

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Petra Król

Biomarkery u dětí se syndromy periodické horečky

Biomarkers in children with periodic fever syndromes

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Pavla Doležalová, CSc.
Pracoviště: Klinika dětského a dorostového lékařství
Všeobecná fakultní nemocnice
Ke Karlovu 2
121 01
Praha

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.03.2016

MUDr. Petra Król

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned below the printed name.

Identifikační záznam:

KRÓL, Petra. Biomarkery u dětí se syndromy periodické horečky. [*Biomarkers in children with periodic fever syndromes*]. Praha, 2016. 87 s., 4 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika dětského a dorostového lékařství. Školitel Doležalová, Pavla.

Abstrakt

Úvod: Syndromy periodické horečky jsou klinické jednotky patřící do velké skupiny autoinflamatorních chorob. Většina těchto syndromů vzniká na podkladě genetické predispozice. Mimo tuto klasifikaci stojí syndrom periodické horečky s aftózní stomatitidou, faryngitidou a krční adenitidou (*PFAPA*) s nejasnou etiologií.

Výsledky: V naší práci jsme popsali největší klinický soubor pacientů se syndromem PFAPA z jednoho centra. Z laboratorních výsledků jsme potvrdili benigní průběh PFAPA syndromu. Zaznamenali jsme signifikantně vyšší hladiny sérových cytokinů (IFN- γ a IL-1 β) v průběhu epizody horečky u PFAPA pacientů v porovnání s kontrolní skupinou. Měření ukázala zvýšené počty plazmatických buněk v periferní krvi PFAPA pacientů. Popsali jsme zvýšené hladiny naivních CD4 a CD8 T lymfocytů a přibližně 2-krát vyšší proporci CD8 T lymfocytů u PFAPA tonzil. Signifikantní rozdíly byly i v hladinách IFN- γ , IL-1 β , IL-6 a TNF- α ve stimulovaných supernatantech v porovnání s nestimulovanými supernatanty z periferní krve u pacientů s PFAPA syndromem. Měření bakteriálního profilu ukázalo, že profily mikroflory v tonzilách jednotlivých dětí jsou individuální.

Závěr: Odstraněním tonzilární tkáně s potenciálním bakteriálním/virovým/jiným spouštěčem dochází u pacientů s PFAPA syndromem k vymizení symptomů. Pacient s PFAPA syndromem je pravděpodobně imunologicky nezralý jedinec s vyšší vnímavostí k vnějším faktorům.

Klíčová slova: periodická horečka, vrozená imunita, zánět

Abstract

Introduction: Periodic fever syndromes are clinical entities classified as autoinflammatory diseases. The most of the periodic fever syndromes have genetic predisposition (monogenic periodic fever syndromes). PFAPA (*Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis a Adenitis*) syndrome is an idiopathic disease with unknown aetiology.

Results: In our study, we described the largest clinical series of patients with PFAPA syndrome from a single center. The laboratory results have confirmed uncomplicated course of PFAPA syndrome. In our measurements we observed significantly higher levels of serum cytokines (IL-1 β and IFN- γ) during episodes of fever in PFAPA patients compared to the control group. Our measurements showed increased numbers of plasma cells in the peripheral blood of PFAPA patients. We have found increased levels of naïve CD4 and CD8 T cells and approximately 2-fold higher proportion of CD8 T cells in tonsils of PFAPA patients. Significant differences were also present at levels of IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF- α in stimulated supernatants compared to supernatants from unstimulated peripheral blood from patients with PFAPA syndrome. Measurements of bacterial profile showed individual microbial profile in patients.

Conclusion: Removal of the tonsillar tissue with the potential bacterial/viral/other trigger leads to disappearance of recurrent episodes of fever. Patient with PFAPA syndrome is probably immunologically immature individual susceptible to external factors.

Keywords: periodic fever, innate immunity, inflammation

Obsah

1. ÚVOD	7 -
1.1 Syndromy periodických horeček	7 -
1.2. Monogenní periodické horečky	9 -
1.2.1 Periodický syndrom asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (TNF)-	9 -
1.2.2 Periodický syndrom asociovaný s mevalonátkinázou	11 -
1.2.3 Familiární středomořská horečka	13 -
1.2.4 Periodické syndromy asociované s kryopyrinem	15 -
1.3 Periodické horečky s neznámou etiologií	18 -
1.3.1 Periodická horečka s aftózní stomatitidou, faryngitidou/tonzilitidou a krční lymfadenopatií	18 -
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	24 -
3. MATERIÁL A METODIKA	26 -
3.1 Klinická a epidemiologická část	26 -
3.1.1 Pacienti	26 -
3.1.2 Diagnostický algoritmus	26 -
3.1.3 Definice klinického obrazu.....	27 -
3.1.4 Terapeutické algoritmy	28 -
3.1.5 Sledování pacientů.....	28 -
3.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii	28 -
3.2.1 Standardní zánětlivé parametry	28 -
3.2.2 Vyšetření mevalonaturie	29 -
3.2.3 Vyšetření sérových hladin cytokinů	29 -
3.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii	30 -
3.3.1 Vyšetření profilu bílé krevní řady pomocí průtokové cytometrie	30 -
3.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve.....	31 -
3.3.3 Histologické vyšetření tonzil	31 -
3.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil.....	31 -
3.3.5 Vyšetření DNA vybraných bakterií a virů.....	31 -
3.4 Kontrolní skupiny	32 -
3.5 Statistická analýza	32 -
4. VÝSLEDKY	33 -
4.1 Klinická a epidemiologická část	33 -
4.1.1 Pacienti se syndromem periodické horečky	33 -
4.1.2 Klinická charakteristika dětí s PFAPA syndromem	34 -
4.1.3 Terapie	37 -
4.1.4 Dlouhodobý průběh	39 -
4.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii	40 -
4.2.1 Standardní zánětlivé parametry	40 -
4.2.2 Vyšetření mevalonaturie	41 -
4.2.3 Vyšetření sérových hladin cytokinů	41 -
4.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii	43 -
4.3.1 Imunofenotypizace lymfocytů z periferní krve a tonzil.....	43 -
4.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve.....	47 -
4.3.3 Histologické vyšetření tonzil	48 -
4.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil.....	49 -
4.3.5 Vyšetření DNA vybraných bakterií a virů.....	49 -
5. DISKUZE	52 -

