

} ALERGOLOŠKA IN
IMUNOLOŠKA SEKCIJA
SZD
} SLOVENSKO IMUNOLOŠKO
DRUŠTVO

Zbornik sestanka:

**Izbrane teme iz
alergologije in
klinične
imunologije 2019**

Ljubljana, Medicinska fakulteta
Univerze v Ljubljani

7. december 2019

Izdajatelj
Alergološka in imunološka sekcij SZD

Urednik zbornika
Mitja Košnik

Strokovni odbor srečanja
Mitja Košnik, Vladka Čurin

Organizacija srečanja
Robert Marčun, Mitja Košnik

Izvedbo sestanka so omogočili:

**Ewopharma
Glaxo SmithKline
Sanofi**

IRIS
Mylan
Novartis

Program

Ura	Trajanje			
08:45	09:00	00:15	REGISTRACIJA	kava
09:00	09:30	00:30	R.Eržen, T. Vesel Tajnšek, Peter Kopač, Ana Koren	EAACI po EAACI
09:30	10:00	00:30	Petra Zieglmayer	Burden of HDM allergic respiratory diseases -Satelitski simpozij Ewopharma
10:00	10:45	00:45	Alojz Ihan	Imunopatogeneza avtoimnih bolezni (model KVČB in psoriaze)
10:45	11:00	00:15	Peter Kopač	Schnitzlerjev sindrom
11:00	11:15	00:15	Alojzija Hočevar	Stillova bolezen
11:15	11:35	00:20	Natalija Edelbaher	Vloga zdravila Nucala v zdravljenju težke astme in nova možnost aplikacije - Satelitski simpozij Glaxo
11:35	12:15	00:40		ODMOR za kosilo
12:15	12:30	00:15	Iva Hafner	Aktivacija in zaviranje inflamatornega NLRP3
12:30	12:45	00:15	Irena Bricl	Ciljana zaščita RhD negativnih nosečnic z imunoglobulinom anti-D
12:45	13:15	00:30	Anja Koren Jeverica	Atopijski dermatitis in alergija
13:15	13:45	00:30	Maja Benko	Atopijski dermatitis: etiologija in zdravljenje s prvim biološkim zdravilom Dupixent (Dupilumab) -Satelitski simpozij Sanofi
13:45	14:00	00:15	Živa Zaletel, Benjamin Jonke	Mejne vrednosti C4 za diagnozo HAE
14:00			ZAKLJUČEK	

SCHNITZLERJEV SINDROM – AVTOINFLAMATORNA BOLEZEN KOT DIFERENCIALNA DIAGNOZA KRONIČNE URTIKARIJE

Peter Kopač¹, Uroš Ažman²

¹ Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergologijo Golnik

² ZD Ljubljana, Zdravstveni dom Ljubljana, Metelkova ulica 9, 1000 Ljubljana

Kronična urtikarija je kožna bolezen za katero je značilno da se več kot 6 tednov pojavijo spontane urtike in angioedem. Ocenjena prevalenca je 0.5-1% v evropski populaciji. Poleg spontane obstaja več vrst inducibilne urtikarije sprožene z specifičnimi dražljaji (toplota, mraz, UV žarki, dotik, pritisk, vibracije, voda). Urtikam podobne spremembe pa se na koži lahko pojavijo tudi pri drugih boleznih, ki jih je potrebno razlikovati od kronične urtikarije: sistemske bolezni veziva, urtikarijski vaskulitis, avtoinflamatorne bolezni. Klinične razlike med kronično urtikarijo in avtoinflamatorno boleznijo so navedene v Tabeli 1.

Tabela 1: Klinične razlike med kronično urtikarijo in avtoinflamatorno boleznijo

	Kronična urtikarija	Avtoinflamatorna bolezen
Izgled sprememb na koži	papulozne spremembe z eritemom	bolj ploščate spremembe, brez eritema, vztrajajo na enem mestu dlje časa
Lokacija	asimetrično	simetrično
Čas trajanja sprememb na koži	prehodno (minute do ure)	trajno (ure do dnevi)
Srbež	intenziven	lahko brez srbeža, bolečina, pekoč občutek
Angioedem	pogosto pridružen	redko
Začetek bolezni	kadarkoli	praviloma v otroštvu
Trajanje bolezni	nekaj let	vse življenje
Odgovor na zdravljenje z antihistaminiki	dober	slab
Sistemske znake	brez	vročina, utrujenost, artralgijske
Vnetni parametri	normalni	povišani
Družinska anamneza	negativna	pogosto pozitivna

Schnitzlerjev sindrom

Schnitzlerjev sindrom je zelo redka avtoinflamatorna bolezen (do sedaj je v literaturi opisanih <150 primerov). Zanj je značilna klinična slika kronične urtikarije s spremljajočimi znaki in simptomi sistemskega vnetja (povišana telesna temperatura, mialgija, artralgijske, limfadenopatija) ter monoklonski zobec IgM ali IgG. Pogostost in jakost težav je med pacienti zelo različna - od vsakodnevnih težav do nekajkrat letno. Najpogosteje se težave začnejo okoli 50 leta. Spontana remisija je redka. Zaplet bolezni je lahko sekundarna amiloidoza, okoli 15% pacientov sčasoma razvije limfoproliferativne bolezni, najpogosteje Waldenstromovo makroglobulinemijo. Zaplet nezdravljene bolezni je lahko sekundarna amiloidoza. Patogeneza ni natančno znana, predpostavlja se povezava z pretirano aktivacijo IL-1. Diagnoza je zaradi redkosti bolezni tipično postavljena kasno. Diagnostični kriteriji so opisan v Tabeli 2. Jasnih smernic za zdravljenje ni, v literaturi je največji uspeh opisan pri zdravljenju z anakinra. Ta spada v skupino imunomodulatornih zdravil. Je rekombinantni, kompetitivni antagonist receptorjev za IL-1, ki z vezavo na receptor zavira vnetno kaskado. Glavni resni neželeni učinki so nevtropenija z posledičnimi resnimi okužbami in trombocitopenija, zato je potrebno redno spremljati diferencialno krvno sliko.

Tabela 2: Diagnostični kriteriji za Schnitzlerjev sindrom

Major kriterija <ul style="list-style-type: none">• Kronični urtikarielni izpuščaj• Monoklonska gamopatija IgG ali IgM
Minor kriteriji: <ul style="list-style-type: none">• Ponavljajoče se febrilno stanje (TT nad 38C)• Dokazana remodelacija kosti z ali brez skeletnih bolečin (MR, scintigrafija ali povišana kostna frakcija alkalne fosfataze)• Nevtrofilni infiltrate v biopsiji kože• Levkocitoza ali povišan CRP ≥ 30 mg/l
Diagnostična sta: <ul style="list-style-type: none">• oba major kriterija in dva minor če ima pacient monoklonsko gamopatijo IgM• oba major kriterija in tri minor če ima pacient monoklonsko gamopatijo IgG

Prikaz primerov

Prvi primer:

47- letni moški je bil napoten zaradi urtikam podobnim kožnih sprememb. V družinski anamnezi je izstopala multipla skeroza matere. Gospod ima znan seboroični dermatitis in obrabo hrbtenice, sicer brez redne terapije, po potrebi jemlje naproksen. 1,5 leta pred pregledom so se začeli enkrat mesečno pojavljati majhni, blago srbeči kožni izpuščaji po celem telesu, ki so izzveneli v roku 2 dni. Za se boj niso puščali spremenjene kože. Ob terapiji z antihistaminikom v 4x odmerku so le delno izzveneli, ob uporabi NSAID so se težave poslabšale. Pol leta pred pregledom se je enkrat mesečno slabše počutil, tresla ga je mrzlica, imel je bolečine v mišicah ter boleče in okorele večje sklepe. Povišane temperature si ni nameril. Kožne spremembe so se intenzivirale. Težave so po nekaj dneh spontano minile. V statusu je ob pregledu od normale izstopal generaliziran urtikalen izpuščaj, brez drugih sprememb na koži.

V laboratorijskih izvidih smo opazili povišane vrednosti vnetnih parametrov (sedimentacija 40 mm/h, CRP 21), celokupnih proteinov (81 g/dl) ter poliklonalno hipergamaglobulinemijo. V elektroforezi seruma so izstopale monoklonske IgM/kapa v koncentraciji 2,9 g/L ter oligoklonalne frakcije IgG kapa in labda. Drugi parametri (DKS, preiskava urina, ščitnični hormoni in nivo komplementa) so bili v mejah normale. Prav tako so bile negativne imunoserološke preiskave (RF, ANA-HEP2, ANCA, ENA). Sekundarne amiloidoze nismo potrdili (SAA: 6 mg/l). V biopsiji kože ni bilo znakov za vaskulitis. Opravil je tudi pregled pri hematologu z punkcijo in biopsijo kostnega mozga, kjer se spremlja z diagnozo monoklonska gamopatija neznanega pomena. Postavljen je bil sum na avtiinflamatorno obolenje - Schnitzlerjev sindrom. Uvedli smo terapijo z anakinra 1 amp. sc. na 48h, ob kateri so težave popolnoma izzvenele. Na mestu vboda se je po 2 tednih pojavila lokalna reakcija v obliki večje, boleče in srbeče kožne spremembe premera 10 cm, ki je po nekaj dneh izzvenela. Nevtropenije ni bilo. Ob kontrolnih pregledih je bilo stanje stabilno z občasnimi poslabšanji seboroičnega dermatitisa na prsnem košu. Pozimi je prebolel virozo, ob kateri ni bila potrebna prekinitev terapije.

Drugi primer:

83-letni je bil leta 2002 prvič pregledan v alergološki ambulanti zaradi urtikarije. Ima vstavljeno umetno aortno zaklopko, prejema antikoagulantno terapijo. Redno je jemal varfarin, tramadol 100 mg in meloxicam 7,5 mg. Izpuščaje je prvič opazil dve leti pred pregledom. Pojavljali so se vsakodnevno, bili so nersbeči in izginili so v roku 24 ur. Ob pojavu izpuščajev so bile pridružene bolečine v kosteh, mialgije, glavobol in kašelj. V laboratorijskih vrednostih so izstopali povišani vnetni parametri CRP 25, SR 60. Opravljena je bila biopsija kože, v kateri ni bilo znakov za vaskulitis. Revmatolog ni ugotavljal znakov eventualne sistemske bolezni veziva.

Postavljena je bila diagnoza spontana kronična urtikarija in uvedena terapija z 2x odmerkom antihistaminika in metilprednisolona 4-16 mg na 3 dni. Simptomi so bili delno olajšani le ob kronični terapiji z metilprednisolonom. Ob tem je razvil osteoporozo.

