

БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
BULGARIAN ASSOCIATION FOR CLINICAL IMMUNOLOGY



Годишник на БАКИ 2009



**Издателство „Лице“
София, 2010**

СЪДЪРЖАНИЕ

О Т Ч Е Т на Управителния съвет за дейността на сдружение „Българска асоциация по клинична имунология“ през 2009 година	5
ПРИЛОЖЕНИЕ НА IVIG's ПРИ ИМУНОДЕФИЦИТНИ СЪСТОЯНИЯ <i>Проф. д-р Елисавета Наумова</i>	15
ИНТРАВЕНОЗНА ГАМА-ГЛОБУЛИНОВА ТЕРАПИЯ ПРИ РЕПРОДУКТИВНИ НЕУСПЕХИ <i>доц. д-р Емилияна Конова, д., д-р Катя Тодорова, д., д-р Алкан Емин, д-р Цветан Луканов, д.</i>	19
МОДИФИЦИРАНИ ИВИГ ПРЕПАРАТИ С УСИЛЕНИ ИМУНОМОДУЛИРАЩИ И ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛНИ СВОЙСТВА <i>Иглика К. Джумерска-Алексиева, Чавдар Л. Василев</i>	28
БЕЗОПАСНОСТ НА ИМУНОВЕНИН-ИНТАКТ 5% IgG <i>Ил. Бинева, Ю. Начева</i>	34
НЕЖЕЛАНИ ЕФЕКТИ ОТ ЛЕЧЕНИЕТО С ИНТРАВЕНОЗНИ ИМУНОГЛОБУЛИНОВИ ПРЕПАРАТИ <i>М. Балева и К. Николов</i>	40
ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПУЛС-ТЕРАПИИ С ИНТРАВЕНОЗЕН ИМУНОГЛОБУЛИН ПРИ БОЛНИ СЪС СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС <i>Р. Рашков, В. Решкова</i>	48
НАСЛЕДСТВЕН АНГИОЕДЕМ – КЛИНИКА, ДИАГНОЗА, ТЕРАПИЯ <i>К. Николов и М. Балева</i>	51
СХЕМИ 1, 2, 3 НА ВОК ПО ИМУНОЛОГИЯ: ИМУНОГЛОБУЛИНИ, КОМПЛЕМЕНТ, СРП, АВТОАНТИТЕЛА, HLA-B27 – НАШИЯТ ПЕТГОДИШЕН ОПИТ <i>А. Михайлова, П. Бонева, М. Димитрова, Д. Йорданова, Е. Наумова</i>	56

ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО
НА ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ
В БЪЛГАРИЯ, 2009

Мария Николова 65

ИНФОРМАЦИЯ

за проведената работна среща

„Редките болести във фокуса на имунологията“ 73

УКАЗАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ 75

ОТЧЕТ

*На Управителния съвет за дейността на сдружение
„Българска асоциация по клинична имунология“
през 2009 година*

I. ОРГАНИЗАЦИОННА ДЕЙНОСТ НА СДРУЖЕНИЕТО

1. Членство

В сдружение „Асоциация по клинична имунология“ членуват 41 лекари и специалисти с немедицинско образование, разпределени, както следва:

- 34-ма лекари със специалност клинична имунология,
- 4-ма биолози със специалност лабораторна имунология,
- 3-ма лекари, работещи в областта на клиничната имунология.

Анализът на членския състав на сдружението показва, че **80,5%** от лекарите със специалност клинична имунология са членове на АКИ. Твърде малък е броят на специалистите с немедицинско образование, работещи в областта на клиничната имунология, въпреки че съществуват предпоставки за тяхното участие.

Новоприети членове през отчетния период – 5-има лекари.

Необходима е по-голяма активност от страна на членовете на асоциацията за привличане на нови членове със специалност лабораторна имунология и млади хора, специализиращи в областта на имунологията. За последните беше взето решение от общо събрание през 2007 г. – 30 лева + 20 лева встъпителна вноска.

2. Проведени заседания на УС на Асоциацията по клинична имунология.

През отчетния период са проведени 5 заседания на УС – 20.03.2009; 08.06.2009; 18.06.2009; 04.09.2009; 13.11.2009, 15.12.2009. Две от заседанията са проведени съвместно с членовете на Експертния съвет по имунология поради сходните проблеми за обсъждане. Протоколите от тези заседания са в протоколната книга на сдружението.

3. Проведени конференции

3.1. Девета международна конференция, посветена на новостите в имунотерапията и напредъка в разработката и приложения на ваксините срещу рака (PIVAC-9), която се проведе на 8 – 10 октомври 2009 г., хотел „Хилтън“ – София, България.

Известни специалисти от Европа и САЩ изнесоха лекции, посветени на този изключително важен и бързо развиващ се клон от медицината, даващ надежда на десетки хиляди болни за животоспасяващо лечение.

Трима млади учени бяха наградени за най-добър постер и получиха грамота и парична награда от EACR. Научната програма включваше 20 пленарни лекции, 10 устни съобщения и 30 постерни презентации. Присъстваха над 100 участници от Европа, САЩ, Аржентина, Корея. За съжаление българското представяне беше слабо, което показва спадналият интерес на медицинската ни общност към новостите в научноизследователската дейност. По време на конференцията се създадоха интересни и полезни контакти с чуждестранните ни колеги. Участниците дадоха изключително висока оценка за организацията, научната и социалната програма.

3.2. Четвърта национална конференция за оценка на качеството в имунологията, която се проведе на 17.12.2009 г., София (резюме ще бъде включено допълнително). В програмата на БАКИ беше предвидено конференцията да се проведе в гр. Трявна. След проучване на възможностите и по преценка на проф. Мартинова се реши, че сезонът не е подходящ за посещение в гр. Трявна.

4. Секция „Поточна цитометрия“

Секцията „Поточна флоуцитометрия“ към БАКИ организира **цикъл от теоретични и практически курсове** за популяризиране на флоуцитометрията като научноизследователски и клиничен метод в България. Курсовете се провеждаха в Центъра за аналитична цитометрия към Националната референтна лаборатория по имунология в НЦЗПБ. Във връзка с това беше създадена отделна **уебстраница** (към сайта на НЦЗПБ) с подробна информация за структурата, целите и дейността на центъра.

Бяха проведени три теоретични курса **ВЪВЕДЕНИЕ ВЪВ ФЛОУЦИТОМЕТРИЯТА** (3 дни, общо 18 учебни часа: 30.03-01.04, 02 – 04.04, 18 – 20.05) и три практически курса **ФЛОУЦИТОМЕТРИЧЕН ИМУНОФЕНОТИПЕН АНАЛИЗ** (3 дни, общо 18 учебни часа: 26 – 28.05; 01-03.06 и 29.09-1.10). Теоретичната програма включваше история и приложения на флоуцитометрията; основни флоуцитометрични методи, основи на клиничната флоуцитометрия, принципи на флоуцитометричния анализ и публикуване на резултатите. Практическият курс включваше принципи на работа със среден клас флоуцитометър, усвояване на методи за имунофенотипизация на левкоцитни популации в цяла кръв и анализ с клиничен и експериментален софтуер. Целта на организаторите беше преди всичко да предизвикат интерес и идеи за възможностите за използване на флоуцитометрията сред представители на възможно най-широк кръг от научни области и медицински специалности и тя беше реализирана. Участваха предимно млади научни работници, докторанти и специализанти от различни институти на БАН (ИБИРР, Института по молекулярна биология, Централна лаборатория по обща екология, Институт по зоология, Институт по биофизика, ИЕПП); Институт по рибарство и аквакултури – Пловдив, от Биологическия факултет на СУ; от факултетите по медицина и дентална медицина на МУ в София, Пловдив и Варна, Националният център по радиобиология и радиационна защита, София, НДНИВМИ – София, частни медицински и ветеринарномедицински центрове и клиники в София, Пазарджик и пр. Общо 77 души преминаха на теоретично обучение и 18 – на практическо. Проявеният интерес беше неочаквано голям и ограниченият брой на местата налага този цикъл да продължи и през следващата година.

Показателен е и фактът, че много от участниците в курсовете продължават да ни търсят за съдействие във връзка с конкретни експериментални задачи, научни разработки и проекти. В тази посока имаме успешно сътрудничество с катедра „Биология“ на МУ в Пловдив, катедра „Цитология, хистология и ембриология“ на Биологическия факултет – СУ, Агробиоинститута в София и пр.

Трябва да се подчертае, че организирането и провеждането на всички курсове се осъществи с ценната подкрепа на BD Biosciences и „Диамед“ – България.

Секцията „Поточна флоуцитометрия“, BD Biosciences и „Диамед“ организираха и курс за опитни флоуцитометристи, посветен на дигиталните софтуерни платформи за анализ (BD FACSCanto II, BDFACSDiva), който се проведе от 10 до 13.02.09 в НЦЗПБ от Иржи Шинкора, BD.

През тази година секцията по флоуцитометрия се опита да популяризира европейската инициатива за сътрудничество в областта на флоуцитометрията **European Cytometry Network**. За целта секцията „Поточна цитометрия“ при БАКИ стана колективен член на ECN и разпространи сред българските флоуцитометристи покана с e-mail адрес, който дава достъп до сайта на мрежата. Сайтът е изключително полезен източник на информация (протоколи, учебници в електронен вид, информация за курсове, дискуссионни форуми, групи по интереси и пр.) във всички области на флоуцитометричните изследвания.

II. ПУБЛИКАЦИОННА ДЕЙНОСТ

Излезе от печат втори брой на годишника на БАКИ, в който е представена дейността на БАКИ през 2008 година. Основна заслуга за това има редакционният съвет с председател проф. Балева и членове доц. Попова и доц. Балтаджиева. Представени са нови имунологични звена. Публикувани са доклади, изнесени на конференции, проведени през 2007 и 2008 година.

III. ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО

През 2009 г. са проведени всички предвидени схеми за ВОК по имунология, както следва:

Схема 1 за определяне на имуноглобулини (Г, А, М, Е), С3 и С4 фракции на комплемента, СРП – 3 цикъла с по 2 проби.

Схеми 2А (АНА и анти-ДНК антители), 2Б (ЕНА антители); 2В (АНЦА), 2Д – антикардиолипинови и β 2-GP антители – 1 цикъл с по 2 проби.

Схема 3 – определяне на HLA-B27 – 1 цикъл с 6 проби.

Схема „Определяне на процент и абсолютен брой на левкоцитни популации“ – 1 цикъл с по една проба за определяне на левкоцитни субпопулации, нисък брой CD4+ клетки и стволови клетки.

В схемата за имунофенотипизиране за 2009 г. са участвали 15 звена за определяне на левкоцитни популации, 7 – за нисък брой CD4+ клетки, и 9 – за стволови клетки.

Във ВОК за определяне показателите на хуморалния имунен отговор за 2009 г. са участвали 24 лаборатории. Съгласно решение на Общото събрание от 2008 г. през тази година бе включен нов показател към схема 1 – общ ИгЕ, който е определен от 10 лаборатории. В качествения контрол за определяне на HLA-B27 от

България са участвали 7 лаборатории, а от Балканския регион (Гърция, Република Македония, Румъния и Турция) – 8.

Всички цикли бяха проведени съгласно предвидения проектографик, с изключение на схема 3. Набирането на подходящи доброволни донори продължава да създава затруднения за своевременното провеждане на схема 3. От друга страна, за страните от Балканския регион ВОК за HLA-B27 се съчетава с този за определяне на алоантитела. По-късното получаване на контролните серуми за този показател е допълнителна причина за неспазване на графика. При провеждане на ВОК през 2009 г. продължи да съществува проблемът с количеството контролни материали. Независимо че бяха заявени достатъчни количества, поради ограничения в максималния брой проби, които INSTAND може да предостави, материалът за всички показатели от схема 2 (автоантитела) се оказа крайно недостатъчен. Това наложи индивидуално разпределение на количествата за отделните лаборатории в зависимост от използвания от тях метод, за да могат всички заявили участие да изработят пробите. За преодоляване на този проблем организаторите на базата на 5-годишния опит обсъждат като възможност използването на собствени проби за провеждане на някои от схемите за автоантитела. Съгласно решението на Общото събрание от 2008 г. куриерската служба за схеми 1 и 2 бе сменена, а пробите за София се вземаха от участващите лаборатории. В резултат всички контролни материали бяха получени навреме.

Схемата на ВОК за имунофенотипизиране е с валидност юли 2009 – юли 2010, поради това всички участници са получили индивидуалните резултати и сертификатите. За останалите схеми индивидуалните резултати ще бъдат изпратени заедно със сертификатите.

V. ИНТЕРНЕТ СТРАНИЦА

През отчетния период:

- се извършва ежедневен преглед на електронната поща на асоциацията;
- публикува се информация за научните форуми през отчетната 2009 година;
- изготвена е страница на английски език с представяне на асоциацията;
- изработени са връзки към български и международни източници на професионална информация и нормативна база;
- публикувани са информационните листовки, с които се популяризира дарителството на костен мозък и стволови клетки от пълна връв в рамките на Националната програма за развитие на трансплантацията на стволови клетки в Р. България през 2007-2013 година.

VI. МЗ-НЗОК-НРД-БЛС

1. БЛС

По искане и съгласно критериите на БЛС са направени предложения за състав на:

- експертна група по специалността „Клинична имунология“,
- група по договаряне с координатор проф. Марта Балева.

Във връзка с това взеха участие в заседанията на БЛС на 18.06.2009 г.

Реши се да се разработят и алгоритми за профилактика и ранна диагноза на имунодефицитите.

Предложения за изменения и допълнения към Наредба №39:

– **приложение № 4** към чл.12, ал.1 (Доп. – ДВ, бр. 60 от 2009 г., в сила от 1.01.2010 г.) – списък на заболяванията, при които децата подлежат на диспансеризация;

– **приложение № 5** към чл.12, ал.2 (Доп. – ДВ, бр. 102 от 2005 г., в сила от 1.01.2006 г., бр. 60 от 2009 г., в сила от 1.01.2010 г.) – списък на заболяванията, при които лицата над 18 години подлежат на диспансеризация;

– **приложение № 6** към чл.12, ал.5 (Доп. – ДВ, бр. 60 от 2009 г., в сила от 1.01.2010 г.) – списък на заболяванията при децата, за които Националната здравноосигурителна каса заплаща;

– **приложение № 7** към чл.12, ал.6 (Доп. – ДВ, бр. 102 от 2005 г., в сила от 1.01.2006 г., доп. бр. 60 от 2009 г., в сила от 1.01.2010 г.) – списък на заболяванията при лица над 18 години, за които Националната здравноосигурителна каса заплаща.

Предложения за изменения и допълнения към Наредба №40:

– Включване на разширен набор изследвания в Наредба № 40, приложение № 2, т. II „Специализирани и високоспециализирани имунологични изследвания“.

– Включване в приложение № 4 на Наредба № 40/2004 към член единствен „Високоспециализирани медицински дейности, извършвани в болнични лечебни заведения и лечебни заведения от специализираната извънболнична помощ с легла за краткосрочно наблюдение и лечение“ следните процедури в „случай с едноревен болничен престой“ и „болничен амбулаторен случай“.

– В приложение № „Високоспециализирани медицински дейности, извършвани в лечебни заведения за болнична помощ с легла за краткосрочно наблюдение и лечение“ да се добави:

т. 30 – Инфузия на венозен имуноглобулинов препарат,

т. 31 – Инфузия на С1 естеразен инхибитор.

– Към клинични пътеки №251 и №252 – „Необходими специалисти“, да се добави: Лекар със специалност „Клинична имунология“.

– Предложение за 3 нови клинични пътеки:

– В приложение №8 – Пакет дейности при диспансеризирани деца по групи заболявания.

– Приложение №9 – Пакет дейности при диспансеризирани пациенти над 18 г. по групи заболявания.

– В приложение № 2 и №4 на Наредба № 40/2004 да се промени номенклатурата на специалността „Имунология“ с „Клинична имунология“ съгласно Наредбата за изменение и допълнение на Наредба №31 (ДВ, бр. 64 / 2001) и приложение № 2 към §10.

2. МЗ

- Предложение за изменение и допълнение на Наредба №38 – към списъка заболявания, за които НЗОК заплаща напълно или частично лечението, да бъде включен и Дефицитът на С1 естеразния инхибитор (код D 84.1. по МКБ-10).

- Предложение за включване на медикамента Danazol в позитивния лекарствен списък.

- Предложение за включване на първичните имунни дефицити в Наредба № 34:

- имунодефицитите с преобладаващ недостиг на антитела с кодове D 80 по МКБ10;

- дефицит на С1 естеразния инхибитор (C1-INH) код D 84.1. по МКБ-10.

Резултати: В ПЛС е включен имуновенин интакт.

Следваща стъпка: Приемане на клинична пътека и/или включване на имунодефицитите в Наредба №34. Проведен е разговор с г-жа Пантова – началник-кабинет на министър Нанев, съвместно с председателя на сдружението на пациентите с имунодефицити отец Стоил за намиране най-бързото и рационално решение на проблема. След разговор със зам.-министър проф. Власковска се подготвя включване на пътеката „Имунодефицити “ в Наредба № 40.

VII. ВРЪЗКИ С ДРУГИ СХОДНИ ОРГАНИЗАЦИИ

- Среща „Отворени врати за имунологична терапия на туморите“, 30-31 октомври 2009, организирана от фондация Nasumi, посветена също на биоимунитета на рака. По покана на проф. Черноземски , г-н Николай Черноземски и акад. Петрунов проф. Наумова изнесе доклад, резюмиращ научната програма на RIVAC9 конференцията. Така се направи мост между двете сходни организации и се постави началото на сътрудничество.

- Проф. Е. Наумова участва в кръгла маса – Трета национална конференция „Трансфузионна терапия и алтернативи на кръвопреливането в хирургичната практика“, Хисаря, 6-7 ноември, 2009 г., с доклад на тема „Приложение на IVIG’ s при имунодефицитни състояния“, с организатор проф. Мартинова. Обсъдиха се възможности за съвместна работа с педиатри от III Градска болница и Пловдив-детска онкохематология по започнатия регистър на ПИД и клиничните пътеки.

- Проф. Алтънкова е представител за България в имунологичната секция на UEMS.

- Проф. И. Алтънкова като отговорник от Асоциацията за връзките с международните организации взе участие във Втория конгрес по имунология в Берлин, за да направи контакти с ръководството на EFIS и Европейската група по клинична имунология (SIG) от името на БАКИ.

Цел на участието:

1. Да се влезе във връзка с европейски структури по имунология и клинична имунология.

2. Да се срещне с д-р Вене.

3. Да се запознае с новостите в имунологията.

Организатори на конгреса – европейски асоциации EFIS, ESID, UCLA и други национални асоциации по имунология – германска, холандска, френска, английска и др, както и FOCIS. Участие на много фирми със симпозиуми за имунологични болести, прилагане на техни лекарства и други имунологично свързани теми.

Научна програма – повече от 30 симпозиума и 60 workshops, в това число и пан-европейски образователен курс за млади участници, на който са представени основни и приложни аспекти на имунологията. Представени са не по-малко от 1500 пленарни лекции и устни презентации и огромен брой постери.

Участници – 4000-5000.

Проф. Алтънкова е предоставила в БАКИ подробен доклад за участието си.

В ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Управителният съвет на БАКИ смята, че заложеното в програмата за дейността на сдружението за 2009 г. е изпълнено. В резултат на направения задълбочен анализ на настоящото и бъдещото развитие на нашата общност са набелязани следващи стъпки, които да залегнат в програмата за 2010 година.

ОБОБЩЕНИЕ ЗА ЧЕТИРИГОДИШНИЯ МАНДАТ НА УС:

Експертният съвет по имунология на 08.07.2005 година взе решение за учредяване на Асоциация по клинична имунология.

Софийски градски съд на основание чл. 18 от Закона за юридическите лица с нестопанска цел с решение на 18.10.2005 г. вписа в регистъра за юридически лица с нестопанска цел сдружение с наименование „Асоциация по клинична имунология“, преименувана в Българска асоциация по клинична имунология през 2008 г. с ЦЕЛИ:

1. да обединява и подпомага членуващите в нея имунолози за постигане на общите им задачи;
2. да създава условия за професионално развитие и изява на своите членове;
3. да популяризира новостите в областта на клиничната имунология;
4. да съдейства за развитието на клиничната имунология в България;
5. да съдейства за издигане ролята и значението на клиничната имунология в медицината;
6. да подпомага работещите в областта на клиничната имунология в диалога и взаимоотношенията им с местната и централна власт, както и с БЛС и НЗОК.

Какво е направено:

- Обединени са 81% от имунолозите.
- Създаде се интернет страница, която има за цел да:
 - информира членовете на сдружението за предстоящи и проведени форуми в областта на имунологията и медицината у нас и в чужбина;
 - популяризира дейността на сдружението и да привлича нови членове;
 - дава възможност за свързване с полезни страници в областта на имунологията;
 - дава информация за дейностите на имунологичните звена в България.

- Имунологичната общност е разпозната от МЗ, НЛС, НЗОК в резултат на това:
 - От разработените 3 клинични пътеки едната е в процес на включване в Наредба № 40 и респективно в НЗОК.
 - Включен е Имуновенин интакт в позитивния лекарствен списък.
 - Установена е тясна колаборация с Националната програма за редки болести с оглед включване на наследствения ангиоедем в Наредба № 34 за безплатно домашно лечение
 - Създаде се Национална система за ВОК по имунология, обхващаща почти всички рутинни имунологични изследвания, което подобри качеството на имунологичните тестове и позволи на имунологичните звена да сключват договори с НЗОК.
 - Учреди се секцията „Поточна цитометрия“ към БАКИ, която стана член на ISAC и ECN.
 - Тясна колаборация със секцията по имунология при СУБ, вкл. съорганизиране на националния конгрес по имунология и честване на деня на имунологията.
 - Участие в работата на UEMS.
 - Учредени награди и стипендии с цел подпомагане на професионалното развитие и излявя на членовете на сдружението.

УС благодари на всички членове на сдружението за активната и ползотворна работа през изминалата 2009 година и четиригодишния период от създаване на БАКИ за повишаване и утвърждаване авторитета на Българската асоциацията по клинична имунология.

Пожелаваме на новото ръководство да продължи положителната тенденция в развитието на сдружението и поддържане на авторитета на Българската асоциация по клинична имунология в национален и международен план.

ПРОГРАМА

за дейността на сдружение „Българска асоциация по клинична имунология“ през 2010 година

1. Провеждане на заседание на УС на 3 месеца, а при необходимост по-често.
2. Оптимизиране организацията на основните дейности на БАКИ:
 - 2.1. WEB страница на асоциацията
 - През 2010 г. ще продължи отразяването на дейността на БАКИ, в т.ч. информация за национални и международни форуми в областта на имунологията, трансплантология, печатни издания и други новини.
 - Ще продължи обогатяването на web страница на английски език.
 - Ще продължи да се публикува представянето на имунологични звена след новопостъпваща информация.
 - Ще се актуализират връзките към сродни организации след новопостъпили предложения.

