone na częste żądlenia (głównie pszczelarze) są jednocześnie bardziej narażone na występowanie reakcji alergicznych po użądleniu [17, 19], ale także i to, że reakcje alergiczne zazwyczaj często występujące na początku pracy w pasiece, w kolejnych latach stopniowo zanikają [16], interesująca wydawała się ocena stężenia tryptazy w tej grupie. Większość zawodowych pszczelarzy, pracując w pasiece przez wiele lat, nie doświadcza po użądleniu przez pszczołę żadnych objawów ogólnych, a często nawet i miejscowych. Dla oceny zmian stężenia tryptazy w zależności od czasu jaki upłynął od użądlenia w niniejszym badaniu wykonano oznaczenia stężeń tryptazy zarówno bezpośrednio po użądleniu, jak i po 6 tygodniach od użądlenia w grupie 30 osób (25 pszczelarzy, 3 osoby pomagające w pasiece, 2 osoby nie mające zwiększonego kontaktu z pszczołami).

Uzyskane wyniki stężeń tryptazy w grupie osób użądlnych (tabela 10) poddano analizie porównawczej (tabela 12). Badanie wykazało brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy stężeniami tryptazy uzyskanymi w ciągu 3 godzin od użądlenia a stężeniami oznaczonymi po min. 6 tygodniach od użądlenia ($p = 0,929$). W przeprowadzonym badaniu użądlenie nie miało wpływu na stężenie tryptazy (rycina 6). Jednakże należy podkreślić, że prawie wszystkie osoby, które oceniano po użądleniu, to osoby mające zwiększony kontakt z pszczołami. Zatem wyniki tych badań należy odnieść do tej grupy osób.

Ponadto należy zwrócić uwagę, że po użądleniu „świeżym” u 5 osób stwierdzono stężenia tryptazy powyżej górnej granicy normy tj. $> 11,4 \mu\text{g/l}$, z których tylko jeden badany doświadczył objawów ogólnoustrojowych – SYS II (badany 18 – wykluczony z analiz ze względu na bardzo odbiegające wyniki badań), a pozostałych 4 pszczelarzy miało normalną reakcję miejscową – NR (badany 9,22,26 i 30). Natomiast podstawowe stężenia tryptazy (BST) przekroczyły normę u 3 z 4 wymienionych powyżej pszczelarzy z normalną reakcją miejscową (badany 22,26,30). Jeden wynik był wyższy od $20 \mu\text{g/l}$ (badany 30), co jest uznane za wartość graniczną dla rozpoznania mastocytozy [132]. Z tego powodu oznaczenia tryptazy powtórzono jeszcze raz u 3 pszczelarzy, u których w obu oznaczeniach stężenia przekraczały górną granicę normy. Trzeci pomiar wykonano w okresie zimowym wolnym od pracy w pasiece, a tym samym bez narażenia na żądlenie. Również w tym przypadku otrzymane wyniki stężeń tryptazy przekroczyły wartość $11,4 \mu\text{g/l}$ u wszystkich 3 pszczelarzy, w tym u badanego 30 ponownie powyżej $20 \mu\text{g/l}$ (badany 22 – $17,7 \mu\text{g/l}$; badany 26 – $14,7 \mu\text{g/l}$; badany 30 – $21,6 \mu\text{g/l}$). Omówione przypadki pokazują, że stężenie tryptazy zarówno bezpośrednio po użądleniu, jak i podstawowe stężenie tryptazy może być podwyższone (nawet znacznie przekraczające normę) u osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami, a równocześnie nie wiązać się z występowaniem reakcji alergicznych u tych osób. Jednym z czynników, który mógł wpłynąć na otrzymane wyniki stężeń tryptazy u pszczelarzy to wysoka średnia wieku osób badanych, a jak podaje piśmiennictwo stężenie tego enzymu rośnie wraz z wiekiem [135].

6.2.2. Porównanie podstawowych stężeń tryptazy (BST) pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami

Zwiększony kontakt z pszczołami wiąże się ze zwiększoną częstością alergii na jad pszczeli, a tym samym z większą częstością ciężkich reakcji alergicznych po użądleniu [19-21]. Dlatego uzasadniona była ocena wpływu zwiększonego kontaktu z pszczołami na podstawowe stężenie tryptazy (BST).

W tym celu oznaczono stężenia podstawowe tryptazy u wszystkich osób badanych (tabela 10 i 11). W przypadku osób użądlnionych do analizy wykorzystano wyniki otrzymane po min. 6 tygodniach od użądlenia. Na podstawie analizy porównawczej wyników badań obu grup badanych uzyskano istotną statystycznie różnicę pomiędzy stężeniami BST osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a stężeniami BST u osób bez zwiększonego

kontakty z pszczołami ($p = 0,013$). U osób pracujących w pasiece stwierdzono istotnie wyższe stężenia podstawowe tryptazy w porównaniu do osób nie mających kontaktu z pszczołami (tabela 13, rycina 10).

Powyższe wyniki sugerują, że kontakt z pszczołami jest ważnym czynnikiem wpływającym na podstawowe stężenie tryptazy.

6.2.3. Ocena korelacji objawów klinicznych występujących po użądleniu przez pszczołę ze stężeniem tryptazy

Jak już wspomniano podwyższone stężenie tryptazy oznaczone bezpośrednio po użądleniu świadczy o epizodzie anafilaksji oraz stanowi czynnik ryzyka ciężkiej reakcji alergicznej po kolejnym użądleniu [7]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach stwierdzono również, że u pacjentów z podstawowym stężeniem tryptazy (BST) $> 11,4 \mu\text{g/l}$ znacząco częściej występują ciężkie objawy ogólnoustrojowe po użądleniu [5, 6, 67, 135]. Uwzględniając opisywaną w literaturze silną korelację pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu a stężeniem tryptazy przeprowadzono następujące analizy statystyczne:

- Ocena korelacji objawów klinicznych po użądleniu „świeżym” z oznaczeniami tryptazy wykonanymi w ciągu 3 godzin od użądlenia. Analizę wykonano w grupie osób użądlnych (tabela 19, rycina 18).
- Ocena korelacji objawów klinicznych po użądleniu z wywiadu ze stężeniami podstawowymi tryptazy – BST w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami (tabela 20, rycina 19).
- Ocena korelacji objawów klinicznych po użądleniu z wywiadu ze stężeniami podstawowymi tryptazy – BST w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami (tabela 21, rycina 20).

Dane dotyczące objawów klinicznych zarówno po użądleniu „świeżym”, jak i po użądleniu z wywiadu uzyskano na podstawie badań ankietowych – tabela 6.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano brak statystycznie istotnych korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu „świeżym” ze stężeniami tryptazy oznaczonymi w ciągu 3 godzin od użądlenia ($p = 0,243$). Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu z wywiadu ze stężeniami podstawowymi tryptazy (BST) zarówno w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami ($p = 0,448$), jak i w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami ($p = 0,577$).

Rozbieżność między uzyskanymi wynikami a danymi z piśmiennictwa podkreślającymi związek stężenia tryptazy z ciężkością objawów klinicznych może m.in. wynikać z faktu, iż prawie wszystkie osoby, które zostały użądłone to zawodowi pszczelarze z długim stażem pracy w pasiece. Dane z literatury odnoszą się natomiast do populacji ogólnej. Nie badano dotychczas stężeń tryptazy po użądleniu u pszczelarzy. Częstość występowania objawów ogólnych po użądleniu „świeżym” w badanej grupie była niewielka. Tylko u 2 osób wystąpiły objawy ogólnoustrojowe (przy czym jedną osobę – badany 18 – wykluczono z analiz statystycznych ze względu na bardzo odbiegające wyniki badań), a u 3 osób nasiloną reakcją miejscową (LLR). U pozostałych 25 badanych po użądleniu pojawiła się tylko normalna reakcja miejscowa. Nie stwierdzono zatem korelacji objawów klinicznych po użądleniu ze stężeniem tryptazy oznaczonym w ciągu 3 godzin od użądlenia u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami.