Leta 2012 je bila opravljena reevaluacija zaradi ponavljajočih urtik slabo odzivnih na antihistaminike, bolečin v kosteh in sklepih ter potrebe po vsakodnevni steroidni terapiji. Redno je jemal metilprednisolon 4 mg/24h, levocetirizine 5 mg/24h, varfarin, meloxicam 7,5 mg in tramadol 100 mg/12h. V izvidih so ponovno odstopali povišani vnetni parametri CRP 30, SR 90 mm/h ter v elektroforezi seruma monoklonski zobec IgM/IgG lambda 4.4 g/l. Z punkcijo kostnega mozga je bil izključen limfom, IgM mielom in Waldenstromova bolezen. Opravi je tudi pregled pri hematologu, kjer se spremlja z diagnozo monoklonska gamapatija neznanega pomena. Pacientove težave in izvidi preiskav so ustrezali kriterijem za Schnitzlerjev sindrom. Uvedli smo terapijo z anakinro 1 amp. sc. na 48h, ob kateri so težave popolnoma izzvenele.

Razprava

Pri pacientih smo zaradi sistemskih simptomov (splošna oslabelost, artralgijska z okorelostjo sklepov, mialgija), slab odziv na antihistaminik in povišanih vnetnih parametrov posumili na eno izmed kliničnih stanj, kjer je urtikarija le simptom. Diagnostično smo se usmerili v potrditev avtoinflamatorne bolezni. Z ciljanimi laboratorijski preiskavami in biopsijo kožnih sprememb smo izključili sistemske bolezni veziva, kronično okužbo, avtoimuni tiroiditis in urtikarijski vaskulitis. Dokazali smo monoklonsko gamapatijo, pacienta se spremljata tudi pri hematologu. Pacienta sta izpolnjevala kriterije za Schnitzlerjev sindrom.

Zaključek:

Pri obravnavi pacientov s sumom na kronično urtikarijo je potrebno pomisliti na avtoinflamatorno bolezen kadar je pridružena povišana telesna temperatura, bolečine v mišicah, sklepih ali kosteh, splošna utrujenost, povečane bezgavke, poškodbe na sluznicah, gastrointestinalni ali nevrološki simptomi; v laboratorijskih izvidih pa izstopajo povišani vnetni parametri, monoklonska gamapatija, proteinurija, povišan serumski amiloid A. Ker so kronična urtikarija in avtoinflamatorni sindromi redke bolezni je smiselno da se vodijo v specializiranih centrih.

Priporočena literatura:

1. Chuamanochan, M., Weller, K., Feist, E., Kallinich, T., Maurer, M., Kümmerle-Deschner, J., & Krause, K. (2019). State of care for patients with systemic autoinflammatory diseases – Results of a tertiary care survey. *World Allergy Organization Journal*, 12(3), 100019. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2019.100019>
2. Krause, K., Grattan, C. E., Bindslev-Jensen, C., Gattorno, M., Kallinich, T., De Koning, H. D., ... Maurer, M. (2012). How not to miss autoinflammatory diseases masquerading as urticaria. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 67(12), 1465–1474. <https://doi.org/10.1111/all.12030>
3. Simon, A., Asli, B., Braun-Falco, M., De Koning, H., Ferman, J. P., Grattan, C., ... Lipsker, D. (2013). Schnitzler's syndrome: Diagnosis, treatment, and follow-up. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 68(5), 562–568. <https://doi.org/10.1111/all.12129>

AVTOINFLAMATORNE BOLEZNI PRI ODRASLIH – STILLOVA BOLEZEN S PRIČETKOM V ODRASLI DOBI

Alojzija Hočevar, Klinično oddelek za revmatologijo, UKC Ljubljana; Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Avtoinflamatorne bolezni so skupina redkih bolezni, ki jih povezujejo podobni patogenetski mehanizmi, klinične značilnosti, potek in prognoza. Označuje jih epizodično pojavljanje sistemskega vnetja in vročine, kot posledico motnje v delovanju naravne imunosti. Aktivacija celic naravne imunosti vodi preko aktivacije inflamatorne do pretirane sinteze in aktivacije številnih pro-vnetnih citokinov. Amplifikacijske poti in pomanjkljivi regulatorni mehanizmi (npr. pomanjkanje celic NK, regulatornih limfocitov T, pomanjkanje interleukina (IL)-10) dodatno prispevajo k t.i. citokinski nevihti. Prekomerni pro-vnetni odgovor lahko dovede do pomembne okvare organov in ogrozi življenje. V zadnjem desetletju je bil dosežen znaten napredek na področju razumevanja patogenetskih mehanizmov in s tem tudi učinkovitejšega zdravljenja (nekaterih) avtoinflamatornih bolezni. (1)

Avtoinflamatorne bolezni v grobem razdelimo na monogenske in poligenske. Monogeni sindromi se običajno prezentirajo kmalu po rojstvu, oziroma v zgodnjem otroštvu. Zelo redko se diagnoza monogene avtoinflamatorne bolezni prvič postavi šele v odrasli dobi. Spekter monogenih avtoinflamatornih bolezni se hitro širi. Med poligenskimi avtoinflamatornimi boleznimi s katerimi se revmatologi srečujemo pri odraslih, je z incidenco 2 primerov na milijon prebivalcev najpogostejša Stillova bolezen s pričetkom v odrasli dobi (AOSD).

Na AOSD posumimo pri bolniku z vztrajajočo visoko vročino ($>39^{\circ}\text{C}$) in kombinacijo drugih »glavnih«, za bolezen značilnih kliničnih simptomov in znakov, ter laboratorijskih odklonov (kožni izpuščaj, artritis in artralgijske, levkocitoza z nevtrofilijo, zelo visoka raven feritina (nad 1000 mcg/l)). Značilnosti AOSD so prikazane v tabeli 1. V akutni fazi se AOSD lahko zaplete z makrofagnim aktivacijskim sindromom (v do 20 %), resnimi motnjami koagulacije (kot sta diseminirana intravenska koagulacija in trombotična mikroangiopatija), fulminano jetrno odpovedjo, težjo prizadetostjo srca in pljuč. (2, 3)

Pri postavitvi diagnoze so nam v pomoč razvrstitevna merila po Yamaguchiju ali po Fautrelu, prikazana v tabeli 2. (4, 5) Ob tem moramo izključiti okužbo (posebno sepsa, okužbo z Epstein-Barr virusom), maligno bolezen (zlasti limfom) in avtoimunske bolezni. Poleg določanja ravni samega feritina ima diagnostični pomen tudi določitev glikoziliranega feritina. Normalno je v telesu $> 50\%$ feritina glikoziliranega. Ob vnetjih se delež glikoziliranega feritina zniža na 20 % do 50%, saj proces glikozilacije ne sledi povišani tvorbi feritina. Pri AOSD je delež glikoziliranega feritina še nižji ($\leq 20\%$). Kombinacija hiperferitinemije in znižanega deleža glikoziliranega feritina ($\leq 20\%$) predstavlja 67% občutljivost in 84% specifičnost za AOSD. Serumska raven feritina dobro korelira z aktivnostjo bolezni in se normalizira z umiritvijo bolezni. Delež glikoziliranega feritina pa se z umiritvijo bolezni normalizira počasneje kot sama raven feritina. (2)

Dolgoročne poteka AOSD se ob prvi prezentaciji ne da predvideti. AOSD lahko poteka monociklično (tj kot ena epizoda, v 20% do 45% primerih), ponavljajoče – relapsirajoče (v 10% do 40% primerih) ali kronično z vztrajno aktivno boleznijo in destruktivnim artritisom (v 35% do 65% primerih). (3)

Zdravljenje z nesteroidnimi protirevmatiki in glukokortikoidi in konvencionalnimi sintezni zdravili (kot sta metotreksat in ciklosporin) bolezni v 30-40% primerov ne umiri. V teh primerih in v primerih težje klinične slike danes predpišemo monoklonska protitelesa usmerjena proti citokinom, ki sodelujejo v patogenetskem procesu (t.j. protitelesa proti IL-1 (npr. anakinra, kanakinumab), ali proti IL-6 (npr. tocilizumab)). Zavora IL-1 je učinkovitejša pri izrazitejšem sistemske vnetju (vročina, izpuščaj, hiperferitinemija, hepatopatija), zavora IL-6 učinkoviteje kot blokada citokina IL-1 umirja sklepno simptomatiko. V primeru terapevtsko rezistentnega poteka prihaja v poštev tudi poizkus zdravljenja z zaviralci Janusovih kinaz. (6)

V predavanju predstavimo naše izkušnje pri diagnostiki in zdravljenju bolnikov AOSD.

Tabela 1. Klinične značilnosti AOSD

Glavni znaki	Druge značilnosti	Resni zapleti
Vročina >39°C ^{\$}	Bolečine v žrelu/odinofagija*	Fulminantni hepatitis
Kožni izpuščaji [#]	Mialgije	Tamponada perikarda
Artritis/artralgijski ^Δ	Splenomegalija	MAS
Levkocitoza > 10,0 x10 ⁹ /l	Limfadenopatija [♦]	Pljučna hipertenzija
Nevtrofilija >80%	Hepatomegalija	
	Perikarditis	ARDS
	Miokarditis	Meningitis
	Plevritis	DIK
	Intersticijski infiltrati	TMA
	Hepatitis	Amiloidoza ^{&}

Legenda: \$ nenaden pričetek, praviloma enkrat dnevno, pozno popoldan oz. proti večeru, traja 2-4 ure; # prehodni (običajno ob vročini), rožnat, nesrbeč, makulozen / makulopapulozen izpuščaji po trupu, udih ima do 80% bolnikov (opisani so tudi redki primeri urtikarije, srbeža in dermatografizma); Δ artritis se pojavlja pri > 2/3 bolnikov, prizadene lahko katerikoli sklep in lahko posnema revmatoidni artritis; pri kroničnem poteku je neredko eroziven, destruktiven (tipična je ankiloza zapestja); * posledica perihondritisa krikotiroidnega hrustanca; ♦ generalizirana, simetrična; MAS makrofagni aktivacijski sindrom (tj. citokinska nevihta); ARDS akutni respiratorni distresni sindrom; DIK diseminirana intravenska koagulacija; TMA trombotična mikroangiopatija; & kot posledica vztrajno aktivne bolezni;

Tabela 2. Razvrstitvena merila za AOSD

Merila	Yamaguchi in sod. ⁴	Fautrel in sod. ⁵
Major	<ul style="list-style-type: none"> ● Vročina > 39°C, > 1 teden ● Artralgijski, >2 tedna ● Tipičen izpuščaji ● Levkocitoza > 10,0x10⁹/l z nevtrofilijo > 80 % 	<ul style="list-style-type: none"> ● Vročina ≥ 39°C ● Artralgijski ● Prehodni eritem ● Faringitis ● Nevtrofilija > 80 % ● Glikozilirani feritin ≤ 20 %
Minor	<ul style="list-style-type: none"> ● Bolečine v žrelu ● Limfadenopatija ali splenomegalija ● Povišane transaminaze ● Odsotnost RF in ANA 	<ul style="list-style-type: none"> ● Tipičen izpuščaji ● Levkocitoza > 10,0x10⁹/l
Za razvrstitev	≥ 5 meril (vsaj 2 major)	4 major in 2 minor merila
Občutljivost	96,3 %	87,0 %
Specifičnost	98,2 %	97,8%