– Публикуване на списък от налична специализирана литература в библиотеката на НЦЗПБ, УМБАЛ “Александровска“ и др.

– Разширяване на списъка от връзки към източници на професионална информация и нормативна база, в т.ч. и връзки към електронни издания на специализирана литература.

– Откриване на дискусия за проблемни случаи в клиничната имунология.

– Създаване подраздел в уебстраницата на БАКИ с информация за секция „Поточна флоуцитометрия“.

– Ежедневно проверяване на електронната поща.

2.2. Медицински стандарти – актуализиране

2.3. ВОК – нови параметри. Актуализиране на ВОК

3. Пета Национална конференция за оценка на качеството в имунологията – декември 2010 г.

4. Плевенски имунологични дни, Международен ден на имунологията, Пролетно училище по репродуктивна медицина, Пета работна среща „Репродуктивна медицина 2010 – противоречия и консенсус“, 29 април – 1 май 2010 – Плевен.

5. Организиране на курсове за професионална квалификация и сертифициране на високоспециализирани дейности в имунологията съвместно с ЕС по имунология. Проф. Мартинова да изготви програмата.

6. Участие на проф. Алтънкова в срещите на UEMS.

7. Годишна среща на секцията „Поточна флоуцитометрия“ към БАКИ на 31.05 в рамките на Balkan Flowusers’ meeting, организиран от BD Biosciences от 1 до 03.06.2010 г. в Ровини, Хърватска.

Дневен ред:

1. Флоуцитометрични изследвания в онкохематологията: стандарти и новости.

2. Референтни стойности за флоуцитометричните показатели в България.

3. Организационни въпроси.

Провеждане на работен обяд с ръководствата на балканските флоуцитометрични дружества, на които да се обсъдят възможностите за съвместна дейност.

Предложение за българското домакинство за провеждане на балканска научна конференция по флоуцитометрия до края на 2010 г.

8. През 2010 г. секция „Поточна флоуцитометрия“ към БАКИ да стане колективен член на международното дружество по клинична флоуцитометрия CCI; Clinical Cytometry Society.

9. МЗ-НЗОК-НРД-БЛС

Следващите стъпки ще бъдат набелязани след публикуване на измененията и допълненията в Наредби № 34, 38, 39, 40.

10. Издаване на годишник, 3-и брой, на асоциацията с информация за проведените курсове и конференции през 2009 година.

11. Награди и стипендии за участие в национални и международни форуми.

- стипендии за участие в национални форуми – 5 броя;
- награди за постери – 2 броя;
- стипендия за участие; краткосрочни специализации в чужбина.

Приложение на IVIG' s при имунодефицитни състояния

Проф. д-р Елисавета Наумова

Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“

*Доклад, изнесен на Трета национална конференция
„Трансфузионна терапия и алтернативи на кръвопреливането
в хирургичната практика“, Хисаря, 6-7 ноември 2009*

Имунен дефицит

- резултат от липса или нарушена функция на компонент(и) на имунната система
- причинен от дефекти в гените, свързани с имунната защита – **първичен имунен дефицит**
- причинен от външни фактори – **вторичен имунен дефицит**

Първични имунодефицитни заболявания (ПИД)

Първичните имунодефицитни заболявания са хетерогенна група, дължащи се на дефекти в гените, свързани с имунната защита, и могат да се класифицират в пет групи:

- ✓ В-клетъчни имунни дефицити
- ✓ Комбинирани имунни дефицити
- ✓ Други добре дефинирани синдроми с имунен дефицит
- ✓ Фагоцитна дисфункция
- ✓ Дефицит на комплемента

ПИД

- Идентифицирани са **над 100 вродени имунодефицитни синдрома**, обхващащи лимфоцитите, фагоцитите и комплементната система.
- Общата **честота на поява на ПИД е 1:100 000** (с изключение на ИГА дефицита 1:500).
- Честотата на **тежките ПИД е 1:1 000 000** раждания.
- **Типът на унаследяване** на ПИД е **X-свързано унаследяване (X-LA) и автозомно рецесивно унаследяване (AR), а в единични случаи автозомно доминантно унаследяване (AD).**

Терапия с IVIG показания

Заместителна терапия при:

- Първични имунодефицитни синдроми като:
 - вродена агамаглобулинемия и хипоагамаглобулинемия;
 - общ вариабилен имунодефицит;
 - тежки комбинирани имунодефицитни състояния;
 - Wiskott Aldrich синдром.
- Вторични имунодефицитни състояния като В-клетъчна ХЛЛ с рецидивиращи инфекции – предпазване от бактериални инфекции.
- Деца с вроден СПИН и рецидивиращи инфекции – предпазване от сериозни бактериални инфекции.

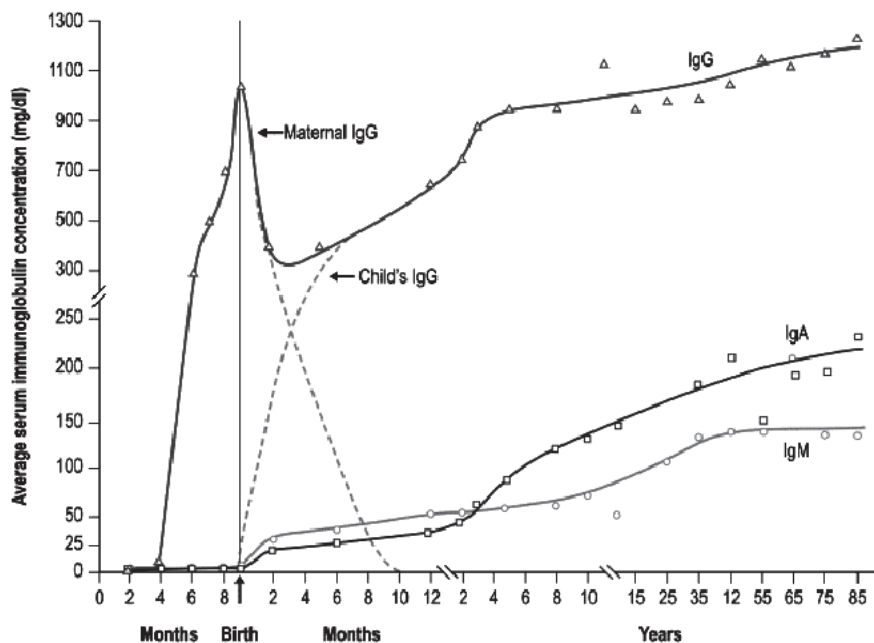
Имуномодулация при:

- Идиопатична тромбоцитопенична пурпура (ITP), по-специално остри форми при деца – предпазване от тежко кървене.
- Болест на Kawasaki – за предпазване от аневризми на коронарната артерия.
- Алогенна трансплантация на костен мозък – понижава риска от инфекции, интерстициална пневмония и GVHD в първите 100 дни след TP.

Основни характеристики на IVIG

- Фракциониране на плазмата (първа стъпка) чрез студен етанол/Cohn-Oncley модификация (фракция II):
 - > 98% имуноглобулин Г (ИгГ); > 90% мономерен ИгГ.
- Следи от други Иг класове (напр. ИгА и ИгМ) и серумни протеини.
- Добавянето на захар, аминокиселини или албумин като стабилизатори предпазва ИгГ от агрегиране.
- Интактността на Fc рецептора е важно за биологичните функции:
 - опсонизация и фагоцитоза;
 - активиране на комплемента;
 - антитяло-зависима цитотоксичност.
- Нормален полуживот, сравним с този на серумния ИгГ
- Нормално съотношение на ИгГ подкласовете
- Широко съотношение на антитела срещу бактерии и вируси

Промени в серумната концентрация на имуноглобулините, свързани с възрастта



Фармакокинетични свойства на IVIG's

- Бързо и без загуби навлиза в циркулацията на пациента след интравенозната инфузия. Разпределя се относително бързо между плазмата и екстраваскуларната течност след приблизително 3-5 дни и се постига равновесие между интра- и екстраваскуларните пространства.

- При производството имуноглобулиновата молекула остава непроменена в нативна форма, запазен Fc фрагмент и ефекторни функции.

- Нормален полуживот от 21 дни. Стойностите му могат да варират при отделни пациенти, особено при такива с първична имунна недостатъчност.

Лечение на ПИД пациенти с IVIG – основни принципи

- Начална доза – 400-600 мг/кг/т на всеки 4 седмици
- Поддържане нивото на серумния ИгГ > 5,0 g/L
- Високо ниво (>8,0g/L) е необходимо за предпазване от хронични белодробни промени и ентеровирусен менингоенцефалит.

- В зависимост от ИгГ катаболизма и/или контрола над инфекциите може да се наложи инфузии на 2-3 седмици.

- Отнема 3 и повече месеци, докато се достигне постоянно серумно ниво и промяна на дозите.

- Мониториране на кръвната урея, креатинин и чернодробна функция на всеки 6-12 месеца
- Пази се Log на дозата, производителя, Lot № и реакциите при всички инфузии.

Лечебен алгоритъм

Интравенозен човешки имуноглобулин при пациенти с ИД с преобладаващ недостиг на антитела като заместителна животоспасяваща терапия представлява разтвор на пречистен човешки IgG (гама-глобулин), освободен от агрегати и вазоактивни вещества, в резултат на което е пригоден за венозно приложение. Прилага се в доза 400-600 mg/kg телесно тегло в три последователни дни на бавна интравенозна инфузия, като преди първата инфузия се изследват серумните имуноглобулини поради риск от анафилактична реакция при пациенти с дефицит на IgA. Може да се разрежда с изотонични солеви и глюкозни разтвори. По време на приложението трябва да се следят внимателно състоянието на пациента и скоростта на инфузията. Поддържащо лечение се провежда всеки 3-4 седмици, като не трябва да се допуска понижение на IgG в серума под 5 g/l. При вторичен имуноглобулинов дефицит дозата е индивидуална.

Противопоказания – алергии към гамаглобулин за интравенозно приложение и селективен IgA дефицит. Възможните странични ефекти след терапия с човешки гамаглобулин за интравенозно приложение са: главоболие, миалгия, температура, асептични менингити, анафилаксия, артериална хипертония, хипергликемия, потискане на бъбречната функция, мозъчна исхемия, мигрена.

- За пациенти, предразположени към странични ефекти, се прави подготовка с:
 - ❖ Aspirin – 15 mg/kg/т на доза
 - ❖ Acetaminophen – 15 mg/kg/т на доза
 - ❖ Diphenhydramine – 1 mg/kg/т на доза
 - ❖ NAID
 - ❖ Кортикостероиди – 6 mg/kg/т на доза
- Алтернативно приложение на подкожни имуноглобулини при пациенти с чести странични реакции

Разработена клинична пътека от ЕС по клинична имунология и Българската асоциация по клинична имунология

Наименование: „Първични имунодефицити“

Предложения за включване във ВСД:

- Случай с едnodневен болничен престой „Лечение с гамаглобулин за интравенозно приложение като заместителна или имуномодулираща терапия при рискови пациенти“.
- Болничен амбулаторен случай „Лечение с гамаглобулин за интравенозно приложение като заместителна или имуномодулираща терапия“ на пациенти с диагностицирано имунодефицитно, аутоимунно заболяване, пациентки с репродуктивни нарушения.

ИНТРАВЕНОЗНА ГАМА-ГЛОБУЛИНОВА ТЕРАПИЯ ПРИ РЕПРОДУКТИВНИ НЕУСПЕХИ

доц. д-р Емилияна Конова, д., д-р Катя Тодорова*, д.,
д-р Алкан Емин, д-р Цветан Луканов, д.

Център за репродуктивно здраве, Медицински университет – Плевен

Понятието „репродуктивни неуспехи“ обхваща три основни групи от клинични състояния, възпрепятстващи раждането на жизнеспособен плод: стерилитет, повтарящи се загуби на плода (инфертилитет) и неуспешни ин витро фертилизации при ART (асистирани репродуктивни техники). Ако отчетем честотата и рисковете за развитие на всяко едно от тези състояния, вероятността за комбинации между тях, сравнително ниската успеваемост на ART процедурите (около 30% за страните от Европейския съюз) и повишения риск за аборт след ART, можем да приемем, че днес безпроблемното зачеване, износване и раждане на здраво дете наистина е успех за семейството. Дори специалистите, занимаващи се с репродуктивна медицина у нас, не знаят приблизителния брой на семействата, които ежедневно посещават клиниките по стерилитет, отделенията по патологична бременност, както и тези, които все още не предполагат, че вече имат „репродуктивен неуспех“. За съжаление, към етиологията на репродуктивните неуспехи трябва да прибавим и признаем ролята на ятрогенната патология, предизвикана от некомпетентни или комерсиализирани диагностика и лечение, като за нашата страна водещо място в това отношение имат лапароскопските електрофенестрации на яйчниците, неправилното и продължително хормонално лечение и игнорирането на мъжкия фактор. Факт е, че при значителна част от семействата, за които ART процедурата се превръща в единствена възможност, анамнестичните данни свидетелстват за стерилитет, индуциран от неправилно лекарско поведение.

Честота на репродуктивните неуспехи

Общата честота на стерилитета в USA се определя като 10-12% от двойките, планиращи бременност (*Human reproduction, 1997*). Разпределена по възрастови групи обаче, честотата е: за възрастта 30-34 г. – 1 от 7 двойки, за възрастта 35-39 г. – 1 от 5 двойки, за възрастта 40-44 г. – 1 от 4 двойки. Характерното за последните години късно начало на планиране на бременност при жените, включително и в нашата страна, допринася за повишаване на честотата на стерилитет.

Загубите на плода са с различна честота в зависимост от етапите на негово развитие. Установено е, че едва 30% от фертилизациите завършват с износване на жизнеспособен плод. 50% от тях се прекъсват още преди следващата менструация, а 25% от имплантираните ембриони се резорбират в рамките на 7-14 дни

*СБАЛАГ „Майчин дом“ – София

след прикрепването към ендометриума. Загубата на клинично установени бременности преди 20-а гестационна седмица е около 15%, а при 2-5% от жените се наблюдават повтарящи се загуби на плода, дефинирани като три или повече загуби на интраутеринни бременности преди 28-а гестационна седмица.

Според 9-и доклад на Европейската IVF мониторингова програма (EIM) към ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embryology) успеваемостта на ART процедурите в 16 европейски държави за 2005 г. е съответно: 30,3% клинични бременности на трансфер при IVF и 30,9% при ICSI. Успеваемостта на интраутеринните инсеминации (IUI) при жени под 40 г. е 12,6% (*Andersen N. и съпр. Hum. Reprod. February 18, 2009*). Данните за успеваемостта във водещи европейски държави показват, че независимо от високите технологии и високата цена на ART едва при 30 от 100 семейства ще има клинична бременност след IVF или ICSI процедура, като при 12 до 48% от тези семейства съгласно проучвания на различни автори (*Simon и съпр., 1999; Winter и съпр., 2002*) има риск от ранни загуби на плода след ART.

Обобщено, раждането на здраво дете е възможно след преодоляване на няколко рискови етапа: риск от стерилитет, риск от неуспешни ин витро процедури, риск от последваща загуба на плода на всеки един етап от бременността, както и риск от развитие на усложнения на бременността. Ето защо при семействата с репродуктивни неуспехи е необходимо да се подхожда с изключително внимание към всички възможни рискови фактори, асоциирани със зачеването и бременността, и единствено мултидисциплинарният подход при тях дава възможност за успех.

Имунологични фактори, асоциирани с репродуктивни неуспехи

Известните етиологични фактори, водещи до репродуктивни неуспехи, се обединяват в следните основни категории: генетични, анатомични, ендокринни, инфекциозни и имунологични. През последните декади интензивно се изследва ролята на имунологичните фактори за фертилизацията, бременността и функцията на плацентата като автономен имунологичен орган. Успешната репродукция е резултат от динамично взаимодействие между имунологични и имуногенетични фактори. Невъзможността за зачеване или износване на плода може да се дължи на нарушен имуноен толеранс на майката спрямо семи-алогенния плод с включване на хуморални и клетъчни ало- и автоимунни реакции. Установени са ефектът и ролята на множество имунологични и имуногенетични фактори, влияещи върху различни етапи на оплождането и бременността. Те могат да бъдат разделени в две основни групи: фактори, влияещи върху фертилизацията и формирането на ембриона до неговата имплантация (ембрионални фактори), и фактори, влияещи на имплантацията и феталното развитие (имплантационни фактори). Имунологичните фактори могат да индуцират две основни патогенетични усложнения: автоимунитет, когато клетъчен или хуморален имуноен отговор е насочен към автоантигени на майката, и алоимунитет, когато тези отговори са насочени към алоантигени на феталните тъкани. В този аспект имунологичните фактори, които с най-висока честота се асоциират и изследват при репродуктивни неуспехи, са: антифосфолипидни антитела, анти tireoidни антитела, анти нуклеарни антитела и

периферни CD3-CD56+CD16+ NK лимфоцити. Една нова насока на проучвания са CD4+CD25+Foxp3+ Treg лимфоцити, които имат ключови характеристики на регулаторни Т лимфоцити при регулиране на имунния отговор по време на бременност.

Антифосфолипидни антитела

Антифосфолипидните антитела (aPL) са автоантитела, насочени срещу отрицателно заредени фосфолипиди (кардиолипин, фосфатидилсерин и др.) и фосфолипид-свързващи протеини (β 2-гликопротеин I, протромбин). Те могат да бъдат насочени срещу фосфолипидни антигени, разположени върху клетъчните мембрани (тромбоцити, ендотелни клетки, трофобластни клетки), в комплекси с кофактори – плазмени протеини (β 2-гликопротеин I), или директно срещу плазмени протеини без фосфолипидни антигени. Най-честата клинична изява на aPL са репродуктивните неуспехи – повтарящи се загуби на плода, преекламписия, интраутеринна рестрикция на плода, плацентарна абрупция, мъртво раждане. Патогенетичните ефекти на aPL върху бременността са разнородни и включват: 1) инхибиране на трофобластната инвазия и продукция на хормони (beta-hCG); 2) свързване с трофобластни клетки и инхибиране сформирването на синцитиотрофобласт; 3) инхибиране диференциацията на екстравилозния трофобласт; 4) повишено съотношение тромбоксан/простаглицин в плацентата и тромбози на утероплацентарната повърхност; 5) тромбози на спиралните артерии след повишена тромбоцитна агрегация, понижена активация на протеин С, повишена експресия на тъканен фактор и повишена синтеза на тромбоцит активиращ фактор (PAF); 6) хроничен утероплацентарен васкулит, плацентарна тромбоза и инфаркт, интервилозит, вилозит и др.

Автоантитела

Известно е, че автоимунни заболявания като системен лупус (SLE), антифосфолипиден синдром (APS), ревматоиден артрит (RA), захарен диабет Тип I и др. сами по себе си са риск за бременността, но пациентки с такива заболявания са имали спонтанни аборти преди поставянето на диагнозата. Тази асоциация, от една страна, потвърждава патогенетичната роля на автоантителата за загубите на плода, а от друга – предполага автоимунен поликлонален характер на загубите подобно на поликлоналния характер на самите заболявания. Специално внимание предизвиква тиреоидният автоимунитет. Поне 18 контролирани проучвания и техният метаанализ показват сходна сигнификантна връзка между тиреоидните автоантитела и спонтанните аборти. Предполагемите механизми са: 1) асоциация на тиреоидните автоантитела с други автоантитела (LAC, антикардиолипин), които сами по себе си са висок риск; 2) в случаи на селектирани групи без други автоантитела се предполага друг подлежащ автоимунен механизъм, като напр. повишени CD5+CD20+ В-лимфоцити при жени с повтарящи се аборти и антитиреоидни антитела или абнормни Т-клетъчни функции; 3) наличие на други асоциирани неимунологични фактори като възраст и тиреоидна функция.

НК лимфоцити

Периферните НК лимфоцити (CD3-CD56^{dim}/CD16^{bright}) също могат да бъдат асоциирани с репродуктивен неуспех. Установено е, че жени с повтарящи се загуби на плода имат повишени периферни CD3-CD56+CD16+ НК лимфоцити в сравнение с контролите. Жени с повтарящи се аборти и висока преконцептуална НК-клетъчна активност имат сигнификантно по-висок брой последващи аборти в сравнение с жените с нормални преконцептуални НК стойности. Периферните и утеринни НК (uNK) лимфоцити представляват различни клетъчни популации по отношение на техния фенотип и функции, но те имат важна роля в хода на нормалната бременност чрез няколко функции: периферните НК лимфоцити потискат активността на uNK лимфоцити, а uNK лимфоцити осигуряват подходяща цитокинова среда и локална имуномодулация, водеща до: инициация на процеса на децидуализация, регулация на плацентарния и трофобластния растеж от цитокини; локална имуномодулация чрез гликоделин и галектин-1 и контрол на трофобластната инвазия.

CD4+CD25+Foxp3+ Tregs лимфоцити

През 2003 г. *Sasaki и съпр.* установяват повишени CD4+CD25+ лимфоцити в децидуална тъкан от ранна бременност, а година по-късно *Hekkinen и съпр.* и *Somerset и съпр.* – повишени циркулиращи CD4+CD25+ по време на ранна бременност с последващ пик през 2-ри триместър и понижение *post partum*. Чрез проучвания в периода 2004-2007 г. (*Sasaki и съпр.*, *Saito и съпр.*, *Tiburgs и съпр.*, *Zhao и съпр.*) се потвърждава повишението на Tregs лимфоцити през 1-ви и 2-ри триместър, прецизират се като CD25^{high}, с високо съдържание на FOXP3 и супресивна функция *in vitro*. През 2007 г. *Mjosberg и съпр.* установяват, че Tregs от периферна кръв на бременни и небременни жени супресират антиапоптогенни отговори *in vitro* с диференциран капацитет за супресия на антипатернални отговори. Тези и други проучвания определят CD4+CD25+Foxp3+ Tregs като: 1) регулаторни Т лимфоцити при регулиране на имунния отговор по време на бременност; 2) потенциални супресори на автоимунитет и отхвърляне на алогофти; 3) участници в имунния толеранс спрямо фетални тъкани, ооцити и сперматозоиди. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs са увеличени в кръв, децидуална тъкан и лимфни съдове, дрениращи матката по време на бременност, и липсата им е несъвместима с развитието на алогенна бременност. Количествен и функционален дефицит на Tregs може да се асоциира с неизяснен стерилитет, загуби на плода и прееклампсия. Една бъдеща перспектива за терапия е техните популации да бъдат експандирани *in vivo*.