Drugą badaną korelacją była zależność pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu w przeszłości a stężeniem podstawowym tryptazy u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami i u osób bez kontaktu z pszczołami. W przypadku użądlenia w przeszłości objawy kwalifikowane jako SYS I-II wg Muellera dotyczyły 3 osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami i 2 osób nie mających kontaktu z pszczołami, LLR wystąpiła u 6 osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami i u 5 osób bez kontaktu z pszczołami, pozostali badani zgłaszali jedynie normalną reakcję miejscową (tabela 6). Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy podstawowym stężeniem tryptazy a objawami klinicznymi po użądleniu, jednakże na rycinie 24 widać pewną tendencję do wzrastania stężenia BST wraz ze wzrostem ciężkości objawów klinicznych w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami. Zależności tej nie widać natomiast na rycinie 23 obrazującej wyniki w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami. Moje spostrzeżenia na temat zależności pomiędzy objawami klinicznymi a podstawowym stężeniem tryptazy w grupie osób nie mających zwiększonego kontaktu z pszczołami są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi populacji ogólnej. Brak jest w aktualnym piśmiennictwie doniesień na temat przeprowadzenia takich badań u osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami.

Oceniając zależność objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę od stężenia tryptazy, dodatkowo w grupie osób użądlnych obliczono 135 % wartości stężenia podstawowego tryptazy (oznaczonego po min. 6 tygodniach od użądlenia, a jednocześnie po ok. miesiącu od zakończenia sezonu pszczelarskiego). Następnie otrzymane wartości porównano ze stężeniami tryptazy oznaczonymi w ciągu 3 godzin od użądlenia. U 3 pszczelarzy (badany 2, 14, 16) wyniki stężeń tryptazy uzyskane w ciągu 3 godzin po

użądleniu przekroczyły obliczone wartości stanowiące 135 % BST, chociaż mieściły się w granicach normy dla tryptazy (tj. $< 11,4 \mu\text{g/l}$), co jest według najnowszych doniesień wystarczające dla potwierdzenia epizodu anafilaksji [128]. Jednakże u wszystkich tych 3 badanych pszczelarzy wystąpiła po użądleniu jedynie normalna reakcja miejscowa. Na podstawie tych obliczeń, podobnie jak w przypadku wcześniejszych analiz statystycznych, można stwierdzić, iż stężenie tryptazy nie koreluje z ciężkością objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami.

6.3. Ocena czynników wpływających na stężenie IgG4

Przeciwciała IgG4 powstają w odpowiedzi na kolejne użądlenia i spełniają rolę ochronną u pszczelarzy [5, 79]. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań stwierdzono, że stężenie przeciwciał IgG4 koreluje z liczbą użądleń i liczbą lat pracy w pasiece [6, 16, 29, 79]. Zaobserwowano również sezonowość w stężeniach IgG4 u pszczelarzy polegającą na tym, że zimą czyli w sezonie wolnym od pracy w pasiece poziom tych przeciwciał spada, a następnie ponownie wzrasta wiosną po pierwszych użądleniach. Ponadto wiadomo, że stężenie IgG4 rośnie również w trakcie prowadzenia swoistej immunoterapii [6, 16, 29]. W początkowym okresie zwiększonej ekspozycji na użądlenia u pszczelarzy oraz u osób w początkowej fazie immunoterapii, oprócz swoistych przeciwciał IgG4, można wykryć również swoiste przeciwciała IgG1 oraz IgG2. Natomiast podczas dłuższej trwającego narażenia na żądlenie i w miarę trwania VIT zdecydowanie dominują przeciwciała IgG4 [16]. Na podstawie dotychczasowych badań stwierdzono, że miano przeciwciał IgG4 wybitnie rośnie w trakcie fazy wstępnej VIT, potem stopniowo obniża się, ale w końcowym okresie VIT osiąga wartości wyższe niż wyjściowe. W jednym badaniu klinicznym wykazano, że przebieg immunoterapii można uznać za pomyślny, jeżeli obserwuje się co najmniej 3-5 – krotny wzrost miana IgG4 [137]. Jednakże oznaczenia tych przeciwciał nie są powszechnie uznane za decydujące o zaprzestaniu immunoterapii. Dotychczas nie wykazano związku stężenia IgG4 z obrazem klinicznym po użądleniu [67].

6.3.1. Ocena zależności stężenia IgG4 od czasu po użądleniu

W dostępnym piśmiennictwie podkreślany jest wpływ zwiększonej ekspozycji na użądlenia na poziom IgG4, natomiast brak doniesień na temat oznaczeń stężenia tych przeciwciał bezpośrednio po użądleniu. Dlatego w niniejszym badaniu w grupie osób

użądzonych stężenia IgG4 oznaczono dwukrotnie tj. w ciągu 3 godzin od użądlenia oraz po min. 6 tygodniach od tego użądlenia (miesiąc po zakończonym sezonie pszczelarskim), czyli w okresie wolnym od użądleń. Przeprowadzona analiza wykazała brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy oznaczeniami (tabela 12, rycina 7). Zatem pojedyncze użądlenie nie wpływa istotnie na stężenie przeciwciał IgG4 u pszczelarzy.

6.3.2. Porównanie stężeń IgG4 pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami

W dotychczas przeprowadzonych badaniach stwierdzono zależność między stężeniem przeciwciał IgG4 a liczbą otrzymywanych użądleń [5, 6, 79]. W niniejszym badaniu sprawdzono prawdziwość tej korelacji. Stężenia przeciwciał IgG4 oznaczono w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami oraz w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami (tabela 10 i 11), a następnie przeprowadzono analizę statystyczną w celu porównania wyników badań obu grup (tabela 13, rycina 11). Uzyskano istotną statystycznie różnicę pomiędzy stężeniami IgG4 osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a stężeniami osób bez zwiększonego kontaktu z pszczołami ($p \ll 0,05$). Potwierdzono zatem dane z piśmiennictwa.

6.3.3. Ocena dodatkowych czynników wpływających na stężenie IgG4 u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami

Ponieważ stężenie przeciwciał IgG4 wzrasta wraz z liczbą lat pracy w pasiece oraz liczbą otrzymywanych użądleń, w niniejszym badaniu sprawdzono korelacje pomiędzy stężeniem IgG4 a następującymi czynnikami:

- staż pracy w pasiece (tabela 25, rycina 26);
- liczba otrzymywanych użądleń dziennie (tabela 26, rycina 27);
- liczba przepracowanych dni tygodniowo w pasiece (tabela 27, rycina 28);
- używanie odzieży ochronnej (tabela 28, rycina 29).

Powyższe analizy przeprowadzono w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami (pszczelarze i członkowie ich rodzin pomagający w pasiece). We wszystkich 4 przeprowadzonych testach potwierdzono silną zależność stężenia IgG4 od stażu pracy w pasiece ($p = 0,041$), liczby otrzymywanych użądleń dziennie ($p = 0,008$), liczby

przepracowanych dni tygodniowo w pasiece ($p = 0,039$) oraz używania odzieży ochronnej ($p = 0,028$). Udowodniono w ten sposób, że na stężenie przeciwciał IgG4 wpływają czynniki mające bezpośredni związek z liczbą otrzymywanych użądleń. W związku z powyższym stężenie IgG4 jest tym wyższe, im pszczelarz ma dłuższy staż pracy w pasiece, im więcej użądleń otrzymuje dziennie pracując w pasiece oraz im więcej dni tygodniowo pracuje w pasiece. Wyższe stężenia IgG4 są również u pszczelarzy, którzy nie używają odzieży ochronnej podczas pracy w pasiece.

6.3.4. Ocena korelacji stężenia IgG4 z objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę

Oznaczanie stężenia przeciwciał IgG4 nie jest badaniem wykorzystywanym w diagnostyce alergii na jad pszczele, ponieważ na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że jego wynik nie koreluje z obrazem klinicznym po użądleniu [6]. U pszczelarzy na skutek częstego żądlenia przez pszczoły stężenia IgG4 są szczególnie wysokie [5, 16], natomiast nie wiadomo czy korelują one z nasileniem objawów. W dostępnej literaturze nie ma danych na ten temat.

Z tego powodu w niniejszym badaniu przeprowadzono analizy korelacji stężenia IgG4 z objawami klinicznymi po użądleniu z wywiadu. Testy te wykonano oddzielnie dla osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami i dla osób nie mających kontaktu z pszczołami (tabele 22 i 23, ryciny 21 i 22). W przypadku osób po użądleniu do analizy wykorzystano wyniki badań uzyskane po min. 6 tygodniach od tego użądlenia.