Legenda: RF revmatoidni faktor; ANA protitijdrna avtoprotitelesa;

Literatura:

- Georgin-Lavialle S, Fayard A, Rodrigues F, Bachmeyer C, Savey L, Grateau G. Autoinflammatory diseases: State of the art. *Presse Med.* 2019 Feb;48(1 Pt 2):e25-e48. doi: 10.1016/j.lpm.2018.12.003.
- Feist E, Mitrovic S, Fautrel B. Mechanisms, biomarkers and targets for adult-onset Still's disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(10):603-18.
- Giacomelli R, Ruscitti P, Shoenfeld Y. A comprehensive review on adult onset Still's disease. *J Autoimmun.* 2018;93:24-36.
- Yamaguchi M, Ohta A, Tsunematsu T, Kasukawa R, Mizushima Y, Kashiwagi H, et al. Preliminary criteria for classification of adult Still's disease. *J Rheumatol.* 1992;19(3):424-30.
- Fautrel B, Le Moël G, Saint-Marcoux B, Taupin P, Vignes S, Rozenberg S, et al. Diagnostic value of ferritin and glycosylated ferritin in adult onset Still's disease. *J Rheumatol.* 2001;28(2):322-9.
- Yoo DH. Biologics for the treatment of adult-onset still's disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2019 Aug 14:1-18. doi: 10.1080/14712598.2019.1652591.

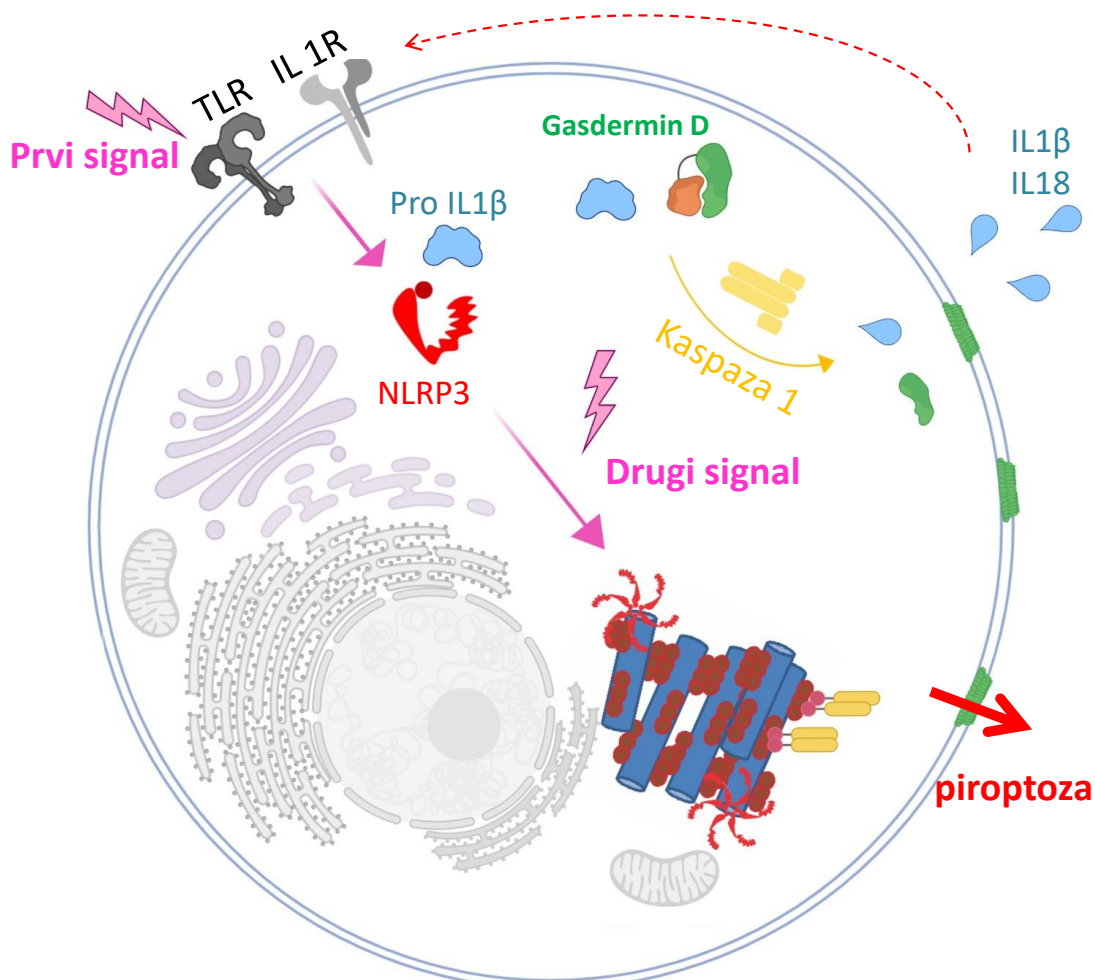
AKTIVACIJA IN ZAVIRANJE INFLAMASOMA NLRP3

Iva Hafner Bratkovič, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo, Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana

INFLAMASOM NLRP3

Mikrobe v telesu zazna veliko različnih receptorjev naravne imunosti. Receptorji NLR, ki vsebujejo osrednjo nukleotid-vezavno in oligomerizacijsko domeno (NBD) ter C-končno domeno, bogato z levcinskimi ponovitvami (LRR), so bili odkriti v začetku tisočletja. V neaktivirani obliki se nahajajo pretežno v citosolu. Vsaj trije od receptorjev (NLRP1, NLRP3 in NLRC4) ob aktivaciji tvorijo inflammasom. Inflammasomi so multiproteinski kompleksi, ki aktivirajo vnetne kaspaze [1, 2].

Za aktivacijo inflammasoma NLRP3 sta potrebna dva aktivacijska signala. Prvi signal preko aktivacije dejavnika transkripcije NF- κ B sproži tako tvorbo proteinov NLRP3 in pro-oblike IL 1 β , kot tudi ustrezne posttranslacijske modifikacije, ki receptor NLRP3 pripravijo, da ob drugem signalu (tega omogočijo aktivatorji NLRP3) oligomerizira, preko homotipne interakcije PYD-PYD veže adaptor ASC. Slednji z domeno CARD interagira z domeno CARD pro-oblike kaspaze 1. Pri tem pride do aktivacije kaspaze 1, ki je potrebna za procesiranje in sproščanje aktivnih vnetnih citokinov IL 1 β in IL 18, cepi pa tudi protein gasdermin D. N-končna domena gasdermina D tvori pore v membrani, kar povzroči celično smrt, imenovano piroptoza [3] (Slika 1).



Slika 1: Aktivacija inflammasoma NLRP3 poteka v dveh korakih.

RAZISKOVANJE MEHANIZMA AKTIVACIJE INFLAMASOMA NLRP3

Receptor NLRP3 je izredno zanimiv, saj se odzove na veliko skupino raznolikih agonistov mikrobnege in endogenege izvora (aktivatorji drugega koraka). Predvidevamo, da odziv NLRP3

sproži skupen celični odziv na raznolike aktivatorje, npr. znižanje citosolne koncentracije kalijevih ionov. Čeprav predklinične raziskave nakazujejo vedno večjo vlogo NLRP3 pri različnih boleznih, je mehanizem aktivacije inflamasma NLRP3 precej neraziskan.

Pri raziskovanju mehanizma aktivacije smo z obsežno in sistematično mutagenozo opredelili pomen posameznih domen NLRP3 v zaznavanju aktivatorjev ter pri sestavljanju inflamasma. Z retrovirusno transdukcijo smo pripravili stabilne celične linije mišjih makrofagov, ki izražajo variante NLRP3, ne pa tudi NLRP3 divjega tipa (saj so bile pripravljene na osnovi celične linije, izolirane iz miši z izbitim genom za NLRP3). Izražanje proteinov smo dokazali s prenosom po Westernu. Odziv linij na različne aktivatorje inflamasma NLRP3 smo preverili s spremljanjem tvorbe agregatov ASC, zorenja citokinov, aktivacije kaspaze 1 in spremljanjem celične smrti, piroptoze. Pokazali smo, da za aktivacijo potrebujemo podaljšano domeno NBD, celotna LRR-domena pa za aktivacijo ni potrebna, niti ne zavira konstitutivne aktivacije. Naši rezultati so nam omogočili, da smo določili kratko varianto (podobne variante se nahajajo tudi v naravi), ki se polno odziva in je sposobna podpirati oligomerizacijo in aktivacijo inflamasma [4].

Mehanizem sestavljanja inflamasma NLRC4 je precej bolje raziskan [5]. V odsotnosti aktivatorjev se NLRC4 nahaja v zaprti konformaciji. Aktivator se veže na predstavnika družine NAIP, pri čemer pride do konformacijske spremembe in izpostavitve površine na NAIP, ki veže NLRC4. Vezava kompleksa aktivator/NAIP povzroči tudi spremembo orientacije domen znotraj NLRC4 in izpostavitve površine na NLRC4, ki je sposobna vezave novih molekul NLRC4 v avtokatalitskem procesu [6, 7]. Tako je minimalno število aktivatorjev že zadostno za aktivacijo inflamasma NLRC4. Zanimalo nas je, ali gre za podoben mehanizem tudi v primeru NLRP3. Naši rezultati kažejo, da NLRP3 ni sposoben avtokatalitske aktivacije, kar predstavlja še dodaten nivo regulacije NLRP3[4].

ZAVIRALCI INFLAMASOMA NLRP3

Aktivacija inflamasma NLRP3 lahko preko povečane aktivacije IL 1 β in IL 18 ter procesov v povezavi s piroptozo privede do sterilnega vnetja, zato je natančna regulacija teh odzivov izredno pomembna. Delovanje inflamasma NLRP3 lahko zavremo na različnih stopnjah:

- uravnavanje izražanja pro-IL 1 β in NLRP3,
- zaviranje oligomerizacije NLRP3,
- zaviranje polimerizacije ASC,
- zaviranje aktivnosti kaspaze-1,
- zaviranje tvorbe por gasdermina D,
- zaviranje delovanja citokinov IL 1 in IL 18.

Trenutno za zdravljenje s kriopirinom povezanih periodičnih vročinskih sindromov uporabljajo zaviralce, ki delujejo na zadnji stopnji, torej onemogočajo delovanje vnetnega citokina IL 1 β . To so antagonist receptorja za IL 1 (IL-1Ra, anakinra), protitelo proti IL 1 β (canakinumab) ter topni receptor za IL 1 (riloncept). V kliničnih poskusih so tudi zaviralci IL 18, z IL 18-vezavnim proteinom so po postopku sočutne uporabe zdravila uspešno zdravili deklico s hudo avtoinflamatorno boleznijo, ki je posledica monogenske mutacije v genu za NLRC4 [8].