Имуномодулираща терапия при репродуктивни неуспехи

Усложнения на бременността, които могат да бъдат асоциирани с имунологични фактори, са: загуби на плода, прееклампсия, интраутеринна смърт на плода, фетална рестрикция (FGR – Fetal Growth Restriction), преждевременно раждане, тромбоцитна алоимунизация, ИТР, миастения гравис, неонатален SLE и др. Всички тези усложнения могат да се развият и при съществуващи автоимунни заболявания като тиреодит на Хашимото, SLE, RA, множествена склероза (MS), APS и

др. Характерно за тези заболявания е, че се изявяват предимно в репродуктивна възраст и преобладават при жените. Имунопатогенезата на автоимунните заболявания, които са риск за репродуктивен неуспех и имунопатогенезата на репродуктивни неуспехи, неасоциирани с автоимунни заболявания, изисква прилагане на имуномодулираща терапия по време на бременността, която да отговаря на следните изисквания:

- да е ефективна по отношение на поликлоналния характер на имунопатогенетичния процес, застрашаващ бременността, т.е. да влияе на различни етапи и ефектори на имунния отговор;

- да е безопасна по отношение здравето на майката, да се понася леко и без средни и тежки странични ефекти при нея, да е съвместима с планиране на бременност и с бременността;

- да е подходяща за продължително приложение в случаите, когато терапията започва при планиране на бременност и се провежда по време на цялата бременност;

- да няма тератогенен ефект върху плода и да е безопасна за него.

Тези изисквания за ефективна имуномодулираща терапия, съвместима с бременността, изключват големи групи препарати, които имат широко приложение при лечение на автоимунните заболявания – високи дози кортикостероиди, интерферони, имunosупресори, нестероидни противовъзпалителни препарати, моноклонални антитела и др.

Интравенозна гама-глобулинова терапия

Имуномодулираща терапия, която отговаря на изискванията ефективност и безопасност по време на бременност, е интравенозната гама-глобулинова терапия (IVIg). Интравенозните имуноглобулинови препарати съдържат високо пречистени нативни молекули на човешки IgG, като разпределението на IgG субкласовете наподобява това в нормален човешки серум. Приготвят от плазмен пул на 1000 до 50 000 кръвни донора и съдържат вариабилните региони на целия В-клетъчен репертоар. Терапевтичното им приложение включва две основни стратегии – имунозаместителна терапия (при вродени и придобити хуморални дефицити) и имуномодулираща терапия (при автоимунни заболявания). IVIG препаратите съдържат над 95% немодифицирани IgG, следи от IgA, IgM, разтворими CD4+, CD8+, HLA молекули и някои цитокини. Полуживотът на инфузираните имуноглобулини варира от 21 до 33 дни. Въпреки, че механизъмът на действие е комплексен и се различава при отделните заболявания, в основата си се дължи на два фактора: интактните Fc-зависими ефекторни функции и спектъра от вариабилни региони на т.нар. естествени антитела.

Естествените антитела са имунорегулатори при имунно-медиирани заболявания и се съдържат в нормалния човешки серум. Те са от клас IgG (около 80% от серумния IgG), IgM и IgA. Наричат се „естествени“, защото не са индуцирани от чужд антиген или имунизация. Репертоарът им е константен през целия живот. В сравнение с имунните антитела са полиреактивни, т.е. разпознават повече от един антиген. Те са автоантитела и могат да бъдат разпознавани от други автоантитела на същия индивид. Голяма част от тях са от клас IgG, следователно основната

част от имуноглобулиновия пул в IVIG препаратите се състои от естествени анти-тела или автоантитела с имуномодулираща функция. Естествените автоантитела в IVIG препаратите (до 40% от IgG) са в състояние да взаимодействат с идиотипите (структури на вариабилните региони) на други антитела и да формират идиотип-анти-идиотип димери, които се увеличават с броя на донорите в пула и допринасят за някои от клиничните ефекти на IVIG. Множеството имуномодулиращи ефекти на IVIG при автоимунни заболявания могат да се обединят в следните основни механизми: антиидиотипни взаимодействия, блокиране на Fc рецептори, влияние върху цитокиновата мрежа, ефект на повишения катаболизъм. IVIG имат капацитета да регулират всички нива на автоимунния отговор – от неговото инициране чрез влияние върху антиген-представящите клетки до неговия резултат – влияние върху специфичните имунни ефектори – Т лимфоцити и антитела. Освен това IVIG могат да регулират и ограничават имунните възпалителни реакции чрез влияние върху медиатори на възпалението, клетъчни рецептори и адхезионни молекули.

Накратко, известните имуномодулиращи ефекти на IVIg върху имунния отговор могат да бъдат обобщени така: 1) **влияние на IVIg върху Fc рецепторите:** блокиране на FcR върху макрофаги (ефект при ИТР и други автоимунни цитопении); инхибиране на антияло-зависима клетъчно-медирана цитотоксичност (ефекти при демиелинизиращи процеси при възпалителни неврологични заболявания – при синдром на Guillian-Barre); сатуриране на FcRn (вътреклетъчен транспортен рецептор за IgG) с последващо повишаване катаболизма на IgG – най-вероятният терапевтичен ефект на IVIg при автоимунни заболявания; 2) **влияние на IVIg върху комплемент и имунни комплекси:** възпрепятства образуването на мембранно-атакуващия комплекс C5b-C9; свързва активираните C3b и C4b (при дерматомиозит – понижава плазмените им нива); чрез свързването на свободни антигени или антитела редуцира образуването на имунни комплекси и тяхната възпалителна активност; 3) **влияние на IVIg върху цитокини:** понижава циркулиращия IL-1 (при болест на Kawasaki) и IL-1-R-антагонист; понижава IL-1b (при синдром на Guillen-Barre); понижава TNFa; намалява активацията на ендотелни клетки; 4) **влияние на IVIg върху дендритни клетки:** инхибира диференциацията и матurationта на дендритни клетки; намалява секрецията на IL-12 след активация; увеличава секрецията на IL-10; намалява експресията на ко-стимулаторни молекули, в резултат – инхибиране на автореактивна, Т-клетъчна активация и пролиферация; 5) **влияние на IVIg върху В лимфоцити и автоантитела:** контролира миграцията на В-лимфоцити от костния мозък към вторичните лимфоидни органи; потиска специфичните автореактивни В лимфоцити; проявява анти-CD5 активност (слещу CD5+CD20+В лимфоцити); неутрализира автоантитела – чрез антиидиотипи, доказани са антиидиотипи в IVIg срещу следните автоантитела – антииреоглобулин, анти-ДНК, антиганглиозидни, антитромбоцитни (гликопротеин Пб/Ша), ацетилахолин-рецепторни, антикардиолипин, анти-Sm и др.; 6) **влияние на IVIg върху Т лимфоцити:** експериментален автоимунен енцефалит и автоимунен увеит, трансферирани чрез CD4+ Т лимфоцити не се развиват след IVIG; понижава продукцията на И-2 и IFN-gama от Th1; възстановява баланса между Th1 и Th2 при автоимунни заболявания.

IVIg препарати са прилагани успешно при пациенти с автоимунни заболявания, като при някои от тях ефектът е потвърден чрез двойно слепи клинични проучвания (напр. дерматомиозит). При други автоимунни заболявания ефектът на IVIg е потвърден чрез клинични съобщения и експериментални модели – SLE, системни васкулити, фиброза, хепарин-индуцирана тромбоцитопения, фактор VIII инхибитори, APS и др.

Ефекти на IVIg при лечение на репродуктивни неуспехи

Установено е, че прилаган по време на бременност, IVIg има следните благоприятни за бременността имуномодулиращи ефекти: 1) намалява Fc-гама-рецепторите, чрез което блокира трансплацентарния транспорт на майчини IgG (важно е за антинуклеарните антитела при SLE пациенти); 2) понижава нивата на aPL – до 30-ия ден след инфузията; 3) потиска броя, пролиферацията и цитотоксичността на NK клетките; 4) пренасочва Th1 към Th2 отговор; 5) модулация на цитокини: инхибиране на проинфламаторни цитокини (IL-2, IL-10, TNF- α , IFN- γ); 6) антикоагулантна активност чрез: инхибиране на TNF-алфа и IFN-гама, които повишават протромбиназата и чрез влияние върху адхезионни молекули (лиганди за интегрини), което намалява тромбоцитната агрегация; 7) възстановява понижените нива на протективни за бременността асиметрични IgG антитела.

Чрез множество лабораторни проучвания са установени ефектите на IVIg върху aPL, които най-често от имунологичните фактори се асоциират със загуби на плода. Обобщено, съобщаваните резултати включват: 1) IVIg инхибира aPL чрез понижена продукция; 2) неутрализация на антителата чрез наличие на антиидиотипни антитела: а) F(ab')₂ фрагменти на IVIg инхибират дозо-зависимо свързването на антикардиолипин антитела с кардиолипин; б) IVIg инхибира тромбогенните ефекти на aPL *in vivo* и редуцира нивата на антикардиолипин антитела в циркулацията; 3) сатурация на FcRn (IgG транспортен рецептор) и повишен катаболизъм на патогенни aPL; 4) при миши модели: IVIg, прилагана при мишки с индуциран APS, води до редукция на феталните резорбции. Подобни резултати са получени при IVIg терапия при експериментално индуциран първичен APS и SLE.

Ефектите на IVIg при репродуктивни неуспехи е обект и на редица клинични проучвания. Първото съобщение при APS е case report за приложение на IVIg при жена с 9 аборта и APS. През периода 1989–1993 г. следва серия от публикувани case reports, а през 1993-1999 – публикации на малки (3-5 жени) и големи (14-19 жени) серии на лечение с IVIg при загуби на плода, асоциирани с APS. През 1999 г. *Clark и сътр.* съобщават 84% раждания при 19 бременности на 15 жени с APS, третирани с IVIg. През 2004 г. *Triolo и сътр.* съобщават успешен изход на бременността при 30 от 40 жени с APS, третирани с IVIg.

През 1995 г. *Alan Beer и сътр.* съобщават, че 86,6% от жените с повишени NK лимфоцити имат успешна бременност при приложение на IVIg преди концепцията. *Dobri Kiprov*, 1996 г. съобщава за 28 успешни от 35 лекувани с IVIg бременности на жени с предшестващи аборти, асоциирани с имунологични фактори. През 1996 г. *Carolyn Coulam* представя резултатите от двойно сляпо проучване върху IVIg терапия при имунно-медиран инфертилитет – 3:1 повишени раждания при жени с IVIg vs. плацебо терапията. Според *Szereday*, 1999 г., IVIg потиска килър-

ната активност на периферни NK лимфоцити при жени с предшестващи загуби на плода.

При пациентки с MS IVIg курсовете не компрометират планиването на бременността и самата бременност, дори някои автори препоръчват приложението им през последния триместър и ранния послеродов период с цел профилактика на постпарталните екзацербации. За всички останали медикаменти, модифициращи хода на заболяването, е известно, че трябва да се преустанови приемът им 30 до 60 дни преди планирано забременяване, а при имunosупресивните медикаменти не трябва да се планира бременност в следващите 3 години.

Кърменето може да има протективен ефект по отношение активността на MS. Профилактирането на следродовия период с други имуномодулатори поради повишен риск от екзацербации налага преустановяване на кърменето. Приложението на IVIg в този период не налага преустановяване на кърменето, т.е. самият препарат се прилага за лечение в неонатологичната практика. Ретроспективен анализ на 108 бременни жени с пристъпно-ремисивна форма на MS, лекувани по време на бременността или в 1-а, 6-а и 12-а седмица след раждането с IVIg или плацебо, показва, че IVIg редуцира пристъпите, асоциирани с бременността и следродовия период, в сравнение с плацебо ефекта (*Achiron и съпр.*, 2004). Един от новостановените ефекти на IVIg при MS, доказан чрез потискане на експериментален автоимунен енцефаломиелит (миши модел на MS), е стимулирането на пролиферацията на Tregs в периферните лимфоидни органи. Авторите заключават, че асоцираната с бременността и IVIg експанзия на Tregs може да медира протекция спрямо активността на MS по време на бременност (*Amal Ephrem. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. Blood*, 2008).

Страничните ефекти от приложението на IVIg обикновено са транзиторни и зависят от температурата на разтвора, скоростта на инфузия, дозата и опита на медицинския персонал. Дозите от 150 до 250 mg/kg са с минимални и леки странични ефекти. *Achiron и съпр.* съобщават за странични ефекти при 5,2% от инфузиите (т.е. при 28 от 969 инфузии), като страничните ефекти при плацебо инфузиите са 6,7%. Страничните ефекти могат да бъдат: главоболие, болки в кръста, гадене, диспнея, втрисане, хипотония, субфебрилитет във вечерните часове, транзиторни артралгии.

Бъбречни увреждания след високи дози IVIg са описани в средата на 1980-те. Анализът на случаите показва, че рисков фактори за бъбречни усложнения са: възрастта на пациентите (средна възраст 60,5 г.), съществуващо бъбречно заболяване и диабет. Усложненията се дължат на стабилизаторите в препаратите (най-често захароза), а не на самите имуноглобулини.

Анафилактичните реакции към IVIg са изключително редки и не са описани при имунокомпетентни индивиди. Анафилактични реакции, медирирани от IgE анти-тела срещу IgA, са възможни при пациенти с дефицит на IgA. Анафилактоидни реакции са възможни в редки случаи при повишена скорост на инфузиите.

Българският имуноглобулинов препарат за интравенозно приложение е Immunovenin-intact – 5% IgG, amp. 5 ml (Human Normal Immunoglobulin for Intravenous Administration). 1 ml от разтвора съдържа: човешки имуноглобулин – 50 mg, човешки серумен албумин – 10 mg, манитол – 20 mg, натриев хлорид – 9 mg, вода за инжекции – до 1 ml. Препаратът е регистриран в България през 1997 г.

В заключение, IVIg при жени с репродуктивни неуспехи и доказани асоциирани с тях имунологични фактори, както и при жени с автоимунни заболявания позволява безопасно планиране на бременността, повлиявайки в същото време автоимунното състояние или заболяване. IVIg е ефективна и безопасна за майката и плода, когато се прилага по време на бременност. Не само у нас, но и по света обаче тази терапия има своите привърженици, скептици и противници.

Модифицирани ИВИг препарати с усилен имуномодулиращи и противовъзпалителни свойства

Иглика К. Джумерска-Алексиева, Чавдар Л. Василев
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН

Имуноглобулинови препарати с допълнително индуцирана антиген-свързваща полиспецифичност

През последните двадесет и пет години усилията на производителите на нормални човешки имуноглобулинови разтвори за венозно въвеждане (ИВИг) са били насочени към производството на препарати от нативни (непроменени) ИГГ молекули с нормално разпределение на четирите ИГГ субкласа. Напоследък обаче се правят и опити за допълнителното модифициране на имуноглобулините от този изотип, което води до придобиването на нови, клинично значими свойства.

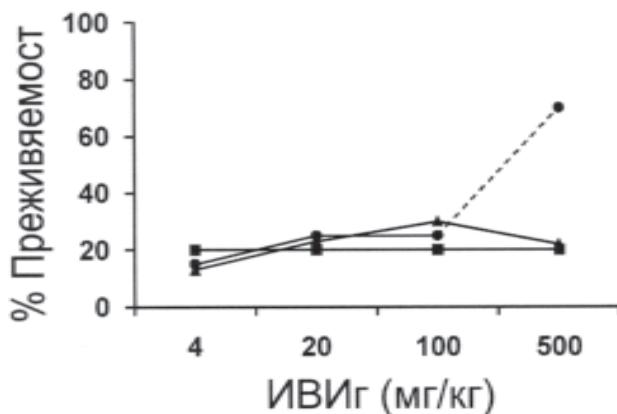
Способността на антителата да взаимодействат с един-единствен или с различни в структурно отношение антигени (антиген-свързваща монореактивност и съответно полиреактивност) се счита за постоянно свойство на всяка индивидуална имуноглобулинова молекула. През последните няколко години няколко изследователски групи установиха, че краткотрайният контакт на поликлонални и на някои моноклонални ИГГ антитела с протеин-дестабилизиращи агенти води до промени в структурата на имуноглобулиновите молекули, до повишаване на антиген-разпознаващата им полиреактивност, както и до появата на нови биологични свойства. Използваните досега протеин-дестабилизиращи агенти включват високосолеви разтвори, буфери с високо или ниско рН, хаотропни агенти, прооксидативни железни йони, реактивни кислородни радикали, хем и др. (1-7). По-долу ще бъде направен преглед на нови данни, получени от нашата и от други изследователски групи, доказващи, че докато лечението с нативни ИВИг препарати не повлиява смъртността при няколко експериментални модела на сепсис, модифицираните с различни методи препарати имат изразено профилактично и лечебно действие при този синдром.

ИВИг препарати, модифицирани чрез въздействие с рН 4.0 буфер

При производството на ИВИг препарати се използват различни методи за фракциониране на кръвните белтъци, като няколко фирми използват и етап на третиране с кисело рН. Сравнителното изследване на седем лицензирани имуноглобулинови препарата показва, че тези от тях, които са произведени с прилагане на процедури, включващи третиране с буфер с рН 4,0, показват по-висока антиген-свързваща полиреактивност (8). ИВИг препаратите с ниска и тези с висока антиген-свързваща полиреактивност притежават и различаващи се биологични свойства. Модифицираните с кисело рН ИВИг имат по-силна потискаща активност върху фитохемаглутинаин-индуцираната пролиферация на човешки мононуклеарни клетки от тази на нативния (нетретиран) ИВИг препарат (8).

Естествените полиреактивни антитела, които се съдържат и в ИВИг препаратите, са част от механизмите на вродената имунна система. Те играят важна роля в предотвратяване на разпространението на попадналите в организма патогени още преди да се активират механизмите на придобития имунитет (9-11). В същото време полиреактивните антитела са и автореактивни и са един вид физиологичен буфер, който предотвратява резки промени в нивата на различни възпалителни медиатори, сигнални молекули и пр. Изказахме хипотезата, че модифицираните ИВИг препарати би трябвало да имат по-добър лечебен ефект при инфекции, придружени от генерализирано възпаление. Наистина, проведените експерименти показаха, че пасивната имунотерапия с третиран по посочения начин препарат повишава процента на преживелите експериментален сепсис животни (12).

Използван бе класически модел на септичен шок, предизвикан от инжектирането на бактериален липополизахарид (ЛПС). Групи от по 15 мишки със септичен шок бяха инжектирани венозно с нативен или с модифициран (предварително обработен с буфер с рН 4) имуноглобулинов препарат или пък само с фосфат-буфериран физиологичен разтвор. Достоверно намаление на смъртността бе отчетено само в групата, получила най-голямата доза от модифицирания ИВИг (фиг. 1).



Фигура 1. Намалена смъртност при мишки с ЛПС-индуциран септичен шок след третиране с ИВИг препарат, обработен с буфер с рН 4. Групи от по 15 мишки бяха инжектирани интраперитонеално с 500 мг ЛПС и веднага след това интравенозно с различни дози (посочени на абсцисата) нативен (триъгълници), обработен с буфер с рН 4 ИВИг (кръгове) или фосфат-буфериран физиологичен разтвор (квадрати).

Досега не са провеждани сравнителни клинични изследвания на имуномодулаторните ефекти на ИВИг препарати, произведени по различни технологии и с различно ниво на антитялова полиреактивност. Нашите данни предполагат, че пасивната имунотерапия с модифицираните по описания начин лицензирани ИВИг би имала лечебен ефект при синдроми, които се характеризират с неконтролирана продукция на провъзпалителни медиатори (цитокинова буря). Освен септичния синдром има и редица инфекциозни заболявания, при които бурната, генерализирана

на и неконтролирана възпалителна реакция на организма е основна причина за неблагоприятния изход. Последни допълнения към списъка от тези инфекции са птичият (H5N1) грип, хеморагичните трески „Денга“, „Ласса“ и „Марбург“, както и тази, причинена от вируса на Западно-Нилската треска (13-17).

Модифицирани човешки имуноглобулини, обработени с железни (феро-) йони или с ХЕМ

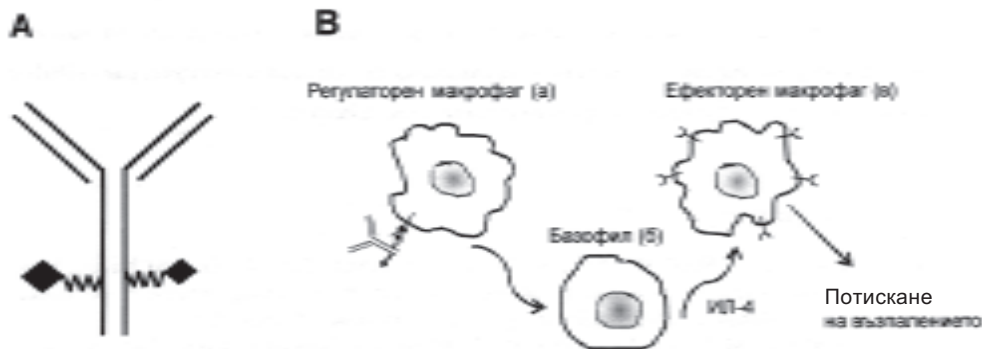
Разработени са и два други подхода за модифициране на човешки имуноглобулинови препарати, основани на третирането им с определени концентрации феро-йони или с ХЕМ (желязо-съдържащ хемоглобинов метаболит). Тези агенти имат мощно прооксидативно действие и по различни механизми частично изменят структурата на променливите участъци на някои от имуноглобулиновите молекули. Резултатът е още по-силно повишаване на антиген-свързващата полиреактивност на пула от ИгГ молекули, отколкото е наблюдаваното при обработения с кисел буфер ИВИг. В серия опити тези модифицирани имуноглобулинови препарати бяха използвани за лечение на животни с различни експериментални модели на сепсис – предизвикан от инжектирането на бактериален ЛПС, на живи бактерии, на зимозан, както и предизвикан от пункция и пристягане на дебелото черво (colon puncture and ligation, CLP). При всички модели се наблюдава протективен ефект, който се постига при десет пъти по-ниска доза ИВИг. В случая с ИВИг, обработен със железни йони, беше доказано, че той има и профилактичен ефект в използвания от нас експериментален модел, когато се въвежда 6 часа след интраперитонеалното инжектиране на ЛПС.

Други експериментални имуноглобулинови препарати с усилено противовъзпалително действие

Отдавна се знае, че към Fc фрагментите на имуноглобулиновите молекули има ковалентно свързани полизахаридни вериги с различен състав. Биологичната им роля обаче остана дълго време неясна.

