

Alergija na lijekove - dijagnostički pristup

Kos, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:132523>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Matea Kos

Alergije na lijekove – dijagnostički pristup

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2014.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Marinović i predan na ocjenu u akademskoj godini 2013./2014.

KRATICE KORIŠTENE U TEKSTU:

AGEP – acute generalized exanthematic pustulosis

BAT – basophil activation test (by flow cytometry)

CADR – cutaneous adverse drug reactions

CAST – cellular allergy stimulation test

CD – cluster of differentiation

DHS/DRESS – drug hypersensitivity syndrome / drug rash with eosinophilia and systemic symptoms

EEM – erythema exudativum multiforme

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HLA – human leukocyte antigen

ICDRG – Interational Contact Dermatitis Research Group

IFN- γ – interferon γ

IL – interleukin

LTT – lymphocyte transformation test

MHC complex – major histo-compatibility complex

MPE – maculopapular exanthema

MPR – maculopapular rash

NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs

PCR – polymerase chain reaction

RAST – radioallergosorbent test

SDRIFE – symmetrical drug-related intertriginous and flexural exanthem

SNS – Steven-Johnsonov sindrom

TCR – T-cell receptor

TEN – toksična epidermalna nekroliza

TNF- α – tumor necrosis factor α

SADRŽAJ:

1. SAŽETAK	
2. SUMMARY	
3. UVOD	1
4. PRISTUP PACIJENTU S REAKCIJOM PREOSJETLJIVOSTI NA LIJEKOVE	2
4.1. Akutna faza	2
4.1.1. Morfološka dijagnoza	3
4.1.2. Laboratorijska analiza	4
4.2. Etiologija	4
4.2.1. Specifični dijagnostički pristup	5
4.2.2. Kronologija	6
4.2.3. Dijagnostički testovi	6
4.2.4. Praktični postupak	6
4.3. Glavne kliničke manifestacije	7
5. ULOGA KOŽNIH TESTOVA U ISPITIVANJU SISTEMSKIH KOŽNIH REAKCIJA NA LIJEKOVE	11
5.1. Kako izvesti kožno testiranje na lijekove?	11
5.1.1. Epikutani test	11
5.1.2. Prick test	13
5.1.3. Intradermalni test	14
5.2. Vrijednovanje kožnih testova	14
5.3. Negativna prediktivna vrijednost epikutanog testa	16
5.4. Sigurnost kožnog testiranja kod alergija na lijekove	17
5.5. Relevantnost i specifičnost epikutanog testiranja	18
6. IN VITRO TESTOVI T-STANIČNO POSREDOVANE PREOSJETLJIVOSTI NA LIJEKOVE	19
6.1. Patogeneza T-stanično posredovane preosjetljivosti na lijekove	19
6.2. Slijed događaja kod T-stanične aktivacije – mogućnost testiranja	20
6.3. Dijagnostički testovi za reakcije preosjetljivosti posredovane specifičnim T-stanicama	21
6.3.1. Analiza različitih površinskih biljega protočnom citometrijom	21
6.3.2. Mjerenje citokina koje proizvode stanice nakon stimulacije lijekom	22
6.3.3. Ispitivanje stanične proliferacije	24
6.3.4. Citotoksičnost	26
7. TEST DEGRANULACIJE BAZOFILA	28
7.1. Tehnički aspekti testa	29
7.2. Klinička primjena testa degranulacije bazofila u dijagnostici alergija	
7.3. na lijekove	30
7.3.1. Test degranulacije bazofila kod alergije na mišićne relaksanse	30
7.3.2. Test degranulacije bazofila kod alergije na β -laktame	31
7.3.3. Test degranulacije bazofila kod sindroma preosjetljivosti na NSAIDs	31
8. ZAHVALE	33
9. LITERATURA	34
10. ŽIVOTOPIS	38

1. SAŽETAK

Neželjene reakcije na lijekove su čest klinički problem. Koža može biti jedini zahvaćen organ ili može biti dio ozbiljnije multiorganske reakcije. Kožne manifestacije uključuju širok spektar pojava poput angioedema, makuloznih, papuloznih, vezikuloznih, buloznih, vaskulitičnih i hemoragijskih lezija. Prvi korak je klinički pristup koji uključuje detaljnu morfološku dijagnozu kožnih simptoma i znakova, isključivanje opasnih znakova i neke osnovne laboratorijske pretrage. Morfološka dijagnostika pomaže postaviti hipotezu o patogenezi.

Brojni lijekovi mogu se testirati in vivo – prick testom, intradermalnim i epikutanim testovima, i in vitro - pri čemu, zbog niske osjetljivosti tih testova, jedino su pozitivni nalazi relevantni, a negativni ne mogu isključiti preosjetljivost.

Prick test i intradermalni test koriste se za istraživanje neposredne preosjetljivosti, a epikutani testovi i intradermalna ispitivanja odgođenog očitavanja korisni su kod kasne pojave simptoma. Epikutana ispitivanja i prick test mogu se provesti s bilo kojim komercijalnim oblikom lijeka, dok intradermalni testovi ovise o dostupnosti sterilnih otopina koje se koriste kod parenteralne primjene.

Provokacijski testovi, koji se smatraju zlatnim standardom, često nisu prihvaćeni od strane pacijenata i nose opasnost od ozbiljnih reakcija. In vitro testovi imaju prednost zbog sigurnosti postupka za pacijenta i mogu pružiti uvid u temeljne patomehanizme same reakcije, no oni su još uvijek samo alat koji se koristi u istraživačke svrhe, nisu standardizirani te se mogu koristiti samo kod određenih tipova alergija na lijekove. Danas se uglavnom koristi test limfocitne transformacije.

U posljednjih nekoliko godina, kvantifikacija degranuliranih bazofila pomoću protočne citometrije (test degranulacije bazofila) pokazao se korisnim alatom za procjenu neposrednog odgovora na alergene posredovanog IgE ili drugih mehanizmima u pacijenata aleričnih na lijekove. Do danas, većina studija o degranulaciji bazofila u literaturi koristi CD69 ili CD203c kao markere za kvantificiranje degranulacije bazofila nakon stimulacije specifičnim antigenom.

Ključne riječi: neželjene reakcije na lijekove, in vivo testovi, in vitro testovi

2. SUMMARY

Adverse drug reactions are a common clinical problem. The skin may be the only organ affected or it may herald a more serious multiorgan reaction. The cutaneous manifestations include a wide spectrum such as angioedema, macular, papular, vesicular, bullous, vasculitic and hemorrhagic lesions. The first step is clinical approach which includes detailed morphological diagnosis of skin symptoms and signs, exclusion of danger signs and some basic laboratory tests. The morphological diagnosis helps to establish a pathogenetic hypothesis.

A battery of drugs can be tested in vivo – prick, intradermal and patch tests, and in vitro – whereby, because of low sensitivity of these tests, only positive tests are relevant, while negative tests cannot rule out a sensitization.

Prick tests and intradermal tests are used to investigate immediate hypersensitivity, patch tests and intradermal tests with delayed readings are helpful for symptoms appearing delayed. Patch tests and prick tests can be done with any commercialized form of a drug, intradermal tests normally rely on the availability of a sterile solution used for parental applications.

Challenge tests, which are considered to be the gold standard, are frequently not tolerated by the patients and bear the risk of severe reactions. In vitro tests have the advantage of being a safe procedure for the patient and may provide insight into the underlying pathomechanisms. They are often still a research tool, are not standardized and fit only to certain type of drug allergies. To date, lymphocyte transformation test is mostly used.

In recent years, the quantification of basophil activation by flow cytometry (basophil activation test) has proven to be a useful tool for the assessment of immediate-type responses to allergens mediated by IgE or other mechanisms in drug-allergic patients. To date, most basophil activation test studies reported in the literature have used CD69 or CD203c as markers to quantify basophil activation after antigen-specific stimulation.

Key words: adverse drug reactions, in vivo tests, in vitro tests

3. UVOD

Alergijske se bolesti javljaju kao posljedica različitih reakcija preosjetljivosti. Mogu se zbivati na različitim organima, a najčešće na koži, te sluznicama dišnog i probavnog sustava. Najčešća očitovanja alergijskih reakcija na koži su urtikarija, angioedem, ekcem, kontaktni alergijski dermatitis, alergijska purpura i vaskulitisi, medikamentozni egzantemi te fotoalergijske reakcije. Alergijske bolesti čine trećinu bolesti u dermatološkim ambulancama.

Medikamentozni egzantemi posljedica su preosjetljivosti organizma na primjenjenu aktivnu tvar lijeka, njegovog omotača ili vehikula. Često se pri alergijskoj reakciji primarno misli na tip I reakcije preosjetljivosti, dakle one posredovane IgE protutijelima, međutim reakcije tipa III i IV često su uzrok preosjetljivosti na lijekove. Zbog sve učestalije polipragmazije medikamentni egzantemi sve su češći problem (Lipozenčić et al. 2008.).

Reakcije preosjetljivosti na lijekove čest su klinički problem, i mogu zahvatiti značajan broj pacijenata. 10-15% pacijenata može imati poteškoća sa neželjenim reakcijama na lijekove, 2-5% zbog toga moraju biti hospitalizirani, a 1-3% hospitalizacija može rezultirati smrtnim ishodom. (Demoly & Hillaire-Buys 2004.)

Sama preosjetljivost na lijekove nešto je češća u žena te nije vezana za dob. Od mnogobrojnih manifestacija preosjetljivosti na lijekove među češćima u kliničkoj praksi su generalizirani makulozni, papulozni i urtikarijski osipi, vaskulitisi, a posljednjih godina fototoksični egzantemi. Važan je put primjene kojim je došlo do senzibilizacije, tako su reakcije preosjetljivosti puno češće nakon lokalne i intramuskularne primjene.

Dijagnoza medikamentnog egzantema u prvom se redu postavlja na temelju kliničke slike, anamneze i laboratorijskih testova. Kožni testovi koji se provode su intradermalni test, zatim skarifikacijski, epikutani i prick test. Ekspozicijski test je najpouzdaniji test u dijagnostici medikamentnih egzantema, međutim zbog potencijalne opasnosti primjenjuje se isključivo u dobro opremljenim alergološkim klinikama i odjelima. Od in vitro testova primjenjuju se test transformacije limfocita, indirektni test degranulacije bazofila te određivanje specifičnih IgE protutijela radioizotopnom metodom (Lipozenčić et al. 2008.).

4. PRISTUP PACIJENTU S REAKCIJOM PREOSJETLJIVOSTI NA LIJEKOVE

Reakcije preosjetljivosti na lijekove su sistemske reakcije koje često zahvaćaju kožu. Kožne manifestacije mogu biti jedini oblik prezentacije preosjetljivosti, no često su zapravo samo 'navjestitelj' sistemske reakcije, kao npr. anafilaktičke reakcije ili teškog sindroma preosjetljivosti na lijekove (DHS/DRESS). (Bircher 2005.). Reakcije preosjetljivosti na lijekove predstavljaju kompleksni izazov za liječnike i alergologe. Da bi se došlo do konačne dijagnoze nužan je strukturirani pristup po koracima.

Načelno, dva su koraka: (1) obrada akutne reakcije preosjetljivosti na lijekove, što uključuje klasifikaciju i određivanje težine same reakcije, njezinu dokumentaciju, izbor alternativnog lijeka i ublažavanje simptoma te (2) identifikaciju lijeka koji je izazvao reakciju.

4.1. Akutna faza

Reakcije preosjetljivosti na lijekove mogu se pojaviti za vrijeme bilo kojeg liječenja, uključujući i biološke agense, njihove aditive, fitoterapijske tvari ili njihov razrijeđen sadržaj. Od najveće je važnosti da se pažljivo odradi inicijalna dijagnostika, uključujući laboratorijsku analizu, te da se ocijeni zahvaćenost unutarnjih organa (jetra, bubrezi) odgovarajućim testovima (diferencijalna krvna slika, jetreni testovi i sl.). Zapravo, poželjno je konzultirati dermatologa, a ako je to nemoguće, fotografirati same eflorescencije te zabilježiti sve lijekove koje je pacijent konzumirao. Te informacije mogu pomoći u utvrđivanju težine reakcije (Bircher 2005.), te samim time utjecati na prognozu, liječenje, ali i daljnju farmakoterapiju.