Vendar interleukina 1 β in 18 nista edina produkta inflamasma, poleg tega pa je smiselno specifično zavreti le inflamasm NLRP3, zato raziskujemo nove načine in spojine, ki bi zavirali aktivacijo inflamasma NLRP3.

Tako smo sodelovali pri karakterizaciji novih spojin [9] in pokazali, da naftokinon šikonin, ki je spojina naravnega izvora z dolgoletno uporabo v tradicionalni kitajski medicini, zavira aktivacijo inflamasma tako na stopnji priprave, kot tudi na stopnji sestavljanja inflamasma ter z direktnim delovanjem na kaspazo 1 [10]. Od različnih majhnih spojin, ki zavirajo delovanje inflamasma NLRP3, je najbolj raziskana spojina MCC960 (CRID3). V zadnjem letu so različne skupine pokazale, da spojina MCC950 (CRID3) inhibira inflamasm preko direktne vezave na NLRP3 [11, 12]. Spojine, podobne MCC950, vstopajo v klinične poskuse, poleg tega določene procese pri aktivaciji inflamasma NLRP3 lahko zavirajo tudi nekatera zdravila, ki jih trenutno uporabljamo za zdravljenje drugih bolezni. Tako bomo morda že v prihodnjem desetletju na voljo alterative biološkim zdravilom, ki zavirajo zadnje stopnje (produkte) aktivacije inflamasma.

ZAHVALA

Raziskovalno delo je finančno podprla Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS (projekta J3-5503 in J3-1746, in program P4-0176).

LITERATURA

1. Hafner-Bratkovic, I., Enigmatična vloga inflammasomov v zdravju in bolezni. Študetski medicinski raziskovalni kongres (2018 ; Ljubljana), 2018.
2. Evavold, C.L. and J.C. Kagan, Inflammasomes: Threat-Assessment Organelles of the Innate Immune System. *Immunity*, 2019. **51**(4): p. 609-624.
3. Kayagaki, N., et al., Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 2015. **526**(7575): p. 666-71.
4. Hafner-Bratkovic, I., et al., NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 5182.
5. Hafner-Bratkovic, I., The NLRC4 inflammasome: The pieces of the puzzle are falling into place. *Inflammasome*, 2017. **3**: p. 10-23.
6. Zhang, L., et al., Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science*, 2015. **350**(6259): p. 404-9.
7. Hu, Z., et al., Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLRC4. *Science*, 2015. **350**(6259): p. 399-404.
8. Canna, S.W., et al., Life-threatening NLRC4-associated hyperinflammation successfully treated with IL-18 inhibition. *J Allergy Clin Immunol*, 2017. **139**(5): p. 1698-1701.
9. Cocco, M., et al., Development of an Acrylate Derivative Targeting the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J Med Chem*, 2017. **60**(9): p. 3656-3671.
10. Zorman, J., P. Susjan, and I. Hafner-Bratkovic, Shikonin Suppresses NLRP3 and AIM2 Inflammasomes by Direct Inhibition of Caspase-1. *PLoS One*, 2016. **11**(7): p. e0159826.
11. Coll, R.C., et al., MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol*, 2019. **15**(6): p. 556-559.
12. Tapia-Abellan, A., et al., MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nat Chem Biol*, 2019. **15**(6): p. 560-564.

CILJANA ZAŠČITA D-NEGATIVNIH NOSEČNIC V 28. TEDNU NOSEČNOSTI Z IMUNOGLOBULINOM ANTI-D

Irena Bricl, Tadeja Dovč Drnovšek, Tanja Hartman, Klara Železnik, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana.

Senzibilizacija na eritrocitne antigene

Do senzibilizacije na tuje eritrocitne antigene lahko pride po transfuziji, med nosečnostjo ali po transplantaciji. Nosečnica se lahko zaradi fetomaternalnih krvavitev (FMK) senzibilizira na eritrocitne antigene, ki jih je plod podedoval od očeta. Pogostost spontanih FMK se proti koncu nosečnosti povečuje, in sicer od 3% nosečnic v prvem tromesečju do 45% v tretjem tromesečju. Večji kot je volumen FMK, večja je verjetnost nastanka eritrocitnih aloprotiteles. Do večjih FMK lahko pride tudi pri posegih kot so amniocenteza, kordocenteza, biopsija horionskih resic, zunanji obrat in prekinitev nosečnosti ter pri poškodbi trebuha. Do senzibilizacije pride večinoma pozno v poteku nosečnosti, zato prvi otrok v večini primerov ne razvije klinične slike hemolitične bolezni ploda in novorojenčka (HBPN).

Klinično pomembna so tista eritrocitna aloprotitelesa, ki lahko povzročijo skrajšano življenjsko dobo eritrocitov. Omenjena aloprotitelesa lahko po transfuziji neskladnih antigensko pozitivnih eritrocitov povzročijo hemolitično transfuzijsko reakcijo, pri nosečnici pa HBPN. HBPN je posledica materinih aloprotiteles, ki prehajajo preko posteljice in so usmerjena proti antigenom, ki jih je plod podedoval od očeta.

Razvoj HBPN je odvisen od specifičnosti, razreda in podrazreda protiteles ter od razvitosti antigenov pri plodu. Nekateri antigeni se izražajo zgodaj v embrionalnem razvoju (Kell (K), Rh), drugi pa pozno v poteku nosečnosti ali celo šele po rojstvu (Le). Imunoglobulini razreda IgM ne prehajajo preko posteljice in zato ne povzročajo HBPN. Imunoglobulini IgG prehajajo preko posteljice, najbolj agresivna so protitelesa podrazreda IgG1 in IgG3, ki lahko povzročijo hudo obliko HBPN. Z vidika razvoja HBPN so najpomembnejša protitelesa specifičnosti anti-D, anti-K in anti-c.

Najbolj imunogen je antigen D, saj transfuzija 200 ml D-pozitivne krvi D-negativni osebi povzroči senzibilizacijo v 85% primerov. Po imunogenosti mu sledi antigen K z 10% verjetnostjo senzibilizacije po neskladni transfuziji. Neskladnost med plodom in materjo v antigenu D je, kljub preprečevanju z injiciranjem IgG anti-D, zaradi pogostosti neskladnosti in močne imunogenosti antigena D še vedno najpogostejši vzrok senzibilizacije. Od izpostavljenosti D-pozitivnim eritrocitom do zaznave protiteles anti-D minejo približno štirje tedni. Najvišja raven protiteles anti-D je 6-8 tednov po primarnem stiku z D-pozitivnimi eritrociti. IgG je pogosto edini razred imunoglobulinov in je običajno podtipa IgG1 in/ali IgG3. Za senzibilizacijo na antigen D zadostuje že 0,1-1 ml D-pozitivnih plodovih eritrocitov v materinem krvnem obtoku.

Preprečevanje senzibilizacij na eritrocitne antigene

Aktivno preprečujemo samo nastanek protiteles anti-D ter delno anti-K. Pacientom, ki potrebujejo transfuzijo zagotavljamo AB0, D in od leta 2007 tudi K-skladne eritrocite, s čimer posledično preprečujemo senzibilizacije na antigena D in K tudi pri vseh ženskah v rodni dobi. Senzibilizacijo na antigen D pri nosečnicah in otročnicah preprečujemo tudi z injiciranjem pripravka humanih poliklonskih protiteles IgG anti-D. Natančen mehanizem delovanja IgG anti-D ni dokončno pojasnjen, glavni mehanizem je verjetno vezava IgG anti-D na D-pozitivne plodove eritrocite v krvnem obtoku nosečnice in njihova odstranitev z makrofagi. Za preprečitev imunizacije na antigen D po injiciranju IgG anti-D pa obstajajo tudi dodatni mehanizmi, ki zavirajo aktivacijo limfocitov B in celic pomagalk Th4 ter zavirajo delovanje nezrelih dendritičnih celic. Za preprečitev senzibilizacije zadošča približno 200 molekul IgG anti-D vezanih na D-pozitiven eritrocit, kar je precej manj kot je D antigenov na površini eritrocita. Pripravek protiteles IgG anti-D se pridobiva s postopkom odvzema plazme namerno senzibiliziranim moškim. Namerna senzibilizacija po evropski zakonodaji ni dovoljena, zato se pripravki IgG anti-D večinoma pridobivajo v ZDA. Način pridobivanja pripravka in omejena količina sta razloga za visoko ceno. Potreben odmerek IgG anti-D za preprečitev senzibilizacije je odvisen od volumna FMK, 10 µg IgG anti-D zadošča za 1ml D-pozitivne plodove krvi v materinem krvnem obtoku. Brez zaščite z IgG anti-D se imunizira 16% D-negativnih nosečnic, ki rodijo D-

pozitivnega otroka. Odstotek imunizacij pri nosečnicah, ki so AB0 neskladne s plodom, se zniža na 2%, verjetno zaradi skrajšanega preživetja plodovih AB0 neskladnih eritrocitov v materinem krvnem obtoku.

Pri vsaki nosečnici do dvanajstega tedna nosečnosti določimo krvno skupino AB0, D in K ter naredimo indirektni Coombsov test (ICT), s katerim odkrivamo prisotnost nepričakovanih eritrocitnih aloprotiteles. Pred začetkom uvajanja novega programa ciljane zaščite smo vsem D-negativnim nosečnicam v 28. tednu nosečnosti ponovili ICT ter v odsotnosti senzibilizacije na antigen D, preventivno injicirali IgG anti-D. Po porodu smo pred začetkom uvajanja ciljane zaščite vsem D-negativnim otročnicam ponovili ICT ter določili krvno skupino in direktni Coombsov test (DCT) novorojenca. Na tak način po porodu postopamo tudi v prehodnem obdobju uvajanja novega programa, ki je trenutno še v teku. Vsem D-negativnim otročnicam, ki so rodile D-pozitivnega otroka, zopet injiciramo odmerek IgG anti-D oziramo glede na ocenjeni volumen FMK injiciramo še dodatne odmerke IgG anti-D.

Preventivno injiciranje IgG anti-D pri D-negativni nosečnici je potrebno tudi v primeru vaginalne krvavitve, spontane ali umetne prekinitve nosečnosti, znotrajmaterničnega posega, zunanjšega obrata, zunajmaternične nosečnosti in poškodbe trebuha. V teh primerih ob indikaciji priporočimo injiciranje IgG anti-D, od 25. tedna nosečnosti dalje pa se odločamo glede na rezultat genotipizacije plodovega *RHD (D)* iz periferne krvi nosečnice.