5.1 Klinická a epidemiologická data	52 -
5.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii	54 -
5.2.1 Standardní zánětlivé parametry	54 -
5.2.2 Vyšetření sérových hladin cytokinů	55 -
5.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii	57 -
5.3.1 Vyšetření profilu bílé krevní řady pomocí průtokové cytometrie	57 -
5.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve.....	59 -
5.3.3 Histologické vyšetření tonzil	59 -
5.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil a vyšetření DNA vybraných bakterií pomocí PCR-DGGE a virů pomocí PCR	60 -
6. ZÁVĚR	62 -
6.1 Patofyziologické děje	63 -
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64 -
8. LITERATURA	66 -
9. SEZNAM PUBLIKACÍ	83 -
10. PODĚKOVÁNÍ	85 -
11. PŘÍLOHY	86 -

1. ÚVOD

1.1 Syndromy periodických horeček

Syndromy periodických horeček se řadí mezi autoinflamatorní onemocnění, která jsou v pediatrii poměrně nově definovanou jednotkou. Pojem periodická nemoc však vznikl mnohem dříve, první popsany případ byl zaznamenán již v roce 1806 Heberdenem, který pozoroval u pacienta recidivující bolesti břicha, občas doprovázené bolestmi na hrudi a končetinách (Heberden 1806). V roce 1895 popsali Janeway a Mosenthal případ 16-leté dívky trpící od narození opakovanými bolestmi břicha s krátkými epizodami horeček (Janeway a Mosenthal 1908). Na základě těchto a dalších rekurentních doprovodných příznaků byl v roce 1948 Reimannem definován termín „periodická nemoc“ a poprvé popsána Familiární středomořská horečka (*FMF; Familial Mediterranean Fever*) charakterizovaná horečkou, akutní bolestí břicha, pleuritidou a artralgiemi, typicky přítomná v rodinách středomořského původu (Reimann 1948). V průběhu následujících let se podařilo popsat další syndromy periodických horeček, u kterých byly díky rozvoji molekulárně-genetických metod definovány vrozené příčiny.

V posledním desetiletí se zformovala nová kategorie tzv. autoinflamatorních onemocnění. Pojem autoinflamatorní vystihuje předpokládané etiologické pozadí těchto stavů, u nichž je epizodická aktivace prozánětlivých mechanismů způsobena poruchou regulace procesů vrozené obranyschopnosti. Na rozdíl od onemocnění označovaných jako autoimunitní zde nehrají zásadní roli autoprotilátky ani antigen-specifické T-lymfocyty (McDermott a Aksentijevich 2002).

Rekurentní febrilie, charakterizované více nebo méně pravidelnými afebrilními intervaly, jsou doprovázeny lokálními zánětlivými projevy. U většiny syndromů periodických horeček se podařilo definovat vrozenou příčinu. Dle typu dědičnosti lze odlišit syndromy dědičné autozomálně dominantně, ke kterým se řadí periodické syndromy asociované s kryopyrinem (*CAPS; Cryopyrin Associated Periodic Syndromes*) a periodický syndrom asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (TNF) (*TRAPS; TNFR-Associated Periodic Syndrome*), a autosomálně recesivně, familiární středomořská horečka a periodický syndrom asociovaný s mevalonátkinázou (*MAPS; Mevalonate kinase Associated Periodic fever Syndrome*). Mimo tuto klasifikaci stojí syndrom periodické horečky s aftózní stomatitidou,

faryngitidou a krční adenitidou (*PFAPA; Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis a Adenitis*) (Marshall 1989), u kterého se doposud nepodařilo definovat vyvolávající příčinu.

Pro stanovení diagnózy periodické horečky je nutná široká diferenciálně diagnostická rozvaha – je potřeba vyloučit infekce (bakteriální, virové, mykotické, parazitární a atypické), systémová onemocnění, malignity a případně imunodeficitní stavy.

Rekurentní horečky mohou být součástí příznaků u řady systémových onemocnění (např. systémová forma juvenilní idiopatické artritidy, systémový lupus erythematosus, morbus Crohn, systémové vaskulitidy atd.). Opakované horečky mohou být asociované s vrozenou nebo získanou poruchou imunity, protilátkové i buněčné, např. syndrom cyklické neutropenie. Protrahovaná či opakující se horečka může být také příznakem generalizovaných malignit (akutní lymfoblastická leukémie, lymfomy, neuroblastom, atd.).