Potrebno je odmah prekinuti davanje lijekova za koje se sumnja da su mogli prouzročiti reakciju (posebice ako su prisutni opasni znakovi poput buloznih ili hemoragičnih lezija, zahvaćanje sluznica ili unutarnjih organa), te započeti simptomatsku terapiju ako je ona potrebna, a posebno ako su prisutni znakovi anafilaktičke reakcije, edem lica ili pak bulozne manifestacije, vaskulitis te znakovi na sluznicama (Bircher 2005.).

Nakon povlačenja svih kliničkih manifestacija i normalizacije laboratorijskih nalaza, preporuča se alergološko testiranje. Najbolje bi bilo da se ono provede u periodu od 3 tjedna do 6 mjeseci nakon same reakcije.

4.1.1. Morfološka dijagnoza

Inicijalno, nužna je sveobuhvatna klinička dijagnoza koja uključuje klinički status (vrućica, malaksalost, limfadenopatija, hepatomegalija) i detaljan opis kožnih lezija. U klinički pregled mora biti uključen kompletan pregled kože i adneksa te vidljivih sluznica. Treba se zabilježiti tip i distribucija lezija, pošteđenost primjerice UV-zaštićenih područja, zahvaćenost lica i sluznice ustiju. Tipični znak je svrbež različitog intenziteta.

Morfološke prezentacije su mnogostruke i raznolike. Iako koža ima ograničen repertoar obrazaca upalne reakcije, može se uočiti vrlo širok spektar znakova (tablica 1), od svrbeža, eritema, urtikarije, angioedema, pa sve do makuloznog, papuloznog, vezikuloznog, buloznog, vaskulitičnog i hemoragičnog egzantema (Nigen et al. 2003., Roujeau 2005.). Neki od ovih znakova karakteristični su kod nuspojava na lijekove (npr. fiksni medikamentozni egzantemi koji se uvijek ponavlja na istim lokalizacijama), dok drugi mogu predstavljati težak izazov u diferencijalnoj dijagnozi prema ostalim kožnim poremećajima (posebno infektivni egzantemi). Zbog toga se za kožne reakcije preosjetljivosti često koristi naziv 'veliki imitatori'.

Tablica 1. LIJEKOVIMA INDUCIRANI KOŽNI SIMPTOMI/ZNAKOVI

<ul style="list-style-type: none">• egzantem<ul style="list-style-type: none">- makulozni- papulozni- vezikulozni- pustulozni- bulozni- fiksni egzantem- hemoragično-nekrotični- lihenoidni- psorijaziformni- pitirijaziformni- ekfolijativni- eritrodermija	<ul style="list-style-type: none">• svrbež• urtikarija, angioedem• mukozne membrane<ul style="list-style-type: none">- erozije, aftozne lezije, ulceracije- stomatitis- genitalne lezije- konjuktivitis- rinitis• fotoinducirani egzantemi• kutani vaskulitis• nodozni eritem• kožni eritemski lupus
---	--

4.1.2. Laboratorijska analiza

U akutnoj fazi laboratorijski nalazi rijetko pomažu u identifikaciji lijeka koji je prouzročio reakciju, ali mogu biti ključni u detekciji i/ili isključenju zahvaćenosti unutarnjih organa. Eozinofilija, neutrofilija, prisutnost limfoblasta ili citopenija trebaju biti istraženi – mogu biti znak vrlo snažne imunološke reakcije, stanične smrti posredovane protutijelima ili pak toksičnosti koštane srži.

Tablica 2. ZNAKOVI TEŠKE REAKCIJE PREOSJETLJIVOSTI

<u>Klinička manifestacija</u>	<u>Laboratorijski znakovi</u>
<ul style="list-style-type: none">- neposredne reakcije preosjetljivosti<ul style="list-style-type: none">- iznenadno crvenilo lica- teška urtikarija- teški angioedem- DHS/DRESS<ul style="list-style-type: none">- centrofacijalni edem- zahvaćenost veće površine tijela (eritrodermija)- bulozni poremećaji kože<ul style="list-style-type: none">- bolna koža- pozitivan Nikolskyjev znak- vezikulozne i bulozne lezije- erozije mukoze ili aftozne lezije- atipične lezije oblika mete- hemoragične ili nekrotične lezije- vaskulitis- sistemski znakovi<ul style="list-style-type: none">- visoka temperatura- slabost	<ul style="list-style-type: none">- eozinofilija- neutrofilija- limfoblastoza- citopenija- povišeni jetreni enzimi i bilirubin- povišen kreatinin, proteinurija

4.2. Etiologija

Cilj dijagnostike preosjetljivosti na lijekove je, kao prvo, definirati nastalo stanje kao alergijsku reakciju na lijek i drugo, identificirati lijek koji je uzrokovao reakciju. Povijest i iskustvo (iz raznih knjiga koje sadrže liste lijekova i njihove nuspojave) najčešće su korišteni stupovi na kojima se bazira identifikacija potencijalnih lijekova. Doza, trajanje terapije, kronologija pojavljivanja simptoma i identifikacija kofaktora (npr. virusne infekcije, hepatopatije, bubrežni poremećaji) pomažu u identifikaciji.

Preporuča se primjena standardiziranog pristupa, poput upitnika (Demony et al. 1999.), posebno liječnicima s malo iskustva u ovome području.

4.2.1. Specifični dijagnostički pristup

Sa specifičnom, etiološki orijentiranom dijagnostikom trebalo bi započeti najranije 3-4 tjedna nakon potpunog nestanka svih simptoma i znakova. S druge strane, nakon 6-12 mjeseci neki testovi, primjerice cirkulirajući IgE, mogu postati negativni, dajući tako lažno negativni rezultat testiranja. T-stanične reakcije mogu dugo perzistirati, te se katkad mogu dokazati i 12 godina nakon same reakcije, no ostale reakcije imaju sklonost 'nestajanja' tijekom godina.

U skladu s kliničkim manifestacijama i njihovom kronologijom, hipoteza o pretpostavljenoj patogenezi treba biti usmjerena odabiru primjerenog dijagnostičkog testa (Bach & Bircher 2005.) (tablica 3).

Tablica 3. KLINIČKA MANIFESTACIJA KAO ORIJENTACIJA O PATOGENEZI		
Klinička manifestacija	Moguća patogeneza	Dijagnostički test
urtikarija, angioedem	pseudoalergijska reakcija, IgE posredovana reakcija	prick test, intradermalni test, specifični IgE, test bazofilne aktivacije
anafilaksija	pseudoalergijska reakcija, IgE posredovana reakcija, rijetko aktivacija imunokompleksa	prick test, intradermalni test, IgE, test aktivacije bazofila
makulopapulozni egzantem	T-stanično posredovan	intradermalni i epikutani test, test limfocitne transformacije
vezikulozno-bulozni egzantem	citotoksična T-stanična reakcija te NK i NK-T reakcija?	test degranulacije bazofila
pustulozni egzantem	T-stanično posredovana reakcija	epikutani i intradermalni test, test transformacije limfocita
fiksna erupcija	reakcija preosjetljivosti tip IV	epikutani test na zahvaćenom području

4.2.2. Kronologija

Vremenski period između prve uzete doze lijeka i pojave prvih simptoma znatno varira. Uzima se da za senzibilizaciju na lijek ili njegov metabolit treba oko 5-7 dana, no kod nekih lijekova prođe i nekoliko tjedana ili čak mjeseci prije nego se alergijska reakcija razvije. Period između početka farmakoterapije pa do pojave prvih simptoma naziva se indukcijski interval. Jednom kad je osoba senzibilizirana, vrijeme između posljednje doze lijeka i pojave prvih simptoma (interval reakcije) varira ovisno o patogenetskom mehanizmu. Tako kod IgE-posredovane reakcije i pseudoalergijske reakcije taj period varira od nekoliko minuta pa do nekoliko sati. Kod T-staničnih reakcija vremenski period varira od nekoliko sati do 2 dana. Također, postoji i određena dinamika reakcija. Primjerice, egzantem se može satima prezentirati u obliku makula koje potom prelaze u papule s vrškom oko 48-72h. Kod SJS i TEN makule se pretvaraju u bule i epidermolizu unutar 6-12h.

Mnogi faktori, primjerice način primjene, metabolizam lijeka i drugi kofaktori (uzimanje hrane, interakcije lijekova, stres) imaju modificirajuću ulogu. Zbog ovih razloga stroga diferencijacija reakcija unutar 1h na teške ili one koje to nisu može biti problematična zbog značajnog preklapanja kronologija različitih tipova reakcija.

4.2.3. Dijagnostički testovi

Primarna dijagnoza uvijek je bazirana na detaljnoj anamnezi i temeljitom pregledu. Klinička prosudba ostaje glavni oslonac, jer zbog niske osjetljivosti dostupnih testova velik broj reakcija ostaje negativan, a provokacijski testovi često nisu izvedivi (Aberer et al. 2003.).

4.2.4. Praktični postupak

Suspektna alergija na lijek treba biti dijagnosticirana prema konceptu temeljnog patogenetskog mehanizma. Uzevši u obzir pacijentovu anamnezu, zatim kliničku prezentaciju na koži i prema tome patogenetski mehanizam, poduzimaju se dijagnostički testovi. Trebalo bi uključiti sve lijekove koji su uzeti prije nego se reakcija pojavila, a također bi i potencijalni kofaktori trebali biti uključeni. Kod sumnje na reakciju preosjetljivosti tipa I izvode se prick test, intradermalni test te se serološki provjerava razina IgE protutijela, a u obzir dolazi i test degranulacije bazofila i provokacijski test. Kod sumnje na reakciju preosjetljivosti tipa IV rade se epikutani i/ili

intradermalni test te test transformacije limfocita, a u obzir dolazi i provokacijski test. Kod pseudoalergijske reakcije, tj. intolerancije u obzir dolazi provokacijski test, test degranulacije bazofila i test oslobađanja medijatora.

Za neke reakcije patogeneza još nije potpuno razjašnjena. Uz to, za neke kožne testove nisu točno poznate optimalne koncentracije lijeka koje se moraju dati. Valjanost nekih in vitro testova za pojedine lijekove još je uvijek upitna.

Pozitivan kožni ili in vitro test dokaz je postojanja reakcije preosjetljivosti na lijek, uz prethodnu kliničku sliku. U slučaju da su kožni i/ili in vitro testovi negativni, preosjetljivost se ne može sa sigurnošću isključiti, te se potencijalno uzročni lijekovi moraju isključiti iz daljnje terapije.

Provokacijski testovi rezervirani su samo za vitalne indikacije i trebaju ih provoditi isključivo liječnici s iskustvom u ovome području (Aberer et al. 2003.). Njihova prednost je u tome što se testira pacijent individualno, sa svojom metaboličkom i imunom pozadinom. I dalje ostaje zlatni standard, no budući da može doći do relapsa reakcije, indikacije za primjenu vrlo su uske.

Napokon, najvažnije je informirati pacijenta o njegovoj preosjetljivosti na pojedini lijek, dati mu pismeno ime generičkog lijeka, tvornička imena, te datum i kliničke manifestacije reakcije. Ako je taj lijek bio nužan u liječenju, treba dati preporuku za alternativni lijek.

4.3. Glavne kliničke manifestacije

Opći simptomi. Slabost, umor, glavobolja, povraćanje mogu oponašati infektivne bolesti, no također mogu biti i alarmantni simptomi i prijeteći znakovi anafilaksije.

Vrućica. Može biti jedini simptom preosjetljivosti, ali u manjem postotku. S druge strane, može prethoditi ili pratiti teške egzanteme, te tada predstavlja važan znak opasnosti. Većinom se javlja s glavoboljom i mijalgijom. Posljedica je oslobađanja citokina IL-6 i TNF- α , a može biti i posljedica formiranja imunokompleksa. Korisno je provjeriti CRP, koji kod teških reakcija često ostaje nizak.