Vse nosečnice, pri katerih odkrijemo potencialno klinično pomembna aloprotitelesa tekom nosečnosti natančno spremljamo. Z določanjem titra in agresivnosti protiteles, z določitvijo antigenov pri otrokovem očetu ter z genotipizacijo plodove DNA iz amniocitov ali zunajcelične plodove DNA iz periferne krvi nosečnice ocenjujemo ogroženost ploda za razvoj anemije. Nosečnice, pri katerih obstaja tveganje za razvoj anemije ploda vodijo v Ambulanti za patološko nosečnost UKC Ljubljana.

Novi nacionalni program: »Neinvazivna določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi RhD-negativnih nosečnic-presejalni test«

Poleg matrine zunajcelične DNA se v krvnem obtoku nosečnice nahaja tudi zunajcelična plodova DNA (zcp-DNA). Glavni vir zcp-DNA so apoptotične celice posteljice. Koncentracija zcp-DNA tekom nosečnosti raste, v prvem tromesečju zcp-DNA predstavlja 3,4% celotne zunajcelične DNA v krvnem obtoku matere, v zadnjem tromesečju količina naraste na 6,2%. Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM) iz zcp-DNA določamo genotipa *D* in *RHCE (CE)* od 16. tedna nosečnosti dalje. Prednost določitve plodovega genotipa *D* iz matrine plazme je v tem, da niti nosečnica niti plod nista ogrožena pri pridobivanju plodovega genetskega materiala. Za izvedbo testa potrebujemo vensko kri D-negativne nosečnice odvzeto v epruveto z antikoagulansom (EDTA). Za ugotavljanje prisotnosti gena *D* določamo prisotnost več regij gena, saj to znatno poveča pravilno napovedna vrednost prisotnosti antigena *D*.

Do uvedbe novega programa presejalnega testiranja s ciljno zaščito z IgG anti-D je nosečnica ne glede na krvno skupino *D* pri plodu prejela zaščito v 28. tednu. Glede na prevalenco antigena *D* v slovenski populaciji (81% D-pozitivnih in 19% D-negativnih oseb) ter odstotek homo in heterozigotnosti v alelih *D*, ocenjujemo, da je kar 41% D-negativnih nosečnic nosilo D-negativni plod in prejelo zaščito v 28. tednu po nepotrebem. Leta 1997 je Lo s sodelavci iz periferne krvi matere izoliral zcp-DNA, ki nam omogoča vpogled v dedna znamenja ploda. Z možnostjo neinvazivnega določanja plodovega genotipa *D* lahko dajemo ciljno zaščito v 28. tednu nosečnosti samo tistim D-negativnim nosečnicam, ki nosijo D-pozitivni plod.

Zdravstveni svet Ministrstva za zdravje je oktobra 2016 potrdil predlog novega programa »*Neinvazivna določitev plodovega genotipa RHD iz periferne krvi D-negativnih nosečnic-presejalni test*«. Novi program ne prinaša sprememb pri vodenju nosečnic v prvem tromesečju. Vsem nosečnicam bomo še naprej do 12. tedna določili krvno skupino (AB0, D in K) ter ICT. Novi program predvideva pri D-negativnih nosečnicah v 25.-26. tednu določitev plodova genotipa *D* iz periferne krvi matere. D-negativnim nosečnicam, pri katerih bomo z genotipizacijo določili, da je plod D-pozitiven, bomo naredili še ICT ter svetovali glede zaščite z IgG anti-D v 28. tednu. D-negativne nosečnice, pri katerih bomo določili, da je plod D-negativen, ne bodo prejele zaščite z IgG anti-D, kontrole v nadaljevanju nosečnosti in po porodu po izteku prehodnega obdobja uvajanja programa ne bodo več potrebne. Po porodu bomo vsem D-negativnim otročnicam, pri katerih bomo med nosečnostjo z genotipizacijo ugotovili, da nosijo D-pozitivni plod, ponovili ICT, določili obseg FMK in izdali

priporočilo glede zaščite IgG anti-D. Pri njenem D-pozitivnem novorojencu bomo serološko določili krvno skupino (AB0, D in K) ter naredili DCT. Pri vseh nejasnih rezultatih genotipizacije plodovega gena *D* bomo nosečnici priporočili zaščito z IgG anti-D.

Z uvajanjem novega programa smo pričeli v jeseni 2018 z začetnim prehodnim obdobjem, v katerem po porodu na ustaljen način testiramo vse D-negativne nosečnice in njihove novorojence. Prehodno obdobje bo predvidoma zaključeno v prvih mesecih leta 2020.

Metode dela

V enoletnem obdobju od 1.10.2018 do 31.9.2019 smo analizirali vse prejete naročilnice D-negativnih nosečnic, ki so bile poslane bodisi za preventivno ali ciljno zaščito. Vse podatke iz naročilnic in rezultate naših preiskav smo s pomočjo sodelavk iz Odseka za prenatalno diagnostiko in Odseka za molekularno in celično biologijo vpisovali v Excell tabelo. Po končanem enoletnem obdobju smo opravili retrogradno analizo vseh zbranih podatkov.

Rezultati

V enoletnem prehodnem obdobju (1.10.2018 – 31.9.2019) uvajanja novega nacionalnega programa ciljne zaščite z IgG anti-D od smo vsem D-negativnim nosečnicam po porodu določali ICT ter po potrebi ocenili volumen FMK, njihovim novorojenčkom pa KS AB0, D, K ter DCT z namenom preverjanja zanesljivosti rezultatov določanja plodovega genotipa *D* iz periferne krvi matere. V tem obdobju smo obravnavali 2699 D-negativnih nosečnic, izmed teh jih je kar 40,8% (1101) nosilo D-negativni plod. Rezultati genotipizacije plodovega *D* po posameznih mesecih so prikazani v Tabeli 1. Metoda določitve plodovega genotipa *D* iz periferne krvi matere se je izkazala za 100% zanesljivo.

Tabela 1: Rezultati genotipizacije plodovega *D* po posameznih mesecih

REZULTAT GENOTIPIZACIJE	OKT. 18	NOV. 18	DEC. 18	JAN. 19	FEB. 19	MAR. 19	APR. 19	MAJ 19	JUN. 19	JUL. 19	AVG. 19	SEP. 19	Skupna statistika
RhD NEG.	16 (35,6%)	55 (39,6%)	88 (44%)	100 (39,4%)	91 (41%)	113 (40,9%)	112 (39,4%)	105 (41%)	108 (45,4%)	116 (41,3%)	117 (42,8%)	80 (34,6%)	1101 (40,8%)
RhD POZ.	29 (64,4%)	84 (60,4%)	109 (54,5%)	147 (57,9%)	131 (59%)	159 (57,6%)	162 (57%)	148 (57,8%)	127 (53,4%)	161 (57,3%)	155 (56,7%)	145 (62,8%)	1557 (57,7%)
Določitev ni možna	/	/	2	5	/	1	4	/	/	3	/	1	16 (0,6%)
Nejasen	/	/	/	2	/	2	6	/	2	1	1	4	18 (0,6%)
Ni podatka	/	/	1	/	/	1	/	2	/	/	/	1	5 (0,2%)
Naročen nov vzorec	/	/	/	/	/	/	/	/	1	/	/	/	1 (0,04%)
Stornirana storitev	/	/	/	/	/	/	/	1	/	/	/	/	1 (0,04%)

Povprečno smo mesečno opravili 225 genotipizacij plodovega *D*. Porazdelitev števila prejetih naročilnic za ciljno zaščito oz. opravljenih genotipizacij plodovega *D* glede na posamezni mesec je prikazana v Tabeli 2. Ob začetku uvedbe novega programa je bilo povprečno mesečno število naročilnic nekoliko manjše, nato je počasi naraščalo iz meseca v mesec ter doseglo predvideno povprečje po treh mesecih izvajanja novega programa.

Tabela 2: Število prejetih naročilnic za ciljano zaščito po posameznih mesecih

	ŠTEVILO PREJETIH NAROČILNIC PO MESECIH
OKTOBER 2018	45
NOVEMBER 2018	139
DECEMBER 2018	200
JANUAR 2019	254
FEBRUAR 2019	222
MAREC 2019	276
APRIL 2019	284
MAJ 2019	256
JUNIJ 2019	238
JULIJ 2019	281
AVGUST 2019	273
SEPTEMBER 2019	231
Skupno število prejetih naročilnic	2699

Vzorec za genotipizacijo plodovega *D* je bil poslan povprečno v 25,8. tednu nosečnosti. Porazdelitev po posameznih mesecih glede na povprečen teden gestacije poslane naročilnice za ciljano zaščito je prikazana v Tabeli 3.

Tabela 3: Porazdelitev po posameznih mesecih glede na povprečen teden gestacije poslane naročilnice za ciljano zaščito

	POVPREČNI TEDEN GESTACIJE GLEDE NA POSLANO NAROČILNICO
OKTOBER 2018	26.
NOVEMBER 2018	25,8.
DECEMBER 2018	25,7.
JANUAR 2019	25,7.
FEBRUAR 2019	25,8.
MAREC 2019	25,9.
APRIL 2019	25,8.
MAJ 2019	25,8.
JUNIJ 2019	25,8.
JULIJ 2019	26.
AVGUST 2019	26,1.
SEPTEMBER 2019	25,8.
	Povprečje: 25,8.

V Tabeli 4 je prikazana razporeditev prejetih naročilnic po posameznih mesecih glede na pripadajočo transfuzijsko ustanovo, iz katere so bile odposlane. S tem smo posredno preverjali odzivnost ginekologov na nov program oz. iz katere regije so se ginekologi najprej in v največji meri vključevali v novi program ciljane zaščite. Največji delež naročilnic (celokupno 43,2%) tekom celotnega obdobja predstavlja Ljubljana z okolico (ZTM).

Tabela 4: Razporeditev prejetih naročilnic za ciljano zaščito po posameznih mesecih glede na pripadajočo transfuzijsko ustanovo

	OKT. 18	NOV. 18	DEC.18	JAN.19	FEB.19	MAR.19	APR. 19	MAJ. 19	JUN.19	JUL. 19	AVG. 19	SEP. 19	Skupno število
BREŽICE	2	1	2	2	/	/	1	4	4	4	8	7	35 (1,3%)
CELJE	2	8	15	32	37	31	35	28	22	31	47	35	323 (11,9%)
IZOLA	3	10	12	9	6	10	11	6	10	7	6	4	94 (3,5%)
JESENICE	3	9	4	10	7	10	17	8	7	11	12	4	102 (3,7%)
MARIBOR	2	8	8	17	17	24	26	30	24	23	22	26	227 (8,4%)
MURSKA SOBOTA	4	4	6	8	6	11	16	13	13	6	8	11	106 (3,9%)
NOVA GORICA	6	8	16	19	14	16	12	10	6	10	11	7	135 (5%)
NOVO MESTO	1	13	20	18	28	36	32	27	13	21	18	11	238 (8,8%)
PTUJ	1	8	11	13	7	12	13	12	18	8	17	17	137 (5,1%)
SLOVENJ GRADEC	/	6	6	4	7	3	12	12	7	5	9	13	84 (3,1%)
TRBOVLJE	/	3	2	3	4	6	4	6	2	9	3	1	43 (1,6%)
ZTM	21	61	97	119	89	116	104	98	110	143	112	94	1164 (43,2%)
Ni podatka	/	/	1	/	/	1	1	2	2	3	/	1	11 (0,4%)
Skupno št. prejetih naročilnic	45	139	200	254	222	276	284	256	238	281	273	231	2699 (100%)

V 5- mesečnemu obdobju (20.4.2019 – 20.9.2019) smo spremljali tudi število naročil s strani ginekologov, ki so se kljub pozivom o uvedbi novega programa ciljane zaščite še vedno odločili za staro shemo zaščite z IgG anti-D (injiciranje IgG anti-D vsem D-negativnim nosečnicam brez določitve plodovega genotipa *D* iz periferne krvi matere) - v tem obdobju je bilo takšnih naročil 29. V Tabeli 5 je prikazana porazdelitev neustreznih naročilnic po posameznih mesecih. Z velikim zadovoljstvom smo opazili, da se je število neustreznih naročil po ciljanih pisnih obvestilih dotičnih vpletenih ginekologov postopno mesečno zmanjševalo.