Jednotlivé syndromy periodických horeček pomůže rozlišit pečlivá osobní, rodinná a epidemiologická anamnéza a přesný popis klinického obrazu. Další diagnostické schéma je pro podobnost klinických projevů často obtížné a navíc specifické odchylky není možné rozlišit ani vyšetřením základních laboratorních ukazatelů (C reaktivní protein, sedimentace, krevní obraz atd.), které bývají obvykle pouze nespecificky zánětlivě změněny.

Dominantní je zánětlivá aktivace imunitního systému (zvýšené parametry zánětu – C-reaktivní protein (CRP), sérový amyloid A (SAA), sedimentace erytrocytů (FW), leukocytóza), bez mikrobiologického průkazu vyvolávajícího agens. Analýza přítomnosti známých mutací deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je významnou pomocnou diagnostickou metodou, negativní nález však nevylučuje přítomnost periodického syndromu na podkladě zatím nepopsané mutace.

1.2. Monogenní periodické horečky

1.2.1 Periodický syndrom asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (TNF)

1.2.1.1 Charakteristika

Periodický syndrom asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (*TRAPS*; *TNFR-Associated Periodic Syndrome*) byl poprvé popsán v roce 1982 v rodině irsko-skotského původu. Byl označen jako Familial Hibernian Fever, později, pro opakované pozorování rodinného výskytu, Familial Periodic Fever (Williamson et al. 1982; Mulley et al. 1998).

TRAPS se zpravidla manifestuje v dětství (průměrný věk 10 let), výjimečně i v pozdějším věku (de Jesus a Goldbach-Mansky 2013). Klinický obraz je charakterizován opakovanými horečkami s variabilním trváním (průměrná délka horečnaté epizody může být 14 dní s maximálním trváním až několik týdnů). Bolesti břicha patří k častým příznakům (77%) doprovázejícím horečky. Náhlý začátek a závažné bolesti břicha často imitují příznaky náhlé příhody břišní a přibližně jedna třetina pacientů s bolestí břicha podstoupí operaci břicha (Hull et al. 2002; Stojanov a Kastner 2005; Stojanov a McDermott 2005). Myalgie patří k dalším frekventně se vyskytujícím příznakům u TRAPSu. Bolest je stěhovavá a může být provázena erytematózní vyrážkou. Výsev může být makulární, edematózní, urtikariální nebo retikulární (Stojanov a McDermott 2005; de Jesus a Goldbach-Mansky 2013). Přibližně polovina pacientů se prezentuje rekurentní konjunktivitidou nebo přední uveitidou. Periorbitální edém je příznakem, který může spolu s ostatními symptomy podporovat diagnózu TRAPS (Jesus et al. 2008; de Jesus a Goldbach-Mansky 2013). Z dalších příznaků mohou být přítomné bolesti kloubů, artritida, pleuritida, neurologické symptomy (bolesti hlavy, poruchy chování, aseptická meningitida (de Jesus a Goldbach-Mansky 2013; Minden et al. 2004). Laboratorně se prokazují zvýšené reaktanty akutní fáze zánětu (CRP, FW, leukocytóza, SAA). Nejzávažnější dlouhodobou komplikací onemocnění je systémová amyloidóza, přítomná asi u 10 % pacientů (Drewe et al. 2003; de Jesus a Goldbach-Mansky 2013).

K diagnóze TRAPS může pomoci stanovení sérové hladiny TNFR1, která je typicky snižena. Diagnóza je pak potvrzena genetickou analýzou.

Celosvětově bylo dosud diagnostikováno několik stovek nositelů TNFRSF1A mutací, přičemž nejvíce pacientů je evropského původu. Předpokládá se, že toto onemocnění je nejčastější příčinou hereditárních syndromů periodických horeček ve vyspělých zemích a po familiární středomořské horečce druhou nejčastější příčinou i celosvětově (Federici et al. 2015).

1.2.1.2 Patogeneze

Jedná se o autosomálně dominantní syndrom způsobený mutací genu pro receptor tumor-nekrotizujícího faktoru (TNFRSF1A) ležícího na krátkém raménku 12. chromozomu (McDermott et al. 1999; Aksentijevich et al. 2001). Bylo již popsáno přes 40 mutací asociovaných s klinickým obrazem TRAPS. TNFRSF1A je gen kódující protein p55, který představuje extracelulární podjednotku membránového TNF receptoru, tzv. TNFR1. TNFR1 spolu s proteinem p75 vytváří membránový TNF receptor (TNFR). Mutace genu TNFRSF1A vedou ke strukturálním změnám zasahujícím do procesu uvolňování (tzv. *shedding*) TNFR1 (Siebert et al. 2005). Za fyziologických podmínek je TNFR aktivován navázáním molekuly TNF- α . Následně dojde k odštěpení TNFR1, který jako solubilní receptor vychytává volný TNF- α z cirkulace. Tímto homeostatickým dějem je regulována koncentrace TNF- α v oběhu (Siebert et al. 2005).

TNF- α je důležitý prozánětlivý cytokin, který prostřednictvím TNFR, exprimovaného na povrchu mnoha typů buněk, spouští intracelulární signální kaskádu, která vede k aktivaci NF-kappa B a aktivačního proteinu 1 (AP-1). Tyto proteiny regulují transkripci řady genů pro další prozánětlivé cytokiny (např. interleukin 6 a 8). Výsledkem je přítomnost protrahovaného zánětu.

Patogenezi TRAPS však nelze vysvětlit pouze defektním sheddingem, protože již byly popsány mutace, u kterých není porucha v odštěpování TNFR1, jako např. nedostatečná proapoptotická aktivace (Drewe et al. 2003).