Zahvaćenost unutarnjih organa. Jetra i cirkulirajuće krvne stanice mogu biti oštećene u reakcijama induciranim lijekovima, bilo kao samostalna manifestacija ili pak u sklopu nekog sindroma. Mogu se naći hepatitis, limfadenopatija, nefritis,

pneumonitis i pankreatitis, iako i drugi organi mogu biti zahvaćeni. Neki organi mogu biti uključeni u lijekovima inducirani autoimuni poremećaj, kao kod primjerice lupusa ili vaskulitisa.

Također, može doći do reakcija u jetri, bubrezima i plućima, a bez kožne reakcije, što otežava prepoznavanje i dijagnozu. Jedini indikator da se radi o reakcijama preosjetljivosti može biti eozinofilija.

Urtikarija i angioedem. Urtike najčešće zahvaćaju trup i ekstremitete, a tipično se pojavljuju unutar nekoliko minuta od uzimanja lijeka te perzistiraju manje od 24h na jednoj lokaciji. Angioedem je netjestasti edem dubljih slojeva kože koji zahvaća lice, usne, oralnu sluznicu i muške genitalije. Obje reakcije mogu biti posljedica reakcije preosjetljivosti tipa I (posredovne IgE) ili tipa III (imunokompleksi), ali također i pseudoalergijskim tipom (npr. intolerancija aspirina). Ovakve reakcije često uzrokuju antibiotici, NSAIDs, radiokontrasti, opći anestetici i drugi. Kod urtikarije glavnu ulogu ima histamin, a kod angioedema bradikinin (Bircher 1999.).

Anafilaksija. Tipična reakcija posredovana IgE, koja započinje unutar nekoliko minuta do nekoliko sati nakon izlaganja lijeku. Inicijalni simptomi su svrbež, urtikarija, angioedem, a također mogu biti i crvenilo lica, konjuktivitis i eritem gornjeg dijela trupa. Ostali znakovi su angioedem, urtikarija, rinitis, bronhospazam, mučnina, povraćanje, bol u trbuhu, proljev, tahikardija, hipotenzija, šok, kardiorespiratorni arrest. Hipoksija mozga može rezultirati glavoboljom, dezorijentacijom, epilepsijom i smrću.

Serumska bolest. Klasični je primjer reakcije preosjetljivosti tipa III, s latencijskim periodom 6-8h. Manifestira se vrućicom, makuloznim i urtikarijskim egzantemom, limfadenopatijom, artralgijama i ponekad perifernim edemima. Penicilin, kotrimoksazol i rifampicin mogu uzrokovati stanje nalik serumskoj bolesti, ali bez mjerljivih imunokompleksa i aktivacije komplementa.

Sindrom preosjetljivosti na lijekove. Za taj sindrom predložen je akronim DRESS (Bocquet et al. 1996.). Tipičan je makulozni i/ili papulozni, rjeđe hemoragični ili bulozni osip i centrofacijalno oticanje. Vrućica, slabost i limfadenopatija mogu biti popraćene hepatitisom te nefritisom. U perifernoj krvi mogu se uočiti eozinofilija,

limfocitoza, agranulocitoza te anemija. Vrijeme između uzimanja lijeka i početka kliničke manifestacije može biti i 6 do 12 tjedana.

Makulopapulozni egzantemi. Manifestiraju se eritematoznim makulama i infiltriranim papulama, a osobito zahvaćaju trup i proksimalne dijelove ekstremiteta. Konfluacija je moguća i rezultira eritrodermijom. Deskvamacija se u većoj ili manjoj mjeri pojavljuje nakon povlačenja samih lezija. Diferencijalno dijagnostički može nalikovati ospicama ili rubeoli. Egzantem je posljedica T-stanično posredovane reakcije, a simptomi se obično pojavljuju 24-48h nakon ekspozicije, iako se prvi znaci diskretnog eritema mogu pojaviti i nakon nekoliko sati. Egzantemi pokazuju različite kliničke značajke ovisno o citokinima koje oslobađaju T-stanice.

Pseudolimfomatozne reakcije. Makulozni egzantemi mogu se razviti u infiltrativne lezije s histološkom slikom pseudolimfoma. Tijek je spor i protrahiran, te se stoga često previdi povezanost s lijekom. Zabilježeni su slučajevi s karbamazepinom, fenitoinom te ACE-inhibitorima (Bocquet et al. 1996.).

Pustulozni egzantemi. Naziv za diseminirani oblik jest akronim AGEPE (acute generalized exanthematic pustulosis) i uključuje generalizirani eritem sa multiplim sterilnim pustulama veličine 1-3mm, koje se rijetko razvijuju u veće bule. Početne lezije pojavljuju se na licu ili intertriginoznim područjima i mogu diseminirati u roku nekoliko sati. Vrućica i leukocitoza uvijek su prisutni.

Egzantem fleksijskih mjesta (tzv. Baboon syndrome). To je rijedak, možda i slabo evidentiran oblik, a za razliku od ostalih manifestacija, ova je češća kod muškaraca. Oštro ograničen eritem perigenitalne i perianalne regije povezan je s afekcijom velikih pregiba, aksila, laktova, koljena. Kasnije se može uočiti i deskvamacija. Sistemski simptomi i znakovi obično su odsutni. Ova manifestacija uglavnom je uzrokovana aminopenicilinima. Kako bi se ovo stanje razgraničilo od sistemskog kontaktnog dermatitisa uzrokovanog živom ili niklom, predložen je akronim SDRIFE (Hausermann & Bircher 2007.).

Fiksne erupcije. Ova reakcija praktično je patognomonična za reakciju na lijek. Česta je nepoželjna kožna reakcija. Lividni eritematozni, katkad i edematozni plakovi, često s kasnijim razvojem bula uočeni su uglavnom na akralnim lokalizacijama. Tipično zaostaje rezidualna hiperpigmentacija. Mogu biti prisutne i izolirane oralne

mukozne lezije ili lezije na muškim genitalijama. Reakcija se uvijek javlja na istom mjestu nakon ponovne ekspozicije uzročnom lijeku. Ova erupcija tipično je pojedinačna, ali uočene su i multilokularne diseminirane manifestacije. Radi se o reakciji posredovanoj T-stanicama.

Vezikulozni i bulozni egzantemi. Uključuju niz stanja, poput EEM, SJS i TEN. EEM je zapravo rijetko uzrokovan lijekovima i javlja se češće u mlađih ljudi koji pate od čestih virusnih infekcija. Kod razvoja SJS-a i TEN-a, prije nego se razviju bulozne lezije koža je bolna na tom mjestu, a uvijek je prisutna i zahvaćenost sluznica.

Vaskulitis. Rijetko je posljedica preosjetljivosti na lijekove. Lezije su karakterizirane palpabilnom purpurom (koja se najčešće pojavljuje na nogama), rjeđe urtikarijskim ili ulcerativnim plakovima. Patohistološki nalaz uključuje leukocitoklastični vaskulitis koji zahvaća površinske kožne žile. Obavezno se mora isključiti zahvaćenost unutarnjih organa.

Lijekovima inducirane autoimune bolesti. Lupus je karakteriziran iznenadnom pojavom vrućice, slabosti, mijalgije, artralgijske i artritisa nekoliko tjedana nakon uzimanja lijeka. Koža je zahvaćena u četvrtini slučajeva, a javljaju se eritematozne lezije koje katkad ljuskaju. Linearna IgA bulozna dermatitoza manje je često stanje koje nalikuje na bulozni pemfigoid i herpetiformni dermatitis.

5. ULOGA KOŽNIH TESTOVA U ISPITIVANJU SISTEMSKIH KOŽNIH REAKCIJA NA LIJEKOVE

Neželjene reakcije na lijekove (CADR – cutaneous adverse drug reactions) čest su problem u kliničkoj praksi. Budući da pacijenti često istovremeno uzimaju više lijekova, katkad je teško točno odrediti lijek koji bi mogao biti odgovoran za reakciju. Osim kliničke slike i kronologije događaja, kožno testiranje sumnjivim lijekom od pomoći je u utvrđivanju samog uzroka reakcije, kao i patofiziološkog mehanizma reakcije. Rezultati kožnih testova ovise o vrsti lijeka koji se testira te o obilježjima početne kožne reakcije na taj lijek. Epikutani test i prick test mogu se obaviti bilo kojim komercijalnim oblikom lijeka, dok se intrakutani test mora obaviti injicirajućim oblikom lijeka ili s čistom i sterilnom pripremom lijeka.

5.1. Kako izvesti kožno testiranje na lijekove?

Objavljene su različite smjernice za izvođenje kožnih testova kod sumnje na reakcije preosjetljivosti na lijekove (Barbaud et al. 2001., Brockow et al. 2002.). Nažalost, u novijoj literaturi koriste se mnoge različite tehnike testiranja reakcija preosjetljivosti na lijekove, posebice kod intradermalnog testa, zbog čega je nemoguće usporediti rezultate različitih centara.

Savjetuje se da se kožno testiranje provede unutar 6 mjeseci od same pojave reakcije, jer nije poznato hoće li nakon tog perioda pozitivan nalaz i dalje perzistirati te da li reaktivnost nekih lijekova traje i duže (Barbaud et al. 2001.)

5.1.1. Epikutani test

Budući da za mnoge čiste tvari još uvijek nije poznat točan prag osjetljivosti, u epikutanom testu se preporuča koristiti 10% koncentraciju lijeka u vazelinu (može i u nekom drugom nosaču), iako kod nekih lijekova i manje koncentracije mogu biti dovoljne (Barbaud et al. 2001.).

Koristeći pulveriziranu tabletu, najviša moguća koncentracija je 30% kako bi se dobila homogena dilucija u vazelinu, vodi ili alkoholu. Ako se pak koristi komercijalni oblik lijeka, preporuča se koristiti 30%-tnu koncentraciju.

Testovi s aciklovirom, karbamazepinom ili pseudoefedrinom povremeno su doveli do generaliziranih CADR simptoma (Barbaud et al. 1998.). Zbog toga se

preporuča da se epikutani test najprije izvede s lijekom razrjeđenim 1%, a ako je taj test negativan ponovi se s koncentracijom 10% (nevažno radi li se o čistoj tvari ili komercijalnom pripravku lijeka). Štoviše, kako bi se izbjegli lažno pozitivni nalazi, neke tvari moraju se testirati i u većim razrjeđenjima.

U dijagnostici fotosenzitivnih reakcija na lijekove trebaju se izvesti i epikutani i foto-epikutani test. Ozračenje se kod fotoepikutanog testa provodi 1. dan ili zbog praktičnih razloga može biti provedeno i 2. dan sa UVA zrakama 5 J/cm² (Barbaud et al. 2001.).

Što se tiče same pripreme za epikutani test, ako se koristi komercijalni pripravak lijeka, prvo je potrebno maknuti ovojnici lijeka, a sama tvar mora biti usitnjena u fini prah. Prah koji se nalazi u kapsulama testira se u 30%-toj koncentraciji u vazelinu te u 30%-tnoj koncentraciji u vodi. Sama ovojnica kapsule se namoči i zasebno testira. Tekući preparati testiraju se kao takvi te također razrjeđeni 30% u vodi. Kada se radi o testiranju komercijalnog pripravka lijeka, svaki se pripravak pripravlja isključivo za jednog pacijenta i ne smije stajati više od 24h (Barbaud et al. 2001.).

Kad kod je to moguće, trebaju se također testirati i konzervansi, bojila te pomoćne tvari komercijalnog pripravka, bilo nerazrjeđeni ili razrjeđeni 10% u vazelinu, ili pak u drugim nosačima u koncentracijama koje se obično preporučuju za testiranje kontaktnog alergijskog dermatitisa.

Što se tiče samog nosača korištenog u epikutanom testu, još nije usuglašeno koji je nosač najbolji. Postoji nekoliko studija u kojima je svaki testirani lijek razrjeđen u različitim pomoćnim tvarima. Kad su se usporedili rezultati tvari razrjeđenih u vazelinu, vodi ili alkoholu, zapravo nisu nađene neke velike razlike (Barbaud et al. 2001.). Vazelin se čini primjeren u većini slučajeva. Steroidni hormoni trebali bi biti testirani razrjeđeni u alkoholu, budući da su zabilježeni lažno negativni rezultati kod testiranja estrogena razrjeđenih u vodi ili vazelinu (Barbaud et al. 2001.). Također, opažena je pojava makulopapuloznog osipa kod pozitivnog epikutanog testa na kortikosteroide razrjeđene u vodi ili alkoholu, a negativan nalaz pri korištenju vazelina (Barbaud, neobjavljeni podaci). Kod studije u kojoj su se istraživale fiksne erupcije kao reakcija na kotrimoksazol uočeno je da je kod 25 od 27 pacijenata došlo do pozitivne reakcije na epikutano testiranje kad je kao nosač korišten dimetilsulfoksid,

dok je samo 8 pacijenata razvilo pozitivnu reakciju kad je kao nosač korišten vazelin (Ozkaya-Bayazit et al. 1999.). Nema značajnih studija o važnosti drugih nosača u epikutanom testiranju.