<i>Tabela 5: Porazdelitev neustreznih naročilnic po posameznih mesecih</i>	<i>29</i>
<i>Skupno število neustreznih naročilnic</i>	
APRIL 2019	6
MAJ 2019	6
JUNIJ 2019	8
JULIJ 2019	5
AVGUST 2019	3
SEPTEMBER 2019	1

ZAKLJUČEK

Z uvedbo novega nacionalnega programa ciljane zaščite z IgG anti-D, s čimer smo pričeli jeseni 2018, je Slovenija tako ena izmed redkih držav v svetovnem merilu, kjer injiciramo IgG anti-D v 28. tednu glede na genotipizacijo plodovega *D*.

Zato lahko sprejetje in izvajanje programa ciljane zaščite smatramo za velik uspeh slovenskega zdravstva na preventivnem področju.

V enoletnem prehodnem obdobju (1.10.2018 – 31.9.2019) smo pri 2699 D-negativnih nosečnicah opravili genotipizacijo plodovega *D* iz periferne krvi. Metoda genotipizacije plodovega *D* se je

izkazala za 100% zanesljivo. Ugotovili smo, da je izmed 2699 D-negativnih nosečnic kar 1101 (40,8%) nosečnica nosila D-negativni plod. S tem smo potrdili naša predvidevanja, da v Sloveniji glede na razporejenost gena *D* v populaciji okoli 41% vseh D-negativnih nosečnic nosi D-negativni plod, kar pomeni, da smo do uvedbe programa ciljane zaščite kar 41% D-negativnih nosečnic po nepotrebnem injicirali IgG anti-D. Z določanjem plodovega genotipa *D* preprečimo nepotrebno injiciranje IgG anti-D in s tem morebitne neželene stranske učinke zdravila in tako poskrbimo za največjo možno varnost nosečnic ter hkrati znižamo stroške, saj gre za sorazmerno drago zdravilo. Prednost določitve fetalnega genotipa *D* iz materine plazme je tudi neinvazivnost metode, saj pri postopku odvzema nista ogrožena niti plod, niti nosečnica.

Na ZTM smo mesečno opravili povprečno 225 genotipizacij plodovega *D*, naročilnica za ciljano zaščito je bila poslana povprečno v 25,8. tednu gestacije, kar ustreza našim priporočilom (po naših navodilih priporočamo določitev plodovega *D* iz periferne krvi v 25.- 26. tednu gestacije). Glede na to, iz katere transfuzijske ustanove je bila sprejeta naročilnica za ciljano zaščito, smo posredno preverjali tudi odzivnost ginekologov na nov program oz. iz katere regije so se ginekologi najprej in v največji meri vključevali v nov program ciljane zaščite. Največji delež prejetih naročilnic tekom celotnega obdobja predstavlja Ljubljana z okolico (ZTM), kar celokupno predstavlja 43,2%. Postopno so se v vse večji meri pričeli v program vključevati ginekologi iz vseh regij, kar je razvidno iz Tabela 4. V 5-mesečnem obdobju (20.4.2019 – 20.9.2019) smo spremljali tudi število naročil s strani ginekologov, ki so se kljub pozivom o uvedbi novega programa ciljane zaščite še vedno odločili za staro shemo zaščite z IgG anti-D, v tem obdobju je bilo takšnih naročilnic 29. Po ciljanih pisnih obvestilih dotičnih vpletenih ginekologov se je število neustreznih naročil na naše zadovoljstvo pričelo postopno zmanjševati.

Obdobje uvajanja novega programa lahko tako zaključimo kot izjemno uspešno. Potrdili smo učinkovitost in zanesljivost določanja plodovega genotipa *D* iz periferne krvi D-negativnih nosečnic. S programom ciljane zaščite tako prejmejo IgG anti-D v 28. tednu zgolj tiste D-negativne nosečnice, ki nosijo D-pozitivni plod. Glede na naše podatke kar 40,8% slovenskih nosečnic nosi D-negativni plod. Brez programa ciljane zaščite bi tako veliko število nosečnic po nepotrebnem izpostavljali morebitnim neželenim učinkom zdravila.

Literatura:

1. Pravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji. Uradni list RS št. 9/2007.
2. Predlog zdravstvenemu svetu: Neinvazivna določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi RHD-negativnih nosečnic-presejalni test. 2014.
3. Kennedy MS, Delaney M, Scrape S. Perinatal issues in transfusion practice. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, westhoff CM. Technical manual, 18th ed. Bethesda: AABB, 2014. p. 561-70.
4. Briel I, Železnik K. Aloimunizacija in hemolitična bolezen. In: Takač I, Geršak K. Ginekologija in perinatologija, 1. izd.- Maribor: Medicinska fakulteta; 2016. p. 516-20.
5. Krumpel BM. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. *Transfusion* 2006;46:1652-6.
6. Dovč Drnovšek T. Določanje plodovega genotipa *RHD* iz plazme RhD-negativnih nosečnic z metodo PCR v realnem času [PhD thesis]. Ljubljana; 2016.
7. Illanes S in Soothill P. Noninvasive approach for the management of hemolytic disease of the fetus. *Expert Rev Hematol.* 2009;2:577-82.
8. Illanes S in Soothill P. Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenatal diagnosis* 2010;30:668-73.
9. Hyland CA, Gardener GJ, Davies H, Ahvenainen M, Flower RL in sod. Evaluation of non-invasive prenatal *RHD* genotyping of the fetus. *MJA* 2009;191(1):21-25.
10. Daniels G., Finning K., Martin P. in Summers J. Fetal RhD genotyping: A more efficient use of anti-D immunoglobulin. *Transfusion Clinique et Biologique* 2007;14:568-71.
11. Alie-Daran SJ, Dugoujon JM in Fournie A. Gm typing, IgG subclasses of anti-Rh(a) and severity of hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1992;62:127-8.

ATOPIJSKI DERMATITIS PRI OTROKU IN POVEZAVA Z ALERGIJO

Anja Koren Jeverica, Služba za alergologijo, revmatologijo in klinično imunologijo, Univerzitetna pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana

UVOD IN EPIDEMIOLOGIJA

Atopijski dermatitis (AD) je pogosta kronična, srbeča, vnetna bolezen kože pri otrocih. Najpogosteje se pojavi pri atopikih, torej otrocih, ki se rodijo z nagnjenostjo k alergijskim boleznim (alergijske bolezni pri starših oz. sorojencih). Pri otrocih z AD se večkrat pojavijo tudi druge alergijske bolezni kot so alergija na hrano, alergijski rinokonjunktivitis oz. astma.

Prevalenco bolezni pri otrocih ocenjujejo na 10% - 30%. Bolezen je posebej pogosta v razvitem svetu in v urbanih okoljih. Tipični izpuščaji se lahko začnejo pojavljati kadarkoli v življenju, pri veliki večini pred 5 letom starosti, največkrat pa že v prvem letu. Bolezen pogosto s časom izzveneva, pri nekaterih pa vztraja tudi celo življenje.

PATOGENEZA

Patogeneza AD je kompleksna in multifaktorska. Pri razvoju bolezni igrajo pomembno vlogo genetski dejavniki (npr. mutacije v genu za filagrin), ki privedejo do motene barierne funkcije kože (povečana izguba vode, olajšan prehod alergenov in bakterij preko kože), kakor tudi dejavniki povezani z imunsko disregulacijo (motnja prirojene imunosti, npr. zmanjšana funkcija toll-like receptorjev, nagnjenost k Th2/Th22 imunskemu odgovoru – IL 4, IL 13) in spremenjeno normalno bakterijsko floro kože. Vnetje v koži je najverjetneje posledica tako motene barierne funkcije (hipoteza »zunaj-noter«) kot imunske disregulacije (hipoteza »noter-zunaj«).

KLINIČNA SLIKA

Za AD je značilna suha, zelo srbeča koža v kateri prihaja do periodičnega pojava vnetja, kar se kaže kot ekcem. Ekcematoidni izpuščaji se lahko pojavijo kjerkoli, največkrat na obrazu in okončinah (pri dojenčkih) oz. ob velikih sklepkih, okoli oči, na vratu (pri večjih otrocih). Kožne spremembe praviloma zelo srbijo, praskanje stanje poslabša, vzpostavi se pozitivna povratna zanka (vnetje-srbečica-praskanje-vnetje). Na vneti koži se pogosto razrastejo bakterije (predvsem *S. aureus*), lahko pa pride tudi do virusnih okužb kože (herpes, moluske, bradavice). Pri otrocih z AD lahko norice potekajo v težji obliki, zato je smiselno cepljenje.

Poslabšanja dermatitisa so lahko sprožena z različnimi dejavniki – okužba, suh zrak (pozimi), praskanje, razrast bakterij, čustven stres, potenje, stik z iritanti (npr. kemikalije v milih, »trda« voda...), lahko tudi alergeni (pršica, pelodi, hrana). Večkrat sprožilec za poslabšanje ni jasen.

ZDRAVLJENJE

AD (predvsem pri zmernih-hudih oblikah) pogosto zelo negativno vpliva na kvaliteto življenja otroka in družine. Najbolj moteča je izrazita srbečica kože, kar vpliva na kvaliteto spanja in vsakodnevne aktivnosti. Cilji zdravljenja so zmanjšati srbečico, pozdraviti vnetje in preprečiti poslabšanja.

Zelo pomembna je redna nega suhe kože, s katero zmanjšamo srbečico in preprečujemo izbruhe bolezni. Uporabljamo indiferentna mazila, brez dodatkov kot so parfumi, eterična olja, rastlinski ekstrakti in podobno. Za suho kožo v umirjeni fazi so primerne oljne kopeli, kadar je koža akutno vnetja pa kopeli z antiseptiki.