1.2.1.3 Terapie

Nesteroidní antirevmatika (NSAID) pomáhají potlačit symptomy v průběhu zánětlivých atak. Krátkodobé podávání glukokortikoidů s nebo bez NSAID je efektivní k ukončení ataky horeček a dalších symptomů, ale nežádoucí účinky kortikoidů jsou limitujícím faktorem. V terapii TRAPS se v současné době nejvíce

uplatňuje používání antagonistů interleukinu-1 (IL-1) (ter Haar et al. 2012; ter Haar et al. 2015). Své místo u některých pacientů má také používání etanerceptu – jedná se o lidský rekombinantní fúzní protein, složený ze solubilního receptoru 2 pro TNF (TNFR2) spojeného s Fc komponentou lidského imunoglobulinu G1 (IgG1), který redukuje klinické a laboratorní známky zánětu svou vazbou na buněčný receptor, čímž blokuje biologickou aktivitu TNF- α . Účinky etanerceptu se mohou v průběhu času snižovat (ter Haar a Frenkel 2014).

1.2.2 Periodický syndrom asociovaný s mevalonátkinázou

1.2.2.1 Charakteristika

Periodický syndrom asociovaný s mevalonátkinázou (*MAPS; Mevalonate kinase Associated Periodic fever Syndrome*) byl poprvé popsán v roce 1984 Jos van der Meerem et. al. jako syndrom periodické horečky doprovázený lokalizovanými formami zánětlivé reakce a byl označen jako syndrom hyperimmunoglobulinemie D (*HIDS; Hyperimmunoglobulinemia D syndrome*) (van der Meer et al. 1984). MAPS byl jistou dobu považován za variantu Stillovy nemoci (Prieur a Griscelli 1984; Geny a et al. 1974) , nebo také nazýván etiocholanolonová horečka (Driesen et al. 1968).

Příznaky MAPS se objevují obvykle v prvním roce života s typickou horečkou, trvající 3 až 7 dní, s faryngitidou, bilaterální krční lymfadenopatií, bolestí břicha, průjmem, nauzeou, zvracením, artralgiemi, artritidou, rašem (makulární, papulární, urtikariální, nodulární typ), bolestí hlavy, splenomegalii či hepatomegalii. Mohou být přítomny i afty v dutině ústní. Ataky horeček se střídají s asymptomatickými obdobími. Interval mezi jednotlivými atakami je většinou 4 – 6 týdnů (Drenth et al. 1994; de Jesus a Goldbach-Mansky 2013). Ataky horeček se mohou vyskytovat po dobu mnoha let a jsou častější v průběhu dětství a dospívání (Bader-Meunier et al. 2011). Horečky jsou všeobecně spouštěné vakcínací, poraněním, operací nebo stresem a jsou charakterizovány vysokou horečkou se zimnicí (Glaser a Goldbach-Mansky 2008; Drenth et al. 1994).

Zvýšené laboratorní parametry v krvi (CRP, leukocytóza, neutrofilie, FW, SAA) ukazují zánětlivou aktivaci v průběhu horečky. V moči je zvýšená exkrece neopterinu jako markeru aktivované buněčné imunitní odpovědi, který je jedním z ukazatelů aktivity onemocnění (Drenth a et al. 1995; Houten a et al. 2000). Kontinuálně zvýšené

hladiny IgD (≥ 100 U/mL) u víc než 90% pacientů a u víc než 80% pacientů také zvýšené hladiny IgA (≥ 260 mg/dL) slabě korelují se závažností onemocnění, dokonce jsou popsáni pacienti s prokázanou MVK mutací a normálními hladinami IgD (Saulsbury 2003). Zvýšené IgD bylo pozorováno i u části pacientů s FMF a TRAPS, i když u těchto syndromů jsou koncentrace obvykle pod 100 U/mL (Saulsbury 2003; Ammouri et al. 2007). Specificita tohoto nálezu je tedy nízká. Navíc je známo, že zejména u malých dětí (kojenců a batolat) bývají koncentrace IgD po dlouhou dobu v normě a zvýší se až v pozdějším věku (Ammouri et al. 2007). V moči je zejména v době ataky horečky přítomná vysoká hladina mevalonátu a jeho metabolitů (Glaser a Goldbach-Mansky 2008).

V diagnostice je důležitá podrobná anamnéza horeček, přidružených symptomů a doba nástupu onemocnění. Laboratorní průkaz vysokého IgD event. spolu s IgA a prokázanou mevalonaturií jsou indikacemi ke genetické analýze. Definitivní diagnóza je založena pouze na průkazu mutace v MVK genu. Z dlouhodobého hlediska mají léčení pacienti dobrou prognózu, v porovnání s FMF a TRAPS je výskyt amyloidózy velmi raritní (Lachmann et al. 2006; Siewert et al. 2006; Obici et al. 2004). Horečky doprovázejí člověka s MAPS po celý život, ale v dospělosti bývá klinický obraz mírnější.