Групата на Джефри Равеч от университета „Рокфелер“ в Ню Йорк застъпва през последните години твърдението, че необходимостта от въвеждане на много високи дози (до 2 г/кг и повече) от ИВИг за достигане на клинично доловим благоприятен ефект може да бъде обяснена единствено с това, че за него е отговорна малка фракция от сборния ИгГ препарат (18). Опитите на изследователите да докажат присъствието на тази фракция и да я охарактеризират са успешни. В няколко последователни публикации те предложиха убедително доказателство за това, че противовъзпалителните ефекти на ИВИг се дължат поне отчасти на наличието на малка популация от ИгГ молекули, които съдържат крайни $\alpha 2,6$ -сиалови остатъци в гликаните на Fc фрагментите си (19). (Виж фиг. 2А.) Напоследък те охарактеризираха и клетъчните рецептори, специфични за тези гликани. Съвсем неочаквано се оказа, че при човека това е специфичният пектин SIGN-R1 DC-SIGN (20). Проведените сравнителни изследвания показват, че фракцията от имуноглобулиновия препарат, обогатена на ИгГ съдържащи подобен гликан, има по-мощна имуномодулираща и противовъзпалителна активност при експериментални авто-

имунни заболявания. Обратно, ИВИг препарат, обработен с ензим, отстраняващ крайната сialова киселина от полизахаридната част на имуноглобули новите молекули, се оказва лишен от противовъзпалително действие.



Фигура. 2. Роля на полизахаридните вериги на имуноглобулините за противовъзпалителното действие на ИВИг. А. ИГГ молекулите притежават полизахаридни вериги, прикрепени към Fc фрагментите им, но само малка част от тези вериги завършват със свободна сialова киселина (означена като черен ромб). **Б.** Фракцията от ИГГ със сialiлирани гликани се свързва към специфичен за тях рецептор върху регулаторни макрофаги (а), те стимулират базофилите към секреция на провъзпалителни цитокини (б), последните предизвикват увеличена експресия на инхибиращия рецептор на ефекторните макрофаги (в). Крайният резултат е потискане на възпалителния процес (според цит. публикации на Дж. Равеч).

Логична идея, която следва от това откритие, е да се направи опит за повишаване процента на тези „противовъзпалителни“ имуноглобулинови молекули чрез увеличаване степента им на сialiлиране. Това може да се постигне чрез допълнителното ензимно сialiлиране на имуноглобулините от клас Г. Цитираната по-горе изследователска група е изяснила и клетъчните и молекулните механизми на имуномодулиращото им действие. Получените данни позволяват да се очертае следната последователност от събития (виж фиг. 2Б): свързването на ИГГ със сialiлиран гликан към посочения по-горе рецептор на повърхността на т. нар. регулаторни макрофаги генерира сигнал, който активира базофилите и те секретират противовъзпалителни цитокини (интерлевкин 4 и др.). Последните предизвикват усилване експресията на потискащия повърхностен рецептор Fc-gamma IIb върху „ефекторните“ макрофаги, които играят основна роля във възпалителния процес. Краен резултат от тези междуклетъчни взаимодействия е потискането на активността им.

Може да се очаква, че в недалечно бъдеще заедно с препаратите от нативни човешки имуноглобулини в клиничната практика ще се прилагат и модифицирани ИВИг с по-мощно имуномодулиращо и противовъзпалително действие.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bouvet, J.-P., Staril, D., Rose, S., Quan, C. P., Kazatchkine, M. D., and Kaveri, S. K. (2001) Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulin with dissociation agents, *J.Autoimmun.* 16, 163-172.
2. McMahon, M. J., and O_Kennedy, R. (2000) Polyreactivity as an acquired artefact, rather than a physiologic property, of antibodies: evidence that monoreactive antibodies may gain the ability to bind to multiple antigens after exposure to low pH., *Journal of Immunological Methods* 241, 1-10.
3. Dimitrov, J. D., Ivanovska, N. D., Lacroix-Desmazes, S., Doltchinkova, V. R., Kaveri, S. V., and Vassilev, T. L. (2006) Ferrous ions and reactive oxygen species increase antigen-binding and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G, *J Biol Chem* 281, 439-446.
4. Dimitrov, J., Roumenina, L., Doltchinkova, V., Mihaylova, N., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S., and Vassilev, T. (2007) Antibodies use heme as a cofactor to extend their pathogen elimination activity and to acquire new effector functions., *J Biol Chem* 282, 26696-26706.
5. Dimitrov, J., Roumenina, L., Doltchinkova, V., and Vassilev, T. (2007) Iron ions and haeme modulate the binding properties of complement subcomponent C1q and of immunoglobulins, *Scand J Immunol* 65, 230-239.
6. Bussone, G., Dib, H., Dimitrov, J., Camoin, L., Broussard, C., Tamas, N., Guillevin, L., Kaveri, S., and Mouthon, L. (2009) Identification of target antigens of self-reactive IgG in intravenous immunoglobulin preparations., *Proteomics* 9, 2253-2262.
7. McIntyre, J., Wagenknecht, D., and Faulk, W. (2005) Autoantibodies unmasked by redox reactions., *JAutoimmun* 24, 311-317.
8. Djoumerska, I., Tchobanov, A., Pashov, A., and Vassilev, T. (2005) The autoreactivity of therapeutic intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations depends on the fractionation methods used, *Scand J Immunol* 61, 357-363.
9. Ochsenbein, A. F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., and Zinkemagel, R. M. (1999) Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286, 2156-2159.
10. Notkins, A. (2004) Polyreactivity of antibody molecules.. *Trends Immunol* 25, 174-179.
11. Zhou, Z., Zhang, Y., Hu, Y., Wahl, L., Cisar, J., and Notkins, A. (2007) The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies., *Cell Host Microbe* 7, 51-61.
12. Djoumerska-Alexieva, I., Dimitrov, J., Voynova, E., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S., and Vassilev, T. (2010) Exposure of IgG to an acidic environment results in molecular modifications and in enhanced protective activity in sepsis, *FEES Journal* 277, 3039-3050.
13. Rimmelzwaan, G., van Riel, D., Baars, M., Bestebroer, T., van Amerongen, G., Fouchier, R., Osterhaus, A., and Kuiken, T. (2006) Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts.. *Am J Pathol* 168, 176-183.
14. Ignatyev, G., Steinkasserer, A., Streltsova, M., Atrasheuskaya, A., Agafonov, A., and Lubitz, W. (2000) Experimental study on the possibility of treatment of some hemorrhagic fevers., *JBiotechnol* 83, 67-76.
15. Atrasheuskaya, A., Petzelbauer, P., Fredeking, T., and Ignatyev, G. (2003) Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection., *FEMS Immunol Med Microbiol* 35, 33-42.

16. Cheung, C., Poon, L., Lau, A., Luk, W., Lau, Y., Shortridge, K., Gordon, S., Guan, Y., and Peiris, J. (2002) Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?, *Lancet* 360, 1831-1837.
17. Venter, M., Burt, F., Blumberg, L., Fickl, H., Paweska, J., and Swanepoel, R. (2009) Cytokine induction after laboratory-acquired West Nile virus infection., *N Engl J Med* 360. 1260-1262.
18. Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. (2008) Fcgamma receptors as regulators of immune responses, *Nat Rev Immunol* 8, 34-47.
19. Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation, *Science* 313, 670-673.
20. Anthony, R., Wermeling, F., Karlsson, M., and Ravetch, J. (2008) Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG, *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 19571-19578.

Безопасност на имуновенин-интакт 5% IgG

Ил. Бинева, Ю. Начева

„Бул Био – НЦЗПБ“ ЕООД, София

Кратки данни за метода на производство

Имуновенин-интакт принадлежи към групата на III поколение венозни имуноглобулини, в които молекулата е със запазена нативна форма. Разликата с предишните поколения продукти се намира в обработката на имуноглобулина (с ензим или модификация на молекулата) с оглед постигане на венозна поносимост на продукта.

В основата на метода за изолиране на имуноглобулина от човешката плазма е студово-етанолното фракциониране на Cohn и съавтори [1], описан през 1946 г. В първите години след започване на производството му препаратът е прилаган мускулно, в малки дози, за профилактика на морбили и хепатит. Не е било ясно как се понася този препарат при венозно инжектиране, а това би дало възможност за лечение с високи дози при лошо функциониране на имунната система на пациента, например при агамаглобулинемия [2]. Тогава Charles Janeway [3] е решил да провери това, като си е инжектирал венозно имуноглобулин, изолиран по метода на Cohn, и не е чудно, че е реагирал с анафилактичен шок. Обяснението на този факт е, че препаратът има антикомплементарна активност поради наличието на високомолекулни имуноглобулинови агрегати, образувани по време на няколкото стадии на утаяване с етанол.

Усилията на производителите на имуноглобулин се насочват към търсене на методи за фракциониране с по-малко стадии на утаяване с етанол и прилагане на други етапи за пречистване и намаляване на антикомплементарната активност. От началото на 60-те години на XX век започва производството на имуноглобулини за венозно приложение, различаващи се по съдържанието на антитела (плазми от различни географски райони), стабилизатори, рН и др. [4, 5]

У нас: частично фрагментираният имуновенин от плацентарни суровини бързо намира мястото си в клиниките от 1982 г. Петнадесет години по-късно той е изместен от имуновенин-интакт, произведен от плазма [6].

В имуновенин-интакт чистотата на IgG е над 98% и съдържанието на IgA е ниско. Това е готов за употреба разтвор с неутрално рН, стабилизиран с човешки албумин и манитол. Качествените показатели отговарят на изискванията на Европейската фармакопея (статия 0918).

Приложения

Препаратът има редица приложения, които са одобрени в европейския регулаторен документ [7] и са описани в листовката: заместителна терапия при имунодефицитните състояния, имуномодулация (имунно-медирана тромбоцитопения, синдром на Guillain Barre, болест на Kawasaki) и при лечение и профилактика на отхвърлянето при присаждане на костен мозък.

Венозните имуноглобулини имат и множество други приложения (**off-label**) – обзорна статия, Scheinfeld and Goodwin [8]:

- хематология – 12 диагнози;
- неврология – 6 диагнози;
- репродуктивна медицина – лечение на безплодие;
- пулмология – 2 диагнози;
- ревматология – 5 диагнози;
- други – 36 диагнози;

Ефикасността на продукта във всички описани по-горе приложения както одобрените в листовката, така и off-label е доказана в многобройни клинични изследвания. Забележителен е фактът, че обхватът на диагнозите, при които се използва венозният имуноглобулин, продължава да се разширява.

Две гледни точки за безопасната терапия с имуновенин-интакт 5% IgG

1. Разбиране на риска (макар и минимален) от странични реакции, т.е. безопасността по време на вливането на препарата. Добре проведената клинична оценка на пациента и познаването на съотношението полза/риск с този продукт помагат за идентификацията на рисковите фактори.

2. Разбиране на мерките по отстраняване на риска от пренос на трансмисивни инфекции с този кръвен продукт. Имуновенин-интакт се провежда от строго контролирана човешка плазма по валидиран метод, включващ етапи на вирусно отстраняване/инактивиране, при спазване на изискванията за ДПП.

- Имунодефицитните състояния се лекуват чрез т.нар. заместителна терапия [9, 10, 11]. Пациентите получават имуноглобулин в количества, които да компенсират недостига му и зависят от честотата на инфекциите. Тези количества са сравнително малки: $0,05 \div 0,5$ г/кг.

- Имуномодулиращата терапия изисква значително по-високи дози: $1 \div 2$ г/кг на цикъл.

Механизмите на действие при тези два типа приложения са различни. Терапията при имунодефицитните състояния вероятно зависи от директното добавяне на липсващите антитела. Високите имуномодулиращи дози имуноглобулин при лечение на автоимунни състояния влияят на експресията и функциите на Fc рецепторите, регулират клетъчния растеж, въздействат върху активирането на диференциращите и ефекторните функции на имунорегулаторните Т и В лимфоцити, които са основните компоненти на адаптивния имунен отговор. Освен това венозните имуноглобулини имат ясно изразен противовъзпалителен ефект при лечението на автоимунни заболявания [12, 13].

Начини на приложение на имуновенин-интакт

● Дозировката и честотата на приложение зависят от вида лечение (заместващо или имуномодулиращо), от заболяването, клиничното състояние и възрастта на пациента. Следователно, не е възможно да се дадат указания за стандартно дозиране.

● Общата доза зависи от теглото на пациента и може да бъде разделена за 2 до 5 последователни дни.

● Отначало вливането започва със скорост $0,5 \div 1$ мг/кг на минута. След 15-30 мин скоростта може постепенно да се увеличи до 4 мг/кг на минута. Този начин на приложение се препоръчва с оглед намаляване на риска от странична реакция.

● Честотата на страничните реакции при приложението на имуновенин-интакт не е висока (съдейки по редките съобщения от здравната мрежа). Подготовката на медицинските специалисти по спецификата на използването на този препарат е много важна. При отчитането на страничните реакции първостепенно значение има *кой* осъществява вливането.

Странични реакции и някои фактори, които обуславят добрата поносимост към имуновенин-интакт

Най-често странични реакции се наблюдават по време на приложението на препарата и до няколко часа след това. Ако това се случи по време на вливането, то скоростта му трябва да се намали или то да бъде спряно. Ако се очакват такива симптоми, то пациентът трябва да бъде подготвен с аналгетици/антипиретици, антихистаминови препарати и хидрокортизон.

Слаби реакции: главоболие, втрисане, болка в кръста, замаяност, тахикардия, болка в корема и гадене.

Сериозни реакции: болка в гърдите, екзема, анафилаксия, а при възрастни пациенти са описани случаи на инфаркт и бъбречна недостатъчност. Проблемите с бъбреците са наблюдавани с продукти, съдържащи захароза (най-често при пациенти над 65 г.), а имуновенин-интакт не съдържа захароза. Неутралното рН на разтвора също допринася за добрата поносимост. Повечето сериозни реакции са наблюдавани при пациенти, които имат анти-IgA антитела. Затова ниското съдържание на IgA в имуновенин-интакт е негово преимущество. Все пак не всички пациенти с анти-IgA антитела реагират на венозния имуноглобулин. Причината за това не е ясна, макар че това се свързва с техния титър.

Вирусна безопасност

Патогените, които могат да бъдат отнесени към вирусната безопасност на i.v.Ig, са тези, които могат да бъдат пренесени (вкл. теоретично) при трансфузии.

Подборът на донорите на кръв става от първостепенно значение поради бързото разпространение на HIV и HCV и заплахата за здравето на лекуваните с кръв и кръвни продукти. Методите за определяне на маркерите за трансмисивни инфекции се усъвършенстват. Освен серологичните проби вече се прави и скрининг за HCV-RNA. У нас се спазват изискванията на Закона за кръвта и потенциално

инфекциозните дарявания се изключват. Прави се и пълно изследване на плазмените сборове за фракциониране и производство на имуновенин-интакт.

- История: Преди 15-16 години в САЩ и някои европейски страни бяха регистрирани случаи на заразяване с HCV на пациенти, лекувани с i.v.Ig [14]. Това се случва скоро след въвеждането на изпитването на донорите за анти-HCV-антитела [15]. Кръвта от тези дарители е дала отрицателен резултат за антитела, но плазмените сборове за фракциониране са съдържали плазми от заразени дарители в т.нар. прозоречен период и поради отсъствието на блокиращите антитела вирусът не е бил отстранен по време на изолирането на имуноглобулина. Поради спецификата на технологиите за производство на i.v.Ig, с които, от една страна, се постига получаването на имуноглобулин с ниска АКА, но, от друга страна, не водят до инактивирането на случайно попаднали вируси, се стига до този пренос на HCV инфекция [16].

- Контролните власти в САЩ и Европа незабавно разработиха нормативните документи за валидиране на технологиите и включване на нови технологични етапи за инактивирането/отстраняването на случайно попаднали вируси по време на производствения процес. Тези документи влизат в сила от 1996 г. Още през същата година един от технологичните стадии (топлинна обработка) при производството на имуновенин-интакт беше валидиран в специализирана лаборатория в Холандия. Доказан е редуциращ фактор за този стадий за моделния „облечен“ вирус ВVDV $\log_{10} > 5,27 \pm 0,26$. Същият краен етап в производството беше валидиран през 2010 г. в Националната референтна лаборатория по ентеровируси, НЦЗПБ и с „не-облечен“ полиовирус I тип (Sabin I) $\log_{10} > 7,6 \pm 0,27$.

Освен споменатия по-горе краен етап в производствената схема на имуновенин-интакт има стадии, които по данни от литературата имат значителен капацитет за отстраняване/инактивиране на вируси. Това са етапите на етанолно фракциониране, утайването с ПЕГ и йонообменната хроматография. Предстои валидирането и на още един стадий за капацитета му за вирусно отстраняване/инактивиране.

Заклучение

Безопасността на i.v.Ig е комплексна тема, включваща:

- *Добрата поносимост при вливането.* Качествените показатели на имуновенин-интакт, които отговарят на изискванията на Европейската фармакопея, са обективните фактори, които имат значение за избягване на страничните реакции. Клиничната оценка на пациента има голямо значение.

- *Вирусната безопасност.* Тя е свързана с намаляването до минимум на риска от пренос на трансмисивни инфекции както чрез строгия контрол на изходната суровина за производство, така и чрез прилагане на валидирани методи за вирусно инактивиране по време на процеса на производство, което се осъществява при спазване на изискванията на ДПП.

Определянето на безопасността на имуноглобулина за венозно приложение става само след многогодишна клинична употреба. Такъв опит, потвърждаващ безопасното приложение на имуновенин-интакт, е събран в българските клиники през последните 15 години.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cohn E., Strong L., Hughes W et al. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68, 459-475
2. Bruton O.C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics*. 1952, 9, 722-728
3. Janeway C.A., Apt L., Gitlin D. Agammaglobulinemia. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1953, 66, 200-202
4. Barandun S., Isliker H. Development of immunoglobulin preparations for intravenous use. *Vox. Sang.* 1986, 51, 157-160
5. Skvaril F., Gardi A. Differences among available immunoglobulin preparations for intravenous use. *Ped. Inf. Dis. J.* 1988, 7, 43-48
6. Бинева Ил., Бозаджиев Л., Велев В., Захария Б.. Метод за получаване на имуноглобулин за венозно приложение. Изобретение рег. № 69876/1985; авторско свидетелство № 39827, патент
7. CPMP/859/95 rev.2. Core SmPC for human normal immunoglobulin for intravenous administration, into effect November 2004
8. Scheinfeld N., Goodwin J. Intravenous immunoglobulin. *eMedicine Hematology*. 2008, March
9. Buckley R.H., Schiff R.I. The use of intravenous immunoglobulin in immunodeficiency diseases. *New Engl. J. Med.*, 1991, 325, 110-117
10. Toubi E., Etzioni A. Intravenous immunoglobulin in immunodeficiency states. *Clin Rev. Allergy Immunol.*, 2005, 29(3)167-72
11. Negi V-S., Elluru S., Siberil S., Graff-Dubois S., Mouthon L., Kazatchkine, M. et.al. Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanism of action. *J. Clin. Immunol.* 2007
12. Nimmerjahn F., Ravetch J. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J. Exp. Med.* 2007, 201 (1) 11-15
13. Dwyer J.M., Manipulating the immune system with immune globulin. *New Engl. J. Med.*, 1992, 326, 107-116
14. Healey C., Sabharwal N., Daub J. Outbreak of acute hepatitis C following the use of anti-hepatitis C virus screened intravenous immunoglobulin therapy. *Gastroenterology*, 1996, 110, 1120-1126
15. Finlayson J., Tankerslay D.L. Anti-HCV screening and plasma fractionation: the case against. *Lancet* 1990, 335, 1274-1275
16. Biswas R., Nedjar S., Wilson L. The effect on the safety of intravenous immunoglobulin of testing plasma for antibody to hepatitis C. *Transfusion* 1994, 34, 596-602

БЕЗОПАСНОСТ НА ИМУНОВЕНИН-ИНТАКТ 5% IGG

Бинева, Ил., Ю.Начева
Бул Био – НЦЗПБ ЕООД

Венозните имуноглобулини трябва да отговарят на три условия: терапевтична ефикасност, добра клинична поносимост и вирусна безопасност. Редките странични реакции са свързани с: възрастта на пациентите, заболяванията, които имат, скоростта на инфузия, съдържанието на ИгА в препарата и вида на стабилизатора. Факторите, които определят вирусната безопасност, са: скринингът на дарената кръв с цел отстраняване на потенциално инфекциозни дарявания, изследване на плазмените сборове за маркери на трансмисивни инфекции, валидирани технологични етапи за отстраняване/инактивиране на потенциални вирусни онечиствания. Дискутирани са нови резултати относно безопасността на имуновенин-интакт по отношение на пренос на трансмисивни инфекции.

Ключови думи: венозен имуноглобулин, странични реакции, вирусна безопасност

Адрес за кореспонденция:

Илина Бинева, Бул Био – НЦЗПБ ЕООД,
бул. „Янко Сакъзов“ 26
1504 София
E-mail: bineva@bulbio.com

SAFETY OF IMMUNOVENIN-INTACT 5% IGG

I.Bineva, J.Nacheva
BB-NCIPD Ltd.

The intravenous immunoglobulin must meet three requirements: therapeutic efficacy, good clinical safety profile and viral safety. The rare side reactions are related to the age of the patients, their clinical states, the rate of the infusion, the IgA content in the product and the types of the stabilizers. The viral safety is achieved by the initial screening of the donated blood, the testing of the plasma pools for markers of transmissible infections and the application of validated technological stages for removal/inactivation of potential virus contamination.

New results on the viral safety of Immunovenin-intact are reported.

Key words: intravenous immunoglobulin, side reactions, viral safety

Address for correspondence:

I.Bineva, BB-NCIPD Ltd.
Boul. Yanko Sakazov 26
1504 Sofia
E-mail: bineva@bulbio.com

НЕЖЕЛАНИ ЕФЕКТИ ОТ ЛЕЧЕНИЕТО С ИНТРАВЕНОЗНИ ИМУНОГЛОБУЛИНОВИ ПРЕПАРАТИ

М. Балева и К. Николов***

Лечението с имуноглобулинови препарати (IVIg) през последните години навлезе широко в медицинската практика за лечение на различни заболявания. Когато пристъпваме към това лечение, трябва да знаем някои от характеристиките и особеностите на този вид лекарства:

1. При едно кръводаряване се вземат 450 мл кръв. От нея се отделят 15 мл плазмени протеини, но само 3 мл от тях са имуноглобулини. Имуноглобулиновите препарати от една серия се произвеждат от фракционираната плазма на 3000 – 5000 донори. Обикновено за интравенозно приложение се използва ампула от 50 мл, в която има 3 g IgG.

2. Донорската кръв се обработва със стандартните процедури за елиминирание на някои познати причинители на инфекциозни заболявания и се контролира по някои показатели – хемоглобин, еритроцити, левкоцити, тромбоцити, изследва се за сифилис, HIV, хепатит В, но не навсякъде и за хепатит С.

3. Състав на IVIG: 95% IgG, следи от IgA и IgM, цитокини, HLA молекули, антителиа.