Ob pojavu vnetja je potrebno uporabiti protivnetno lokalno terapijo, v prvi vrsti kortikosteroidna mazila, za blažje spremembe lahko tudi lokalne inhibitorje kalcinevrina. Antihistaminiki lahko omilijo srbečico, ne vplivajo pa na samo bolezen. Ob sekundarni impetiginizaciji uporabimo lokalno ali sistemsko antibiotično terapijo, razširjene okužbe s herpes virusi zdravimo z viroleksom.

SISTEMSKO ZDRAVLJENJE PRI TEŽKI OBLIKI AD

Manjši delež otrok trpi za hudo, razširjeno obliko AD, kjer je lokalno zdravljenje neučinkovito. Pri takih trdovratnih oblikah pride v poštev zdravljenje s sistemskimi imunosupresivnimi zdravili (npr. ciklosporin, metotreksat, azatioprin, mikofenolat mofetil). Sistemskih kortikosteroidov se zelo izogibamo, saj imajo pri AD večkrat izrazit »rebound« fenomen. Te otroci potrebujejo multidisciplinarno obravnavo (dermatolog, alergolog, imunolog, infektolog).

Težka oblika AD je povezana z zelo okrnjeno kvaliteto življenja. Izredno moteča je huda srbečica, ki vodi v moteno spanje in vsakodnevne aktivnosti (manjkanje v šoli), motena je otrokova samopodoba, močno se poveča tveganje za psihične težave. Pri oceni resnosti bolezni nam pomagajo različne ocenjevalne lestvice, največkrat uporabimo t.i. SCORAD indeks. Večkrat prispeva k resnosti bolezni tudi slaba complianca kar se tiče lokalne terapije, predvsem fobija pred steroidi, ki je precej razširjena med starši. Pri vseh otrocih s težko obliko AD izključimo morebitne imunske pomanjkljivosti (npr. SCID-Omen, Wiskot-Aldrich).

V Službi za alergologijo, revmatologijo in klinično imunologijo Pediatrične klinike v Ljubljani smo v zadnjih 5 letih zdravili s sistemskimi zdravili 53 otrok (30 deklic in 23 dečkov) s težko obliko AD, njihova povprečna starost ob uvedbi terapije je bila 6,8 let (14 mesecev – 18 let). Pri vseh naših bolnikih je bil prvi izbor zdravljenja ciklosporin. V povprečju smo dosegli zadovoljivo umiritev bolezni po 23 dnevih terapije (3 – 84 dni). Povprečno so bili otroci zdravljeni s ciklosporinom 16 mesecev (3 – 59 mes).

Pri 41 (78%) otrocih smo ocenili zdravljenje s ciklosporinom kot zelo uspešno. Z učinkom pomembno korelira terapevtski nivo zdravila, ki ga pri bolnikih redno monitoriramo. Za dober učinek zdravila je bil v večini primerov potreben nivo okoli 100 ng/ml. Pri 6 otrocih je imel ciklosporin slab učinek, zaradi česar smo uvedli dodatno imunomodulatorno zdravilo metotreksat. Pri eni bolnici smo prehodno (3 mesece) poskusili z omalizumabom (anti IgE), brez uspeha. Pri nobenem otroku nismo beležili nefrotoksičnosti. Najpogostejši neželeni učinki zdravljenja so bile okužbe kože: pri 9 bolnikih bakterijska okužba kože, pri 8 bolnikih moluske oz. bradavice, pri 6 bolnikih razširjena okužba kože s HSV1, pri 2 bolnikih intenzivnejši potek noric.

Pri dveh bolnicah (starost 5 in 6 let) s stranskimi učinki ciklosporina smo pred kratkim pričeli s terapijo z biološkim zdravilom dupilumab (anti IL-4).

POVEZAVA Z ALERGIJO – SENZIBILIZACIJA PREKO KOŽE

Pogosto je AD prva manifestacija atopičnega fenotipa, ki se začne zgodaj v otroštvu. Otroci z AD so nagnjeni k razvoju senzibilizacije (pojav IgE specifičnih za različne alergene iz okolice). Zaradi motene kožne bariere, je le-ta bolj propustna za prehod alergenov, bakterij in drugih delcev iz okolja. Alergeni, ki prehajajo preko kože so lahko t.i. inhalacijski alergeni (npr. pršica, živalska dlaka, pelodi) pa tudi alergeni iz različne hrane. Do 80% otrok z atopijskim dermatitisom ima pozitivne alergološke teste (so senzibilizirani) za različne alergene. Raziskave so pokazale, da se delci hrane nahajajo v okolju (v prahu, na površinah, rokah...) in lahko ob stiku s poškodovano kožo prehajajo skozi njo v organizem. Na živalskih modelih so uspeli prikazati, da prav prehod alergena preko kože spodbuja Th2 imunski odgovor ter sintezo sIgE. Seveda pa sama senzibilizacija še ne pomeni tudi klinične slike alergije. Pri večini otrok manjša količina protiteles IgE ne bo povzročala težav (asimptomatska senzibilizacija), kadar pa je teh protiteles več, se lahko pojavijo znaki alergije.

Številne raziskave potrjujejo, da je AD glavni rizični dejavnik za razvoj alergije na hrano. Kar 10 - 30% otrok z AD ima pridruženo alergijo na hrano (najpogosteje jajce, mleko, arašide, drevesne oreščke). Dojenčki z AD imajo do šestkrat večjo verjetnost za pojav alergije na hrano v starosti 1 leta v primerjavi s tistimi brez AD. Najbolj rizični za pojav alergije na hrano so tisti otroci pri katerih se je AD začel zelo zgodaj v življenju (v prvih mesecih) in poteka v težji obliki. Pri otrocih, kjer se AD pojavi kasneje v življenju je alergija na hrano bistveno manj pogosta. Številne študije so prikazale tudi povezavo med AD in kasnejšim pojavom astme in alergijskega rinitisa (»alergijski pohod«). Riziko za razvoj alergijske bolezni dihal je prav tako največji pri zgodnjem-perzistentnem fenotipu AD.

Otrok z alergijo na hrano bo v večini primerov razvil znake takojšnje IgE reakcije po zaužitju te hrane (koprivnica/otekanje, bruhanje, izcedek iz nosu, kašelj, piskanje, edem larinksa, anafilaktični šok). Kasneje se lahko pojavi tudi poslabšanje AD (znak kasne reakcije). Zelo redko se ob izpostavitvi alergeni hrani pojavijo le znaki kasne reakcije (poslabšanje AD). V primeru jasnih znakov alergijske reakcije po izpostavitvi hrani je potrebno dotično hrano izločiti iz otrokove prehrane. V kolikor obstaja dvom glede smotnosti diete, opravimo provokacijski test pod nadzorom alergologa.

Diete nikoli ne uvajamo samo na podlagi dokaza IgE senzibilizacije (pozitivni kožni ali krvni testi), sploh če otrok omenjeno hrano uživa brez težav. Nepotrebne diete dodatno zmanjšajo kvaliteto življenja in lahko vodijo v prehranske primanjkljaje. V zadnjem času je tudi postalo očitno, da neprimerna izločitev hrane iz otrokove diete ne zmanjša, ampak celo poveča tveganje za razvoj alergije na to hrano, saj negativno vpliva na razvoj oralne tolerance, ki se razvija v črevesju.

Da je koža primaren organ kjer poteka senzibilizacija na alergene dokazujejo številne raziskave. Pri novorojenčkih so že v prvih tednih življenja prikazali povečano izgubo vode preko kože (t.i. transepidermalna izguba vode), kar kaže na dejstvo, da je motena barierna funkcija kože prisotna zelo zgodaj, že pred začetkom klinične slike AD. Povečana transepidermalna izguba vode v starosti 2 dni v raziskavah pozitivno korelira z razvojem alergije na hrano pri 2 letih.

Iz teorije motene barierne funkcije kože in posledičnega razvoja senzibilizacije in alergije izhajajo novejšje hipoteze glede možnosti preprečevanja AD in alergij preko intervencij za izboljšanje kožne bariere. Nekatere raziskave so že prikazale, da lahko z rednim preventivnim mazanjem suhe kože z negovalnimi mazili zgodaj v življenju izboljšamo barierno funkcijo in zmanjšamo verjetnost za pojav AD in senzibilizacije na alergene. Druge študije proučujejo učinek zgodnjega agresivnega (»proaktivnega«) zdravljenja AD (v primerjavi s standardnim »reaktivnim« zdravljenjem) na pojav senzibilizacije in alergije na hrano.

SPODBUJANJE ORALNE TOLERANCE Z ZGODNJIM UVAJANJEM ALERGENE HRANE

V zadnjem času je prišla v ospredje t.i. »hipoteza dvojne izpostavitve alergenu«. Po tej teoriji se senzibilizacija na hrano razvije s pomočjo izpostavitve alergenu preko okvarjene kože (predvsem pri otrocih z AD), medtem ko se oralna toleranca vzpostavlja preko imunskega sistema v gastrointestinalnem traktu. Najbolj ogroženi za razvoj senzibilizacije na hrano so torej tisti dojenčki, ki živijo v okolju kjer je alergen prisoten v njihovi okolici, sami pa tega alergena na uživajo.

V času, ko so smernice svetovale izogibanje alergeni hrani (npr. uvajanje jajc po 1 letu, arašidov in rib po 3 letu), se je incidenca alergije na hrano močno povečala. Raziskave so pokazale, da imajo otroci, ki alergeno hrano (npr. jajca, arašide) začnejo uživati prej, manjšo verjetnost za razvoj alergije. Leta 2008 so se tako smernice močno spremenile in so predlagale uvajanje vse hrane (vključno s potencialnimi alergeni) med 4 in 6 mesecem starosti, prav tako niso več priporočali preventivnih diet za nosečnice in doječe mame.

Leta 2015 so bili objavljeni rezultati prelomne LEAP študije, ki je jasno prikazala, da zgodnje uvajanje arašidov (med 4 in 10 mesecem starosti) pri rizičnih otrocih bistveno zmanjša verjetnost za pojav alergije na arašide kasneje v življenju (pri 5 letih). Kasneje so podobne rezultate prikazale tudi nekatere raziskave, ki so proučevale zgodnje uvajanje jajc (PETIT študija).

Kot posledica teh raziskav v zadnjih letih sedaj aktivno spodbujamo zgodnje uvajanje alergene hrane (jajce, arašidi, drevesni oreščki) čimprej po 4 mesecu starosti pri rizičnih dojenčkih (predvsem tistih z zmerno-težko obliko AD) kot metodo promoviranja oralne tolerance. Otroci z blagim AD lahko začnejo uživati alergeno hrano brez predhodnega alergološkega testiranja, medtem ko pri zmernem-težkem AD priporočamo pred prvo uvedbo pregled pri alergologu in alergološko testiranje. V primeru že prisotne senzibilizacije uvedemo hrano pod nadzorom preko t.i. provokacijskega testa. Istočasno spodbujamo starše, da pogosto in redno uporabljajo negovalne kreme in da hitro in agresivno zdravijo zagone dermatitisa, saj bodo s tem zmanjšali verjetnost za senzibilizacijo.