W wykonanej analizie statystycznej w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami otrzymano graniczny wynik istotności ($p = 0,084$) z widocznym na rycinie 26 wyraźnym trendem pokazującym odwrotnie proporcjonalną korelację stężenia IgG4 z objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę. Natomiast w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami nie uzyskano korelacji stężenia przeciwciał IgG4 z objawami klinicznymi po użądleniu ($p = 0,105$). Zatem stężenie przeciwciał IgG4 może wpływać protekcyjnie na ciężkość objawów występujących po użądleniu, ale tylko u pszczelarzy. Może być to związane z faktem, iż u pszczelarzy stężenia IgG4 są dużo wyższe niż w populacji ogólnej i w związku z tym tylko w tej grupie mają znaczenie ochronne.

6.3.5. Porównanie stosunku sIgE jad/IgG4 pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami

Stosunek stężeń sIgE jad/IgG4 może być wykorzystywany do monitorowania przebiegu swoistej immunoterapii [6]. Podobna sytuacja do immunoterapii występuje u pszczelarzy, którzy pracując w pasiece stopniowo nabierają naturalnej tolerancji na jad pszczeli na skutek powtarzających się dość regularnie użądleń, co ma z kolei związek ze wzrastającym stężeniem przeciwciał IgG4. Przeprowadzone w niniejszym badaniu analizy statystyczne wykazały istotne statystycznie różnice w stężeniach sIgE jad oraz IgG4 pomiędzy grupą osób mających zwiększony kontakt z pszczołami a grupą osób nie mających kontaktu z pszczołami (rozdział 5.2.2.). Pacjenci narażeni na częste żądlenia wykazują wyższe stężenia zarówno przeciwciał sIgE jad, jak i IgG4. W związku z tym zdecydowano o porównaniu stosunku stężeń sIgE jad/IgG4 w wymienionych grupach (tabela 13, rycina 12). Również w tym przypadku testy wykazały istotną statystycznie różnicę w stosunku sIgE jad/IgG4 ($p \ll 0,05$) pomiędzy osobami mającymi zwiększony kontakt z pszczołami a osobami bez zwiększonego kontaktu z pszczołami. Analizowany stosunek stężeń sIgE jad/IgG4 jest istotnie niższy w grupie osób mających zwiększony kontakt z pszczołami, co świadczy o większym wzroście stężenia IgG4 niż sIgE jad podczas pracy w pasiece.

6.4. Ocena dodatkowych czynników ryzyka reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę

Na podstawie aktualnego piśmiennictwa wiadomo, że pewne czynniki wpływają na ciężkość reakcji alergicznej po użądleniu przez pszczołę. Do najczęściej wymienianych należą: wiek, płeć, choroby układu krążenia, przyjmowane leki (głównie β -blokery i ACEI), mastocytoza, podwyższony poziom tryptazy w surowicy oraz epizod ciężkiej reakcji anafilaktycznej po użądleniu (SYS III – IV) w wywiadzie [5, 6, 23, 24]. Dodatkowymi czynnikami wpływającymi na występowanie i przebieg reakcji alergicznych po użądleniu u pszczelarzy są: współistnienie chorób atopowych, występowanie objawów alergicznych ze strony górnych dróg oddechowych podczas pracy w pasiece, staż pracy w pasiece oraz liczba użądleń otrzymywanych podczas pracy przy pszczołach [20, 21, 27-30].

Powyższe czynniki ryzyka (z wyjątkiem stężenia tryptazy) zostały ocenione u wszystkich osób badanych na podstawie analizy retrospektywnej (badanie ankietowe).

Oceny stężeń tryptazy w surowicy dokonano na podstawie wykonanych badań laboratoryjnych, co zostało szczegółowo omówione w rozdziale 6.2.

Na podstawie przeprowadzonych badań przyjmuje się, że ryzyko wystąpienia ciężkiej reakcji anafilaktycznej (SAR) po użądleniu rośnie wraz z wiekiem. Ponadto u osób starszych często stwierdza się współistnienie jednocześnie kilku dodatkowych czynników ryzyka – m.in. choroby układu krążenia, terapia β -blokerami, ACEI i innymi lekami przeciw nadciśnieniowymi. Udowodniono również, że wraz z wiekiem rośnie poziom tryptazy [5, 6, 23, 24].

Analizę statystyczną oceniającą korelację objawów klinicznych po użądleniu z wiekiem badanych osób wykonano oddzielnie dla grupy osób mających zwiększony kontakt z pszczołami i dla grupy osób nie mających kontaktu z pszczołami. Test przeprowadzony w grupie osób ze zwiększonym kontaktem z pszczołami wykazał statystycznie istotną korelację pomiędzy wiekiem a objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę ($p = 0,029$). Jednakże zależność ta pokazuje, że objawy kliniczne po użądleniu są wraz z wiekiem coraz łagodniejsze (tabela 29, rycina 30). Zatem w przypadku osób mających zwiększony kontakt z pszczołami otrzymano wynik odwrotny niż sugerują dane literaturowe, według których rośnie wraz z wiekiem ryzyko ciężkich reakcji alergicznych po użądleniu. Dane te jednak dotyczą populacji ogólnej, natomiast w niniejszym badaniu oceniano głównie pszczelarzy w wieku powyżej 40 lat (tabela 6), u których sporadycznie występowały jedynie miejscowe objawy po użądleniu. Ponadto wiadomo, że reakcje uczuleniowe, nawet te systemowe, zanikają u większości pszczelarzy wraz ze stażem pracy w pasiece [16]. Natomiast analiza w grupie osób nie mających kontaktu z pszczołami (tabela 30) wykazała brak statystycznie istotnej korelacji objawów klinicznych po użądleniu z wiekiem badanych ($p = 0,102$). Jednak na wykresie ilustrującym tę zależność (rycina 31) widoczna jest wyraźna tendencja do narastania ciężkości objawów klinicznych po użądleniu wraz z wiekiem. Te spostrzeżenia pokrywają się z danymi z piśmiennictwa dotyczącymi populacji ogólnej.

Płeć męska predysponuje do częstszych reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę, ponieważ mężczyźni częściej niż kobiety wykonują zawody i czynności wymagające przebywania na świeżym powietrzu (pszczelarze, rolnicy, sadownicy, leśnicy, budowlańcy itd.). Sugeruje się ponadto, że większa częstość SAR u mężczyzn jest stwierdzana dlatego, że większość mężczyzn zgłasza się do lekarza tylko w ciężkich przypadkach [61]. Podobnie jak w przypadku wieku, również płeć męska stanowi czynnik ryzyka ciężkich reakcji alergicznych. W przeprowadzonym badaniu 24 z 33 mężczyzn to zawodowi pszczelarze, stąd niecelowe było wykonanie testów statystycznych oceniających

zależność występowania objawów klinicznych od płci, gdyż doprowadziłoby to do formułowania błędnych wniosków.

Powszechnie uznanymi czynnikami ryzyka ciężkiej reakcji alergicznej po użądleniu są choroby układu krążenia oraz terapia lekami z grupy β -blokerów i ACEI [86]. Leki blokujące receptory β -adrenergiczne powodują blokadę naturalnych mechanizmów β -adrenergicznych, które hamują syntezę i uwalnianie mediatorów reakcji alergicznych – m.in. histaminy [138]. Pomimo to, że w badaniach klinicznych nie udowodniono, iż β -blokery są czynnikiem ryzyka ciężkiej anafilaksji o różnym podłożu, nadal zaleca się ich odstawienie. W przypadku gdy terapia tymi lekami jest niezbędna, należy używać tylko preparaty kardioselektywne [139]. W przypadku ACEI zazwyczaj nie ma problemu z zastąpieniem ich innymi lekami.

Analizując wpływ powyższych czynników ryzyka, również w tym przypadku zwrócono uwagę na fakt, że prawie wszystkie osoby obciążone współistnieniem choroby układu krążenia lub zażywające leki z grupy β -blokerów lub ACEI to pszczelarze, u których częstość reakcji alergicznych po użądleniu była niewielka (tabela 6). Dlatego wyniki analiz statystycznych dotyczących wpływu chorób układu krążenia oraz terapii lekami z grupy β -blokerów lub ACEI na ciężkość reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę nie byłyby w tej grupie badanej wiarygodne.