ИСТОРИЯ НА ПРИЛОЖЕНИЕТО НА ИМУНОГЛОБУЛИНОВИТЕ ПРЕПАРАТИ

Терапията с интравенозни имуноглобулинови препарати има вече повече от половинвековна история. Първите съобщения за приложението на това лечение са свързани с имунодефицитните състояния и хроничната лимфоцитна левкемия. Първоначално са се правели мускулни, а по-късно – венозни апликации.

През 1981 г. швейцарският лекар Paul Imbach предписва IVIG на болно дете с имуноен дефицит и автоимунна тромбоцитопенична пурпура. За негово учудване освен повишаването на серумния IgG са се повишили и тромбоцитите. Този факт се потвърждава и от други автори и от средата на 80-те години на миналия век това лечение се прилага при всички болни с автоимунна тромбоцитопенична пурпура. Нещо повече – разширяват се показанията за приложението му при много други заболявания.

* Университетска Александровска болница, Медицински университет – София

** МБАЛ „Св. Анна – Варна“, Медицински университет – Варна

МОТИВИ ЗА ПРИЛОЖЕНИЕТО НА ИМУНОГЛОБУЛИНОВИТЕ ПРЕПАРАТИ (IVIG)

1. IVIG са имуномодулатори.
2. IVIG съдържат идиотипи, които неутрализират различни автоантитела.
3. Блокират Fc рецепторите по повърхността на макрофагите и В клетките.
4. Потискат инфламаторни молекули като цитокини, хемокини, металопротеинази.
5. Неутрализират токсини.
6. Редуцират имунните комплекси.
7. Заместителна терапия при имунни дефицити.
8. Прилагат се като алтернатива на друго лечение: напр. при пациенти, които не бива да приемат или при които е изчерпан ефектът на имunosупресивната терапия.

ПОКАЗАНИЯ ЗА ПРИЛОЖЕНИЕ

FDA представя списък на 30 апробирани и на 55 други индикации, които не са достатъчно проучени за приложение на IVIG. Те се разделят на няколко групи:

Добре проучени:

1. Имуни дефицити
2. Автоимунна тромбоцитопения
3. Болест на Kawasaki
4. Трансплантация на стволови клетки и костномозъчна трансплантация
5. Хронична В-лимфоцитна левкемия за превенция на инфекциозни усложнения
6. Превенция на реакцията трансплантат срещу хазяин
7. Превенция на инфекция с CMV

По-слабо проучени:

1. Апластична анемия
2. Аплазия на еритроцити
3. Автоимунна хемолитична анемия
4. Хемолитична болест на новороденото
5. Болни с придобити смущения във факторите на кръвосъсирването
6. Придобита болест на von Willebrandt
7. Дефицит на сегментоядрените левкоцити
8. Пемфигус, пемфигоид
9. Реакции при кръвопреливане
10. Офталмопатия при Базедов
11. Претибиален микседем
12. Мултиплен миелом
13. Ревматоиден артрит
14. Дерматомиозит
15. Системен лупус

16. При опасност от вторичен имунен дефицит – травма, изгаряне, ниско телло при раждане, HIV

17. При пациентки с репродуктивни проблеми

ЗАБОЛЯВАНИЯ, ПРИ КОИТО Е ПРОСЛЕДЕН ЕФЕКТЪТ НА IVIG

Алергични заболявания

През 1957 г. за първи път е използван за лечение при алергични пациенти. В следващите десетилетия много автори го използват за лечение на **бронхиална астма** като алтернатива на лечението с кортикостероиди, особено при кортикостероид-резистентни пациенти и при пациенти с много усложнения от кортикотерапията. През деветдесетте години на миналия век болен с Kawasaki и атопичен дерматит е лекуван успешно с IVIG, като са се повлияли успешно и двете заболявания. При болни с атопичен дерматит IVIG се препоръчва в случаите на неуспешно друго лечение или наличие на множество усложнения от това лечение. Установено е, че намалява концентрацията на серумните IgE, подобряват се симптомите на болестта, но само при една част от болните. По отношение на кръвната еозинофилия са наблюдавани болни както с повишаване, така и с понижаване на еозинофилията.

Дерматологични заболявания

При тези болести IVIG е втора линия на лечение – в случаите, когато стандартната терапия е изчерпала своите възможности или има много странични ефекти. Така напр. се съобщава, че при **дерматомиозит** изчезва обривът и се подобрява мускулната сила. При **системен лупус** се наблюдава клинично и имунологично подобрение, при **склеродермия** – намаление на дистрофичните изменения, при **булозни дерматози** се прилага само едновременно с друго лечение, при **синдром на Stevens-Johnson** се разчита на намиращите се в IVIG анти – Fas антитела, които ще инхибират Fas-медираната апоптоза на кератиноцитите, индуцирана от FasL.

Неврологични заболявания

IVIG са първа линия на лечение при следните заболявания: хронична инфламаторна демиелинизираща невропатия, синдром на Guillain-Barre, мултифокална моторна невропатия. Като втора линия за лечение се използват при мултиплен склероза и миастения гравис.

Необходими изследвания преди започване на терапията

При започване на лечение с IVIG трябва да се вземат под внимание следните показатели:

- Серумни имуноглобулини (високи IgG и ниски IgA)
- RF и криоглобулини, особено при болни с предшестваш обрив и артралгия
- Креатинин, урея
- Хиперпролинемия
- Тромбоцити
- **Особено при бременни** – генетични фактори, свързани с повишена склонност към тромбофилия: фактор V Leiden, 20210, MTHFR, PAI.

- **При бременни** – ANA, антифосфолипидни антитела, антиовариални, антиуреидни антитела
- **При бременни** – NK клетки
- **При бременни** – CD4/CD8 – да се обърне внимание на понижените CD8, вследствие на което съотношението CD4/CD8 се повишава

Фактори, на които трябва да се обърне внимание преди началото на лечението

Преди началото на лечението трябва да се съобразим със следните фактори:

• Възраст на болния – при много възрастни пациенти има опасност от усложнения, IVIG е подходящ при по-възрастни жени с репродуктивни нарушения, при по-младите – водещи са генетичните фактори.

- Подходящ ли е пациентът за тази терапия, или има и друга алтернатива?
- Да се прецени ползата и вредата от това лечение.
- Да се изключи ендометриоза.
- Да се изключи атеросклероза.
- Да се изключи кардиоваскуларен риск.
- Наличие на хиперкоагулационен статус.
- Наличие на хипервискозитет на кръвта.
- Болни с продължителна имобилизация.
- Дехидратирани болни.
- Болни с диабет.
- Болни със сепсис.
- Болни с парапротеинемия.
- Болни, приемащи нефротоксични лекарства.
- Болни с високи триглицериди.
- Кой препарат да изберем? Да се обърне внимание на препаратите, съдържащи **сукроза**.

- Внимателно да се прецени смяната на препарата и промяната в дозата.

Преди лечението трябва да се запознаем с качествата на препарата, тъй като всеки препарат е произведен от различни плазми и има различни антитела, подложен е бил на различни методи за инактивация на вирусите, има различни стабилизиращи агенти, различен рН, различни странични ефекти, различно съдържание на IgA, различно съдържание на соли, различен осмолалитет.

При самото приложение трябва да се съобразят следните факти: да се извършва мониториране на виталните показатели при инфузия с IVIG в продължение на няколко часа – първия час през 15 мин, след това на всеки час. Важно е къде ще направим инфузията – в болнична или извънболнична обстановка? Необходимо е да се избягва приложението на живи ваксини 2 седмици преди и 3 месеца след апликацията на IVIG. Не бива да се забравя вземането на информирано съгласие от пациента или неговия представител, тъй като не сме гарантирани от усложнения от приложението на един биологичен препарат, **вкл. и инфекциозни усложнения**. Не на последно място трябва да си зададем въпроса: **Кой ще плати това скъпо лечение?**

НЕЖЕЛАНИ ЕФЕКТИ ОТ ЛЕЧЕНИЕТО С IVIG

Използването на IVIG при по-голям кръг от болни и при повече и най-различни показания доведе до проявяването на много от страничните ефекти на това лечение (1-4). Според FDA 15 % от болните, приемали IVIG, имат странични ефекти. Повечето от тях са по време веднага след инфузията или на следващия ден:

- Реакции на мястото на апликацията
- Гадене и повръщане
- Тахикардия и промени в кръвното налягане
- Асептичен менингитен синдром (главоболие, фотофобия, вратна ригидност!)
- Главоболие, **понякога дължащо се на мозъчен кръвоизлив!**
- **Отпадналост и обърканост** – също се свързва с преминаване на кръвно-ликоворната бариера!
- Системни алергични реакции – обрив и зачервяване, сърбеж
- Ставни и мускулни болки
- Болки в кръста
- Повишаване на телесната температура
- Хемолиза и хемолитична анемия
- Неутропения
- Белодробен оток
- Дълбоки венозни тромбози
- Васкулит на ретината и пануеит след лечение на IVIG, **богат на ANCA**
- **Бъбречна недостатъчност** – описани са 114 такива случая, 17 от които със смъртен изход!
- При някои пациенти, напр. с имунна тромбоцитопения, той не действа или ефектът му се изчерпва.
- **Липсата на ефект е също страничен ефект!**
- Опасност от инфекция от неотстранени или неизвестни причинители (напр. болест на **Creutzfeldt-Jacobs**), има данни за трансмисия на **хепатит С!**
- Неудобства при лечението – прилага се всеки месец, за предпочитане в болница и инфузията продължава няколко (4-6) часа.
- Скъпоструващо лечение

ПРИЧИНИ ЗА НЕЖЕЛАНИТЕ ЕФЕКТИ

- Използване на това лечение при неподходящи диагнози и пациенти.
- Липса на лабораторни изследвания – както имунологични, така и биохимични преди, по време и след терапията.
- Твърде интензивно вливане на имуноглобулиновите препарати – за кратък период (за 1-2 ч), в големи количества (1,2 – 2 g/kg за период от 3-5 дни), много често (през 14 дни).
- Липса на мониториране на лечението и усложненията.
- Стабилизатори и презервативи в препаратите.
- Наличие на сукроза.
- Наличие на агрегати (димерни и полимерни имуноглобулини), които могат да дегранулират неутрофилите.

- Наличие, макар и на нищожни, количества IgA.
- Наличие на ANCA (срещу лактоферин, левкоцитна еластаза, катепсин, bactericidal/permeability increasing protein), но не и срещу МРО и серинова протеаза **в титри от 1:32 до 1:2048!** в имуноглобулиновите препарати.
- Наличие на ANA в титри 1:30 – 1:240 в имуноглобулиновите препарати.
- Наличие на антигладкомускулни (ASMA) антитела в някои препарати в титър 1:240. Тези антитела нямат характеристиката на антиактинови антитела, които могат да интерферират с ANCA в имуноглобулиновите препарати.
- Тези антитела (ANCA, ANA, ASMA) се намират и в нормалния серум в много ниски количества – това са т.нар. естествени антитела. В концентрирания пул от имуноглобулини тяхната концентрация е много по-висока и те могат да се насочат към собствени антигени. При масивна инфузия на IVIG тези реакции не могат вече да се блокират от реципиента.
- Реакцията на организма е обусловена от имуноглобулиновите агрегати, от наличните антитела в големи количества, които предизвикват оксидативен взрив, активация на PAF, дегранулация на клетки, особено на неутрофили.

ЛЕЧЕНИЕ НА НЕЖЕЛАНИТЕ ЕФЕКТИ

- Премедикация – аналгетици/антипиретици
- Антихистаминови препарати
- Кортикостероиди
- Избор на препарат!

ДАНИ ОТ МНОГОЦЕНТРОВИ ПРОУЧВАНИЯ

Неонатална алоимунна тромбоцитопения – алтернативи са кортикостероидите, обменна хемотрансфузия, последвана от трансфузия на тромбоцити. IVIG се предпочита в случаите на много ниски тромбоцити (< 20 000) и при наличие на интракраниален кръвоизлив.

Булозни дерматози – в случаите, когато стандартната терапия (кортикостероиди, имunosупресори, плазмафереза, екстракорпорална фотофореза) е с изчерпани възможности или има много странични ефекти.

Guillain-Barre синдром – IVIG и плазмаферезата имат еднакъв резултат. Лечението с кортикостероиди дава противоречиви резултати.

Мултиплена склероза – ако лечението с кортикостероиди, интерферон бета, глатирамер, азатиоприн, метотрексат, циклофосфамид и циклоспорин не е ефективно.

Миастения гравис – лекува се с инхибитори на ацетилхолинестеразата, тимектомия, кортикостероиди, азатиоприн, циклоспорин, циклофосфамид. При изчерпване на ефекта – IVIG. При криза – плазмафереза, последвана от IVIG.

Проблемна бременност – IVIG имат по-голям ефект при по-възрастни жени – средна възраст $36,4 \pm 1,4$ г., с данни за имунологични нарушения. Много автори считат, че това лечение трябва да започне преди зачеването и да продължи регулярно всеки месец до края на втория триместър, а според други – до 34 г.с. Стандартно се поставя 400-500 мг/кг за една доза, като някои автори предпочитат

двойно по-ниско количество – 200-250 мг/кг за една доза. Да не забравяме, че имуномодулиращият ефект на тази терапия е качествен, а не количествен!

НАКРАЯ: КАКВО НИ ПРЕДСТОИ?

- Създаване на работни групи и още многоцентрови проучвания
- Създаване на консенсуси и алгоритми
- Създаване на норми за имунологичните показатели
- Работа с други заинтересовани специалности – педиатри, интернисти, невролози, акушери, гинеколози и др.
- Работа с пациентските организации
- Популяризиране на данните за това лечение
- Популяризиране на данните за възможните странични ефекти и тяхното лечение

ЛИТЕРАТУРА

1. Bertolini TE, Nance AH, Horner LT et al. Complications of intravenous gammaglobulin in neuromuscular and other disease. *Muscle Nerve* 1996; 19: 388-391.
2. Ippoliti C, Williams LA, Huber S. Toxicity of rapidly infused and concentrated immune globulin. *Clin Pharmacol* 1992; 11: 1022-1026.
3. The use of IVIG therapy in dermatology. *Am Acad Dermatology Annual Meeting* 2008, Symp 320.
4. Guidelines for the use of IVIG in neurological diseases (revised July 2005). *Assoc of British Neurologists*.

НЕЖЕЛАНИ ЕФЕКТИ ОТ ЛЕЧЕНИЕТО С ИНТРАВЕНОЗНИ ИМУНОГЛОБУЛИНОВИ ПРЕПАРАТИ

М. Балева и К. Николов***

** Университетска Александровска болница, Медицински университет – София, **МБАЛ „Св. Анна – Варна“, Медицински университет – Варна*

Лечението с имуноглобулинови препарати през последните години навлезе широко в медицинската практика за лечение на различни заболявания. В същото време използването на IVIG при по-голям кръг от болни и при повече и най-различни показания доведе до проявяването на много от страничните ефекти на това лечение. Повечето от тях са по време веднага след инфузията или на следващия ден: реакции на мястото на апликацията, гадене и повръщане, тахикардия и промени в кръвното налягане, асептичен менингитен синдром (главоболие, фотофобия, вратна ригидност!), системни алергични реакции, ставни и мускулни болки, болки в кръста, повишаване на телесната температура, хемолиза и хемолитична анемия, неутропения, белодробен оток, дълбоки венозни тромбози, бъбречна недостатъчност, опасност от инфекция от неотстранени или неизвестни причинители (напр. болест на Creutzfeldt-Jacobs) и пр. Това налага стриктно спазване на алгоритъма и показанията за това лечение.

Ключови думи: интравенозни имуноглобулини, странични ефекти

ADVERS EFFECTS OF THE IVIG TREATMENT

M. Baleva and K. Nikolov***

** University Hospital Alexandrovska, Medical University – Sofia, ** University Hospital St. Anna, Medical University – Varna*

IVIG treatment is widely used in a large number of diseases and conditions. Therefore, a wide variety of side effects have been observed. In most cases the adverse effects develop during, immediately after or within 24 hours after the intravenous administration of IVIG – reactions at the site of administration, nausea, vomiting, tachycardia, and changes in blood pressure, aseptic meningitis syndrome (headache, photophobia, and stiff neck!), systemic allergic reactions, joint and muscle pains, back pain, fever, haemolysis and haemolytic anemia, neutropeny, pulmonary edema, deep vein thromboses, renal failure, increased risk of infection with unpurified or unknown pathogens (i.e., Creutzfeldt-Jacob disease), etc. These side effects require keeping the instructions for administration, the algorithm and indications for treatment with IVIG.

Key words: intravenous immune globulines, advers effects

ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПУЛС-ТЕРАПИИ С ИНТРАВЕНОЗЕН ИМУНОГЛОБУЛИН ПРИ БОЛНИ СЪС СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС

Р. Рашков, В. Решкова

*Клиника по ревматология,
УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София, България*

I. ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е автоимунно заболяване на съединителната тъкан, което протича с разнообразни клинични симптоми, синдроми и имунни феномени. Целта на настоящото клинично изследване е да се оцени ефектът от приложението на пулсова терапия (ПТ) с интравенозен имуноглобулин при болни със СЛЕ и да се сравни с група болни, нелекувани с имуновенин.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В клиниката по ревматология в София са проследени 2 групи болни:

I група – 29 жени на възраст 20-60 години, лекувани с имуновенин 250 мг/кг през 3 месеца за период от 12 до 18 месеца успоредно с ежемесечни пулсове с метилпреднизолон и циклофосфамид по 1 г месечно при активност на болестта.

II група – 23 жени на възраст от 20 до 70 години, лекувани за период от 12 до 18 месеца с пулсови терапии с метилпреднизолон и ендоксан по 1 грам венозно месечно.

Всички болни се лекуват с метилпреднизолон от 8 до 16 мг дневно. Болните, които имат епилептиформени гърчове, приемат трилептал или кепра най-малко 3 месеца преди проследяването. Диагнозата СЛЕ е поставена по критериите на ARA 1982 г. Клиничното състояние на болните е оценено в началото и края на лечението по скалата за болестна активност на СЛЕ – SLEDAI, имунологично изследване на антитела, изследване на протеинурия.

III. РЕЗУЛТАТИ

I Група – лекувани с ПТ с имуновенин

1. Епилептиформени гърчове има 1 болен, в края на лечението не се регистрират гърчове.
2. Органичен мозъчен синдром има при 5-има болни, след лечението остава при 1 болен, подобрението е 80% в групата.

3. Нарушение на функциите на ЧМН има при 3-ма болни, след лечението остава 1 болен с тези оплаквания, подобрението в групата е 66,6%.

4. Лупусно главоболие има при 12 болни, в края на лечението се наблюдава при 10 болни, подобрението в групата е 16,6%.

5. Мозъчносъдови инциденти се регистрират при 3-ма болни, в края на лечението последствията са при 1 болен, подобрението в групата е 66,6%.

6. Васкулит има при 4-ма болни, в края на курса на лечение остава в период на излекуване при 2-ма болни, подобрението е 50 %.

7. Протеинурия се установява при 19 болни, в края на лечението остава при 1 болен, подобрението в групата е 91%.

8. Обриви се установяват при 12 болни, в края на лечението се регистрира нов обрив при 1 болен, подобрението в групата е 91,7%.

9. Артралгии/артрит в началото се наблюдава при всички болни, като в края на лечението 2-ма болни имат артралгии.

10. Анти – нДНК антитела – при 20 болни има значително намаляване на стойностите, като общото намаляване в групата е 60%.

11. Анти Sm антитела – всички болни са с нормални показатели на антитялото в началото на лечението.

12. Антикардиолипинови антитела (АКЛА) – при 2-ма болни в началото са повишени и има значително намаляване в хода на терапията.

II група – лекувани само с ПТ с метилпреднизолон и циклофосфамид

1. Епилептиформни гърчове имат 12 болни, от които при 10 болни се наблюдава намаляване до изчезване на припадъците, подобрението в групата е 83%.

2. Психотични прояви има при 3-ма болни, а в края на лечението се наблюдават само при 1 от тях.

3. Органичен мозъчен синдром се диагностицира при 14 болни, подобрение отбелязват 6 от тях, подобрението на симптома е с 42%.

4. Увреда на функциите на черепно-мозъчни нерви (ЧМН) се установява в началото на лечението при 6-има, а в края на лечението с подобрение са 4-ма болни, подобрението на симптома е 66,6%.

5. Лупусното главоболие – в началото имат 22-ма болни, в края на лечението симптомът липсва при 7 болни, подобрението е с 31 %.

6. Мозъчносъдови инциденти се установяват с МРТ при 11 болни в началото на лечението. До края на лечението при 1 болна има нов мозъчносъдов инцидент, при останалите няма нови прояви.

7. Протеинурия се установява при 11 болни, в края на лечението остава при 2 болни, подобрението на симптома е 82%.

8. Обриви в началото има при 22-ма болни, в края – при 1 болен.

9. Артралгии/артрит в началото се наблюдават при всички болни, в края на лечението от артралгии се оплакват 3-ма болни.

10. Изследването на антителата срещу двойноверижната ДНК показва тенденция към намаляване и нормализиране в края на лечението при болни – при 11 болни намалява, при 2-ма болни не се променя, при 3-ма болни нараства, подобрението на показателя е с 22%.

11. Анти Sm антитела – при 2-ма болни в началото има високи стойности, при 1 се нормализира в хода на лечението, при другия остава висока.

13. АКЛА – при 1 болен има високи стойности, които намаляват в хода на лечението, но не се нормализират.

Изводи:

1. При сравняване на двете групи болни в първа група – с имуновенин, се установява сигнификантна разлика в положителното повлияване на органичния мозъчен синдром и протеинурията в сравнение с II група.

2. С 38% повече намаляват антителата срещу двойноверижната ДНК в I група с имуновенин в сравнение с II група за наблюдавания период на лечение.

ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПУЛС-ТЕРАПИИ С ИНТРАВЕНОЗЕН ИМУНОГЛОБУЛИН ПРИ БОЛНИ СЪС СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС

Р. Рашков, В. Решкова,

Клиника по ревматология,

УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София, България

Изследвани са две групи болни от системен лупус – лекувани с пулсова терапия с имуновенин и такива, лекувани само с пулсова терапия с метилпреднизолон и циклофосфамид. Установява се, че при болните от първата група се подобряват значително по-добре мозъчният синдром и протеинурията и намаляват антителата срещу двойноверижна ДНК в сравнение с втората група пациенти.

Ключови думи: системен лупус, интравенозни имуноглобулини

PULSE THERAPY WITH INTRAVENOUS IMMUNE GLOBULINE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS

R. Rashkov, B. Reshkova

University Hospital „St Ivan Rilski“ Sofia, Bulgaria

We investigate two groups of patients with systemic lupus: treated with pulse therapy with intravenous immune globuline and treated only with methylprednisolone and cyclophosphamide. We find an improvement of cerebral symptoms and proteinuria and decreased anti DNA antibodies in the first group in comparison with second group.