LITERATURA

1. Huiwen Tham E et al. Epicutaneous sensitisation to food allergens in atopic dermatitis: What do we know? *Pediatr Allergy Immunol* 2019, 00:1-12.
2. Huiwen Tham E et al. Mechanisms by which atopic dermatitis predisposes to food allergy and the atopic march. *Allergy Asthma Immunol Res* 2019, 11(1):4-15.
3. Lowe AJ et al. The skin as a target for prevention of the atopic march. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2018, 120:145-151.
4. Greer FR. et al. The Effects of Early Nutritional Interventions on the development of Atopic Disease in Infants and Children: The Role of Maternal Dietary Restriction, Breastfeeding, Hydrolyzed Formulas, and Timing of Introduction of Allergenic Complementary Foods, *Pediatrics* 2019, 143(4).
5. Du Toit G et al. Randomized trial of peanut consumption in infants at risk of peanut allergy. *N Engl J Med* 2015, 372:80-8013.
6. Natsume O et al. Two-step egg introduction for preventing of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017, 389(10066):276-286.
7. Fleischer DM et al. Consensus communication on early peanut introduction and the prevention of peanut allergy in high-risk infants. *J Allergy Clin Immunol* 2015, 136:258-61.
8. Togias A. et al. Addendum guidelines for the prevention of peanut allergy in the United States: Report of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol* 2017, 139:29-44.

MEJNA VREDNOST ČETRTE KOMPONENTE KOMPLEMENTA (C4) ZA NAMEN DETEKCIJE BOLNIKOV S HEREDITARNIM ANGIOEDEMOM

Živa Zaletel¹, Benjamin Jonke², Matija Rijavec³, Mitja Košnik^{1,3}

¹Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

²Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana Slovenija

³Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik, Slovenija

UVOD

Hereditarni angioedem (HAE) je redka, lahko življenje ogrožajoča dedna bolezen, za katero so značilne ponavljajoče se epizode otekanja okončin, trebuha, obraza, črevesne stene in zgornjih dihal brez urtik. Pomembno je razlikovanje HAE od drugih vrst angioedemov (AE), saj se zdravljenje razlikuje. Kadar je vzrok znižana koncentracija ali aktivnost C1 inhibitorja (C1-INH), govorimo o HAE zaradi pomanjkanja C1-INH (C1-INH-HAE) (1,2). Otekanje črevesne sluznice značilno povzroči količine bolečine v trebuhu, slabost, bruhanje in drisko, otekanje v področju grla pa lahko vodi celo v zadušitev. Diagnozo postavimo z meritvijo koncentracije C4 ter koncentracije in/ali aktivnosti C1-INH (1).

Opisi primerov kažejo, da imajo bolniki z znanim C1-INH-HAE lahko občasno tudi normalno koncentracijo C4. Že leta 2004 je Karim s sodelavci opisal primer deklice s pozitivno družinsko anamnezo za HAE, ki je imela ob epizodah otekanja okončin z bolečinami v trebuhu normalno koncentracijo C4, koncentracija C1-INH pa je bila znižana (3). Tudi leta 2007 so Tarzi in sodelavci opisali posamezne primere bolnikov s C1-INH-HAE, ki so imeli normalne serumske koncentracije C4. V obeh raziskavah so prišli do zaključka, da bi bilo ob anamnezi, sumljivi za C1-INH-HAE, ne glede na koncentracijo C4, potrebno izmeriti še serumsko koncentracijo in aktivnost C1-INH (3,4). V literaturi ni jasnega stališča, pri kateri mejni vrednosti C4 bi lahko C1-INH-HAE vseeno zanesljivo izključili (1,2,3,4).

NAMEN

V Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Klinike Golnik je obstoječa mejna postavljena glede na razporeditev koncentracije C4 pri splošni populaciji Evropejcev.

V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali je mejna koncentracija C4 0,16 g/l postavljena prenizko ter ali bi jo bilo potrebno dvigniti na 0,21 g/l. Ugotavljali smo tudi, če je pri koncentraciji C4 > 0,21 g/l smiselno določati še koncentracijo in/ali aktivnost C1-INH, ali že sama vrednost C4 > 0,21 g/l z zadostno verjetnostjo izključi C1-INH-HAE.

METODE

Retrospektivno smo zbrali podatke bolnikov z anamnezo, sumljivo za HAE, ki so imeli v zadnjih 19 letih na Kliniki Golnik izmerjeno koncentracijo C4 0,16–0,21 g/l, jih kontaktirali preko pošte in telefona ter jim iz shranjenega ali ponovno odvzetega vzorca določili koncentracijo in aktivnost C1-INH.

Retrospektivno smo pridobili še podatke o koncentraciji C4 ter o koncentraciji in aktivnosti C1-INH bolnikov s potrjenim C1-INH-HAE s področja Slovenije, Srbije, Hrvaške in Severne Makedonije.

Prospektivno smo od oktobra 2018 vključili zaporedne bolnike z anamnezo AE brez urtik in vsem izmerili koncentracijo C4 ter koncentracijo in aktivnost C1-INH. Preverili smo, če je med bolniki s koncentracijo C4 > 0,21 g/l kakšen s C1-INH-HAE.

REZULTATI

V retrospektivnem delu analize bolnikov z anamnezo, sumljivo za C1-INH-HAE, smo med 27 bolniki našli eno bolnico z znižano koncentracijo C1-INH (0,16 g/l) in znižano aktivnostjo C1-INH (33%) ter postavili visok sum na C1-INH-HAE. Našli smo tudi eno bolnico z mejno znižano aktivnostjo C1-INH (44%), pri kateri bi bila za potrditev suma potrebna ponovna meritev aktivnosti C1-INH. Če bi bila pri ponovni meritvi aktivnost C1-INH mejno znižana (41–67 %) ali znižana (≤ 40 %), bi diagnozo C1-INH-HAE potrdili.

V bazi podatkov bolnikov s potrjenim C1-INH-HAE s področja Slovenije, Srbije, Hrvaške in Severne Makedonije smo našli dva s koncentracijo C4 0,16 g/l.

V prospektivnem delu analize med 90 bolniki s koncentracijo C4 > 0,21 g/l nismo našli nobenega z znižano koncentracijo ali aktivnostjo C1-INH. Pri tej skupini bolnikov smo potrdili pozitivno korelacijo med koncentracijo C4 in koncentracijo C1-INH (Pearsonova analiza, $p < 0,0001$).

Tabela 1	Število meritev [C4] v g/l	Povprečna vrednost [C4] v g/l	Standardni odklon [C4] v g/l	Razpon [C4] v g/l	Razpon [C1-INH] v g/l	Razpon % aktivnosti C1-INH
Bolniki z anamnezo sumljivo za HAE in [C4] med 0,16 in 0,21 g/l	27	0,18	0,013	0,16–0,20	0,16–0,42 ^A	33–124 ^B
Bolniki s področja Slovenije, Srbije, Hrvaške in Severne Makedonije s potrjenim C1-INH-HAE (5)	150	0,07	0,03	< 0,05–0,16 ^C	< 0,05–0,73	0–64
Bolniki s [C4] > 0,21 g/l od 2.10.2018 do 19.7.2019	90	0,33	0,15	0,22–1,54	0,20–0,49	74–118

Legenda: [C4] = koncentracija C4, [C1-INH] = koncentracija C1-INH.

^AEna bolnica s [C4] 0,16 g/l je imela znižano [C1-INH] (< 0,20 g/l).

^BBolnica z znižano [C1-INH] je imela tudi znižan % aktivnosti C1-INH (≤ 40 %), ena bolnica je imela mejno znižan % aktivnosti C1-INH (41–67 %).

^CDva bolnika sta imela [C4] 0,16 g/l.

ZAKLJUČKI

Ugotovili smo, da je obstoječa mejna vrednost C4 0,16 g/l, postavljena glede na razporeditev koncentracije C4 med splošno populacijo Evropejcev, za namen odkrivanja HAE postavljena prenizko. Na osnovi vrednosti C4 med 0,16–0,21 g/l bolezni ne moremo z gotovostjo izključiti, kar dokazuje 1 bolnica iz retrospektivnega dela raziskave s koncentracijo C4 0,16 g/l, ki je imela znižano koncentracijo in aktivnost C1-INH ter 2 bolnika s področja Slovenije, Srbije, Hrvaške in Severne Makedonije s potrjenim C1-INH-HAE, ki sta imela koncentracijo C4 0,16 g/l. Bolj smiselna se zdi postavitev mejne vrednosti C4 glede na populacijo bolnikov s C1-INH-HAE. Z analizo podatkov bolnikov s potrjenim C1-INH-HAE s področij Slovenije, Srbije, Hrvaške in Severne Makedonije smo dokazali, da je pri koncentraciji C4 > 0,21 g/l verjetnost C1-INH-HAE zanemarljiva (1 na 147.160 bolnikov). Sklepamo, da bi morali referenčno vrednost C4 za namen odkrivanja C1-INH-HAE dvigniti na 0,21 g/l. Glede na naše rezultate tudi menimo, da merjenje koncentracije in aktivnosti C1-INH pri vrednosti C4 > 0,21 g/l ni potrebno, saj je verjetnost bolezni izredno majhna. To je razvidno iz razporeditve vrednosti C4 iz retrospektivnega dela analize pri bolnikih s širše regije ter iz prospektivnega dela analize, kjer med bolniki z anamnezo AE brez urtik nismo našli niti enega s koncentracijo C4 > 0,21 g/l, ki bi imel C1-INH-HAE.

VIRI

1. Banerji A. Hereditary angioedema: classification, pathogenesis, and diagnosis. *Allergy Asthma Proc.* 2011; 32 (6): 403–7.
2. Misra L, Khurmi N, Trentman TL. Angioedema: Classification, management and emerging therapies for the perioperative physician. *Indian J Anaesth.* 2016; 60 (8): 534–41.
3. Karim Y, Griffiths H, Deacock S. Normal complement C4 values do not exclude hereditary angioedema. *J Clin Pathol.* 2004; 57: 213–4.
4. Tarzi MD, Hickey A, Förster T, et al. An evaluation of tests used for the diagnosis and monitoring of C1 inhibitor deficiency: normal serum C4 does not exclude hereditary angio-oedema. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149 (3): 513–6.
5. Rijavec M, Košnik M, Zidarn M, et al. Hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency in south-eastern Europe: SERPING1 mutations and genetic factors modifying the clinical phenotype. *European Human and Genetics Conference (ESHG); 2019 Jun 15–18; Gothenburg, Sweden; 2019.*