Gdje aplicirati epikutani test? Inače se epikutani test primjenjuje na gornjem dijelu leđa, međutim ispravno je i primjeniti ga na mjestu na kojem je nastala sama kožna lezija. Kod fiksnih kožnih lezija poznato je da epikutani test ili pak ponovljena aplikacija lijeka (Alanko 1994.) postaju pozitivni jedino ako se primjene na mjesto gdje je zaostala rezidualna pigmentacija nakon reakcije, a kad se primjeni na koži leđa, dakle na nezahvaćeno mjesto, reakcija je negativna.

Testiranje na prethodno zahvaćenom dijelu kože može biti vrijedno i kod ostalih kožnih reakcija na lijekove, kao što je objavljeno za makulopapulozni osip kao reakciju na tetrazepam (Barbaud et al. 2001.).

Kod očitavanja epikutanog testa koriste se kriteriji Internacionalne grupe za istraživanje kontaktnog dermatitisa – ICDRG (Wilkinson et al. 1970.). Budući da epikutani test može izazvati neposrednu reakciju, posebice kod β -laktamskih antibiotika, nužno je očitati rezultat unutar 20 min kod pacijenata koji su razvili urtikariju ili anafilaktički šok. Takve neposredne reakcije zabilježene su kod β -laktama, neomicina, gentamicina, bacitracina te diklofenaka.

5.1.2. Prick test

Prick test izvodi se na volarnoj strani podlaktice primjenjujući komercijalni oblik lijeka. Kad god je moguće trebalo bi testirati čistu tvar te pomoćne tvari zasebno. Ako se kod pacijenta kao prethodna reakcija razvila urtikarija, tada bi trebalo koristiti razrjeđenja koja se sekvencijalno povećavaju.

S obzirom na nedavne studije, možemo smatrati očitavanje prick testa standardiziranim; reakcija se smatra pozitivnom ako je nakon 20 min od injiciranja tvari promjer veći od onog negativne kontrole (0.9%-tna otopina NaCl) te ako je promjer ≥ 3 mm sa okolnim eritemom (Barbaud et al. 2001., Brockow et al. 2002.).

U svim slučajevima, trebalo bi napraviti kasno očitavanje 24h nakon testa, jer se kod ovog testa mogu pojaviti i kasni pozitivni rezultati (Barbaud et al. 2001.).

5.1.3. Intradermalni test

Intradermalni test izvodi se onda kad prick test pokaže negativne rezultate 20min nakon injiciranja sumnjivog lijeka. Ne provodi se kod pacijenata sa SJS, TEN te leukocitoklastičnim vaskulitisom, budući da postoji šansa da se ponovno izazovu ta stanja, a s velikim se oprezom primjenjuje kod pacijenata koji su imali DRESS (Barbaud et al. 2001.). Budući da intradermalni test kod 10% testiranih može izazvati rani ili kasni relaps kožne reakcije, preporučuje se njegovo izvođenje u bolničkim uvjetima. Za ovaj test potrebno je pribaviti sterilan oblik lijeka.

Mjesto injiciranja (leđa, podlaktica, ekstenzorno područje nadlaktice), sam volumen injicirajuće tvari (0.02 mL, 0.04 mL (Barbaud et al. 2001.) do 0.05 mL (Brockow et al. 2002.)) te trenutak ranog očitavanja reakcije (u većini slučajeva 20-30 min) još uvijek nisu standardizirani. Prema različitim autorima i smjernicama intradermalni se test smatra pozitivnim kada je promjer reakcije jednak ili pak više od 2 puta veći od promjera injekcijske papule (Barbaud et al. 2001.), ili ≥ 10 mm (Barbaud et al. 1998); za urtiku veličine 1-2 mm očekuje se porast promjera 3 mm ili veći (Brockow et al. 2002.). U većini radova, odgođene reakcije koje se pojavljuju nakon 24h, smatraju se pozitivnima ako se pojavi infiltrirajuća eritematozna reakcija (Barbaud et al. 2001).

Kako tehnike primjene intradermalnog testa nisu standardizirane, pragovi specifičnosti teško su usporedivi između različitih grupa (Barbaud et al. 2001.). Uzimajući u obzir dva rada o izvođenju kožnih testova bazirana na smjernicama (Barbaud et al. 2001., Brockow et al. 2002.), moglo bi se savjetovati da se odredi volumen injekcije, bez obzira na mjesto injiciranja, koji dovodi do promjera injekcijske modrice od 3mm. Očitavanje nakon 20min može se smatrati pozitivnim ako bi promjer reakcije bio ≥ 6 mm.

5.2. Vrijednovanje kožnih testova

Osim kod β -laktamskih antibiotika, u otkrivanju uzroka nepoželjne kožne reakcije na lijek sama korist prick testa i intradermalnog testa nije vrednovana onoliko kao epikutanog testa. U nekim radovima specifičnost intradermalnog testa ne može biti vrednovana, jer manjkaju negativne kontrole.

Od 60 pacijenata sa kožnom reakcijom na lijek kod kojih je epikutani test bio negativan, 58% imalo je pozitivnu reakciju kod intradermalnog testa (Barbaud et al. 2001.). Od 94 pacijenta sa odgođenom preosjetljivošću na β -laktame 36% su imali pozitivnu reakciju i na epikutani i na intradermalni test, dok je 8% imalo pozitivan intradermalni test a negativan epikutani (Romano et al. 2002.).

Kod reakcije na vankomicin, prick test i intradermalni test ostali su negativni čak i pri kasnom očitavanju, dok je epikutani test bio pozitivan i specifičan (20 negativnih kontrola) (Barbaud et al. 2001.). Ovo istraživanje naglašava da odgođene reakcije kod intradermalnog testa nisu uvijek dovoljne u istraživanju uzroka reakcija odgođene preosjetljivosti na lijekove, no epikutani test može upotpuniti analizu i biti pozitivan unatoč negativnom intradermalnom testu.

Epikutani test ima vrijednost u otkrivanju odgovornog lijeka kod generaliziranog ekcema, sistemskog kontaktnog dermatitisa, AGEP, SDRIFE, MPR (Barbaud et al. 1998.), i fiksnih lezija (Alanko 1994.), a čini se i kod DRESS-a. Fotoepikutani test koristan je u istraživanju fotosenzitivnosti na lijekove. S druge strane, manje su vrijedni u istraživanju Steven-Johnsonova sindroma i Lyellovog sindroma (Wolkenstein et al. 1996.), urtikarije, te svrbeža i vaskulitisa (Barbaud 2005.).

Kod urtikarije, prick test može dati neposredne pozitivne rezultate, kao kod primjerice β -laktama, anestetika te sinergistina. Nadalje, iako je to rijetkost, noviji radovi potvrđuju da prick test može imati odgođene pozitivne reakcije kod cjepiva, β -laktamskih antibiotika, a također i kod sinergistina, pseudoefedrina te minociklina (Barbaud et al. 2001.).

Neposredne pozitivne reakcije kod intradermalnog testa nisu neuobičajene kod urtikarije, angioedema ili anafilaktičkog šoka, a uglavnom su proučavane kod β -laktama, odnosno penicilina (Rodriguez-Bada et al. 2006.).

Posljednje studije potvrdile su vrijednost intradermalnog testa u istraživanju odgođene preosjetljivosti na lijekove. Kod makulopapuloznog osipa odgođene reakcije intradermalnog testa zabilježene su za β -laktame, a također i za heparin (Barbaud et al. 2001.).

Sama korist kožnih testiranja ovisi i o lijeku koji se testira. Najčešći su izvještaji o pozitivnom epikutanom testu na ove lijekove: β -laktamski antibiotici, posebice amoksicilin, kotrimoksazol, kortikosteroidi, derivati heparina (iako je korisniji intradermalni test), pristinamicin, karbamazepin, diltiazem, hidroksizin, pseudoefedrin, tetrazepam. Iako se ne smatraju klasičnim lijekovima, zadnje studije naglašavaju da radiološka kontrastna sredstva mogu uzrokovati odgođenu reakciju preosjetljivosti. U takvim slučajevima kožni testovi imaju svoju vrijednost.

Čini se da kožni testovi nemaju nikakvu vrijednost u istraživanju intolerancije na nesteroidne protuupalne lijekove, rumenila povezanog s kortikosteroidima, angioedema vezanog uz ACE-inhibitore ili blokatore angiotenzinskih II receptora, nuspojave vezane uz hijaluronsku kiselinu ili urtikarije uzrokovane bupropionom.

5.3. Negativna prediktivna vrijednost epikutanog testa

Prediktivna vrijednost negativnog rezultata kožnih testiranja je nepoznata. Mnogo je objavljenih slučajeva nepoželjnih reakcija na lijekove kod kojih je epikutani test negativan, dok je odgođeni intradermalni test bio pozitivan (Barbaud et al. 2001.)

U nedavnoj studiji (J. Waton and A. Barbaud, pers. commun., European Academy of Allergy and Clinical immunology, Vienna, 2006.) demonstrirana je readministracija lijeka koji je doveo do nepoželjne reakcije. Kod 18 od 140 pacijenata (13%) razvila se pozitivna reakcija, iako su imali negativne kožne testove (epikutani, intradermalni i test ubodom). Readministracija lijeka provedena je kod 229 pacijenata koji su imali negativan epikutani ili prick test. Pozitivna reakcija zabilježena je kod 22 pacijenta (9.6%) (Lammintausta & Kortekangas-Savolainen 2005.).

U studiji (Waton & Barbaud 2006.) 3 od 18 pacijenata (17%) imalo je pozitivnu reakciju pri oralnoj readministraciji β -laktama, iako su prick test, epikutani i intradermalni testovi bili negativni. Kod negativnog prick testa i intradermalnog testa, ali bez prethodno učinjenog epikutanog testa, oralni provokacijski test na β -laktamske antibiotike bio je pozitivan kod 49 od 89 pacijenata (55%) (Torres et al. 2002.), no druge studije pokazale su pozitivan nalaz samo kod 4 od 153 pacijenata (Barbaud et al. 2001.) te kod 35 od 416 pacijenata (8.4%) (Messaad et al. 2004.).

Kod reakcija na makrolide, 2 od 6 pacijenata (33%) razvila su pozitivnu reakciju kod readministracije (Waton & Barbaud 2006.), iako su prick test, epikutani i

intradermalni testovi bili negativni, dok su 2 od 2 pacijenta sa urtikarijom kao reakcijom na makrolide imali negativan nalaz kod intradermalnog testa, ali i negativan provokacijski test na suspektne makrolide (spiramicin, josamicin).

Kod nepoželjnih reakcija na paracetamol, kod 3 od 18 pacijenata (17%) zabilježen je pozitivan nalaz pri readministraciji (Waton & Barbaud 2006.). Kod nepoželjnih kožnih reakcija na kortikosteroide, kod jednog od 9 slučajeva (11%) zabilježena je pozitivna reakcija pri readministraciji (Waton & Barbaud 2006.)

Zaključno, kod nepoželjnih kožnih reakcija na lijekove s odgođenim mehanizmom preosjetljivosti koje nisu teške (primjerice makulo-papulozni osip) savjetuje se prvo primjeniti epikutano testiranje, a ako je ono negativno, ostala kožna testiranja s neposrednim i odgođenim očitanjem reakcije. U neposrednim reakcijama preosjetljivosti od koristi su prick test i intradermalni test. Nema nikakve koristi da se kod pacijenta primjenjuje epikutani test, ako je prethodno učinjeni intradermalni test pokazao pozitivnu odgođenu reakciju.