Key words: systemic lupus, intravenous immune globulines

НАСЛЕДСТВЕН АНГИОЕДЕМ – КЛИНИКА, ДИАГНОЗА, ТЕРАПИЯ

К. Николов и М. Балева***

1. Обща характеристика на генетичния дефект

Наследственият ангиоедем е наследствено заболяване, което се предава по автозомно-доминантен път. Дължи се на мутации в гена за C1 естеразния инхибитор-SERPING 1-11q12-q13.1 хромозома. До настоящия момент са описани повече от 150 различни вида мутации (1).

Заболяването е описано като особена форма на едема на Н. Quincke (2) от W. Osler (3). През 1963 г. VH Donaldson и RR Evans (4) доказват, че причина за болестта е намалената серумна концентрация на C1 естеразния инхибитор. Известни са и следните други наименования на болестта: наследствен ангионевротичен оток, херeditарен ангиоедем, особена форма на едема на Quincke. Счита се, че болестта се проявява в следните три форми:

I тип – генната мутация предизвиква производство на недостатъчно количество от C1 естеразния инхибитор с ниска активност. В този случай промените засягат целия ген.

II тип – генната мутация предизвиква производство на неактивен инхибитор с нормална концентрация. Мутациите са в 8 екзон близо до активния център.

III тип – генната мутация засяга коагулационен фактор XII, което предизвиква повишена продукция на брадикинин. C1 инхибиторът е с нормална функция и концентрация, този тип е естроген зависим, наблюдава се главно при жени.

2. C1 естеразен инхибитор

C1 естеразният инхибитор е член на суперфамилия плазмени протеиназни инхибитори, наречени СЕРПИНИ. Той инхибира функцията на следните протеази: C1r, C1s, каликреин, фактор XIIa, маноза-свързващ лектин-асоциирана протеаза I и 2. При количествен дефицит или качествено дефект в молекулата на C1 инхибитора се активират плазмени протеолитични каскади и се образуват големи количества вазоактивни субстанции, от които най-голямо патогенетично значение има брадикининът. Вследствие на това се увеличава съдовият пермеабилитет.

Дефицитът или функционалната неактивност на C1 естеразния инхибитор по време на пристъп на НАЕ води до увеличаване на C1 естеразата, последната изчерпва C2 и C4 компонентите на комплемента, които формират C3 конвертазата,

* МБАЛ „Св. Анна – Варна“, Медицински университет – Варна

** Университетска Александровска болница, Медицински университет – София

вследствие на което се активира не само класическият, но и алтернативният път за активация на комплементарната каскада.

3. Клинична картина на наследствения ангиоедем (НАЕ)

Заболяването се счита за рядко с честота от 1/10 000 до 1/150 000 души (5, 6, 7, 8). Смъртността обаче е висока – 15 – 33%, главно от оток на ларинкса и последвалата механична асфиксия. Не са описани различия между отделните раси, както и между двата пола, но трети тип е главно при жени, като са наблюдавани и няколко случая при мъже. Обикновено болестта се проявява още в детството – в 40% от случаите преди 5 г. възраст, а в 75% – преди навършване на 15 г. По време на пубертета симптомите са по-тежки, но има и данни, че с напредване на възрастта по-рядко се наблюдават тежки клинични изяви. Обикновено заболяването е фамилно, но се наблюдават и спонтанно възникнали нови мутации.

Най-често заболяването започва с прояви от страна на кожата – появяват се пристъпни отоци по лицето, ръцете, стъпалата, гениталиите, мукозите. Обикновено отокът е несърбящ, в някои случаи има и придружаващ обрив (при 25% от болните еритем преди поява на отока, при 30-50% – *erythema marginatum*). Наблюдавани са главоболие, смущения в зрението (диплопия), атаксия, както и едем на мускули със силна болезненост. Отокът на мукозите се проявява с подуване на езика, фаринкса, ларинкса и последващ задух и дихателна недостатъчност.

Поради отока на стомашната и чревната лигавица са описани стомашни болки, симулиращи клиниката на язвена болест, или апендикуларни болки, симулиращи прояви на остър корем, понякога и асцит. По-рядко са наблюдавани плеврит, мозъчен удар, хемипареза. Характерно за отоците е, че не се повлияват от стандартната антиалергична терапия. Продължителността на оточния синдром е различна и при нелекуваните пациенти е между 24 – 72 часа. Обикновено кризите са всяка седмица (1).

Предразполагащи фактори за проява на болестта са: травма (особено при зъболекарски манипулации), менструация, инфекция, физически упражнения, прием на алкохол, стрес, прием на някои лекарства (естрогени, АСЕ инхибитори, ангиотензин II рецепторни антагонисти), бременност.

НАЕ може да се наблюдава едновременно със следните заболявания: системен лупус (2% от случаите), гломерулонефрит, ревматоиден артрит, тиреоидит, синдром на Sjogren, пернициозна анемия, инфекция с *Helicobacter pylori*, като в последния случай симптомите са по-тежки.

4. Параклинични изследвания

При първи тип НАЕ обикновено се установява намаление на серумната концентрация на C1 инхибитора и на C2 и C4 фракциите на комплемента. При втория тип концентрацията на C1 инхибитора е нормална при намалена функционална активност, C4 и C2 фракциите са понижени. Третият тип се характеризира с нормална концентрация и непроменена функционална активност на C1 инхибитора, като C4 обикновено е в норма.

При рентгенографското изследване може да се установят данни за илеус, за плеврит, а при компютърно-аксиална томография и ехография – задебеляване на чревната стена, наличие на течност около червата, голямо количество перитонеална течност. Хистологичните промени в засегнатите участъци се характеризират с едем на дерма или субкутанен или субмукозен едем без наличие на възпалителен инфилтрат. Може да има вазодилатация.

5. Диференциална диагноза

Диференциалната диагноза включва следните състояния:

- отоци при придобит дефицит на C1 инхибитора при имунокомплексни или лимфопролиферативни заболявания;
- отоци при наличие на антитела срещу C1 инхибитора;
- отоци при уртикария и ангиоедем;
- медиирани от ИгЕ реакции отоци;
- отоци при други заболявания – патология на щитовидната жлеза, бъбречна и сърдечна недостатъчност и пр.

6. Лечение

За профилактика на болестта се препоръчват кратковременни курсове със 100-600 мг дневно Danazol или по-продължително лечение с 200 мг дневно. Страничните ефекти на това лечение са: високо кръвно налягане, маскулинизация, порядко – хепатотоксичност и чернодробни тумори. Контраиндикациите включват простатния карцином, бременността, детската възраст, сърдечната и чернодробната недостатъчност, неизясненото генитално кървене. Друг медикамент е е-аминокапроновата киселина, която е по-малко ефективна.

Напоследък като заместител на Danazol се прилага Stanazol в доза 2 мг дневно в продължение 1-3 месеца. При деца под 1 г. – 1 мг дневно. Контраиндикации са свръхчувствителност, нефроза, рак на гърдата и на простатата. Този медикамент усилва ефекта на антикоагулантите, на инсулина и на сулфанилурейните препарати.

Най-голям опит при лечение на НАЕ е натрупан от прилагането на концентрат от C1 инхибитор както като профилактично средство, така и за лечение. При някои случаи ефект има само прилагането на свежа плазма.

В момента се въвеждат и следните нови медикаменти: рекомбинантен C1 инхибитор, рекомбинантен инхибитор на каликреина (DX-88), антагонист на брадикинина (Icatiban), други протеазни инхибитори – антитромбин III, бета-макроглобулин, алфа-1-антитрипсин (1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Zuraw BL. Hereditary angioedema. N Engl J Med, 359, 2008, 1027-1036.
2. Quincke H. Iiber akutes umschriebenes Hautoedem. Monatsh Prakt Derm 1888, 1, 129-131.
3. Osler W. Hereditary angio-neurotic oedema. Am J Med Sci 1888, 95, 362-367.
4. Donaldson VH & RR Evans. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C1-esterase. Am J Med 1963, 35, 37-44.
5. Cicardi M & A. Agostoni. Hereditary angioedema. N Engl J Med, 1996, 334, 25 1666-1667.
6. Visentin DE, WH Yang, J Karsch. C1-esterase inhibitor transfusions in patients with hereditary angioedema. Ann Allergy Asthma Immunol, 1998, 80, 6, 457-461.
7. Borum ML & DE Howard. Hereditary angioedema. Complex symptoms can make diagnosis difficult. Postgrad Med, 1998, 103, 4, , 251,255-256.
8. Bork K, K Siedlecki, S Bosch et al. Asphyxiation by laryngeal edema in patients with hereditary angioedema. Mayo Clin Proc, 2000, 75, 4, 349-354.

НАСЛЕДСТВЕН АНГИОЕДЕМ – КЛИНИКА, ДИАГНОЗА, ТЕРАПИЯ

К. Николов* и М. Балева**

* МБАЛ „Св. Анна – Варна“, Медицински университет – Варна
 ** Университетска Александровска болница, Медицински университет –
 София

Заболяването е описано през 1882 г. като особена форма на едема на Quincke. Диагнозата на наследствения ангиоедем (НАЕ) се поставя въз основа на следните критерии: 1. Фамилност на заболяването. 2. Характер на отока и повлияване от антихистаминови средства и кортикостероиди. 3. Повлияване на отока от вливането на свежа плазма или пречистен C1 естеразен инхибитор. 4. Данни за силно понижена или липсваща серумна концентрация на C1 естеразния инхибитор. 5. Данни за намалена функционална активност на C1 естеразния инхибитор. 6. Генетични изследвания. Обикновено 85 % от болните имат ниска или липсваща концентрация на C1 естеразния инхибитор и намалена функционална активност на този протеин (I тип НАЕ – количествен дефицит). Останалите 15 % са с нормални серумни нива на C1 естеразния инхибитор, но с понижена функционална активност (II тип НАЕ – качествен дефицит). В този случай много често появата на отока е свързана с механична травма. Генният дефект, обуславящ I тип НАЕ, се дължи на мутантен алел, неспособен да експресира информация за синтез на инхибитора. При II тип НАЕ мутантният алел кодира синтеза на функционално неактивен инхибитор с променен реактивен център. При 2% от болните с НАЕ са установени положителни антинуклеарни антитела и клинична симптоматика за лупус. При роднините на болни от НАЕ се срещат и други автоимунни заболявания. Лечението на НАЕ включва приложението на свежа плазма или препарат от C1 инхибитор по време на пристъп и модифицирани андрогени (Danazol) в междупристъпния период.

Ключови думи: Наследствен ангиоедем

HEREDITARY ANGIOEDEMA –
CLINICAL, DIAGNOSTIC
AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS

K. Nikolov* and M. Baleva**

* *Department of Dermatovenerology, Medical University – Varna*

** *Department of Clinical Immunology, Medical University – Sofia*

The hereditary angioedema (HAE) was first described in 1882 as a peculiar form of the Quincke's edema. The hereditary angioedema has autosomal-dominant pattern of inheritance. The diagnosis is based upon the following criteria: 1. Family history. 2. Type of edema and effect of antihistamin agents and corticosteroids. 3. Effect of fresh-frozen plasma or purified C1-esterase inhibitor. 4. Marked decrease or lack of serum C1-esterase inhibitor. 5. Decrease activity of C1-esterase inhibitor. 6. Genetic studies. Approximately 85% of the patients have low or no detectable C1-esterase inhibitor in the serum and decreased activity of this protein (type I HAE – quantitative deficit). The rest 15% of the patients have normal C1-esterase inhibitor serum levels with decreased activity of the protein (type II HAE – qualitative deficit). The second type of HAE is associated with the development of edema after mechanical trauma. The underlying genetic defect in type I HAE is allele mutation leading to the lack of expression of information for the synthesis of the inhibitor. In type II HAE the mutant allele codes a functionally inactive inhibitor molecule with altered active center. Approximately 2% of the patients have positive antinuclear antibodies and clinical manifestation suggesting systemic lupus erythematosus. Different immunological abnormalities have been found in the relatives of HAE patients. The treatment of HAE includes the transfusion of fresh-frozen plasma or C1-esterase inhibitor during an attack and modified androgens (Danazol) between the attacks.

Key words: Hereditary angioedema

Схеми 1, 2, 3 на ВОК по имунология: имуноглобулини, комплемент, СРП, автоантитела, HLA-B27 – нашият петгодишен опит

А. Михайлова, П. Бонева, М. Димитрова, Д. Йорданова, Е. Наумова
Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“, София

Въведение

Лабораториите, осъществяващи медико-диагностични услуги, трябва да гарантират и поддържат високо качество на предлаганите изследвания, точност и своевременно получаване на резултатите, тъй като в редица случаи диагнозата и терапията на пациента се базират на техните резултати. Това налага изработването и провеждането на стриктна политика за осигуряване на качеството във всяко едно от тези звена. Прецизността и точността на резултатите се осигуряват чрез процесите на вътрешен качествен контрол (ВКК) и външна оценка на качеството (ВОК). Една от основните цели за осигуряване на качеството в медико-диагностичните лаборатории е да се намалят междулабораторните вариации (1, 2, 3) и да се унифицират резултатите между отделните лаборатории (4), което да позволи адекватната им клинична интерпретация. Чрез ВКК се верифицира и мониторира ежедневното функциониране на тест системите, точността и валидността на резултатите. Ролята на ВОК в осигуряване на качеството е по-широка и включва демонстриране и оценка на възможностите на дадена лаборатория за специфични измервания, тествания и анализи; сравняване и съпоставяне на методи и резултати от различни лаборатории; предоставяне на информация за обучение на персонал; адекватни мерки за подобряване на качеството. Ето защо участието в схеми на ВОК е неразделна част от политиката за оценка на качеството за всяка медико-диагностична лаборатория.

Необходимостта от създаването на организирана програма за ВОК по имунология в България бе продиктувана от няколко факта: отделните лаборатории участваха с ограничен брой показатели в различни схеми на ВОК; НЗОК изисква сертификати от ВОК, провеждана на национално ниво; ВОК е основна част от акредитационната процедура. Целта бе: да се създаде и организира система на ВОК по имунология на национално ниво; да се обхванат максимален брой клинично значими параметри, изследвани от достатъчен брой участници – предпоставка за адекватни съпоставяне, анализ и оценка на резултатите, отговарящо на изискванията за провеждане на ВОК; да се организира ВОК по имунология от Българската асоциация по клинична имунология (БАКИ). ВОК на показатели от хуморалния имунен отговор, включваща няколко схеми, започна през 2005 г. Участниците могат да се регистрират за схеми по избор, както и за отделни или за всички параметри от дадена схема. В настоящата статия е направен сравнителен анализ на резултатите от междулабораторния качествен контрол на показатели от хуморалния имунен отговор за петгодишен период (2005 – 2009). Допълнително са представени данните от въведената през 2006 г. ВОК за определяне на HLA-B27.

Материал, методи и резултати

Схема 1 – имуноглобулини, комплемент, С-реактивен протеин (СРП)

През 2005 г. в тази схема за качествен контрол са взели участие 17 лаборатории, а през 2008 г. броят им е нараснал на 28, но през 2009-а е спаднал на 26. Проведени са 4 цикъла за 2005 – 2006 г., а от 2007 г. е взето решение от БАКИ за провеждане на три цикъла годишно с по две проби на цикъл. През 2009 г. към тази схема е включено определяне на ИгЕ.

Резултатите на всеки участник се съпоставят с таргетните стойности и граници на вариации, определени от INSTAND, от които се получават контролните материали. За изчисляване на отклоненията (в %) на индивидуалните резултати се използва следната формула:

$$[(\text{лабораторна стойност} - \text{таргетна стойност})/\text{таргетна стойност}] \times 100.$$

Допълнително се оценява дали тези резултати са в рамките на допустимите вариации въз основа на приетите от INSTAND долна и горна гранична стойност за съответния параметър.

Имуноглобулини, комплемент

Използваните методи за определяне на ИгГ, ИгА, ИгМ, С3 и С4 фракциите на комплемента са: радиална имунодифузия (РИД), нефелометрия (НМ) и турбидиметрия (ТД). Относителният дял на лабораториите, използващи РИД, е най-голям, но постепенно намалява в годините (2005 г. – 64,7%; 2006 г. – 55%; 2007 г. – 53,8%; 2008 г. – 50%; 2009 г. – 46,2%). Нарастването на броя участници, прилагащи турбидиметрични и константният брой на тези с нефелометрични методи водят до инвертиране на съотношението между двата метода през 2007 г. (НМ –19%; ТД – 27%) и 2008 г. (НМ – 17,9%, ТД – 32,1%) в сравнение с 2005 (НМ – 29,4%, ТД – 5,9%) и 2006 г. (НМ – 25%; ТД – 19%). През 2009 г. нараства броят на лабораториите, прилагащи НМ, и намалява този на използващите ТД, което води до еднакво съотношение между двата метода (27%).

Анализът на резултатите на отделните участници показва (табл. 1), че най-често установяваните несъответствия за ИгГ, ИгМ и С3 намаляват в годините, но тези за С4 (> допустима стойност), независимо че варират, остават в относително висок процент. Най-малко неприемливи резултати се наблюдават за ИгА. Повече и по-значими отклонения от приетите граници на вариации се констатират при РИД, главно над горни допустими стойности.

Таблица 1. Отклонения от допустимите граници

Параметър	2005	2006	2007	2008	2009
ИгГ (<допустима стойност)	16,3%	13,0%	26,6%	9,5%	8,0%
ИгМ (>допустима стойност)	23,5%	14,0%	8,9%	1,8%	2,7%
С3 (<допустима стойност)	13,2%	10,6%	3,8%	6,5%	1,5%
С4 (>допустима стойност)	19,4%	35,2%	20,5%	12,5%	18,2%

През 2009 г. започна определяне на общ ИгЕ. Участвали са 10 лаборатории, а използваните методи са: имуноензимни (n=5), хемилуминисценция (n=4) и латекс-саглутинация (n=1). Като цяло резултатите са съпоставими с тези на INSTAND. Несъответствията се констатираат в стойности над (n=1) и под (n=1) допустимите граници на вариации.

С-реактивен протеин (СРП)

Във ВОК по този показател се използват 4 метода: турбидиметрични, латекс-аглутинационни (ЛА), нефелометрични и радиална имунодифузия. Около 80% от участниците прилагат ЛА или ТД техники. През 2008 г. съотношението е в полза на ТД (ЛА – 26.3%; ТД – 52.6%), но през 2009 г. то инвертира (ЛА – 47%, ТД – 35.3%). Индивидуалните лабораторни стойности за СРП продължават да варират в много широки диапазони. Латекс-аглутинационните методи показват най-значими девиации при количествено определяне на СРП, а някои лаборатории продължават да представят резултатите като отрицателни или положителни (в различна степен). Лабораториите, прилагащи автоматизирани методи (ТД, НМ), дават като цяло резултати в допустимите граници на вариации, а отклоненията са незначими.

Схема 2 – автоантитела

Схемата, предназначена за определяне на различни автоантитела в серум, е разделена на отделни подсхеми, провеждани еднократно за годината с по две проби за съответния показател.

Схема 2А – антинуклеарни антитела (АНА) и анти-ДНК антитела

Броят на участниците в тази схема е нараснал от 14 през 2005 г. на 20 през 2009 г. Прави впечатление увеличаването на лабораториите, използващи имуноензимен метод (ИЕМ) за определяне на АНА и анти-ДНК антитела, и намаляване на тези, прилагащи индиректна имуофлуоресценция (ИИФ). Докато през 2005 г. 57% от участниците са използвали ИИФ за определяне на АНА, през 2009 г. те са намалели до 30%, а 65% са предпочели ИЕМ. Единични лаборатории дават резултати за този показател по двата метода. Само един участник използва аглутинационен метод за откриване на АНА. Определянето на анти-ДНК антитела показва подобна тенденция по отношение на методологичния подход. Докато през 2005 г. 35,7% са изследвали този параметър с ИИФ и 64,3% чрез ИЕМ, то през 2009 г. ИИФ е била метод на избор за 10,5% от участниците, а ИЕМ за 84,2%. През 2006 г. две лаборатории са използвали радиоимунологичен метод за определяне на анти-ДНК антитела, а от 2007 г. една прилага Western blot техника. Като цяло индивидуалните резултати са коректни и съответстват на използвания метод. Различия се наблюдават при антитела срещу редки антигени, които не се откриват с ИЕМ. Например, при определяне на АНА чрез ИЕМ нито един от участниците не е успял да установи реактивност срещу центромерен протеин (СЕНР F), който обаче е детектиран от всички, използващи ИИФ. В този случай резултатите съответстват на данните от INSTAND, според които над 50% от участниците, прилагащи методи, различни от ИИФ, дават отрицателен резултат за АНА за тази проба. При използване на ИИФ, независимо че титърът варира в широки граници, той се определя

приемливо от всички участници. Несъответствия се наблюдават при оценка на вида светене. Например, през 2006 г. само три лаборатории (33,3%), използващи ИИФ, установяват нуклеарно точковидно светене, причинено от антитела срещу разтворим ядрен протеин SP 100 в серум на пациентка с първична билиарна цироза. Допълнително, през 2009 г. нито един участник не е успял да дефинира коректно вида светене, характерен за ядрен gp210.

При определяне на анти-ДНК антитела се установяват само единични несъответствия. Например, през 2005 г. отрицателна проба е определена като положителна чрез ИИФ от един участник.

Схема 2Б – антитела срещу U1nRNP, Sm, SSA, SSB, Scl70, Jo1

През 2005 г. в тази схема са участвали 14 лаборатории с постепенно нарастване до 20 през 2008 и 2009 г. Имуноензимният метод е предпочитан от повечето участници (90%). Две лаборатории използват Western blot. Повечето лаборатории изследват всички показатели от тази схема. Всички участници определят коректно специфичните автоантитела, както и нивото им (score). Наблюдава се обаче установяването на допълнителни антителни специфичности от единични лаборатории, които не съответстват на консенсусните. Например, откриване от една лаборатория на анти-Jo1 в две проби – едната на пациентка със смесена съединителнотъканна болест и наличие на антитела срещу U1nRNP и SS-A/Ro-52 антигени, а другата със СЛЕ, положителна за антитела към SSA/Ro (Ro52, Ro60) и SSB/La. Същият участник установява в серума на пациентката със смесена съединителнотъканна болест и реактивност към Sm протеин. Интересно е да се отбележи, че за същата проба друга лаборатория открива антитела към SSB/La в допълнение на тези срещу U1nRNP и SS-A/Ro-52 антигени.