1.2.2.2 Patogeneze

Jedná se o autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutací genu pro mevalonátkinázu (MVK) na dlouhém raménku 12. chromozomu (Drenth et al. 1999; Cuisset et al. 2001). Nejčastěji se jedná o missense mutace (bodová mutace, při které dochází k záměně aminokyseliny vedoucí k tvorbě abnormálního proteinu), u 80 % pacientů byla prokázaná mutace genu V377I (Frenkel et al. 2001; Cuisset et al. 2001). Vzniklý produkt, enzym mevalonátkináza, za fyziologických podmínek katalyzuje fosforylaci kyseliny mevalonové na kyselinu 5-fosfomevalonovou, důležitou pro vznik cholesterolu (Goldstein a Brown 1990). Cholesterol je důležitý prekurzor žlučových kyselin, vitamínu D, steroidních hormonů a nonsteroidových isoprenoidů. Mutace genu MVK u pacientů s MAPS vede k produkci mevalonátkinázy s reziduální enzymatickou aktivitou (1-7%). Významnou roli v patogenezi hraje zřejmě zvýšená akumulace kyseliny mevalonové a snížení tvorby isoprenoidových produktů, včetně geranylu a farnesyly (Goldstein a Brown 1990; Houten a et al. 2000; Houten et al.

2003). Následkem nedostatečné koncentrace těchto produktů dochází k zvýšené sekreci IL-1 β v mevalonátkináza-deficientních buňkách a tudíž k prozánětlivé stimulaci (Frenkel et al. 2002).

Onemocnění bývá často vyvoláno očkováním, infektem nebo jiným stresem. In vitro studie poukázaly na zvýšenou aktivitu HIDS-defektní mevalonátkinázy při nižší teplotě (30°C). Se zvyšováním teploty na 37–39°C docházelo k progresivnímu snížení funkce enzymu. Tento in vitro experiment by mohl potvrdovat hypotézu asociace doby nástupu MAPS s očkováním nebo infektem a vysvětlit tak epizodicky zvýšený odpad kyseliny mevalonové v moči (Houten et al. 2002). Existuje varianta mutace MVK genu, tzv. mevalonová acidurie, u které je defekt enzymu výrazný (< 1 %) s obvykle nedetekovatelnou aktivitou mevalonátkinázy. Toto onemocnění má na rozdíl od MAPS závažný klinický dopad (Hoffmann et al. 1986; Simon et al. 2004a).

1.2.2.3 Terapie

NSAID poskytují úlevu od symptomů v průběhu atak. Krátkodobé podávání kortikoidů s nebo bez NSAID může zmírnit průběh ataky. Kolchicin nebo statiny se ukázaly jako neúčinné v terapii, proto se dále již nedoporučují (Ostuni et al. 1988; Simon et al. 2004b). Krátkodobý účinek blokády interleukinu (IL-)1 je efektivní v ukončení zánětlivých atak. U pacientů s častými atakami a/nebo přetrvávajícími zvýšenými zánětlivými parametry v krvi mezi atakami se doporučuje terapie blokádu interleukinu (IL-)1 (Anakinra) nebo blokádu TNF (Etanercept) (Bodar a et al. 2005; Demirkaya a et al. 2007; ter Haar et al. 2015). U pacientů se závažným refrakterním onemocněním s nízkou kvalitou života je možností definitivní terapie pomocí alogenní transplantace kmenových buněk krvetvorby (van der Burgh et al. 2013).

1.2.3 Familiární středomořská horečka

1.2.3.1 Patogeneze

Familiární středomořská horečka (*FMF*; *Familiar Mediterranean Fever*) je autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v MEFV (*Mediterranean fever*) genu na krátkém raménku 16. chromozomu, který kóduje protein pyrin/marenostrin. Gen byl poprvé popsán v roce 1997, predominantně je exprimován v neutrofilech, eozinofilech, a monocytech (Livneh et al. 1997; Centola et al. 1998). Nejčastější

mutace genu jsou lokalizované v B30.2 (SPRY) doméně, která funguje jako ligand nebo signál-transdukční doména. Mutace domény mohou způsobovat opoždění apoptózy a prodloužení zánětlivé odpovědi buňky (Chae et al. 2003; Chae et al. 2006; Gumucio et al. 2002). Exprese pyrinu je stimulovaná prozánětlivými cytokiny např. interleukinem 4, TNF- α a interferonem gamma (IFN- γ). Pro vysvětlení patogeneze onemocnění existují 2 odlišné hypotézy:

a) Sekvestrační teorie – podporuje inhibiční efekt poškozené proteinové domény na kaspaza-1-mediovanou aktivaci interleukinu 1 β jako prozánětlivého cytokinu (Chae et al. 2003; Chae et al. 2006).

b) Pyrin inflamazomová hypotéza – ukazuje schopnost pyrinu vytvořit vlastní „prozánětlivou jednotku“, tzv. pyrinový inflamazom, výsledkem čehož je aktivace interleukinu 1 β (Yu et al. 2006).

1.2.3.2 Charakteristika

U FMF je začátek onemocnění do 20 let s trváním ataky horečky obvykle 12-72 hodin. Horečky obvykle doprovází akutní bolest břicha a artritida velkých kloubů trvající 1 až 3 dny (Fonnesu et al. 2009; Younes et al. 2002). Ataky horečky se pravidelně opakují v rozmezí jedenkrát za týden až jedenkrát za rok s asymptomatickým intervalem mezi atakami (Ozen a et al. 2006; Chae et al. 2006; Glaser a Goldbach-Mansky 2008). Ataky horečky se objevují náhle s teplotou 38.5 – 40°C s bolestí břicha přítomnou až u 95% pacientů (Simon et al. 2005). Po odeznění příznaků může zejména u neléčených pacientů přetrvávat subklinický zánět se zvýšenou tvorbou AA amyloidu a rizikem jeho orgánové akumulace ústící do obrazu amyloidózy. Za hlavní příčinu bolestí břicha je považovaná akutní peritonitida, mohou se však vyskytnout i jiné serozitidy, jako pleuritida a perikarditida (Kees et al. 1997; Barski et al. 2012) a raš připomínající erysipeloid, který je lokalizovaný na dolních končetinách. Dále se mohou vyskytovat bolesti svalů a kloubů. Pro hodnocení průběhu onemocnění je nutné kromě zhodnocení klinického obrazu sledovat trend zánětlivých parametrů, zejména sérového amyloidu A (SAA) (Touitou 2003; Livneh et al. 1997). SAA je jedním z nejsenzitivnějších a nejobektivnějších laboratorních markerů v monitoraci rozvoje komplikací zánětu u hereditárních periodických horeček.