Częstsze występowanie ciężkich reakcji anafilaktycznych o różnym podłożu u chorych na mastocytozę wynika z faktu nadmiernej produkcji komórek tucznych przez szpik kostny. Objawy chorobowe mastocytozy można podzielić na 2 grupy:

- Grupa 1 – objawy wynikające z nagromadzenia mastocytów w tkankach. Są to najczęściej zmiany skórne (mastocytoza skórna), ale mogą pojawić się również objawy ogólnoustrojowe wynikające z nagromadzenia się dużej liczby mastocytów w narządach wewnętrznych (mastocytoza układowa).
- Grupa 2 – objawy kliniczne będące efektem uwolnienia mediatorów przez komórki tuczne. Mogą one wystąpić jako efekt reakcji nadwrażliwości typu I w odpowiedzi na alergen lub pojawiają się pod wpływem różnych czynników fizycznych i chemicznych, takich jak: leki (niesteroidowe leki przeciwzapalne, kwas acetylosalicylowy, anestetyki), jady owadów, jodowe środki cieniujące, alkohol, stres, wysiłek fizyczny, ciepło, zimno oraz zabiegi inwazyjne [88].

W omawianej grupie badanych osób nie było chorych na mastocytozę, stąd nie jest możliwe omówienie wpływu tego czynnika ryzyka na przebieg reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę. Jednakże należy zauważyć, iż u jednej osoby (Badany 30) w pomiarach stężenia tryptazy w surowicy stwierdzono dwukrotnie wartości powyżej 20 $\mu\text{g/l}$, co uznaje się za

wartość graniczną dla rozpoznania mastocytozy. Badany 30 jest pszczelarzem w wieku 80 lat chorującym na astmę, alergiczny nieżyt nosa oraz chorobę niedokrwienną serca. Od kilkunastu lat zażywa leki z grupy β -blokerów, ACEI, blokerów kanałów wapniowych oraz kwas acetylosalicylowy. Od czasu wprowadzenia ww. leczenia zauważył okresowe pojawianie się zmian skórnych pod postacią rumienia obu dłoni. Jednakże nigdy nie wystąpiły u niego inne objawy poza normalną reakcją miejscową po użądleniu, a pracuje w pasiece od 42 lat. Prawdopodobnie badany ten, pomimo stwierdzanych obecnie wysokich stężeń tryptazy oraz współistnienia chorób dodatkowych, pracując wiele lat w pasiece nabył typową dla pszczelarzy naturalną tolerancję na jad pszczeleli.

Ponieważ żadna z osób z grupy badanej nie doświadczyła w przeszłości ciężkiego epizodu anafilaksji kwalifikowanego jako SYS III lub SYS IV według klasyfikacji Muellera, nie było możliwe przeprowadzenie oceny wpływu tego czynnika ryzyka na ciężkość objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę.

Szczególną uwagę należy zwrócić na dodatkowe czynniki ryzyka dotyczące tylko pszczelarzy. Jak już wspomniano jest to grupa zawodowa najbardziej narażona na użądlenia, a tym samym na występowanie alergii na jad pszczeleli [19-21].

Najczęściej podkreślane jest stanowisko, iż atopia stwierdzana jest z tą samą częstotliwością u osób uczulonych na jad owadów co w populacji ogólnej. Jednakże reguła ta nie dotyczy pszczelarzy. Piśmiennictwo podaje, że choroby atopowe stanowią istotny czynnik ryzyka występowania reakcji alergicznych na jad pszczeleli w grupie zawodowej pszczelarzy. Sugeruje się, że podczas pracy w pasiece pszczelarze z atopią łatwiej niż pozostali uczulają się na jad głównie poprzez inhalację kurzu z uli lub w wyniku użądleń [16]. Na podstawie dotychczasowych badań stwierdzono, że występowanie w trakcie pracy w pasiece objawów takich jak: kichanie, łzawienie oraz wyciek wydzieliny z nosa predysponuje do pojawienia się alergii na jad pszczeleli [30].

W niniejszym badaniu tylko 1 z badanych pszczelarzy choruje na astmę, a 2 pszczelarzy na alergiczny nieżyt nosa (tabela 6). Zaledwie 2 osoby zauważyły objawy ze strony górnych dróg oddechowych podczas pracy w pasiece. Z powodu tak małej liczby osób obciążonych atopią odstąpiono od przeprowadzenia analiz statystycznych oceniających wpływ współistnienia chorób atopowych oraz objawów alergicznych ze strony górnych dróg oddechowych występujących podczas pracy w pasiece na obraz kliniczny po użądleniu przez pszczołę.

Kolejne istotne czynniki wpływające na występowanie i przebieg reakcji alergicznych u pszczelarzy to staż pracy w pasiece oraz liczba użądleń otrzymywanych rocznie. W świetle

aktualnego piśmiennictwa wiadomo, iż częstość reakcji alergicznych u pszczelarzy, a także dodatnie wyniki testów diagnostycznych w kierunku alergii na jad pszczoły jest zdecydowanie większa w pierwszych latach pracy w pasiece. W kolejnych latach pracy reakcje uczuleniowe, nawet te systemowe, zanikają u większości pszczelarzy. Ponadto ciężkie reakcje alergiczne dotyczą głównie pszczelarzy rzadko żądlnych, tj. mniej niż 10-25 razy w roku [6, 19]. Natomiast pszczelarze otrzymujący 200 i więcej użądleń rocznie praktycznie nie prezentują żadnych objawów ogólnych [6]. Znaczenie stażu pracy w pasiece oraz liczby użądleń otrzymywanych rocznie znajduje swoje odzwierciedlenie w stężeniu przeciwciał ochronnych IgG4. Dokładne analizy oceniające zależność stężeń IgG4 od lat pracy w pasiece oraz liczby otrzymywanych użądleń przedstawiono w rozdziale 6.3.

Pora roku, w której dochodzi do użądlenia, ma również znaczenie dla występowania reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę u pszczelarzy. Stwierdzono bowiem, iż na początku sezonu pszczelarskiego tj. wiosną reakcje alergiczne występują częściej u pszczelarzy i mają zdecydowanie cięższy przebieg niż te, które pojawiają latem i wczesną jesienią, czyli w pełni i na koniec sezonu pszczelarskiego. Może mieć to związek ze zmieniającymi się stężeniami przeciwciał IgG4, których poziom rośnie stopniowo przez cały sezon pszczelarski i pełni coraz silniejszą rolę ochronną.

W badanej grupie osób pracujących w pasiece 36,4 % osób zauważyło, że występujące u nich reakcje po użądleniu przez pszczołę są zdecydowanie większe na początku niż na końcu sezonu pszczelarskiego.

Podsumowując znaczenie czynników wpływających na częstość występowania oraz przebieg reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę, należy podkreślić, iż powinno się je rozpatrywać oddzielnie dla osób mających zwiększony kontakt z pszczołami i dla osób nie mających kontaktu z pszczołami. Pszczelarze są bowiem grupą osób istotnie różniącą się od ogółu populacji nie tylko pod względem większego narażenia na żądlenie, ale również pod względem przebiegu reakcji po użądleniu. Wynika to z szeregu procesów immunologicznych, które zachodzą w organizmie pszczelarza pod wpływem powtarzających się regularnie użądleń przez kolejne lata pracy w pasiece. W efekcie u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami stwierdza się istotnie wyższe stężenia swoistych przeciwciał sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂ oraz tryptazy w surowicy, ale nie jest to związane z częstszym występowaniem i cięższym przebiegiem reakcji alergicznych po użądleniu. Wraz ze wzrostem liczby użądleń wzrasta stężenie ochronnych przeciwciał IgG4 u pszczelarzy. Powoduje to wytworzenie się naturalnej tolerancji na jad pszczoły. Dlatego czynniki ryzyka reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę stwierdzone dla populacji ogólnej nie znajdują potwierdzenia w grupie pszczelarzy.