Схема 2В – антинеутрофилни цитоплазмени антитела (ANCA)

Подсхемата е включена във ВОК по имунология през 2006 г. и за първата година в нея са участвали 12 лаборатории. През 2007 г. броят им се е увеличил (n=17), но спада до 14 за 2008 и 2009 г. В тази схема преобладават ИЕМ за изследване на антитела срещу протеиназа-3 (PR3) и миелопероксидаза (MPO). Единични лаборатории определят ANCA както чрез ИИФ, така и с ИЕМ. Трябва да се отбележи, че в годините нараства броят на участниците, предпочитащи ИЕМ, и през 2009 г. те достигат 64,3%. Прогресивно намалява броят на лабораториите, използващи ИИФ (2005 г. – 42,8%; 2006 г. – 33,3%; 2007 г. – 28,6%; 2008 – 28,6%; 2009 г. – 21,4%). При определяне на ANCA несъответствия са установени през 2009 г. за едната проба, представляваща материал от плазмафереза на пациент с вероятна диагноза бързо прогресиращ гломерулонефрит, дефинирана от INSTAND като положителна за cANCA и протеиназа 3. Три лаборатории обаче дават отрицателен резултат независимо от използвания метод (ИИФ или ИЕМ).

Схема 2В – антикардиолипинови (CL) и анти-в2-GP антитела

Подсхемата започва през 2007 г. с участието на 9 лаборатории, чийто брой нараства до 15 за 2009 г. Всички участници използват имуноензимни методи. Различия се констатира само в определяне на имуноглобулинов клас на антителата. Дванадесет лаборатории разграничават имуноглобулиновия изотип на a-CL (ИГГ –

n=12; ИгМ – n=10), 5 – на a-v2GP антителата, а три определят като цяло наличието на ИгГ, ИгМ и ИгА a-CL и a-v2GP антитела. Резултатите отговарят на конценсусните с изключение на тези за една от пробите през 2009 г. Контролният материал е разреден серум от пациент със съмнение за антифосфолипиден синдром, определен от INSTAND като положителен за a-v2GP ИгМ (нискотитърни), но отрицателен за a-CL (ИгГ и ИгМ) и a-v2GP ИгГ антитела. Интересен е фактът, че 7 от десетте участници, определящи ИгМ класа, дефинират пробата като положителна за антикардиолипинови антитела от този изотип (6 лаборатории дават оценка 2, а 1 – оценка 4). Същата проба е определена като положителна и от трите участници, използващи за детекция полиспецифично антитяло.

Схема 3 – определяне на HLA-B27

В края на 2006 г. се проведе пилотен качествен контрол за определяне на HLA-B27 антиген, оформен впоследствие като схема 3 на националната система за ВОК по имунология. В тази схема участват 14 лаборатории: 6 от България и 8 от балканските страни (Гърция, Румъния и Турция), включени в Регион 8 на Европейската федерация по имуногенетика (EFI). За адекватна оценка на възможностите на участниците да определят HLA-B27 освен положителни и отрицателни за HLA-B27 проби във всеки цикъл се включват и такива с кръстосано реагиращи антигени (HLA-B7 и B40). Всички български лаборатории предпочитат флоуцитометрични методи (ФЦ), докато тези от Регион 8 използват главно молекулярно-биологични и в по-малка степен серологични (лимфоцитотоксичен тест – ЛЦТ) техники. През 2006 и 2008 г. всички участници определят коректно пробите, но през 2007 г. 92,8 % от резултатите са коректни. Интересно е да се отбележи, че наблюдаваните несъответствия и проблеми са свързани с едни и същи проби. Една лаборатория при ФЦ определяне дава отрицателен резултат за HLA-B27 положителната проба 01 и невалиден резултат за две проби (03 – HLA-B27 негативна, HLA-B7 позитивна и 05 – HLA-B27 положителна). Друга лаборатория, използваща ДНК техника, съобщава за недостатъчно количество проба 01. Трета лаборатория, използваща ЛЦТ, не е тествувала проба 05 поради липса на живи клетки. През 2009 г. всички участници дават коректни резултати с изключение на един, определящ като HLA-B27 положителна, позитивна за кръстосано реагиращия HLA-B7 антиген проба, при това чрез ДНК техника.

Обсъждане

Провеждането на междулабораторен контрол на качеството в имунологията на национално ниво показва увеличаване на броя участници в схемите за хуморалните фактори на имунния отговор. Допълнително програмата за ВОК бе разширена с включване на нови тестове (ANCA, антикардиолипинови и анти-v2GP антитела, ИгЕ и HLA-B27) с диагностично значение. Значително е намален относителният брой лаборатории, даващи отклонения от допустимите стойности за ИгА, ИгГ, ИгМ и комплемент С3. Персистира обаче по-голям процент на участниците, даващи по-високи от консенсусните стойности на С4 чрез РИД. Независимо от това наблюдаваното намаляване на неприемливите резултати за имуноглобулините и фракциите на комплемента е показател за подобряване на работата и аналитични-

те възможности на участващите лаборатории, което съответства на данните на други автори (5, 6). Най-големи вариации в схема 1 продължават да се наблюдават за С-реактивен протеин. Полуколичествените латекс-аглутинационни методи с екстраполиране на крайните разреждания в единици показват значими отклонения от допустимите граници и са изключително неточни (7). Друг проблем при тази техника е представянето на резултатите за СРП като отрицателни или положителни, поради което те не могат да бъдат адекватно оценени при ВОК. В схемата за автоантитела (АНА, анти-ДНК, ENA профил, ANCA, антикардиолипинови и анти-в2GP антитела) се наблюдава доста добра съпоставимост между резултатите на участниците. При имунофлуоресцентно определяне на АНА титрите варират в широки диапазони за една и съща проба, като се наблюдава тенденция за по-ниска количествена оценка вероятно поради използването на различни субстрати. Малко лаборатории (33,3%) успяват да определят чрез ИИФ точковидното ядрено светене, дължащо се на антитела към SP 100, и нито една не дефинира имунофлуоресцентния профил, характерен за ядрен gp210. Подобни резултати от определяне на АНА са наблюдавани и в други програми за ВОК (8, 9). Имуноензимните методи са с ограничени възможности за откриване на редки специфичности АНА, но в повечето случаи достатъчни за изследване на клинично значими автоантитела. Като цяло резултатите за анти-ДНК антитела са коректни независимо от използвания метод. В схемата за ENA профил всички участници откриват специфичните антитела. Различията се наблюдават при оценка на резултата – граничен, ниска или умерена концентрация на антитела за една и съща проба, установено и от други автори (8). Това би могло да се обясни с използването на китове от различни производители, съответно различни мерни единици (индекс, Е/мл и др.) и различни критерии за степенуване на положителен резултат. Откриването от единични участници на допълнителни антителни специфичности (например реактивност към Sm протеин в анти-RNP и към SSB/La в анти-SSA/Ro позитивни проби) най-вероятно се дължи на онечиствания в антигенните препарати. Определянето на ANCA, анти-PR3 и анти-MPO антитела като цяло показва коректни резултати. Интересно е установяването на антикардиолипинови антитела в проба, определена като отрицателна от INSTAND. Фактът, че серумът е разреден и големият брой участници (77%), даващи слабо положителен резултат, предполага, че не се касае за несъответствие. Тези данни подлежат на допълнителен анализ. В този контекст трябва да се отбележи, че контролът на дадена система за имунологично изследване се усложнява от комплексността на използваните методи (10). Вариабилността може да бъде на различни нива, вкл. източник на антигена (цяла тъкан, клетъчен екстракт, пречистен протеин, рекомбинантен протеин), откривано антитяло (изотип, афинитет, концентрация), детекционната система (поликлонално, моноклонално антитяло, конюгат – ензим, флуорохром) и вариации на метода (инкубационно време, обем, избор на субстрат). Всички тези фактори трябва да се вземат под внимание, когато се констатира и анализират проблеми.

При определяне на HLA-B27 като цяло лабораториите дават коректни резултати. Най-много несъответствия и проблеми са установени през 2007 г., при това свързани с едни и същи проби. Невъзможността за флуцитометричното определяне на HLA-B27 би могло да се обясни с методологичен или технически проблем, както и с наличието на кръстосано реагиращ антиген. Буди недоумение обяс-

нението за „недостатъчно проба“ при използване на ДНК-базирани техники. Според политиката на ВОК и в двата случая пробите се приемат за нетестувани, което намалява необходимия брой изследвания за успешно участие във ВОК по този показател. Необяснимо е също даването на HLA-B27 положителен резултат чрез молекулярно-биологичен метод за проба, носеща кръстосано реагиращия HLA-B7 антиген.

Трябва да се отбележи и съществуването на причини, характерни за самия процес на ВОК, които могат да окажат влияние върху достоверността на резултатите от качествения контрол. Например, все още се наблюдават вероятни технически и математически грешки (размяна на резултати, некоректни мерни единици и др.) при попълване на данните, които са причина за неприемливи стойности на единични участници в схема 1 от ВОК. Поради самата процедура на качествения контрол тези данни се приемат за некоректни при крайната оценка на индивидуалните резултати. Допълнително, някои участници не попълват всички необходими данни, променят формите и т.н., което затруднява организаторите на ВОК.

В заключение, качеството на лабораторните резултати е от фундаментално значение, тъй като некоректна информация би могла да доведе до неправилна диагноза или неадекватно лечение. Регулярното участие в схемите на ВОК по имунология показва значимо подобряване на аналитичните възможности на лабораториите и намаляване на неприемливите резултати, което потвърждава ползата от междулабораторни сравнителни програми за качествен контрол. Организираната програма за ВОК по имунология в България дава възможност участниците да оценят предимствата и недостатъците на използваните методи и стандарти, случайните и системни грешки, квалификацията на персонала, политиките и процедурите за качествен контрол в ежедневната лабораторна дейност, при необходимост да предприемат съответни коригиращи действия, което безспорно подобрява качеството на предлаганите медико-диагностични услуги.

КНИГОПИС

1. Hanson, D.J. Improvements in medical laboratory performance. *Postgrad. Med.*, 46, 1969, 51-56.
2. Hain, R.F. Proficiency testing in the physician's office laboratory: an ounce of prevention. *S. Med. J.*, 65, 1972, 608-610.
3. Rickman, W.J., C.Monical and M.J.Waxdal. Improved precision in the enumeration and absolute numbers of lymphocyte phenotypes with long-term monthly proficiency testing. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 677, 1993, 53-58.
4. Stull, T.M., T.L.Hearn, J.S.Hancock et al. Variation in proficiency testing performance by testing site. *JAMA*, 279, 1998, 463-467.
5. Nakamura, R.M. and J.H.Rippey. Quality assurance and proficiency testing for autoantibodies to nuclear antigen. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, 109, 1985, 109-114.
6. Tholen, D., N.S.Lawson, T.Cohen et al. Proficiency test performance and experience with College of American Pathologists' programs. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, 116, 1995, 307-311.
7. Immunology QAP Newsletter, PCPA Quality Assurance Programs Pts Limited – Immunology, South Australia, 2006, 3-7.

8. Bizzaro, N., R.Tozzoli, E.Tonutti et al. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA, and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J. Immunol. Methods*, 219, 1998, 99-107.

9. Pham, B.N., S.Albarede, A.Guyard et al. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus*, 14, 2005, 113-119.

10. Lock, R. J. My approach to internal quality control in a clinical immunology laboratory. *J Clin Pathol*, 59, 2006, 681-684.

**СХЕМИ 1, 2, 3 НА ВОК ПО ИМУНОЛОГИЯ:
ИМУНОГЛОБУЛИНИ, КОМПЛЕМЕНТ, СРП, АВТОАНТИТЕЛА,
HLA-B27 – НАШИЯТ ПЕТГОДИШЕН ОПИТ**
А. Михайлова, П. Бонева, М. Димитрова, Д. Йорданова, Е. Наумова
Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“, София

Направен е сравнителен анализ на резултатите от междулабораторен качествен контрол на показатели от хуморалния имунен отговор и определяне на HLA-B27 за петгодишен период (2005 – 2009 г.), проведен в рамките на националната система за ВОК по имунология. Установено е намаляване на неприемливите резултати за имуноглобулини (А, Г, М) и С3 фракция на комплемента. Персистира обаче значителният дял на отклонения за С4 над горна допустима граница. Повече и по-значими отклонения от приетите граници на вариации продължават да се наблюдават при радиалната имунодифузия. Най-големи девиации за С-реактивен протеин се установяват при използване на латекс-аглютинационни методи. При имунофлуоресцентно определяне на АНА титрите варират в широки, но допустими диапазони. Малко участници (33,3%) дефинират точковидното ядрено светене, дължащо се на антитела към SP 100 и нито един не определя вида флуоресценция, характерна за ядрен gp210. От лабораториите, използващи имуноензимни методи нито една не открива тези антителни специфичности, както и антитела срещу центромерен протеин (CENP F). Резултатите за анти-ДНК антитела са коректни, с единични изключения. При определяне на ENA профил междулабораторните различия се наблюдават при степенуване на положителен резултат.

При изследване на ANCA, анти-PR3, анти-MPO, анти-CL и анти-v2GP антитела несъответствия се установяват само за една проба. Определянето на HLA-B27 показва най-много некоректни резултати (7,2%) за 2007 г. В заключение, регулярното участие в организираната програма за ВОК по имунология в България показва значимо подобряване на аналитичните възможности на лабораториите и намаляване на неприемливите резултати, което безспорно подобрява качеството на предлаганите медико-диагностични услуги.

Ключови думи: автоантитела, имуноглобулини, комплемент, HLA-B27, външна оценка на качеството

Адрес за кореспонденция:

Анастасия Михайлова
Клиника по клинична имунология
МБАЛ „Александровска“
Ул. „Г. Софийски“ 1
1431 София

Abstract

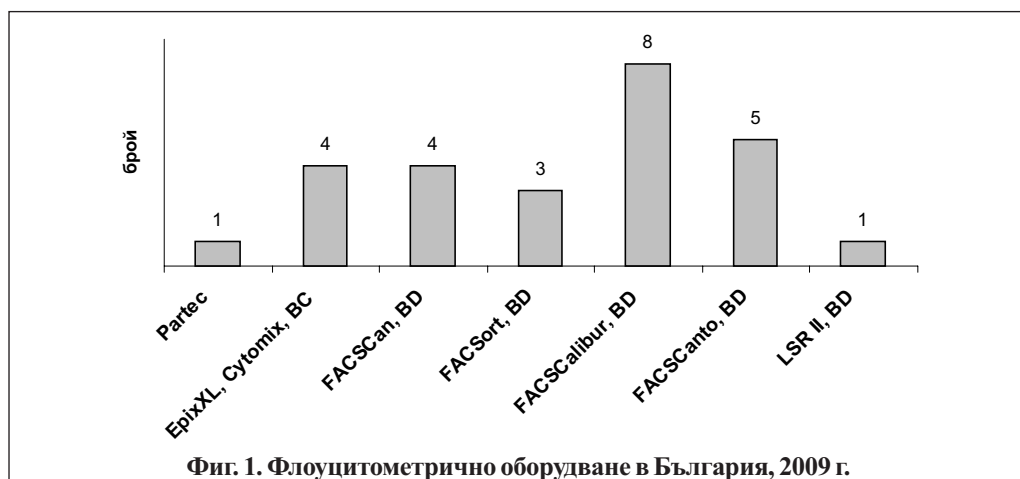
A comparative analysis of the results for the humoral immune factors and HLA-B27 received from the inter-laboratory quality assessment for five years period (2005-2009) within the National program for EPT in immunology has been done. Decrease of the unacceptable results for immunoglobulins (A, G, M) and C3 component of complement has been observed. Significant deviation for C4 over upper acceptable range was found to persist. More significant discrepancies from the acceptable limits of variations have been observed using radial immunodiffusion. The largest deviations for C-reactive protein (CRP) have been found by using latex agglutination tests. ANA titers vary in large but acceptable ranges when using indirect immunofluorescence. A few participants (33.3%) define dot nuclear staining due to antibodies against SP 100 and no one of them can determine fluorescence pattern typical for nuclear gp210. From the labs using ELISA neither of them defines these two antibodies specificities nor the antibodies against CENP F. The results for DNA antibodies are correct apart from a few exceptions. Inter-labs variations in determination of ENA profiles were observed at positive result scoring. During the five year period PR3, MPO, CL and v2-GP antibodies discrepancies have been found for one sample only. Determination of HLA-B27 shows most incorrect results (7.2%) in 2007. In conclusion, a regular participation at the organized program for EPT in immunology in Bulgaria shows enormously improvement of the analyzing skills of the labs and decreases the incorrect results that undoubtedly improves the quality of the diagnostic service.

ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО НА ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В БЪЛГАРИЯ, 2009

Мария Николова

Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София

Флоуцитометрията е метод за многопараметърен анализ на клетки, субклетъчни фракции и други микрочастици с изключително висока чувствителност и прецизност, който навлиза все по-широко в лабораторно-клиничната практика. Наред с традиционното си приложение в диагностиката и мониторинга на онкохематологичните заболявания и имунните дефицити с различен произход флоуцитометричните измервания имат място в инфекциозната имунология, алергологията, ревматологията, репродуктивната имунология, клинично-фармакологичните проучвания. Приоритет на флоуцитометрията са количествени измервания, при които точността има решаващо клинично значение, като проследяването на минимална резидуална болест при пациенти с лимфопролиферативни заболявания, контролиране на абсолютния брой на CD4 Т клетките при ХИВ+ пациенти или определянето на концентрацията на CD34+ стволови клетки в материал за авто/алогенна трансплантация. През последните години броят на инсталираните в България флоуцитометри нарасна значително (**фиг. 1**). Съвременните модели флоуцитометри се характеризират с голяма скорост (50 000–70 000 частици за 1 секунда) и мощност на анализа (10 до 18 параметъра) и идентифицират изключително редки събития (1 на 10 000). Тези особености налагат и строга система за осигуряване на качеството и сравнимостта на флоуцитометричните измервания. Външната оценка на качеството (ВОК) на флоуцитометричните изследвания, провеждана понастоящем от Асоциацията по клинична имунология, има вече 7-годишна традиция и представлява ценен механизъм в помощ на медицинските



Фиг. 1. Флоуцитометрично оборудване в България, 2009 г.

лаборатории, работещи по европейските стандарти ISO/IEC 17025:2005 и ISO/IEC 15 189: 2004, както и за лаборатории, желаещи да сключат договор с НЗОК.

Организация на ВОК по флоуцитометрия през 2009 г.

Организирането и координирането на ВОК по флоуцитометрия се осъществява от Референтната лаборатория по имунология към НЦЗПБ, акредитирана от БСА за извършване на флоуцитометрични измервания (Сертификат 235 ЛИ, валиден до 31.10.2013 г.). През 2009 г. ВОК по флоуцитометрия включваше три цикъла по избор: „Определяне на процент и абсолютен брой на лимфоцитни субпопулации“ (цикъл 1), „Определяне на процент и абсолютен брой на лимфоцитни популации в проба с нисък брой CD4 лимфоцити“ (цикъл 2), „Определяне на процент и абсолютен брой на CD34+ клетки“ (цикъл 3). Както обикновено, бяха контролирани два метода: флоуцитометрично определяне на процент и флоуцитометрично определяне на абсолютен брой (директно или индиректно). Оценяваните параметри в трите цикъла, съответно 12, 11 и 4, са посочени в **Табл. 1**. През 2009 г. като материал за изследване и в трите цикъла се използваха сертифицирани стандартни образци с

Таблица 1. Изследвани параметри в трите цикъла на ВОК по флоуцитометрия, 2009 г.

Параметри	Цикъл 1	Цикъл 2	Цикъл 3
Т лимфоцити, CD3+ (%)	+	+	-
Т лимфоцити, CD3+ (клетки/μl)	+	+	-
Т хелперни лимфоцити, CD3+CD4+ (%)	+	+	-
Т хелперни лимфоцити, CD3+CD4+ (клетки/μl)	+	+	-
Т цитотоксични лимфоцити, CD3+CD8+ (%)	+	+	-
Т цитотоксични лимфоцити, CD3+CD8+ (клетки/μl)	+	+	-
Т лимфоцити, активирани CD3+HLA-DR+ (%)	+	-	-
В лимфоцити, CD19+ (%)	+	+	-
В лимфоцити CD19+ (клетки/μl)	+	+	-
НК клетки, CD3-CD56+CD16+ (%)	+	+	-
НК клетки, CD3-CD56+CD16+ (клетки/μl)	+	+	-
Лимфосума Т+В+НК	+	+	-
Стволови клетки CD34+ в проба 1 (%)	-	-	+
Стволови клетки CD34+ в проба 1 (клетки/μl)	-	-	+
Стволови клетки CD34+ в проба 2 (%)	-	-	+
Стволови клетки CD34+ в проба 2 (клетки/μl)	-	-	+
Общо	12	11	4

дефинирани референтни стойности и интервали, съответно: стабилизирана цяла кръв, **BD Multichек control (BD Biosciences, Cat N340912)**, стабилизирана цяла кръв с ниско съдържание на CD4 Т клетки **BD Multichек CD4 Low Control (BD Biosciences, Cat N340914)** и стабилизирана обработена CD34+ цяла кръв **BD Stem cell control Kit (BD Biosciences, Cat N340991)**. Последната включва две проби – с ниско и високо съдържание на CD34+ клетки. Етапите на провеждане бяха, както следва: предварителна подготовка (предложение за участие и информация за начина на провеждане на ВОК, събиране на заявки за участие, кодиране на лабораториите); подготовка на пробите и изпращането им заедно с указания до участниците; събиране и обработка на резултатите; изпращане на окончателните резултати заедно със сертификат в случай на успешно участие.

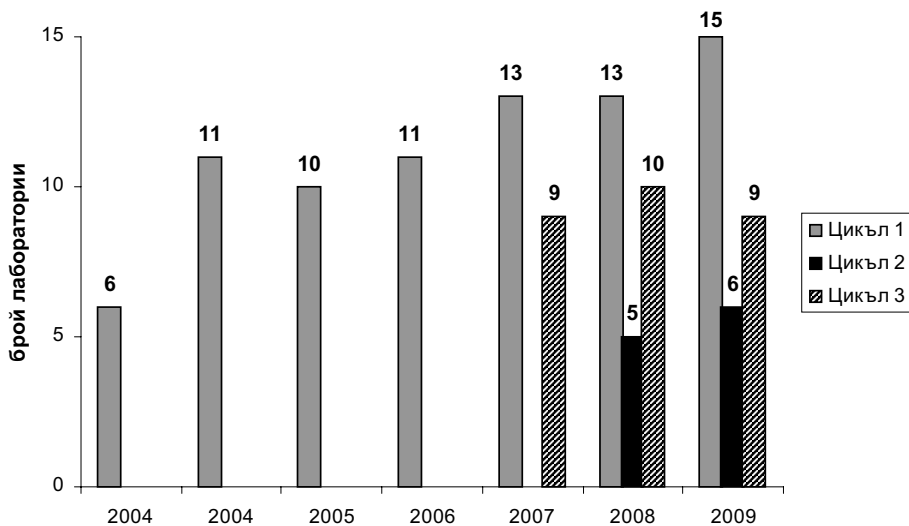
Оценката и класифицирането на резултатите се извършваше за всеки цикъл поотделно на базата на съответните сертифицирани стойности и тяхната неопределеност, указани в сертификата на образеца. Лаборатории със съвпадение на над 75% от показателите, съответно: най-малко 9 в цикъл 1, най-малко 8 в цикъл 2 и най-малко 3 в цикъл 3, получиха сертификат за успешно преминал контрол.