SAA patří do skupiny plazmatických lipoproteinů. V porovnání s CRP bývá často zvýšen i u méně závažných infekcí, včetně virových, a jeho stanovení tak umožňuje lepší rozlišení minimální odpovědi akutní zánětlivé fáze od normálního stavu. Délétrvající zvýšená hladina SAA proteinů vyvolává vznik málo rozpustných AA amyloidových fibril, které se ukládají v mezibuněčném prostoru predisponovaných tkání např. ledvin a podmiňují klinický obraz sekundární amyloidózy. Možnosti ovlivnění sekundární amyloidózy jsou omezené, nicméně potlačením zánětlivé odpovědi organismu dochází k snížení produkce cytokinů vedoucích k aktivaci tvorby SAA v játrech (Grateau 2000; Saatci et al. 1997). Sekundární amyloidóza je nejvíc zastoupená u FMF, častá je u neléčených pacientů (Livneh et al. 1994; Livneh et al. 1992). U CAPS se u jednotlivých syndromů zastoupení liší, u TRAPS je > 10%. Jen raritně se objevuje u MAPS (Pastore et al. 2014; Lachmann et al. 2014; Bilginer et al. 2011).

V průběhu ataky horečky je u FMF kromě SAA zvýšeno i CRP, fibrinogen a další parametry zánětu. Pokud je přítomná proteinurie, jedná se pravděpodobně o alarmující signál renální amyloidózy (Bilginer et al. 2011). Mutace v genu pro pyrin/marenostrin u FMF umožňuje rozlišit genetická analýza.

1.2.3.3 Terapie

V léčbě se uplatňuje kolchicin jako prevence febrilních atak u 60% pacientů a signifikantní redukce počtu atak u dalších 20–30% dětí (Ozkaya a Yalçinkaya 2003; Livneh et al. 1994; Livneh et al. 1992; Zemer et al. 1986). Kolchicin je třeba užívat celoživotně včetně období gravidity a laktace. Většinou pacientů je velmi dobře tolerován. Na velkých souborech pacientů v prevalentních populacích se ukázalo, že špatný terapeutický efekt kolchicinu často souvisí se špatnou compliance pacientů (Ben-Chetrit a Levy 1991). U skutečných nonresponderů je zkoumán terapeutický efekt blokády interleukinu 1 (Anakinra) (Roldan et al. 2008; Moser et al. 2009; ter Haar et al. 2015).

1.2.4 Periodické syndromy asociované s kryopyrinem

1.2.4.1 Patogeneze

Periodické syndromy asociované s kryopyrinem (*CAPS; Cryopyrin Associated Periodic Syndromes*) je skupina autoinflamatorních onemocnění způsobená mutací

v CIAS1 (*Cold Induced Autoinflammatory Syndrome 1*) genu, jinak známého jako NLRP3/ NALP3 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*), nebo-li PYPAF1 gen (*PYRIN-containing Apaf1-like protein 1*) (Boschan et al. 2006; Feldmann et al. 2002). Onemocnění je autozomálně dominantní. Mutace může vznikat spontánně v průběhu embryogeneze nebo je přítomná u jednoho z rodičů. Gen kódující kryopyrin patří do rodiny NLRs (NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain receptors*)-like receptory) (Mathews et al. 2008).

U zdravého jedince je kryopyrin součástí inflamazomu jako makromolekulární jednotky podílející se na zánětlivé kaskádě, složené z několika interagujících molekul. Inflamazom aktivuje přes kaspázu-1 interleukin 1 β a NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). IL-1 β je prozánětlivým cytokinem. NF- κ B je proteinovým komplexem, který řídí transkripci DNA, produkci dalších prozánětlivých cytokinů (např. interleukinu 6) a buněčné přežití (O'Connor et al. 2003). Mutace v CIAS1 genu vede ke strukturálnímu porušení inflamazomu, a tudíž ke kontinuální nadprodukci IL-1 β a ostatních zánětlivých cytokinů. Nadprodukce IL-1 β způsobuje mnohé symptomy typické pro toto onemocnění.

1.2.4.2 Charakteristika

CAPS je soubor klinických jednotek s různou intenzitou závažnosti a podle toho se dělí na Familiární chladovou kopřivku (*FCAS; Familial Cold Autoinflammatory Syndrome*), Muckle-Wellsův syndrom (*MWS; Muckle-Wells Syndrome*) a chronický infantilní neurologický, kožní a kloubní syndrom (*CINCA/NOMID; Chronic Infantile Neurologic Cutaneous Articular Syndrome nebo-li Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease*) (Prieur et al. 1987; de Jesus a Goldbach-Mansky 2013).

U CAPS se může vyskytovat překrývání projevů jednotlivých syndromů.