7. Wnioski

- U osób mających zwiększony kontakt z pszczołami wyniki badań diagnostycznych w kierunku oceny nadwrażliwości na jad pszczeleli (sIgE jad, sIgE fosfolipaza A₂) nie zależą od czasu jaki upłynął od użądlenia, co sugeruje możliwość diagnozowania tej grupy w dowolnym czasie. Pojedyncze użądlenie przez pszczołę nie miało istotnego wpływu na stężenie przeciwciał IgG4 oraz tryptazy u badanych pszczelarzy.
- Stopień ekspozycji na użądlenia koreluje ze stężeniami sIgE jad, sIgE fosfolipaza A₂ i swoistych IgG4, które są istotnie wyższe u pszczelarzy w porównaniu do osób nie mających kontaktu z pszczołami. Wykazano zależność pomiędzy klasą sIgE jad a klasą sIgE fosfolipaza A₂ u wszystkich badanych osób.
- Stężenia przeciwciał: tIgE oraz sIgE jad nie korelują z ciężkością objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę zarówno u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami, jak i u osób nie mających kontaktu z pszczołami. Natomiast istnieje zależność pomiędzy klasami przeciwciał sIgE jad oraz sIgE fosfolipaza A₂ a obrazem klinicznym po użądleniu przez pszczołę w całej grupie badanej.
- Korelację objawów klinicznych po użądleniu ze stężeniem sIgE fosfolipaza A₂ uzyskano tylko u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami. Również w tej grupie wykazano, że wysokie stężenie przeciwciał IgG4 wiąże się z łagodniejszymi objawami klinicznymi po użądleniu.
- Podstawowe stężenie tryptazy jest istotnie wyższe u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami niż u osób nie mających kontaktu z pszczołami. W obu grupach nie koreluje ono z ciężkością objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę (dane z wywiadu).
- Stężenie przeciwciał IgG4 rośnie u pszczelarzy wraz ze zwiększeniem ekspozycji mierzonej liczbą lat przepracowanych w pasiece, liczbą użądleń otrzymywanych dziennie, liczbą dni przepracowanych tygodniowo w pasiece oraz brakiem stosowania odzieży ochronnej.
- U badanych pszczelarzy nasilenie objawów klinicznych po użądleniu zmniejsza się wraz z wiekiem. Natomiast u osób nie mających kontaktu z pszczołami zaobserwowano tendencję odwrotną tj. narastanie z wiekiem ciężkości objawów klinicznych po użądleniu.

8. Streszczenie

Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*), w tym pszczoły miodnej (*Apis mellifera*), stanowi jedną z głównych przyczyn anafilaksji zarówno u dorosłych, jak i u dzieci. Badania diagnostyczne w kierunku tej alergii są wciąż niedoskonałe, ponieważ ich wyniki nie korelują ze stopniem ciężkości reakcji alergicznych występujących po użądleniu. Pszczelarze i ich rodziny jako osoby wysoce ekspozowane na użądlenia są bardzo interesującą grupą do badania zależności pomiędzy objawami klinicznymi po użądleniu a wynikami testów diagnostycznych oraz do oceny dodatkowych czynników ryzyka reakcji alergicznych po użądleniu. Tymczasem w najnowszej literaturze niewiele jest doniesień odnośnie badań pszczelarzy pod kątem alergii na jad pszczeli. Dlatego w niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę oceny klinicznych i immunologicznych czynników ryzyka występowania reakcji alergicznych po użądleniu przez pszczołę u pszczelarzy i ich rodzin.

W badaniu uczestniczyły 54 osoby w wieku od 4 do 85 lat. Osoby te były rekrutowane w okresie od czerwca do października 2011 roku na zebraniach kół pszczelarskich w Kaliszu, Koźminku (powiat kaliski, gmina Koźminek) i Skalmierzycach (powiat ostrowski, gmina Nowe Skalmierzyce) oraz w Klinice Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej UM w Poznaniu. Ochotnicy zgłaszali się na badania bezpośrednio po użądleniu przez pszczołę (30 osób) lub bez użądlenia (24 osoby). Dodatkowo na podstawie badań ankietowych zebrano dane kliniczne badanych osób odnośnie występujących w przeszłości objawów po użądleniu przez pszczołę oraz czynników ryzyka wystąpienia reakcji alergicznych po użądleniu.

U wszystkich badanych osób oznaczono w surowicy stężenia: całkowitych przeciwciał IgE (tIgE), swoistych przeciwciał IgE przeciwko jadowi pszczelemu (sIgE jad) i przeciwko fosfolipazie A₂ (sIgE fosfolipaza A₂), tryptazy oraz swoistych przeciwciał IgG4. U osób, które zgłosiły się na badania w ciągu 3 godzin od użądlenia, powyższą diagnostykę powtórzono po min. 6 tygodniach. Wszystkie wymienione powyżej oznaczenia wykonano metodą ImmunoCap, Phadia, a do analiz statystycznych użyto pakietu Statistica.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stężenia przeciwciał: tIgE, sIgE jad i sIgE fosfolipaza A₂ oraz stężenie tryptazy i przeciwciał IgG4 oznaczone bezpośrednio po użądleniu przez pszczołę oraz po min. 6 tygodniach od użądlenia nie różnią się u badanych osób. Jednakże należy podkreślić, iż osoby użądłone to w większości osoby mające zwiększony kontakt z pszczołami (28 osób z 30 użądzonych), dlatego wyniki tych badań należy odnieść do tej grupy osób. Ponadto stwierdzono istotnie wyższe stężenia: sIgE

jad, sIgE fosfolipaza A₂, podstawowego stężenia tryptazy oraz przeciwciał IgG4 u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami w porównaniu do osób nie mających kontaktu z pszczołami.

Wykazano, że stężenia przeciwciał: tIgE oraz sIgE jad nie korelują z ciężkością objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę zarówno u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami, jak i u osób nie mających kontaktu z pszczołami. Z kolei korelację objawów klinicznych po użądleniu ze stężeniem sIgE fosfolipaza A₂ uzyskano tylko u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami, co może sugerować większą wartość diagnostyczną oznaczeń stężenia sIgE fosfolipaza A₂ w porównaniu do sIgE jad. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ciężkością objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę a stężeniem tryptazy oznaczonym w ciągu 3 godzin od użądlenia u badanych osób mających zwiększony kontakt z pszczołami. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy ciężkością objawów klinicznych po użądleniu przez pszczołę a podstawowym stężeniem tryptazy zarówno u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami, jak i u osób nie mających kontaktu z pszczołami. Potwierdzono, że stężenie przeciwciał IgG4 rośnie u pszczelarzy wraz z liczbą lat przepracowanych w pasiece, liczbą użądleń otrzymywanych dziennie podczas pracy w pasiece oraz liczbą dni przepracowanych tygodniowo w pasiece oraz że jest ono wyższe u pszczelarzy nie używających stroju ochronnego do pracy w pasiece. Dodatkowo wykazano, iż wysokie stężenie przeciwciał IgG4 wiąże się z łagodniejszymi objawami klinicznymi po użądleniu przez pszczołę u osób mających zwiększony kontakt z pszczołami. Zaobserwowano również, że u badanych pszczelarzy objawy kliniczne po użądleniu przez pszczołę mają wraz z wiekiem coraz mniejsze nasilenie. Natomiast u osób nie mających kontaktu z pszczołami widoczna jest tendencja do narastania ciężkości objawów klinicznych po użądleniu wraz z wiekiem.

9. Summary

Hymenoptera venom allergy, including the honey bee (*Apis mellifera*) venom allergy, is one of the major cause of anaphylaxis both in adults and children. Diagnosis of hymenoptera venom allergy still needs to be improved, because the results of actually used diagnostic tests do not correlate with the severity of allergic reactions after the sting. Being highly exposed to the stings, beekeepers and their families are very interesting group to study the relationship between clinical symptoms after the sting and the results of diagnostic tests and to assess additional risk factors of allergic reaction after the sting. However, in the recent literature there are only few reports concerning bee venom allergy in beekeepers. Therefore, the aim of this PhD thesis was to assess clinical and immunological risk factors of allergic reactions after a bee sting in the beekeepers and their family members.

The study involved 54 subjects aged from 4 to 85 years. These individuals were recruited from June to October 2011 at the meetings of the beekeepers' associations in Kalisz, Kozminek and Skalmierzyce and the Department of Pneumology, Allergology and Clinical Immunology, Poznan University of Medical Sciences. The blood samples were collected immediately after a bee sting (in 30 persons) or without sting (24 persons). In addition, based on the questionnaire data, history of symptoms after a bee sting and risk factors of allergic reactions after a bee sting were analyzed.