Резултати от ВОК по флоуцитометрия, 2009 г.

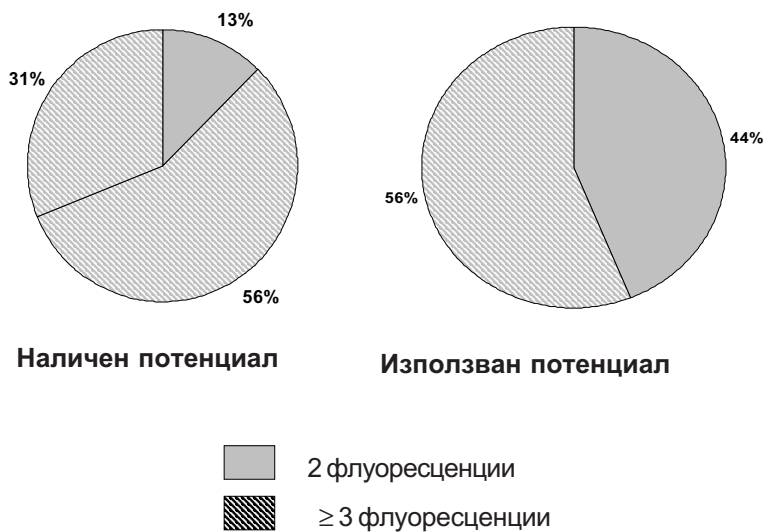
През 2009 г. във ВОК по флоуцитометрия участваха всички 16 лаборатории, извършващи клинични флоуцитометрични изследвания в България, като 15 от тях се включиха в цикъл 1, шест лаборатории – в цикъл 2, и девет – в цикъл 3. Три лаборатории участваха и в трите цикъла, а 4 – само в един. На **фиг. 2** е отразено нарастването на броя на участващите във ВОК лаборатории през годините. Почти всички участници разполагаха с цитометър, реагенти и консумативи на фирмата BD Biosciences (15/16). Очертава се тенденция към все по-широко използване на многопараметърната флуоресценция и използване на апарати от ново поколение с два и повече лазерни източника, което е предпоставка за повишаване на лабораторната точност. През 2009 г. 56% от използваните флоуцитометри са имали възможност да анализират по 3 флуоресценции, а 31% – повече от 3 флуоресценции (пет параметъра), в сравнение съответно с 50 и 25% за 2008 г. Въпреки наличния потенциал за многопараметърен анализ и директно определяне на абсолютния брой на клетъчни популации (87% от лабораториите участници) той е използван само в 56% от случаите (**фиг. 3**).

Анализът на резултатите от цикъл 1 показва много добро изпълнение*: 89% съвпадение на резултатите за процент и 93% – на резултатите за абсолютен брой. Сертификат на базата на 75% съвпадение получиха 93% (14/15) от участвалите в този цикъл лаборатории. Тенденцията за по-точно определяне на процента на „големите“ лимфоцитни популации (общи Т лимфоцити, CD4+ Т, CD8+ Т) в сравнение с „малките“ популации (В лимфоцити, НК клетки и активирани Т клетки) в общи линии се запазва. През последните години точността при определяне на процента

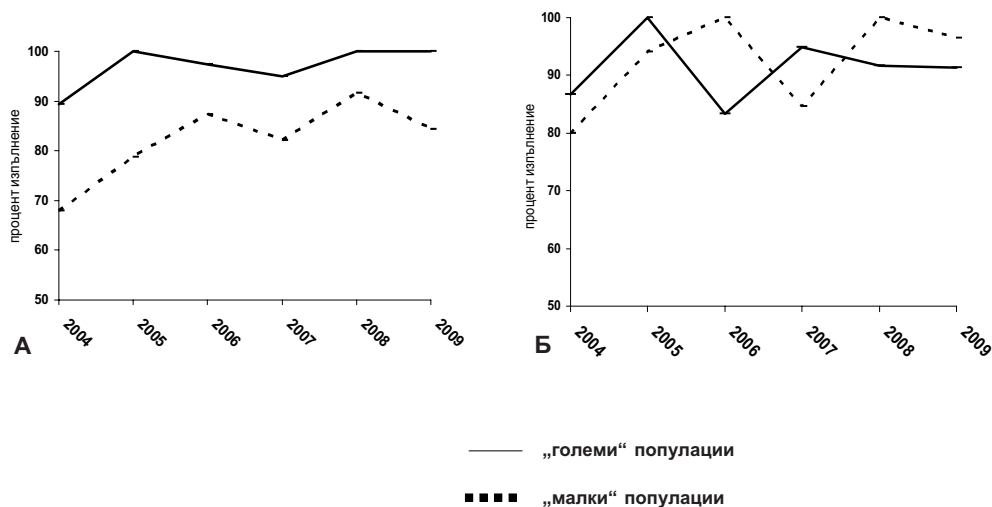
* Изпълнението се определя от съпадението между получените от лабораторията резултати и сертифицираните стойности с тяхната неопределеност за съответните параметри. 100% съвпадение означава, че всички получени от лабораторията резултати попадат в съответните сертифицирани граници.



Фиг. 2. Участие във ВОК по флоуцитометрия, 2004 – 2009 г.



Фиг. 3. Сравнение между наличния и използван аналитичен потенциал на наличните флоуцитометри.



Фиг. 4. Резултати от определянето на процент (А) и абсолютен брой (Б) за големите (непрекъсната линия) и малки (пунктирна линия) лимфоцитни популации по години. Резултатите са представени като процент изпълнение в зависимост от съпадението между получените от лабораторията стойности и сертифицираните стойности с тяхната неопределеност за съответните параметри. По абсцисата са нанесени кодовете на участвалите лаборатории.

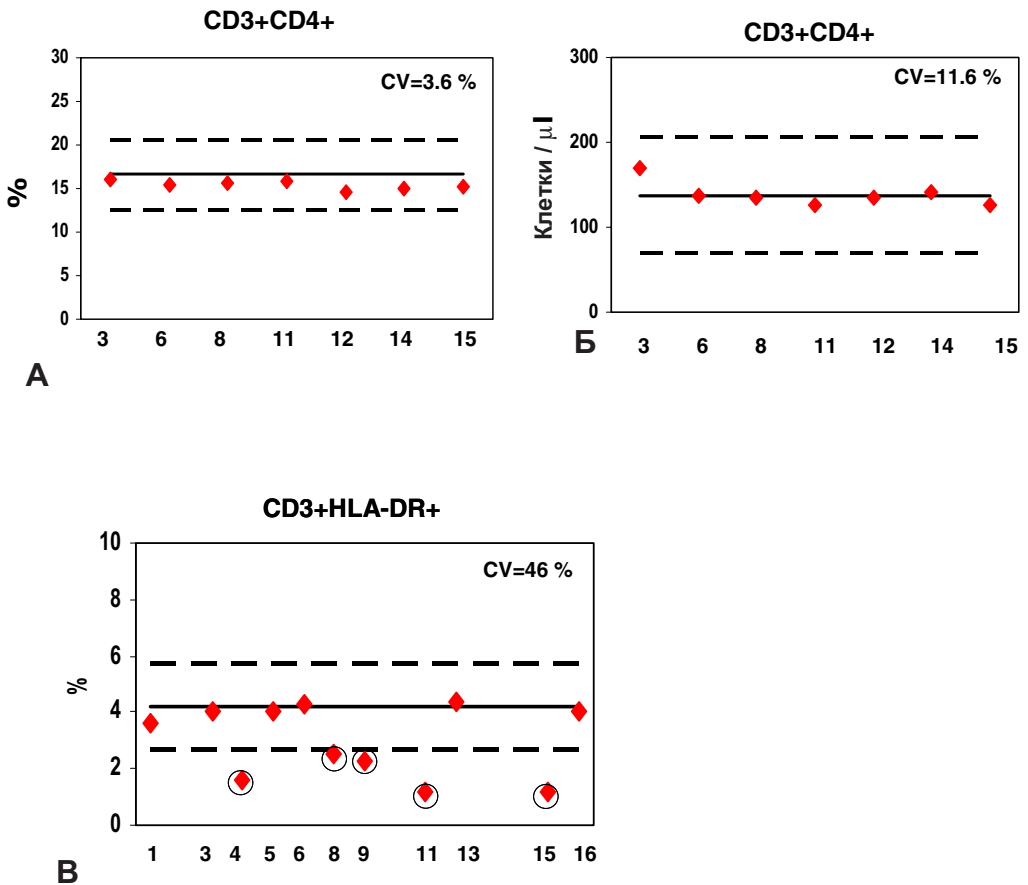
на големи субпопулации е била около 100%, а на абсолютен брой – около 95% (фиг. 4). През 2009 г. обаче изпълнението по два ключови показателя – абсолютен брой на общи Т лимфоцити и на CD4+ Т лимфоцити, е по-лошо от обичайното, като резултатите на 14% от лабораториите (2/15) са били извън допустимите граници. Задоволителен е фактът, че през последните две години се подобрява измерването на малките популации, въпреки че определянето на процента активирани Т лимфоцити (HLA-DR+CD3+) остава проблемно. Коефициентът на вариация на резултатите по този показател е твърде висок (46%).

Известно е, че при измерването на клетки с по-ниска концентрация средната грешка относително нараства, което изисква висока точност при работа с нискобройни проби. Ето защо особено внимание при качествения контрол беше обърнато на резултатите от цикъл 2. Средният процент на съпадение както при определянето на процент, така и на абсолютен брой беше 97%, което означава, че само една от участвалите лаборатории е показала отклонение по един показател. Радващ е фактът, че резултатите за процент и за абсолютен брой на CD4 Т лимфоцитите, които са водещи при диагностиката и мониторинга на ХИВ инфекцията, показват 100% съпадение със сравнително нисък коефициент на вариация, съответно 5,6% и 11% (фиг. 5).

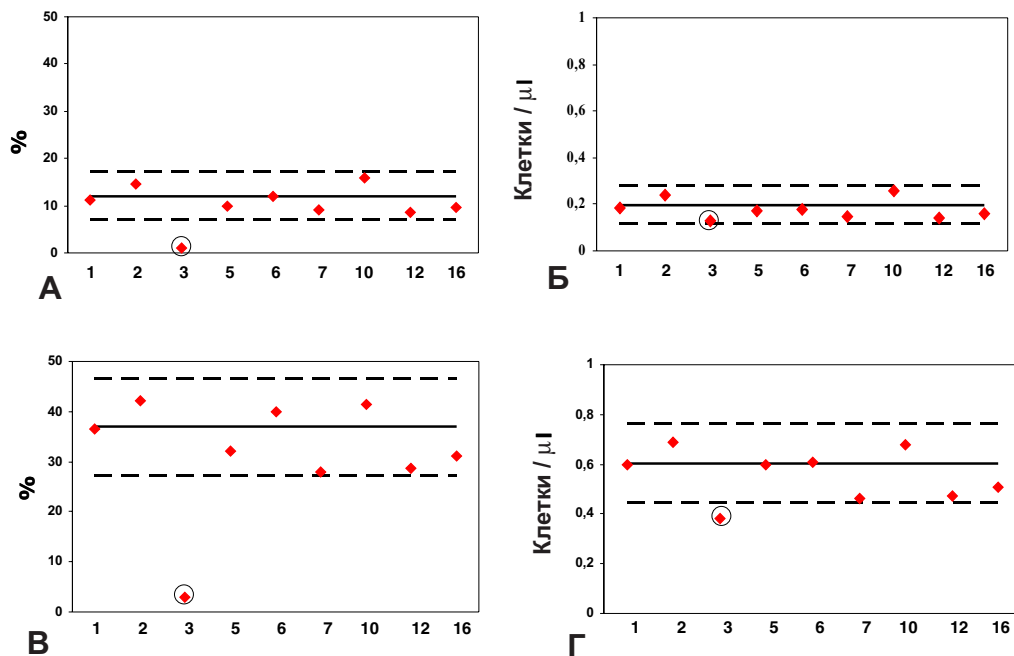
Анализът на несъответствията показва, че преобладаващата част от неточните резултати са получени в една и съща лаборатория. Фактът, че отклоненията засягат както определянето на процент, така и на абсолютен брой и не са еднопосочни означава, че се касае по-скоро за случайни грешки, свързани с липса на опит, отколкото с лошо качество на реагенти или неизправност на апаратурата. От друга страна, големият брой отклонения по показателя процент активирани Т лимфоцити

са еднопосочни: на и под долна граница, което насочва към няколко възможни обяснения: неправилна техника на обработка и (или анализ, нисък авидитет) концентрация на използваното моноклонално антитяло (anti-HLA-DR).

Определянето на процента и абсолютния брой на CD34+ стволови клетки в материал от пъпна връв, периферна кръв или костен мозък е друга област с нарастващо значение, която изисква идентифицирането на клетки с ниска концентрация. Получените резултати са много добри, като 88% попадат в референтните граници. Четирите установени отклонения са допуснати от една лаборатория и са еднопосочни: на и под долна граница. Тъй като лабораторията е извършвала индиректно определяне на абсолютен брой, грешките най-вероятно са свързани с метода за преброяване на левкоцитите (фиг. 6).



Фиг. 5. Резултати от определянето на процента (А) и абсолютния брой (Б) на CD4 Т лимфоцити в проба с нисък брой CD4 (цикъл 2). Анализ на отклоненията при определяне на процента активирани Т лимфоцити в цикъл 1 (В). По абсцисата са нанесени кодовете на участвалите лаборатории. Посочен е коефициентът на вариация на резултатите. Маркирани са резултатите, които не съвпадат със сертифицирания референтен интервал.



Фиг. 6. Резултати от определянето на процента (А и В) и абсолютния брой (Б и Г) на CD34+ клетки в проба 1 (А, Б) и проба 2 (В, Г) от цикъл 3. По абсцисата са нанесени кодовете на участвалите лаборатории. Маркирани са резултатите, които не съвпадат със сертифицирания референтен интервал.

Заклучение

Флоуцитометричните измервания намират все по-широко приложение в диагностиката и мониторинга на вродените и придобити имунни дефицити, онкохематологичните заболявания, трансплантологията, алергологията, репродуктивната имунология и пр. Осигуряването на качеството на тези измервания е предпоставка за правилната интерпретация на резултатите и тяхното практическо приложение. Външният качествен контрол по флоуцитометрия, осъществяван от секция Флоуцитометрия на Българската асоциация по клинична имунология, се утвърди като достъпна алтернатива и/или допълнение на съществуващите международни схеми. По-нататъшното осъществяване на тази програма изисква активен диалог със заинтересованите лаборатории за задоволяване интересите на всички участници. Програмата за ВОК по флоуцитометрия е отворена за всички желаещи да извършват качествен цитометричен анализ, независимо дали се касае за клинични или научноизследователски лаборатории. Възможностите за развитие на ВОК по флоуцитометрия за свързани с включването на нови стандартни сравнителни образци, както и с разширяването на набора от контролирани методи и параметри като по-рядко изследвани маркери/популации (напр. регулаторни Т клетки, маркери на левкозни клетки, цитокин-секретиращи Т клетки и пр.) или функционални фло-

уцитометрични изследвания. Не на последно място, популяризирането на българската програма и включването на участници от други балкански и европейски страни би допринесло значително за развитието и подобряването на качеството на този вид лабораторни измервания.

ЛИТЕРАТУРА

1. EA Policy for Participation in National and International Proficiency testing Activities, EA-2/10 (rev.00) Aug **2001**.
2. Процедура за провеждане на междулабораторни сравнения и изпитвания за пригодност, BAS QR 18 на ИС на БСА, 12 август **2004**.
3. Наредба №13 от 30 юли 2003 г. за критериите, показателите и методиката за акредитация на лечебните заведения, ДВ, бр. 80 от 09.09.2003 г., изм. ДВ бр. 28/2004 г.
4. Guzel O, Guner EI ISO 15189 accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I. *Clin Biochem*. **2009** Mar;42(4-5):274-8.
5. Bjurklund E, Gruber A, Mazur J, et al. CD34+ cell subpopulations detected by 8-color flow cytometry in bone marrow and in peripheral blood stem cell collections: application for MRD detection in leukemia patients. *Int J Hematol*. **2009** Oct;90(3):292-302.
6. Panterne B, Richard MJ, Sabatini C et al. Quality control of defrosted cord blood units: results from an inter-laboratory study, *Transfus Clin Biol*. **2010** Apr;17(2):41-6.
7. Siftar Z, Paro MM, Sokolij I et al. External quality assessment in clinical cell analysis by flow cytometry. Why is it so important? *Coll Antropol*. **2010** Mar;34(1):207-17.

Ключови думи: ВОК – външна оценка на качеството, флоуцитометрия, левкоцитни популации

Адрес за кореспонденция

Доц. д-р Мария Николова, дм
Национална референтна лаборатория по имунология,
Национален център по заразни и паразитни болести,
ул. „Янко Сакъзов“ № 26, 1504 София,
тел. 943 56 36
email mstoimenova@ncipd.org

ИНФОРМАЦИЯ

за проведената работна среща „Редките болести във фокуса на имунологията“

На 29 май в „Новотел“ – Пловдив, в рамките на Първата национална конференция по редки болести се проведе работна среща „Редките болести във фокуса на имунологията“. На срещата, организирана от Българската асоциация по клинична имунология (БАКИ) и с активната подкрепа на Информационния център за редки болести в Пловдив, присъстваха водещи имунолози в България, педиатри от УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив, студенти, специализанти по имунология, представители на пациентски организации, фармацевтични фирми.

В първата сесия докладчиците (проф. Е. Наумова, проф. Ф. Мартинова, доц. Д. Попова, д-р Спасова, д-р Милев) очертаха статуса и основните проблеми в България по отношение регистрирането, диагностиката и лечението на първичните имунодефицити (ПИД) като редки имуномедиирани болести.

На втората сесия представители на пациентските организации за *Общ вариабилен имунодефицит* (отец Стоил Лазаров) и *Наследствен ангиоедем* (Йорданка Павлова) информираха за дейността си. Представен беше и препаратът Firazur (Icatibant) на фирма Solpharma (Хърватия) за лечение на наследствен ангиоедем.

По време на дискусиата в края на работната среща бяха предложени следните

РЕШЕНИЯ

за по-нататъшна дейност в областта на ПИД

1. Да се създаде **Национална работна група по ПИД** с представители на БАКИ, Българското дружество по педиатрия и пациентски организации.

Координатор: проф. д-р Елисавета Наумова, дмн

В програмата на работната група да се включат следните **ДЕЙНОСТИ**:

1.1. Да се актуализира подготвената от експертния съвет на БАКИ *клинична пътека за ПИД* с консенсусен алгоритъм за диагностично и терапевтично поведение на ПИД. Да се допълни информация за: 1) антибиотичното лечение на инфекциите при пациентите с ПИД, 2) ПИД на фагоцитната система, 3) наследствен ангиоедем, 4) продължителност на болничен престой и минимален срок за повторна хоспитализация.

Отговорници:

1. д-р Мария Спасова, дм
Клиника по педиатрия,
УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

2. доц. д-р Мариана Мурджева, дм
Лаборатория по клинична имунология,
УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

1.2. Създаване на регистър на болните с ПИД.

§ Изготвяне на *анкетна карта* с критерии за събиране на необходими данни за пациентите с оглед включването им в регистър за ПИД.

§ Изпращане на писмо покана и изготвената анкетна карта до университетските клиники по педиатрия, лабораториите по клинична имунология и представителите на пациентските организации отец Стоил Лазаров и Йорданка Иванова.

§ Въвеждане на информацията в Excel таблица.

§ Преговори с фирмите производители на имуномодулатори с оглед изготвяне на софтуерен продукт.

Отговорници:

1. д-р Гешева,
Клиника по клинична имунология,
УМБАЛ „Александровска“ – София
2. д-р Мария Спасова, дм
Клиника по педиатрия,
УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

2. На основата на изработения консенсусен алгоритъм за диагностично и терапевтично поведение на ПИД, БАКИ да подготви обобщена **монография-наръчник за ПИД**, която да представи на ОПЛ, имунолози, педиатри и други специалисти, свързани с диагностиката и лечението на тези заболявания.

Отговорници:

проф. д-р Фани Мартинова, дмн
СБАЛ „Пирогов“ – София,
доц. д-р Дора Попова, дм, ВВМА – София

Други имунолози, желаещи да участват в посочените дейности, могат да се свържат с:

проф. д-р Елисавета Наумова, e-mail: immunology@abv.bg (или на асоциацията)

или

доц. д-р Мариана Мурджева, e-mail : mmurdjeva@yahoo.com

УКАЗАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ

Ръкописите се оформят като стандартни машинописни страници (30 реда, 60 знака) с достатъчен интервал между редовете и се предават на магнитен носител и две разпечатки. Под имената на авторите се посочва местоработата им.

Резюме: до 250 думи, като се посочват и ключови думи. Посочва се адрес за кореспонденция.

На английски език се превеждат заглавието, имената на авторите (транскрибирани), местоработата, резюмето, ключовите думи, адресът за кореспонденция.

Литературната справка се подрежда по реда на появата ѝ в текста. Изписва се по следния начин: Koller MD, Templ E, Riedl M, et al. Pituitary function in patients with newly diagnosed untreated systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1677-1680. При цитиране на български автори се изписват всички имена. Останалите се представят до третия вкл., след което се пише et al. Напр. Koller MD, Templ E, Riedl M, et al.

В текста номерът на литературния източник се цитира в квадратни скоби, напр. [5]. В текста авторите се цитират с името на първия, а останалите – като съавтори, напр. MD Koller и съавт. [5].

Таблицы, скици, снимки и фигури се придружават от заглавие и легенда на български език.

Всеки ръкопис се придружава от декларация, че материалът не е публикуван досега освен като резюме на съобщение, изнесено на научен форум.

**ГОДИШНИК
на БАКИ
2009**

Българска
Първо издание

Книгоиздател ПАВЕЛ СЛАВЯНСКИ
Предпечат МАРИАНА ХРИСТОВА
Коректор СТОЯНКА ДУШЕВА

Формат 70/100/16
Печатни коли 4,75

ISSN 1313-47-52

© Издателство „Лице“, 2010
e-mail: litse@abv.bg
0888 56 54 39; 089 794 85 70