FCAS je považován za nejméně závažné onemocnění, u kterého zánětlivá aktivace nezpůsobuje permanentní poškození jednotlivých systémů. Projevuje se epizodami horeček 1–2 hodiny po expozici chladem s urtikariálním rašem, artralgiemi a konjunktivitidou. Symptomy trvají minimálně 12–24 hodin. K dalším příznakům patří profuzní pocení, závratě, bolesti hlavy a nauzea (Hoffman et al. 2001).

MWS je charakterizovaný horečkami, urtikariálním rašem a artralgiemi (Dodé et al. 2002). Objevují se také opakované artritidy, konjunktivitidy, nauzea, bolesti břicha. Příznaky trvají 1–3 dny. V průběhu závažnějších atak si pacienti často stěžují na bolesti hlavy. U některých pacientů se rozvine aseptická meningitida. K nejtypičtějším příznakům patří progresivní senzorineurální hluchota (Hawkins et al. 2004).

CINCA/NOMID je nejzávažnější jednotkou v této skupině skupině onemocnění. Je charakteristická kontinuálním zánětem se začátkem horeček a urtikariálním rašem často již v novorozeneckém období (Prieur et al. 1987). Nejvýznamějším příznakem je neurologické postižení s chronickou aseptickou meningitidu, bolestmi hlavy, zvýšeným nitrolebním tlakem, edémem papily a progresivní senzorineurální ztrátou sluchu spojenou s mentálním deficitem, záchvaty, iritabilitou a tranzitorní hemiplegií (de Jesus a Goldbach-Mansky 2013). Další příznaky zahrnují krátkou postavu, hepatosplenomegalii, kloubní deformity (Goldbach-Mansky et al. 2006).

Dlouhodobou komplikací onemocnění může být amyloidóza vedoucí až k renálnímu selhání. Diagnostika je založená na podrobné anamnéze, klinickém obraze a genetické analýze. U většiny pacientů se jako první příznak objeví makulopapulární urtikariformní raš již při narození nebo krátce po něm. V krvi jsou nespecificky zvýšené parametry akutní fáze zánětu, objevuje se i vysoký SAA (de Jesus a Goldbach-Mansky 2013; Pastore et al. 2014; Bilginer et al. 2011).

1.2.4.3 Terapie

Do roku 2005 pro CAPS neexistovala efektivní léčba. Pacienti byli léčeni NSAID (ibuprofen, naproxen), kortikoidy nebo metotrexátem, které potlačovaly příznaky onemocnění.

Od roku 2005 se v léčbě těchto syndromů používá biologická terapie, která je cílená proti interleukinu-1 a je velmi účinná u pacientů s CAPS. V léčbě se uplatňuje anakinra (antagonista receptoru pro IL-1), rilonacept (dimerický fuzní protein fungující jako interleukin-1 inhibitor) a canakinumab (lidská monoklonální protilátka proti interleukinu-1 beta) (Koné-Paut a Piram 2012; Koné-Paut a Galeotti 2014; Gillespie et al. 2010; Lachmann et al. 2009; ter Haar et al. 2015).

Léčba je celoživotní. Důležitá časná diagnóza a zahájení terapie předchází nenávratnému poškození (neurologické, senzoryneurální, atp). V případě pacientů s neurologickou symptomatologií a závažnými bolestmi hlavy se podávají vyšší léčebné dávky. Další terapie zahrnuje fyzioterapii, dlahy, ortézy a další podpůrné pomůcky k léčbě kloubních deformit. U dětí se sluchovým poškozením se používají naslouchadla.

1.3 Periodické horečky s neznámou etiologií

1.3.1 Periodická horečka s aftózní stomatitidou, faryngitidou/tonzilitidou a krční lymfadenopatií

1.3.1.1 Charakteristika

V roce 1987 Marshall a kolektiv poprvé popsali stav charakterizovaný opakovanými horečkami u předškolních dětí (Marshall et al. 1987). Takzvaný Marshallův syndrom byl pak přejmenovaný na PFAPA syndrom (periodická horečka s aftózní stomatitidou, faryngitidou/tonzilitidou a krční lymfadenopatií) (Padeh et al. 1999; Feder 2000).

Klinický obraz je typický: batole nebo předškolní dítě s opakujícími se, často pravidelnými, krátkými (3-6 dní) febrilními epizodami doprovázenými minimálně jedním s následujícími příznaky: tonzilofaryngitida s negativním kultivačním nálezem, krční lymfadenopatie a afty v ústech. Vedlejší příznaky jsou nespecifické, patří mezi ně únava, bolesti hlavy, nauzea, bolesti břicha, zvracení, průjem, bolesti kloubů, atd. (Padeh et al. 1999; Thomas et al. 1999; Feder a Salazar 2010; Hofer et al. 2014; Krol et al. 2013). Postižené děti jsou mezi atakami horeček zcela bez obtíží, s normálním klinickým i laboratorním nálezem a dobře prospívají (Feder a Salazar 2010; Hofer et al. 2014; Krol et al. 2013).

Průběh epizod a kombinace klinických projevů doprovázejících horečku jsou obvykle zcela uniformní a charakteristické pro každého jednotlivého pacienta a v řadě případů jsou rodiče schopni pouhým pozorováním dítěte poměrně spolehlivě odlišit typickou „ataku“ periodické horečky od běžných dětských respiračních infekcí. Pomocným vodítkem může být nepřítomnost dalších projevů typických pro virové infekce dýchacích cest, jako jsou zejména rýma a kašel (Krol et al. 2013).