In all volunteers, serum concentrations of: total IgE antibodies (tIgE), venom specific and phospholipase A₂ specific IgE antibodies, serum tryptase and venom specific IgG4 antibodies were determined. The diagnostic tests were repeated after 6 weeks in people, who were surveyed immediately after a sting. All the determinations were conducted using ImmunoCap, Phadia, and the data obtained were analyzed with Statistica software.

The study shown that there are no differences between results of laboratory tests (tIgE, venom specific and phospholipase A₂ specific IgE antibodies, serum tryptase and venom specific IgG4 antibodies) obtained directly after a bee sting and 6 weeks after the sting. These results are related only to subjects with increased contact with bees (beekeepers and their family members working in the apiary). Moreover, significantly higher levels of venom specific IgE, phospholipase A₂ specific IgE, baseline serum tryptase and specific IgG4 antibodies in subjects with increased contact with bees compared to those without contact with bees were found. It was also shown, that the levels of tIgE and venom specific IgE antibodies did not correlate with the severity of clinical symptoms after a bee sting in subjects with increased contact with bees as well as in subjects, who had no contact with bees. Only in

SUMMARY

individuals with increased contact with bees the correlation between phospholipase A₂ specific IgE and clinical symptoms was obtained, which may suggest a higher diagnostic value of phospholipase A₂ specific IgE than the venom specific IgE in those people. There was no correlation between the severity of clinical symptoms and the concentrations of serum tryptase levels determined within 3 hours after the sting in subjects with increased contact with bees. There was also no correlation between the severity of clinical symptoms after a bee sting and baseline serum tryptase levels in subjects with increased contact with bees as well as in people, who had no contact with bees. The study confirmed that the concentrations of IgG4 antibodies in beekeepers increase with the time spend for working on the hives, the number of stings received per day, the number of days worked per week in the apiary and they are higher in beekeepers, who do not use protective clothing while working in the apiary. Furthermore it was found that high levels of IgG4 antibodies are associated with milder symptoms after a bee sting in subjects with increased contact with bees. It was also observed that clinical symptoms after a bee sting are milder with age in beekeepers. In contrast, in subjects, who had no contact with bees the clinical symptoms after a bee sting are tend to be more severe with age.

10. Piśmiennictwo

1. Matysiak J, Matysiak J, Kokot ZJ, Bręborowicz A: Hymenoptera venom allergy with special emphasis on honeybee (*Apis mellifera*) - current knowledge. *Alergia Astma Immunologia* 2011, 16(4), 163-171.
2. Silva R, Gomes E, Cunha L, Falcao H: Anaphylaxis in children: a nine years retrospective study (2001-2009). *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012, 40(1), 31-36.
3. Golden BK: Allergic reactions to hymenoptera. *ACP Medicine. Immunology/Allergy* 2007, 15, 1-6.
4. Golden DB: Insect sting anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007, 27(2), 261-272.
5. Blum S, Gunzinger A, Muller UR, Helbling A: Influence of total and specific IgE, serum tryptase, and age on severity of allergic reactions to Hymenoptera stings. *Allergy* 2011, 66(2), 222-228.
6. Bilo BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN: Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2005, 60(11), 1339-1349.
7. Cichocka-Jarosz E, Bręborowicz A: Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych u dzieci. *Klin Pediatr* 2007, 15, 34-39.
8. Cichocka-Jarosz E, Bręborowicz A: Uczulenie na jad pszczoły. *Pediatrics po dyplomie* 2007, 11(2), 116-132.
9. Novembre E, Cianferoni A, Bernardini R, Veltroni M, Ingargiola A, Lombardi E, et al.: Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin Exp Allergy* 1998, 28(7), 834-838.
10. Grigoreas C, Galatas ID, Kiamouris C, Papaioannou D: Insect-venom allergy in Greek adults. *Allergy* 1997, 52(1), 51-57.
11. Fernandez J, Blanca M, Soriano V, Sanchez J, Juarez C: Epidemiological study of the prevalence of allergic reactions to Hymenoptera in a rural population in the Mediterranean area. *Clin Exp Allergy* 1999, 29(8), 1069-1074.
12. Incorvaia C, Mauro M, Pastorello EA: Hymenoptera stings in conscripts. *Allergy* 1997, 52(6), 680-681.
13. Charpin D, Birnbaum J, Lanteaume A, Vervloet D: Prevalence of allergy to hymenoptera stings in different samples of the general population. *J Allergy Clin Immunol* 1992, 90(3 Pt 1), 331-334.

14. Schafer T, Przybilla B: IgE antibodies to Hymenoptera venoms in the serum are common in the general population and are related to indications of atopy. *Allergy* 1996, 51(6), 372-377.
15. Bilo MB: Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. *Allergy* 2011, 66 Suppl 95, 35-37.
16. Muller UR: Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005, 5(4), 343-347.
17. Kalogeromitros D, Makris M, Gregoriou S, Papaioannou D, Katoulis A, Stavrianeas NG: Pattern of sensitization to honeybee venom in beekeepers: a 5-year prospective study. *Allergy Asthma Proc* 2006, 27(5), 383-387.
18. Brown TC, Tankersley MS: The sting of the honeybee: an allergic perspective. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011, 107(6), 463-470; quiz 471.
19. Munstedt K, Hellner M, Winter D, von Georgi R: Allergy to bee venom in beekeepers in Germany. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008, 18(2), 100-105.
20. Annala IT, Karjalainen ES, Annala PA, Kuusisto PA: Bee and wasp sting reactions in current beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996, 77(5), 423-427.
21. de la Torre-Morin F, Garcia-Robaina JC, Vazquez-Moncholi C, Fierro J, Bonnet-Moreno C: Epidemiology of allergic reactions in beekeepers: a lower prevalence in subjects with more than 5 years exposure. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1995, 23(3), 127-132.
22. Cichočka-Jarosz E, Lange J, Lis G: Care program of the patients sensitized to Hymenoptera venom - principles and conditions of realization. *Alergia Astma Immunologia* 2008, 13(1), 1-9.
23. Przybilla B, Rueff F: Hymenoptera venom allergy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2010, 8(2), 114-127; quiz 128-130.
24. Bilo BM, Bonifazi F: Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008, 8(4), 330-337.
25. Niedoszytko M, de Monchy J, van Doormaal JJ, Jassem E, Oude Elberink JN: Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy* 2009, 64(9), 1237-1245.
26. Annala IT, Karjalainen ES, Morsky P, Kuusisto PA: Clinical symptoms and immunologic reactivity to bee and wasp stings in beekeepers. *Allergy* 1995, 50(7), 568-574.
27. Pastorello EA, Incorvaia C, Sarassi A, Qualizza R, Bigi A, Farioli L: Epidemiological and clinical study on bee venom allergy among beekeepers. *Boll Ist Sieroter Milan* 1988, 67(5-6), 386-392.

28. Celikel S, Karakaya G, Yurtsever N, Sorkun K, Kalyoncu AF: Bee and bee products allergy in Turkish beekeepers: determination of risk factors for systemic reactions. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2006, 34(5), 180-184.
29. Eich-Wanger C, Muller UR: Bee sting allergy in beekeepers. *Clin Exp Allergy* 1998, 28(10), 1292-1298.
30. Annala IT, Annala PA, Morsky P: Risk assessment in determining systemic reactivity to honeybee stings in beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997, 78(5), 473-477.
31. Richter AG, Nightingale P, Huissoon AP, Krishna MT: Risk factors for systemic reactions to bee venom in British beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011, 106(2), 159-163.
32. Dotimas EM, Hider RC: Honeybee venom. *Bee World*. 1987, 62(2), 51-70.
33. Banks BE, Shipolini RA: Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. Venoms of the hymenoptera, Academic Press Inc, London, 1986.
34. Kokot ZJ, Matysiak J, Urbaniak B, Dereziński P: New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. *Anal Bioanal Chem* 2011, 399(7), 2487-2494.
35. Banks BE, Hanson JM, Sinclair NM: The isolation and identification of noradrenaline and dopamine from the venom of the honey bee, *Apis mellifica*. *Toxicon*. 1976, 14(2), 117-125.
36. Collins AM, Blum MS: Alarm responses caused by newly identified compounds derived from the honey bee sting. *J. Chem. Ecol.* 1982, 8, 463-470.
37. Schmidt M, Weimer ET, Sakell RH, R. HD: Proteins in the high molecular weight fraction of honeybee venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 115(2), 107.
38. Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf DC, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ: The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005, 1752(1), 1-5.
39. Kettner A, Hughes GJ, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, et al.: Api m 6: a new bee venom allergen. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2001, 107(5), 914-920.
40. Peiren N, de Graaf DC, Brunain M, Bridts CH, Ebo DG, Stevens WJ, et al.: Molecular cloning and expression of icarapin, a novel IgE-binding bee venom protein. *FEBS Lett.* 2006, 580(20), 4895-4899.
41. Matysiak J, Schmelzer CE, Neubert RH, Kokot ZJ: Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2011, 54(2), 273-278.
42. Allergen Nomenclature. International Union of Immunological Societies. Allergen Nomenclature Sub-Committee. www.allergen.org/Allergen.aspx.