5.4. Sigurnost kožnog testiranja kod alergija na lijekove

Epikutano testiranje može reinducirati nepoželjne reakcije na lijek. To je zabilježeno s aciklovirom, hidoksizinom, pseudoefedrinom i triamcinolonom (Barbaud et al. 1998., 2001.).

Relaps nepoželjnih reakcija na lijekove češći je kod intradermalnog testiranja. Od 30 provedenih intradermalnih testiranja, uočena su 3 manja incidenta (Barbaud et al. 2001.). Kod β -laktamskih antibiotika nuspojave bi se pojavile u 0.1-2% testiranih pacijenata (Co Minh et al. 2006.). Od 998 testiranih pacijenata sa sumnjivom preosjetljivošću na β -laktame, njih 15% imalo je pozitivan rezultat intradermalnog testiranja, a 13 pacijenata (8.8%) razvilo je sistemsku reakciju za vrijeme testiranja. Anafilaksija te period kraći od 1h između posljednje uzete doze lijeka i pojave reakcije na lijek bili su učestaliji kod pacijenata koji su razvili sistemsku reakciju prilikom testiranja nego kod 135 pacijenata koji su imali pozitivan intradermalni test, ali bez sistemske reakcije (Co Minh et al. 2006.).

Prema tome, test ubodom i intradermalni test mogu inducirati sistemske reakcije, iako su rezultati testiranja negativni.

5.5. Relevantnost i specifičnost epikutanog testiranja

Od krucijalne je važnosti interpretacija rezultata kožnog testiranja na lijekove. Kao negativna kontrola trebalo bi se testirati pomoćno sredstvo koje se koristilo za razrjeđenje samog lijeka: lažno pozitivni nalaz epikutanog testa na lijek je rijedak, ali može se pojaviti kao posljedica senzibilizacije na etanol, a također i na vazelin (Ulrich et al. 2004.).

Lažno pozitivni rezultati češći su kod intradermalnog testa (Barbaud et al. 2001.), ali lažno pozitivni ili nerelevantni rezultati mogu se dobiti i kod epikutanog testiranja. Zbog toga je naglašena potreba za uspoređivanjem rezultata kožnih testova s onim dobivenim kod negativnih kontrola (Barbaud et al. 1998., 2001.).

Epikutani test na lijek može biti pozitivan kao posljedica kontaktnog dermatitisa na lijek ili neku njegovu pomoćnu tvar, a da se uopće ne radi o nepoželjnoj reakciji na sam lijek (Barbaud et al. 2001.). Epikutani test može biti pozitivan za komercijalni oblik lijeka ili za komponentu samog proizvoda, ali oralnu readministraciju lijeka pacijent može sasvim dobro tolerirati. Pozitivna reakcija tada je često posljedica prijašnjeg razvoja kontaktnog ekcema zbog upotrebe sredstava koja sadrže tu tvar. Isto tako, postoji i varijanta nerelevantno pozitivnog epikutanog testa s komercijalnim oblikom lijeka gdje su uzrok reakcije bili konzervansi ili stabilizatori, a ne sam lijek (Barbaud et al. 2001.).

Lažno pozitivni rezultat prick testa može se uočiti prilikom testiranja kodeinskih derivata te čistog spiramicina.

6. IN VITRO TESTOVI T-STANIČNO POSREDOVANE PREOSJETLJIVOSTI NA LIJEKOVE

In vivo testovi, epikutani, intrakutani te prick test često ne rezultiraju pozitivnim reakcijama, čak ni kod pacijenata s odličnom dokumentacijom alergijske reakcije. Provokacijski testovi, koji se smatraju zlatnim standardom, često su neprihvaćeni od strane pacijenata, nose rizik teških reakcija i ne mogu diferencirati razliku između alergijskih i pseudoalergijskih reakcija (Aberer et al. 2003.).

Prednost in vitro testova je što su sigurniji za pacijenta, izbjegavajući pritom mogućnost razvoja novih reakcija ili relaps starih, te omogućuju uvid u same patomehanizme reakcija. Ipak, još uvijek se koriste većinom u istraživačke svrhe, nisu standardizirani, odgovaraju samo određenim tipovima alergijskih reakcija, te ovise o dostupnosti čiste tvari i svježih krvnih stanica ili smrznutih mononukleara, koje nisu uvijek pri ruci. Usprkos tome, napredak u istraživanju alergija na lijekove, kao i potreba za takvim testovima, oživjeli su interes za ovu temu.

6.1. Patogeneza T-stanično posredovane preosjetljivosti na lijekove

Raste broj dokaza da T-stanice specifične za reakciju na lijek imaju važnu ulogu u patogenezi reakcija preosjetljivosti koje nisu posredovane IgE protutijelima. Pozitivni rezultati epikutang testa nakon 24-48h, pozitivna in vitro reaktivnost u testu limfocitne transformacije (LTT) te u pojedinačnim generacijama na lijekove specifičnih T-staničnih linija i T-staničnih klonova iz krvi pacijenata s različitim oblicima preosjetljivosti na lijekove kao npr. MPE, DRESS, AGEP, SJS, TEN, jasno pokazuju da T-stanice specifične na lijek mogu biti detektirane u zahvaćenom tkivu te perifernoj krvi pacijenata (Hari et al. 2001., Beeler et al. 2006.). Novija studija jasno je pokazala da je 1:250 do 1:10 000 T-stanica u perifernoj krvi tih pacijenata reaktivno na relevantni lijek. Također, ova studija dokazala je da T-stanice reaktivne na lijek perzistiraju u perifernoj krvi čak do 12 godina (Beeler et al. 2006.).

Pretpostavlja se da je dugotrajna perzistencija memorijskih T-stanica specifičnih za lijek, usprkos strogom izbjegavanju samog lijeka, zapravo posljedica križne reaktivnosti T-stanica, jer one često posjeduju i druge specifičnosti (kao što je dokazana visoka frekvencija križne reaktivnosti na MHC peptidnim kompleksima).

Ipak, prava priroda ovih pretpostavljenih križnih reakcija, koje bi mogle održavati 'pool' memorijskih stanica, još je nepoznata.

Funkcionalna disekcija T-stanica reaktivnih na lijekove dobivena iz različitih kliničkih slika otkrila je da postoji heterogenost reakcija preosjetljivosti na lijekove na koži, a također i na drugim organima (poput bubrega), zahvaljujući različitim funkcijama T-stanica.

6.2. Slijed događaja kod T-stanične aktivacije – mogućnosti testiranja

Potpuna stimulacija T-stanica zahtjeva formaciju imunološke sinapse koja uključuje MHC, T-stanični receptor (TCR) te različite adhezijske i kostimulativne molekule. Ova aktivacija uključuje slijed događaja na samoj membrani, ali i unutar T-stanice, te bi se mogla monitorirati te pomoći u identifikaciji T-stanica s određenom antigenom specifičnošću. Nakon što su T-stanice potaknute određenim antigenom, ulaze u proces sazrijevanja koji traje nekoliko dana i uključuje vezivanje, proliferaciju i funkcionalnu diferencijaciju.

Vezivanje započinje vezanjem TCR na specifični antigen koji je prezentiran na MHC molekulama tip I ili II, te je praćeno povišenjem intracelularnog Ca^{2+} , generiranjem inositol-1,4,5-trifosfata te ekspresijom većeg broja tzv. ranih gena (c-fos protoonkogen, c-myc, c-jun, te transkripcijski faktori NFAT i NF- κ B) unutar 30min od antigenog prepoznavanja. Nakon 1-2h od antigenog prepoznavanja, odvija se ekspresija gena koji kodiraju IL-2, 3, 4, 5 i 6, INF- γ , TGF- β , CD25, CD40, rani aktivacijski marker CD69 te brojne druge proteine.

U ranoj proliferacijskoj fazi, oko 1-2 dana nakon T-stanične aktivacije, inducirana je ekspresija dodatnih gena koji uključuju HLA-DR, CD80 te se sintetiziraju razne adhezijske molekule i DNA (Stepp et al. 2000., Posadas et al. 2002.). 3-5 dana nakon aktivacije, T-stanice ulaze u fazu terminalne diferencijacije, koja je karakterizirana ekspresijom funkcionalnih gena te produkcijom perforina i granzima B, koji su važni za citotoksične stanice, dok se ekspresija FasL javlja nešto ranije (Song et al. 2000.).

Mjerenje ovih ranih znakova aktivacije T-stanica teoretski se može upotrijebiti u in vitro detekciji T-stanica koje su reagirale na lijekove.

6.3. Dijagnostički testovi za reakcije preosjetljivosti posredovane specifičnim T-stanicama

Kada bi bilo poželjno obaviti in vitro testove? Ne rade se za vrijeme akutne faze bolesti, jer je imunološki sustav još uvijek snažno aktiviran uz prisutnu proliferaciju (Hari et al. 2001.). Kožni testovi i in vitro testovi izvode se nakon određenog vremena, kada se povuku klinički simptomi, te se tijelo očisti od inkriminirajućeg lijeka te antialergijske terapije. Generalno, mononuklearne stanice periferne krvi izolirane za vrijeme akutne faze vrlo su aktivne. Primjerice, u testu limfocitne transformacije, tako aktivirane stanice i dalje bi proliferirale te bi njihov izmjeren broj bio velik (iako su uvjeti nestimulirani), dok bi kod lijekom stimuliranih uvjeta njihova daljnja proliferacija bila samo marginalna i na taj način teže detektabilna. Zadnji podaci sugeriraju da ovakav koncept nije uvijek primjenjiv. Uočeno je da je test limfocitne transformacije kod SJS/TEN češće pozitivan u akutnoj fazi nego 6 tjedana nakon remisije, dok je kod DRESS-a prikladnije provesti kasnije testiranje.

Danas nije moguće predvidjeti hoće li reaktivnost T-stanica u pojedinog pacijenta perzistirati mjesecima ili čak i godinama, te hoće li pacijenti čija se in vitro reaktivnost izgubila tolerirati lijek pri ponovnoj primjeni. S jedne strane, uočena je pozitivna in vitro reakcija T-stanica nakon stimulacije β -laktamima i sulfometoksazolom više od 12 godina nakon terapije, koji su tada uzrokovali odgođenu i neposrednu reakciju (Beeler et al. 2006.). S druge strane, čini se da neki pacijenti izgube reaktivnost u roku 1-3 godine nakon reakcije. Tako mnoge skupine provode testove nakon minimalnog vremenskog intervala od 3 tjedna, ali i više od 3-6 mjeseci nakon akutne reakcije.

Posebna je situacija kod djece, jer kod njih preosjetljivost na lijekove katkad ne može biti dokazana unatoč tome što je anamneza prilično uvjerljiva. Razlog bi mogao biti taj što mala djeca nisu sposobna razviti primjereni memorijski imuni odgovor, ili pak što stanice aktivirane lijekom podilaze brznoj apoptozi (Thornton et al. 2004.).

6.3.1. Analiza različitih površinskih biljega protočnom citometrijom

U perifernoj krvi pacijenata s akutnom reakcijom na lijek, cirkulirajuće T-stanice su aktivirane u fazi diferencijacije (Hari et al. 2001.). Također se pokazalo da

in vitro kulture specifičnih, lijekovima aktiviranih limfocita eksprimiraju površinske molekule poput CD25, CD69, CD40L, a kasnije i CD71 i HLA-DR, koje su najčešće minimalno eksprimirane ili čak i odsutne u mirujućim stanicama. Takvi aktivacijski antigeni lako se detektiraju imunofluorescencijom i protočnom citometrijom, te na taj način pridonose identifikaciji T-staničnih subpopulacija u ukupnoj kulturi limfocita, koje su uključene u proces aktivacije.

Doista, preliminarne studije o aktivacijskim markerima mjerenim protočnom citometrijom u različitim pacijenata s alergijom na lijekove pokazuju da mononuklearne stanice periferne krvi izolirane iz pacijenta za vrijeme remisije pojačano eksprimiraju CD69, CD25 i CD71 na površini relativno velikog broja T-stanica, dok kod pojedinaca koji nisu senzibilizirani takva nad-regulacija nije uočena. Frekvencija CD69+ T-stanica nakon mjerenja protočnom citometrijom bila je mnogo viša od frekvencije izmjerene enzimski vezanom imunospot tehnikom ili karboksifluorescein-diacetat-sukcinimidil-esterskim mjerenjem (Beeler et al. 2006.). Preliminarni podaci upućuju da regulacija CD69 na T-stanicama ima dvije komponente: (1) rana aktivacija T-stanica specifičnih na lijek preko aktivacije TCR-receptora, (2) daljnja amplifikacija odgovora lučenjem citokina koji induciraju CD69 na susjednim T-stanicama, koje nisu specifične na lijek. Zaključno, amplifikacija se nastavlja samo ako su 'prave' T-stanice koje su reagirale na lijek prisutne u 'bazenu' T-stanica. Na taj način, mjerenje CD69 može biti koristan alat u detektiranju prisutnosti na lijekove specifičnih i križno reaktivnih T-stanica u perifernoj krvi pacijenata alergičnih na lijek.

6.3.2. Mjerenje citokina koje proizvode stanice nakon stimulacije lijekom

U skladu s njihovom ulogom dirigiranja svih faza imunog odgovora, citokini su važni medijatori efektorskih funkcija. Generalno, količina i obrazac citokina in vivo i in vitro korelira s tipom imunog odgovora koji se razvio nakon kontakta s antigenom.

Za vrijeme akutne faze alergijske reakcije na lijek, in vivo monitoriranje obrazaca citokina u neposrednim i odgođenim tipovima reakcija na lijekove otkriva Th1 ili Th2 profil citokina, što ovisi o samom kliničkom entitetu o kojem se radi. U ispitanika s odgođenim tipom reakcije na β -laktame objavljena je visoka produkcija IL-2, IFN- γ i TNF- α u mononuklearnim stanicama periferne krvi. S druge strane, u reakcijama na β -laktame koje su IgE posredovane, kao primjerice anafilaksija,

ovakvo monitoriranje pokazalo je Th2 profil citokina, prvenstveno s ekspresijom IL-4 (Posadas et al. 2000.).

Većina studija istražuje ulogu citokina u različitim kožnim reakcijama preosjetljivosti kombinirajući imunohistološku analizu akutnih kožnih lezija i kvantifikaciju citokina in vitro, otpuštenih od strane za lijek specifičnih T-staničnih klonova pacijenta u remisiji. Generalno, T-stanični klonovi alergičnog pacijenta pokazuju veoma raznolik obrazac citokina. Ipak, povišena proizvodnja IFN- γ često se uočava kod pacijenata s različitim kliničkim slikama poput MPE, DRESS i AGEP kao reakcija na karbamazepin, lamotrigin, celekoksib i druge (Britschgi & Pichler 2002.). IFN- γ tako može imati dominantnu ulogu u patofiziologiji različitih egzantema te poslužiti kao citokinski biljeg. Njegova visoka produkcija također daje objašnjenje nadregulacije MHC II klase na keratinocitima. Tako aktivirani keratinociti naknadno omogućuju prezentaciju lijeka CD4+ T-stanicama (Yawalkar et al. 2000.).

Još jedan prilično dominantan citokin koji se pojavljuje u različitim formama preosjetljivosti na lijekove je IL-5. U akutnom DRESS-u i MPE-u, nađena je visoka razina IL-5 u serumu, a sekrecija IL-5 i eotaksina (ekspimiran u uzorcima tkiva) zajedničko je obilježje specifičnih T-staničnih klonova (Pichler et al. 1997., 1998.). Eotaksin i IL-5 poznati su kao ključni faktori u regulaciji rasta, diferencijacije i aktivacije eozinofila. Oba su detektirana u kulturama mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi pacijenata s takvom slikom. Posljedično, mjerenje IL-5 u kombinaciji s testom limfocitne transformacije predložen je kao bolji mjerni instrument detekcije senzibilizacije na lijekove, nego LTT sam (Merk 2005.). S druge strane, u studiji koja je istraživala obrazac citokina u neposrednim i odgođenim reakcijama, ekspresija IL-5 nije bila povišena, a analiza T-staničnih klonova pacijenata s DRESS-om na karbamazepin i lamotrigin nije pokazala visoku produkciju IL-5, nego IFN- γ (Posadas et al. 2000.).

U posebnoj vrsti reakcije preosjetljivosti na lijekove poput AGEP, analiza IL-8 mogla bi biti korisna, budući da je taj kemokin proizveden od strane T-stanica, a ovakav oblik reakcije često uzrokuje zajedno s IFN- γ i GM-CSF (Britschgi & Pichler 2002.). Bazirano na ovim saznanjima, savjetuje se da se kod većine reakcija preosjetljivosti trebaju provjeriti T-stanice koje luče IFN- γ i IL-5. Takav pristup mogao

bi biti jednako osjetljiv, ako ne i osjetljiviji od testova proliferacije u stanjima s eozinofilijom.

Procjena produkcije citokina može se provesti molekularnim tehnikama poput PCR-a. Na razini proteina, citokini se mjere i supernatantima staničnih kultura bioesejima te imunoesejima (ELISA, radioimunoesej i sl.). Analiza intracelularnih citokina protočnom citometrijom s monoklonalnim protutijelima obilježenim fluoresceinom također se može koristiti in vitro i ex vivo.

6.3.3. Ispitivanja stanične proliferacije

Test limfocitne transformacije trenutno je najrasprostranjeniji test za detekciju T-stanične preosjetljivosti na lijekove. Primjenjuje se za odgođeni tip reakcija preosjetljivosti, ali može detektirati i T-stanice u perifernoj krvi pacijenata s neposrednom reakcijom (Beeler et al. 2006.). LTT mjeri proliferativni odgovor T-stanica i mononukleara periferne krvi u in vitro uvjetima. Specifičnost proliferativnog odgovora demonstrirana je uspostavljanjem na lijek specifičnih T-staničnih linija i pretežno CD4+ T-staničnih klonova iz LTT kultura ili epikutanog testa s različitim lijekovima, poput β -laktama, lidokaina, mepivakaina, sulfametoksazola i karbamazepina, celekoksiba, lamotrigina, ciprofloksacina. U testu limfocitne transformacije mononukleari iz periferne krvi dobiveni iz senzibiliziranog pacijenta kultiviraju se 6 dana, jedan dio uz prisutnost suspektog lijeka, a kao negativna kontrola služi kultura stanica samo s medijem (bez lijeka). Senzibilizirani limfociti podilaze blastogenezi te luče citokine, a proliferacijski odgovor može se mjeriti kao vezivanje ^3H -timidina za vrijeme sinteze DNA. Rezultat se može prikazati kao stimulacijski indeks, koji je omjer stanične proliferacije s antigenom u odnosu na proliferaciju bez antigena. Uobičajeno je stimulacijski indeks >2 , a za β -laktame >3 smatrati pozitivnim.

Retrospektivna analiza 923 slučaja pacijenata sa suspektom alergijom na lijek ukazala je da senzitivnost testa limfocitne transformacije ovisi o lijeku koji se testira. 78 od 100 pacijenata s vrlo vjerojatnom alergijom na lijek imalo je pozitivan test, dakle osjetljivost je bila 78%. Kada su se analizirale alergije samo na β -laktame, osjetljivost je bila oko 74%, što znači da je veća od one kod kožnih testova (62%). Negativna i pozitivna prediktivna vrijednost testa limfocitne transformacije donekle se mogu izračunati za penicilinske pripravke, naročito za amoksicilin. Pod

pretpostavkom da je incidencija senzibilizacije na amoksisilin 5% u izloženih, negativna prediktivna vrijednost iznosi 98.6%, a pozitivna 79%.

U skladu s ovim nalazom ide i zapažanje da su pacijenti koji su klasificirani kao manje vjerojatno senzibilizirani na lijek imali nižu incidenciju pozitivnog LTT-a, dok su pacijenti s vrlo malo vjerojatnom sumnjom na senzibilizaciju imali najnižu incidenciju pozitivne reakcije na testu. U studiji, kod 62% pacijenata (od njih 50) s vrlo dobro dokumentiranom odgođenom ili neposrednom preosjetljivošću na β -laktame, mononuklearne stanice periferne krvi proliferirale su in vitro na najmanje jednu vrstu penicilina koji su testirani, neovisno o tipu reakcije (Luque et al. 2001.). Osjetljivost testa bila je veća kod skupine koji su imali neposrednu reakciju (64.5%) u odnosu na one koji nisu (57.9%), no proliferativni odgovor u skupini s neposrednom reakcijom bio je manje intenzivan nego u drugoj skupini. Objavljene su i niže osjetljivosti testa limfocitne transformacije, 33% (Barna et al. 1980.).

U spomenutoj retrospektivnoj analizi 923 slučaja također je evaluirana specifičnost testa limfocitne transformacije. 15 od 102 po svojoj prilici nealergičnih pacijenata imalo je pozitivan rezultat testa, tako da je specifičnost iznosila 85%. Ipak, ovakva relativno niska specifičnost mogla bi biti zbog činjenice da je svaki pozitivan LTT na NSAIDs bio označen kao lažno pozitivan, jer je bio smatran pseudoalergijskom reakcijom (iako neke reakcije, kao primjerice one na diklofenak, mogu biti prave alergijske reakcije). Nedavne analize LTT-a kod senzibiliziranih na β -laktame pokazale su specifičnost 93% (Luque et al. 2001.).

Zaključno, test limfocitne transformacije, s ukupnom osjetljivošću oko 60-70% još je uvijek polemičan zbog mnogih nedostataka: zahtjeva sterilne kulture stanica, mnogo vremena jer je opsežan, specifična proliferacija ovisi o kvaliteti medija stanične kulture, a stanice su radiokativno obilježene. Ipak, nadopunjujući druge testove, koristan je kao alat u dijagnostici alergija na lijekove (Pichler & Tilch 2004.). Ako ga izvode iskusni tehničari, može dati vrijedne informacije u dijagnostici alergija; pozitivan rezultat pomaže u otkrivanju inkriminiranog lijeka, no negativan rezultat ne isključuje preosjetljivost na lijek.

Da bi se evaluirao proliferativni in vitro odgovor, može se upotrijebiti protočna citometrija. Uzorci stanica koji sadrže za lijek specifične stanice prvo se boje fluorescentnom bojom. Nakon svake diobe stanica, kao posljedice stimulacije,

stanice postaju 2x manje fluorescentne, zbog podjele boje među stanicama kćerima. Tako se se broj staničnih dioba može odrediti u skladu sa smanjenjem intenziteta fluorescencije. Prednost ove metode je što omogućuje identifikaciju stanične populacije koje se dijeli pri reaktivnosti na lijek. Osjetljivost i specifičnost testa tek se treba evaluirati.

6.3.4. Citotoksičnost

Tipično svojstvo reakcije preosjetljivosti tipa IV jest sudjelovanje citotoksičnih T-stanica. Čini se da su citotoksične T-stanice donekle uključene u sve oblike T-stanično posredovanih reakcija na lijekove, iako su one klinički prilično različite. Citotoksične T-stanice često se nalaze na dermo-epidermalnoj granici ili u epidermisu, sa znakovima oštećenja keratinocita, no mogu se pojaviti i u drugim organima, poput bubrega (intersticijski nefritis) ili jetre (hepatitis). Većina podataka pokazuje da citotoksične stanice ubijaju ciljane stanice uglavnom perforinom/granzimom B, koji su važni medijatori stanično posredovane citotoksične reakcije (Stepp et al. 2000., Yawalkar et al. 2000.). Također je dokazano da razina perforina u mononuklearima periferne krvi mjerena PCR-om korelira s težinom alergijske reakcije u akutnoj fazi (Posadas et al. 2002.). Zanimljivo je da je u in vitro analizi specifičnih T-staničnih klonova i T-staničnih linija pacijenata s razmjerno blagim egzantemom također dokazano ubijanje stanica posredovano FasL-om (Kuechler et al. 2004.). Budući da citotoksične T-stanice najvjerojatnije dovode do najtežih oblika reakcija preosjetljivosti, poput SJS/TEN-a i hepatitisa, njihova je detekcija od velike važnosti. Zanimljivo je da posljednji podaci pokazuju da se neke visoko potentne citotoksične T-stanice nisu mogle detektirati proliferacijskim testovima, nego se mogu identificirati kao specifične na lijek prema njihovom citotoksičnom potencijalu u citotoksičnom testu (Kuechler et al. 2004.). Nažalost, takvi testovi su opsežni i zahtjevaju radioaktivno obilježavanje ciljnih stanica. Nepostojanje proliferacije može objasniti zašto je LTT često negativan kod preosjetljivosti posredovanih citotoksičnim stanicama, poput TEN-a. Do danas još uvijek nije utvrđen jednostavan in vitro test koji bi omogućio identifikaciju in vitro aktiviranih T-stanica s citotoksičnim kapacitetom (Yawalkar et al. 2000., Kuechler et al. 2004.).