43. Francese S, Lambardi D, Mastrobuoni G, la Marca G, Moneti G, Turillazzi S: Detection of honeybee venom in envenomed tissues by direct MALDI MSI. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2009, 20(1), 112-123.
44. Vetter RS, Visscher PK, Camazine S: Mass envenomations by honey bees and wasps. *West J Med* 1999, 170(4), 223-227.
45. Hoffman DR: Hymenoptera venom allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2006, 30, 109-128.
46. Somerfield SD, Stach JL, Mraz C, Gervais F, Skamene E: Bee venom inhibits superoxide production by human neutrophils. *Inflammation.* 1984, 8(4), 385-391.
47. Blank S, Seismann H, Michel Y, McIntyre M, Cifuentes L, Braren I, et al.: Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy* 2011, 66(10), 1322-1329.
48. Stone SF, Brown SG: Mediators released during human anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011, 12(1), 33-41.
49. Nittner-Marszalska M: Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych, Mediton Oficyna Wydawnicza, Łódź, 2003, Vol. 2.
50. Małolepszy J: Choroby alergiczne i astma, Volumed, Wrocław, 1996.
51. Moffitt JE, Golden DB, Reisman RE, Lee R, Nicklas R, Freeman T, et al.: Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 114(4), 869-886.
52. Severino M, Bonadonna P, Passalacqua G: Large local reactions from stinging insects: from epidemiology to management. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009, 9(4), 334-337.
53. Milanowski A: Nelson Pediatría, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2012, Vol. 1.
54. Brown SG: Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 114(2), 371-376.
55. Reisman RE: Unusual reactions to insect stings. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005, 5(4), 355-358.
56. Quercia O, Emiliani F, Foschi FG, Stefanini GF: Unusual reaction to hymenoptera sting: a case of Schonlein-Henoch purpura. *Allergy* 2007, 62(3), 333-334.
57. West PL, McKeown NJ, Hendrickson RG: Massive hymenoptera envenomation in a 3-year-old. *Pediatr Emerg Care* 2011, 27(1), 46-48.
58. Betten DP, Richardson WH, Tong TC, Clark RF: Massive honey bee envenomation-induced rhabdomyolysis in an adolescent. *Pediatrics* 2006, 117(1), 231-235.
59. Kolecki P: Delayed toxic reaction following massive bee envenomation. *Ann Emerg Med* 1999, 33(1), 114-116.

-
60. Golden DB, Breisch NL, Hamilton RG, Guralnick MW, Greene A, Craig TJ, et al.: Clinical and entomological factors influence the outcome of sting challenge studies. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 117(3), 670-675.
61. Rueff F, Kroth J, Przybilla B: Risk factors in hymenoptera venom allergy. *Allergologie* 2010, 33(7), 297-302.
62. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Hamilton RG, Lichtenstein LM: Insect sting allergy with negative venom skin test responses. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107(5), 897-901.
63. Golden DB, Marsh DG, Freidhoff LR, Kwitrovich KA, Addison B, Kagey-Sobotka A, et al.: Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 100(6 Pt 1), 760-766.
64. Goldberg A, Confino-Cohen R: Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 100(2), 182-184.
65. Reisman RE: Insect sting allergy: the dilemma of the negative skin test reactor. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107(5), 781-782.
66. Golden DB, Tracy JM, Freeman TM, Hoffman DR: Negative venom skin test results in patients with histories of systemic reaction to a sting. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 112(3), 495-498.
67. Rueff F, Jappe U, Przybilla B: Standards and pitfalls of in-vitro diagnostics of Hymenoptera venom allergy. *Hautarzt* 2010, 61(11), 938-945.
68. Phadia, Uppsala, Sweden. www.phadia.com.
69. Muller UR: New developments in the diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001, 124(4), 447-453.
70. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M: Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000, 30(8), 1166-1171.
71. Scherer K, Bircher AJ, Heijnen IA: Diagnosis of stinging insect allergy: utility of cellular in-vitro tests. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009, 9(4), 343-350.
72. Hamilton RG: Diagnostic methods for insect sting allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004, 4(4), 297-306.
73. Simons FE: Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 125(2 Suppl 2), S161-181.
74. Ott H, Tenbrock K, Baron J, Merk H, Lehmann S: Basophil activation test for the diagnosis of hymenoptera venom allergy in childhood: a pilot study. *Klin Padiatr* 2011, 223(1), 27-32.

75. Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, Hemmer W, Sturm EM, Griesbacher A, et al.: Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One* 2011, 6(6).
76. Hemmer W: Cross-reactivity to honeybee and wasp venom. *Hautarzt* 2008, 59(3), 194-199.
77. Vidal C, Sanmartin C, Armisen M, Rodriguez V, Linneberg A, Gonzalez-Quintela A: Minor interference of cross-reactive carbohydrates with the diagnosis of respiratory allergy in standard clinical conditions. *Int Arch Allergy Immunol* 2012, 157(2), 176-185.
78. Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Golden DB, Finkelman FD, et al.: Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2007, 120(1 Suppl), S2-24.
79. Manso EC, Morato-Castro FF, Yee CJ, Croce M, Palma MS, Croce J: Honeybee venom specific IgG subclass antibodies in Brazilian beekeepers and in patients allergic to bee stings. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1998, 8(1), 46-51.
80. Haeberli G, Bronnimann M, Hunziker T, Muller U: Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2003, 33(9), 1216-1220.
81. Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G: Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy* 2009, 64(4), 543-548.
82. Schwartz LB: Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006, 26(3), 451-463.
83. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani AM, Rasp G, Van der Zwan JK, et al.: Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol* 1994, 14(3), 190-204.
84. Muller UR: Elevated baseline serum tryptase, mastocytosis and anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2009, 39(5), 620-622.
85. Jogie-Brahim S, Min HK, Fukuoka Y, Xia HZ, Schwartz LB: Expression of alpha-tryptase and beta-tryptase by human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 113(6), 1086-1092.
86. Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, et al.: Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase-a study of the European Academy of Allergology and Clinical

- Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 124(5), 1047-1054.
87. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD: IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 125(2 Suppl 2), S73-80.
88. Szczeklik A: Choroby Wewnętrzne, Medycyna Praktyczna, Kraków, 2006.
89. Lee JK, Vadas P: Anaphylaxis: mechanisms and management. *Clin Exp Allergy* 2011, 41(7), 923-938.
90. Reisman RE: Natural history of insect sting allergy: relationship of severity of symptoms of initial sting anaphylaxis to re-sting reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1992, 90(3 Pt 1), 335-339.
91. Greene A, Breisch NL: Avoidance of bee and wasp stings: an entomological perspective. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005, 5(4), 337-341.
92. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology, Public Education Committee. Tips to remember. www.aaaai.org/patients/publicedmat/tips/stinginginsect.stm.
93. Bonadonna P, Zanotti R, Pagani M, Caruso B, Perbellini O, Colarossi S, et al.: How much specific is the association between hymenoptera venom allergy and mastocytosis? *Allergy* 2009, 64(9), 1379-1382.
94. Blaauw PJ, Smithuis OL, Elbers AR: The value of an in-hospital insect sting challenge as a criterion for application or omission of venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1996, 98(1), 39-47.
95. Szymański M, Złotnik I, Kucharewicz I, Bodzenta-Łukaszyk A: The efficacy of venom immunotherapy in patients with Hymenoptera venom allergy - the evaluation based on in vivo and in vitro methods. *Alergia Astma Immunologia* 2002, 7(4), 216-222.
96. Incorvaia C, Mauro M, Pravettoni V, Pucci S: Hypersensitivity to Hymenoptera venom: advances in diagnosis and implications for treatment. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2011, 5(2), 128-135.
97. Reisman RE: Insect stings. *N Engl J Med* 1994, 331(8), 523-527.
98. Cox L, Nelson H, Lockey R, Calabria C, Chacko T, Finegold I, et al.: Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 127(1 Suppl), S1-55.
99. Valentine MD, Schuberth KC, Kagey-Sobotka A, Graft DF, Kwiterovich KA, Szklo M, et al.: The value of immunotherapy with venom in children with allergy to insect stings. *N Engl J Med* 1990, 323(23), 1601-1603.

100. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Hamilton RG, Lichtenstein LM: Outcomes of allergy to insect stings in children, with and without venom immunotherapy. *N Engl J Med* 2004, 351(7), 668-674.
101. Golden DB, Kelly D, Hamilton RG, Craig TJ: Venom immunotherapy reduces large local reactions to insect stings. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 123(6), 1371-1375.
102. Muller UR, Haeberli G: Use of beta-blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 115(3), 606-610.
103. Stumpf JL, Shehab N, Patel AC: Safety of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with insect venom allergies. *Ann Pharmacother* 2006, 40(4), 699-703.
104. White KM, England RW: Safety of angiotensin-converting enzyme inhibitors while receiving venom immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008, 101(4), 426-430.
105. Roll A, Hofbauer G, Ballmer-Weber BK, Schmid-Grendelmeier P: Safety of specific immunotherapy using a four-hour ultra-rush induction scheme in bee and wasp allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006, 16(2), 79-85.
106. Gorska L, Chelminska M, Kuziemski K, Skrzypski M, Niedożytko M, Damps-Konstanska I, et al.: Analysis of safety, risk factors and pretreatment methods during rush hymenoptera venom immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2008, 147(3), 241-245.
107. Rueff F, Wolf H, Schnitker J, Ring J, Przybilla B: Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy* 2004, 59(6), 589-595.
108. Muller U, Helbling A, Berchtold E: Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol* 1992, 89(2), 529-535.
109. Bonifazi F, Jutel M, Bilo BM, Birnbaum J, Muller U: Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy* 2005, 60(12), 1459-1470.
110. Rueff F, Przybilla B, Muller U, Mosbech H: The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on Insect Venom Allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1996, 51(4), 216-225.
111. Niedożytko M, Lange M, Chelminska M, Jaskiewicz K, Piskosz A, Wasag B, et al.: Systemic mastocytosis. *Pneumonol Alergol Pol* 2005, 73(3), 239-244.
112. Bonadonna P, Zanotti R, Muller U: Mastocytosis and insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010, 10(4), 347-353.

113. Brockow K, Kiehn M, Riethmuller C, Vieluf D, Berger J, Ring J: Efficacy of antihistamine pretreatment in the prevention of adverse reactions to Hymenoptera immunotherapy: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 100(4), 458-463.
114. Muller U, Hari Y, Berchtold E: Premedication with antihistamines may enhance efficacy of specific-allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107(1), 81-86.
115. Incorvaia C, Frati F, Dell'Albani I, Robino A, Cattaneo E, Mauro M, et al.: Safety of hymenoptera venom immunotherapy: a systematic review. *Expert Opin Pharmacother* 2011, 12(16), 2527-2532.
116. Golden DB, Kwiterovich KA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM: Discontinuing venom immunotherapy: extended observations. *J Allergy Clin Immunol* 1998, 101(3), 298-305.
117. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM: Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2000, 105(2 Pt 1), 385-390.
118. Graft DF, Golden BK, Reisman RE: The discontinuation of Hymenoptera venom immunotherapy. Report from the Committee on Insects. *J Allergy Clin Immunol* 1998, 101(5), 573-575.
119. Lerch E, Muller UR: Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1998, 101(5), 606-612.
120. Muller U, Berchtold E, Helbling A: Honeybee venom allergy: results of a sting challenge 1 year after stopping successful venom immunotherapy in 86 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1991, 87(3), 702-709.
121. Munstedt K, Wrobel D, Kalder M: Efficacy of venom immunotherapy in beekeepers. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010, 20(1), 58-62.
122. Fal MA: Alergia, choroby alergiczne, astma, Medycyna Praktyczna, Kraków, 2010, Vol. 1.
123. Sturm GJ, Heinemann A, Schuster C, Wiednig M, Groselj-Strele A, Sturm EM, et al.: Influence of total IgE levels on the severity of sting reactions in Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2007, 62(8), 884-889.
124. Rieger-Ziegler V, Rieger E, Kranke B, Aberer W: Hymenoptera venom allergy: time course of specific IgE concentrations during the first weeks after a sting. *Int Arch Allergy Immunol* 1999, 120(2), 166-168.

125. Potier A, Lavigne C, Chappard D, Verret JL, Chevailler A, Nicolie B, et al.: Cutaneous manifestations in Hymenoptera and Diptera anaphylaxis: relationship with basal serum tryptase. *Clin Exp Allergy* 2009, 39(5), 717-725.
126. Rueff F, Chatelain R, Przybilla B: Management of occupational Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011, 11(2), 69-74.
127. Nittner-Marszalska M: Diagnosis of hymenoptera allergy. *Alergia Astma Immunologia* 2006, 11(4), 1-6.
128. Borer-Reinhold M, Haeberli G, Bitzenhofer M, Jandus P, Hausmann O, Fricker M, et al.: An increase in serum tryptase even below 11.4 ng/mL may indicate a mast cell-mediated hypersensitivity reaction: a prospective study in Hymenoptera venom allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2011, 41(12), 1777-1783.
129. Dugas-Breit S, Przybilla B, Dugas M, Arnold A, Pfundstein G, Kuchenhoff H, et al.: Serum concentration of baseline mast cell tryptase: evidence for a decline during long-term immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *Clin Exp Allergy* 2010, 40(4), 643-649.
130. Cichocka-Jarosz E, Sanak M, Szczeklik A, Brzyski P, Gielicz A, Pietrzyk JJ: Serum tryptase level is a better predictor of systemic side effects than prostaglandin D2 metabolites during venom immunotherapy in children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011, 21(4), 260-269.
131. van der Linden PW, Struyvenberg A, Kraaijenhagen RJ, Hack CE, van der Zwan JK: Anaphylactic shock after insect-sting challenge in 138 persons with a previous insect-sting reaction. *Ann Intern Med* 1993, 118(3), 161-168.
132. Valent P, Sperr WR, Schwartz LB, Horny HP: Diagnosis and classification of mast cell proliferative disorders: delineation from immunologic diseases and non-mast cell hematopoietic neoplasms. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 114(1), 3-11; quiz 12.
133. Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, Kiener HP, Samorapoompichit P, Semper H, et al.: Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 98(7), 2200-2209.
134. Sperr WR, Stehberger B, Wimazal F, Baghestanian M, Schwartz LB, Kundi M, et al.: Serum tryptase measurements in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2002, 43(5), 1097-1105.
135. Guenova E, Volz T, Eichner M, Hoetzenecker W, Caroli U, Griesinger G, et al.: Basal serum tryptase as risk assessment for severe Hymenoptera sting reactions in elderly. *Allergy* 2010, 65(7), 919-923.

136. Belhocine W, Ibrahim Z, Grandne V, Buffat C, Robert P, Gras D, et al.: Total serum tryptase levels are higher in young infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2011, 22(6), 600-607.
137. Nicolov G, Michova A, Kandova J, Radenkova-Saeva J, Konstantinova D: Immunological changes during bee venom immunotherapy in patients with insect allergy. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* 2010, 63(8), 1225-1231.
138. Ciszowski K, Mietka-Ciszowska A: Hymenoptera stings. *Przegl Lek* 2007, 64(4-5), 282-289.
139. Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, et al.: Predictors of side effects during the buildup phase of venom immunotherapy for Hymenoptera venom allergy: the importance of baseline serum tryptase. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 126(1), 105-111.