Zaključno, nužno je kombinirati anamnezu, kliničku sliku i laboratorijske testove s kožnim i in vitro testovima, jer se jedino tako može pouzdano razlučiti koji je lijek doveo do alergijske reakcije.

7. TEST DEGRANULACIJE BAZOFILA

Bazofili periferne krvi i tkivni mastociti efektorske su stanice u IgE posredovanim neposrednim reakcijama, poput rinitisa, astme i anafilaksije. Također mogu biti uključeni u druge alergijske i pseudoalergijske reakcije, gdje su upleteni drugačiji aktivacijski mehanizmi, primjerice aktivacija komplementa i sl.

Bazofili čine svega 0.5% leukocita periferne krvi, što otežava njihovu purifikaciju. Budući da ove stanice imaju važnu ulogu u neposrednim alergijskim reakcijama, razvijeni su neki funkcionalni in vitro testovi koji detektiraju njihovu aktivaciju. Jedan od prvih bio je test oslobađanja histamina, no nije zaživio u kliničkoj praksi budući da nema dovoljnu osjetljivost niti specifičnost (Hamilton & Adkinson 2003.). To je razlog zbog kojeg je nekoliko skupina posljednjih godina iskoristilo protočnu citometriju te razvilo nove alate kako bi monitorirali aktivaciju bazofila nakon stimulacije specifičnim antigenom, koristeći ekspresiju membranskih biljega (Monneret et al. 1999.).

Protočna citometrija koristan je alat u analizi različitih tipova stanica te se može upotrijebiti za identifikaciju specifičnih staničnih populacija, čak i onih koje se nalaze u niskim količinama. Njezina je korist dokazana u studiji aktivacije inducirane alergenom (Ebo et al. 2006.). Prvi korak ovih ispitivanja jest identifikacija bazofila specifičnim fluorescentnim antitijelima (npr. anti-IgE, anti-CD123, anti-HLA-DR, anti-CCR3), a drugi korak jest demonstracija određenih membranskih fenotipova koji se pojavljuju nakon ekspozicije alergenima.

Ipak, većina studija u literaturi upućuju na ekspresiju CD63 (Sanz et al. 2002.) ili CD203c (Boumiza et al. 2005.) na bazofilima nakon degranulacije in vitro. Antitijela na CD203c prepoznaju transmembranski protein tipa II, koji se umnožava na površini nakon degranulacije.

Tek se treba ustanoviti hoće li u budućnosti novi antigen degranulacije bazofila CRTH2 te degranulacijski markeri CD13, CD164 i CD107a koji su vezani uz degranulaciju moći biti primjenjeni u protočno asistiranoj dijagnostici i/ili čak poboljšati tehniku (Ebo et al. 2006.).

Bazofili su sposobni otpustiti sadržaj granula nakon procesa degranulacije ovisnog o antigenoj stimulaciji. Premošćivanje IgE receptora djelovanjem alergena

dovodi do intracitoplazmatske fuzije granula te fuzije njihove membrane sa staničnom membranom, dovodeći do egzocitoze granula (degranulacije). Molekule koje su prisutne na membrani granula, poput CD63, nakon degranulacije se eksprimiraju na membrani bazofila.

CD63 jest protein granula koji nije samo eksprimiran u bazofilnim granulama, nego i na monocitima, makrofagima i trombocitima. Njegova ekspresija u korelaciji je s degranulacijom i otpuštanjem histamina, što ga čini idealnim biljekom bazofilne aktivacije (Bochner 2000.). Pri in vitro stimulaciji alergenom, stanice periferne krvi inkubiraju se sa suspektnim alergenom 15-40 min. Nakon reakcije, stanice se označavaju anti-CD63 i anti-IgE-FITC monoklonalnim protutijelima. Koriste se dvije kontrole: negativna kontrola u kojoj se stanice inkubiraju sa stimulacijskim puferom koji se koristi u testu (katkad sadrži i IL-3) koja odražava bazalnu stimulaciju, te pozitivna kontrola u kojoj se mogu koristiti anti-IgE ili anti-IgE-receptorsko protutijelo.

Uz pomoć krivulja optimalne osjetljivosti u odnosu na specifičnost, određivanje pozitivnosti mora biti učinjeno za svaki alergen kako bi se rezultati mogli evaluirati.

Test degranulacije bazofila generalno se smatra korisnim za in vitro alergološku dijagnostiku te je i klinički potvrđen za razne alergene: mišićni relaksansi, β -laktamski antibiotici, pirazolani i NSAIDs (Sanz et al. 2001., 2002., 2005.).

7.1. Tehnički aspekti testa

Protočna citometrija može se provesti s punom krvi pacijenta ili pak izoliranim leukocitima. Iako je puna krv jednostavnija za manipuliranje, pokazuje neke nedostatke koji bi mogli sniziti osjetljivost testa. Kod alergija na lijekove postoje mnogi izvještaji da je osjetljivost niža ako se upotrijebi puna krv, a ne izolirani leukociti.

U testu degranulacije bazofila što se tiče negativne kontrole, važno je dobiti što nižu moguću vrijednost. Generalno, negativna kontrola niža je od 5% u 80% slučajeva. Od čimbenika koji utječu na negativnu kontrolu spominju se prirodna in vivo ekspozicija alergenima, koja na taj način može podići bazalnu aktivnost (primjerice, sezona cvjetanja kod pacijenata alergičnih na pelud) te neki pirogeni i endotoksini koji mogu kontaminirati vodu koja se koristi u testu.

Većina studija kao pozitivnu kontrolu koristi monoklonalni ili poliklonalni anti-IgE, no poznato je da određeni postotak pacijenata ne reagira na anti-IgE, bilo na oslobađanje histamina ili produkcije sulfodileukotriena (Crockard & Ennis 2001.). Postotak nereaktora kreće se između 15 i 25%, ovisno o autoru. Za test aktivacije bazofila postotak pacijenata bez odgovora kreće se oko 10% (Ebo et al. 2006.). Osjetljivost pozitivne kontrole može se povećati primjenom monoklalnlog anti-IgE-Fc-receptorskog protutijela.

Vrlo je važno odrediti optimalnu koncentraciju za svaki alergen, koja će dovesti do maksimalne stanične aktivacije, uz pomoć krivulja doza-učinak. Ako je koncentracija alergena koja uzrokuje stimulaciju uska i pokazuje velike individualne varijacije, potrebno je koristiti nekoliko koncentracija u testu. Suprotno tome, ako se stimulacija postiže širokim rasponima koncentracija s malim individualnim razlikama, moguće je koristiti jednu koncentraciju alergena. Za lijekove, preporuča se koristiti barem dvije uzastopne koncentracije oko one optimalne.

Inkubacija s IL-3 smatra se ključnom za optimalnu produkciju sulfodileukotriena (CAST), a također povećava i oslobađanje histamina, međutim nema konsenzusa o takvoj potrebi poboljšanja osjetljivosti testa bazofilne degranulacije.

Kako se bi se rezultati testa valjano evaluirali, važno je uzeti u obzir 2 stavke: (1) apsolutni broj bazofila koji se analizirao, a savjetuje se da bude iznad 150, te (2) postotak degranuliranih bazofila. U negativnoj kontroli postotak degranuliranih bazofila obično je ispod 5%.

U usporedbi s ostalim in vitro dijagnostičkim tehnikama, test degranulacije bazofila obično pokazuje dobru korelaciju s oslobađanjem histamina i/ili utvrđivanjem sulfodileukotriena (CAST) (Monneret et al. 1999., Sanz et al. 2001. & 2002.), ali čini se da ima veću osjetljivost i specifičnost nego drugi testovi.

7.2. Klinička primjena testa degranulacije bazofila u dijagnostici alergija na lijekove

7.2.1. Test degranulacije bazofila kod alergije na mišićne relaksanse

Monneret et al. (1999.) primjenili su protočnu citometriju (IgE, CD45, CD63) te su uočili da rezultati koreliraju s onima intradermalnog testa. U studiji koja je uključivala 39 pacijenata, nađena je osjetljivost 54% i specifičnost testa 100%.

Ebo et al. (2006.) objavili su osjetljivost testa za rokuronij 91.7% i specifičnost 100% u studiji koja je uključila 14 pacijenata s anafilaksijom i pozitivnim kožnim testovima na rokuronij.

7.2.2. Test degranulacije bazofila kod alergije na β -laktame

Sanz, Gamboa et De Weck (2002.) testirali su dijagnostičku pouzdanost testa aktivacije bazofila i CAST u seriji od 81 pacijenta s neposrednom reakcijom na β -laktame i 30 zdravih kontrola. Rezultati se mogu podijeliti u 2 skupine, dakle rezultati kod pacijenata s pozitivnim kožnim testovima i one s negativnim kožnim testovima. 58 pacijenata imalo je pozitivne kožne testove, te je uz kontrolnu grupu od 30 pacijenata (dakle, negativni kožni testovi na β -laktame) ukupna osjetljivost testa aktivacije bazofila iznosila 50.7%, a specifičnost 93.3%. Rezultat testiranja na amoksicilin pokazao je najveću osjetljivost i specifičnost, a također i pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost u odnosu na ostale testirane β -laktame. Pozitivna prediktivna vrijednost za β -laktame iznosila je 6.4%, a negativna 97.7%. S druge strane, 23 pacijenta imali su negativne rezultate kožnih testiranja, a njih 39% imalo je pozitivan test aktivacije bazofila, sa specifičnošću 93.3%. CAST je u ovoj skupini bio pozitivan kod 22.7% pacijenata, sa specifičnošću 83.3%.

U multicentričnoj studiji koja je obuhvaćala 10 europskih skupina, bio je uključen 181 pacijent alergičan na β -laktame i 80 kontrola (De Weck et al. 2006.). Osjetljivost testa aktivacije bazofila iznosila je 47.8%, no u kombinaciji s CAST-om povećala se na 67%. Specifičnost je iznosila 92%. Osjetljivost specifičnih IgE bila je svega 38%. Stoga ovi rezultati pokazuju da su test aktivacije bazofila i CAST, pogotovo kad se kombiniraju, napouzdaniji in vitro testovi koji dokazuju in vitro neposrednu alergijsku reakciju na β -laktame, iako još osjetljivost nije optimalna.

7.2.3. Test degranulacije bazofila kod sindroma preosjetljivosti na NSAIDs

Taj sindrom karakteriziran je trijadom astme, rinitisa i nosne polipoze, te s druge strane, urtikarijom i angioedemom. Danas se još uvijek tvrdi da ne postoji in vitro dijagnostički test za ovo stanje, iako neki izvještaji sugeriraju da postoje pozitivni rezultati CAST testa na NSAIDs (De Weck et al. 2006.).

Velika multicentrična studija 12 europskih skupina je uključila 150 pacijenata s preosjetljivošću na NSAIDs i 163 kontrola (De Weck et al. 2006.). U ovoj studiji

osjetljivost testa bazofilne aktivacije kod kombinacije acetil-salicilne kiseline, diklofenaka i naproxena iznosila je 75%, sa specifičnošću oko 90%. Također, uočeno je da način izolacije leukocita može utjecati na reakcije kontrola tolerantnih na acetil-salicilnu kiselinu: normalni pojedinci također mogu pokazati o dozi ovisnu bazofilnu aktivaciju na različite NSAIDs.

Zaključno, test aktivacije bazofila predstavlja dijagnostički alat interesa u studijama neposrednih reakcija preosjetljivosti na lijekove (Sanz et al. 2005., Ebo et al. 2006.). Ova tehnika nudi mnoge prednosti: reproducira in vitro mehanizme preosjetljivosti koji su uključeni u neposredne reakcije, omogućava dijagnozu alergijskih i pseudoalergijskih reakcija na lijekove, posebice one koje nisu često detektabilne serološkim metodama (npr. specifični IgE), rezultati se dobivaju unutar nekoliko sati, više različitih lijekova mogu se simultano testirati s malom količinom krvi, te ovaj test često omogućuje izbjegavanje izvođenja ekspozicijskog testa.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici, profesorici dr.sc. Branki Marinović, koja mi je pomogla izabrati zanimljivu temu o širokom spektru alergija na lijekove. Zahvaljujem na njezinom strpljenju, sugestijama i na dostupnosti u svakom trenu dvojbi i problema.

Zahvaljujem posebno svojoj obitelji, zaručniku, kao i prijateljima koji su svakodnevno samnom prolazili kroz težak put postanka jednog plemenitog zanimanja.

9. LITERATURA

1. Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, Brockow K, Pichler WJ, Demoly P (2003.) Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy* 58:854-863
2. Alanko K (1994.) Topical provocation of fixed drug eruption: a study of 30 patients. *Contact Dermatitis* 31:25-27
3. Bach S, Bircher AJ (2005.) Drug hypersensitivity reactions: from clinical manifestations to an allergologic diagnosis. *Allerg Immunol* 37:213-218
4. Barbaud A (2005.) Drug patch testing in systemic cutaneous drug allergy. *Toxicology* 209:209-216
5. Barbaud A, Reichert-Penetrat S, Trechot P, Jacquin-Petit MA, Ehlinger A, Noirez V, Faure GC, Schmutz JL, Bene MC (1998.) The use of skin testing in the investigation of cutaneous adverse drug reactions. *Br J Dermatol* 139:49-58
6. Barbaud A, Gonçalo M, Bruynzeel D, Bircher A (2001.) Guidelines for performing skin test with drug in the investigation of cutaneous adverse drug reactions. *Contact Dermatitis* 45:321-328
7. Barbaud A, Trechot P, Reichert-Penetrat S, Commun N, Schmutz JL (2001.) Relevance of skin tests with drugs in investigating cutaneous adverse drug reactions. *Contact Dermatitis* 45:265-268
8. Barna BP, Gogate P, Moeder M (1980.) Lymphocyte transformation and radioallergosorbent tests in drug hypersensitivity. *Am J Clin Pathol* 73:172-176
9. Beeler A, Engler O, Gerber BO, Pichler WJ (2006.) Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T-cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol* 117:455-462
10. Bircher AJ (1999.) Drug-induced urticaria and angioedema. *Eur J Dermatol* 9:657-663
11. Bircher AJ (2005.) Symptoms and danger signs in acute drug hypersensitivity. *Toxicology* 209:201-207
12. Bochner BS (2000.) Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol* 160:S292-S302
13. Bocquet H, Bagot M, Roujeau JC (1996.) Drug-induced pseudolymphoma and drug hypersensitivity syndrome (drug rash with eosinophilia and systemic symptoms: DRESS). *Semin Cutan Med Surg* 15:250-257
14. Boumiza R, Debard AL, Monneret G (2005.) The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin Mol Allergy* 3:3-9

15. Britschgi M, Pichler WJ (2002.) Acute generalized exanthematous pustulosis, a clue to neutrophil-mediated inflammatory processes orchestrated by T cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2:325-331
16. Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring , Pichler W, Demoly P (2002.) General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 57:45-51
17. Co Minh HB, Bousquet PJ, Fontaine C, Kvedariene V, Demoly P (2006.) Systemic reactions during skin test with β -lactams: a risk factor analysis. *J Allergy Clin Immunol* 117:466-468
18. Crockard AD, Ennis M (2001.) Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow? *Clin Exp Allergy* 31:975-977
19. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bilo B, Blanca M, Torres M, Mayorga L, Campi P, Drouet M, Sainte-Laudy J, Romano A, Jermann T, Weber JM (2006.) ENDA group: Diagnosis of immediate-type betalactam allergy in vitro by flowcytometry (Flow-CAST) and sulfidoleukotriene production. A multicentric study (abstract). 25th Congr EAACI, Vienna, 2006, p 196
20. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Sturm G, Blanca M, Torres M, Mayorga L, Correia S, Kowalski M, Medrala W, Szczeklik A (2006.) ENDA group: Diagnosis of hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in vitro by flowcytometry (Flow-CAST) and sulfidoleukotriene assay. A multicentric study (abstract). 25th Congr EAACI, Vienna, 2006, p 188
21. Demoly P, Hillaire-Buys D (2004.) Classification and epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Immunol Allergy Clin North Am* 24:345-356
22. Demoly P, Kropf R, Pichler WJ, Bircher A (1999.) Drug hypersensitivity: questionnaire. *Allergy* 54:999-1003
23. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, De Cleck LS, Stevens WJ (2006.) Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 61:1028-1039
24. Hamilton RG, Atkinson NF (2003.) Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 111(suppl):S687-S701
25. Hari Y, Frutig-Schnyder K, Hurni M, Yawalkar N, Zanni MP, Schnyder B, Keppeler A, Von Greyerz S, Braathen LR, Pichler WJ (2001.) T cell involvement in cutaneous drug eruptions. *Clin Exp Allergy* 31:1398-1408
26. Häusermann P, Bircher AJ (2007.) SDRIFE – another acronym for a distinct cutaneous drug exanthema. Do we really need it? *Dermatology* 214:1-2
27. Kuechler PC, Britschgi M, Schmid S, Hari Y, Grabscheid B, Pichler WJ (2004.) Cytotoxic mechanisms in different forms of T-cells mediated drug allergies. *Allergy* 59:613-622

28. Lammintausta K, Kortekangas-Savolainen O (2005.) The usefulness of skin tests to prove drug hypersensitivity. *Br J Dermatol* 152:968-974
29. Lipozenčić J (2008.) *Dermatovenerologija*, Zagreb, Medicinska naklada
30. Luque I, Leyva L, Jose Torres M, Rosal M, Mayorga C, Segura JM, Blanca M, Juarez C (2001.) In vitro T-cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy* 56:611-618
31. Merk HF (2005.) Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. *Toxicology* 209:217-220
32. Messaad D, Sahla H, Benahmed S, Godard P, Bousquet J, Demoly P (2004.) Drug provocation tests in patients with a history suggesting an immediate drug hypersensitivity reaction. *Ann Intern Med* 140:1001-1006
33. Monneret G, Gutowski MC, Bienvenu J (1999.) Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method. *Clin Exp Immunol* 115:393-396
34. Nigen S, Knowles SR, Shear NH (2003.) Drug eruptions: approaching the diagnosis of drug-induced skin diseases. *J Drugs Dermatol* 2:278-299
35. Ozkaya-Bayazit E, Bayazit H, Ozarmagan G (1999.) Topical provocation in 27 cases of cotrimoxazole-induced fixed drug eruption. *Contact Dermatitis* 41:185-189
36. Pichler WJ (2007.) *Drug hypersensitivity*, Basel, Switzerland, Karger
37. Pichler WJ, Schnyder B, Zanni M, Hari Y, von Greyerz S (1998.) Role of T cells in drug allergies. *Allergy* 53:225-232
38. Pichler WJ, Tilch J (2004.) The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 59:809-820
39. Pichler WJ, Zanni M, von Greyerz S, Schnyder B, Mauri-Hellweg D, Wendland T (1997.) High IL-5 production by human drug-specific T cell clones. *Int Arch Allergy Immunol* 113: 177-180
40. Posadas SJ, Leyva L, Torres MJ, Rodriguez JL, Bravo I, Rosal M, Fernandez J, Juarez C, Blanca M (2000.) Subjects with allergic reactions to drug show in vivo polarized patterns of cytokine expression depending on the chronology of the clinical reaction. *J Allergy Clin Immunol* 106:769-776
41. Posadas SJ, Padial A, Torres MJ, Mayorga C, Leyva L, Sanchez E, Alvarez J, Romano A; Juarez C, Blanca M (2002.) Delayed reactions to drugs show levels of perforin, granzyme B, and Fas-L to be related to disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 109:155-161
42. Rodriguez-Bada JL, Motanez MI, Torres MJ, Mayorga C, Canto G, Perez-Intestrosa E, Suau R, Blanca M (2006.) Skin testing for immediate hypersensitivity to β -lactams: comparison between two commercial kits. *Allergy* 61:947-951

43. Romano A, Viola M, Mondino C, Pettinato R, Di Fonso M, Papa G, Venuti A, Montuschi P (2002.) Diagnosing nonimmediate reactions to penicillins by in vivo tests. *Int Arch Allergy Immunol* 129:169-174
44. Roujeau JC (2005.) Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology* 209:123-129
45. Sanz ML, De Weck AL, Gamboa PM (2005.) A new combined test with flowcytometric basophil activation and determination of sulfidoleukotriens is useful for in vitro diagnosis of hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Int Arch Immunol* 136:58-72
46. Sanz ML, De Weck AL, Uasuf C, Gamboa PM, Chazot M (2001.) Use of flow cytometry to assess basophil activation in patients allergic to betalactam antibiotics. Correlation between flow cytometric allergen stimulation test (FAST) and other in vivo and in vitro tests. *Int Arch Allergy Immunol* 124:307-308
47. Sanz ML, Gamboa PM, Antepara I, Uasuf C, Vila L, Garcia-Aviles C, Chazot M, De Weck AL (2002.) Flow-cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 32:277-286
48. Song A, Nikolcheva T, Krensky AM (2000.) Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunol Rev* 177:236-245
49. Stepp SE, Mathew PA, Bennett M, De Saint Basile G, Kumar V (2000.) Perforin: more than just an effector molecule. *Immunol Today* 21:254-256
50. Thornton CA, Upham JW, Wikstorm ME (2004.) Functional maturation of CD4+CD25+CTLA4+CD45RA+ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens. *J Immunol* 173:3084-3092
51. Torres MJ, Mayorga C, Leyva L, Guzman AE, Cornejo-Garcia JA, Juarez C, Blanca M (2002.) Controlled administration of penicillin to patients with a positive history but negative skin and specific serum IgE test. *Clin Exp Allergy* 32:270-276
52. Ulrich G, Schmutz JL, Trechot P, Commun N, Barbaud A (2004.) Sensitisation to petrolatum: an unusual cause of false-positive drug patch test. *Allergy* 59:1006-1009
53. Wilkinson DS, Fregert S, Magnusson B, Bandmann HJ, Calnan CD, Cronin E, Hjorth N, Maibach HJ, Malten KE, Meneghini CL, Pirilä V (1970.) Terminology of contact dermatitis. *Acta Derm Venereol* 50:287-292
54. Wolkenstein P, Chosidow O, Flechet ML, Robbiola O, Paul M, Dume L, Revuz J, Roujeau JC (1996.) Patch testing in severe cutaneous adverse drug reactions, including Steven-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Contact Dermatitis* 35:234-236
55. Yawalkar N, Egli F, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ (2000.) Infiltration of cytotoxic T cells in drug-induced cutaneous eruptions. *Clin Exp Allergy* 30:847-855

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 31.01.1990., a djetinjstvo i osnovnu školu provela sam živeći u Samoboru. Svoje obrazovanje započela sam u Osnovnoj školi Bogumila Tonija u Samoboru 1996., a nastavila upisom u Gimnaziju Lucijana Vranjanina u Zagrebu, opći smjer 2004 godine. 2008. upisujem Medicinski fakultet u Zagrebu, a usput se i zapošljavam u McDonald'su.

Tijekom studija aktivno sam sudjelovala u projektima CroMSIC-a, 2012. godine postajem demonstrator Kliničke propedeutike i iste godine započinjem znanstveni rad na Zavodu za hematologiju, KBC Zagreb, pod vodstvom doc. dr. sc. Pulanića koji je još uvijek u tijeku.

2012.g. prisustvovala sam Stepp-ovom tečaju 'BLS & AED' te tečaju 'Primarna obrada rane' pod vodstvom prof. dr. sc. Delimara. Kao aktivni sudionik sudjelovala sam na studentskom kongresu CROSS 2013. i 2014. godine.