V průběhu horečnatých epizod je pravidlem přítomnost nespecificky zvýšené zánětlivé aktivity, která obvykle stoupá během prvních dnů neléčené epizody a po

jejím odeznění se spontánně upravuje. Přítomnost laboratorních zánětlivých parametrů nepomůže v odlišení epizody PFAPA syndromu od virové ani bakteriální infekce horních dýchacích cest a proto by samotné zvýšení např. CRP, který může dosahovat vysokých hodnot až nad 200 mg/l, nemělo vést k rozhodnutí o zahájení antibiotické léčby (Feder a Salazar 2010; Hofer et al. 2014; Krol et al. 2013).

Diferenciální diagnostika PFAPA syndromu zahrnuje širokou škálu onemocnění, a to infekcí včetně atypických, defekty imunity, autoimunitní, autoinflamatorní a nádorová onemocnění.

Diagnóza PFAPA syndromu je založena na pečlivé anamnéze a zhodnocení hlavních klinických projevů dle Marshallových kritérií, která byla později upravena Hoferem et al. (Tabulka 1) (Thomas et al. 1999; Feder a Salazar 2010; Hofer et al. 2014; Dang et al. 2011). Použití antibiotik nemá vliv na průběh febrilních atak, které jsou u většiny pacientů typicky zastaveny podáním jednorázové dávky prednisonu (Padeh et al. 1999; Thomas et al. 1999; Berlucchi et al. 2003). Prognóza tohoto syndromu je dobrá a u většiny dětí dochází během několika let k plnému ústupu projevů (Krol et al. 2013).

Incidence PFAPA syndromu bude pravděpodobně vyšší, než naznačují počty pacientů v odborných ambulancích, stoupající trend v posledních letech ukazuje zvyšování povědomí o této klinické jednotce u dětských lékařů (Cocharde et al. 2010). Často jsou však pacienti nesprávně vedeni pod diagnózou chronické tonzilitidy, opakovaně nadměrně užívají antibiotika a následná indikovaná tonzilektomie vede k remisi a nerozpoznání PFAPA syndromu (Krol et al. 2013).

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1) Pravidelně se opakující horečky s nástupem před 5. rokem života2) Symptomy s absencí infekce horních cest dýchacích. Přítomnost minimálně jednoho z následujících příznaků:<ol style="list-style-type: none">a) aftozní stomatitidab) krční lymfadenopatiec) faryngitida3) Vyloučení cyklické neutropenie4) Kompletně asymptomatický interval mezi epizodami horeček5) Normální růst a vývoj dítěte6) Vyloučení monogenních syndromů periodických horeček hlavně u pacientů s gastrointestinálními příznaky a rašem |
|---|

Tabulka 1. Modifikovaná diagnostická kritéria pro PFAPA syndrom (Thomas et al. 1999; Hofer et al. 2014; Dang et al. 2011)

1.3.1.2 Diagnostický algoritmus

1.3.1.2.1 Anamnéza

Osobní a rodinná anamnéza je základem pro stanovení diagnózy. Formální standardizované údaje je možné od rodičů i praktického lékaře získat např. za pomoci cíleného dotazníku, který mohou rodiče dostat ještě před první návštěvou specializované ambulance pro periodické horečky. Dotazník by měl být vyplněn ve spolupráci s praktickým lékařem pro děti a dorost, který dlouhodobě pečuje o daného pacienta a má k dispozici jeho zdravotní dokumentaci. Kromě osobní anamnézy sledující zdravotní stav dítěte od narození je třeba zjistit informace o reakci na očkování, přítomnosti a charakteristice akutních a chronických onemocnění i rodinnou anamnézu zaměřenou na periodické horečky. Podrobně je rozebírána charakteristika jednotlivých atak, věk při první typické febrilní epizodě, trvání horečky a afebrilních mezidobí, pravidelnost výskytu atak, průvodní symptomy, reakce na antipyretika, příp. na kortikoidy, atd. (Krol et al. 2013).

1.3.1.2.2 Vstupní klinické a laboratorní vyšetření

Klinické vyšetření v době horečky i v mezidobí je zaměřeno zejména na vyloučení přítomnosti projevů jiných onemocnění, např. artritidy, kožních projevů, hepatosplenomegalie či generalizované lymfadenopatie, které by měly vyvolat podezření na jiná systémová onemocnění. Důležitý je přesný popis krčních uzlin a tonzil i dutiny ústní. U dětí se syndromem PFAPA lymfadenopatie mimo febrilní ataky nepřetrvává a krční mandle jsou obvykle drobné a zcela klidné, bez jakýchkoli známek chronické tonzilitidy (Krol et al. 2013).

Laboratorní vyšetření by mělo být provedeno alespoň dvakrát, v době ataky horečky (do 48 hodin od nástupu horeček) a v afebrilním mezidobí (minimálně po 14 dnech normální teploty), k ověření plné normalizace zánětlivých parametrů. Krevní testy zahrnují krevní obraz včetně manuálního rozpočtu (vyloučení cyklické neutropenie event. jiných patologií), sedimentaci erytrocytů, C-reaktivní protein (CRP, případně i sérový amyloid A, SAA) a biochemické vyšetření (jaterní a ledvinné funkce). V afebrilním mezidobí je vhodné provést imunologický skrínink (sérové imunoglobuliny včetně IgD, event. autoprotilátky podle klinického nálezu: antinukleární protilátky, skrínink celiakie, Crohnovy nemoci), u očkovaných dětí při podezření na funkční imunodeficit i protilátky proti vakcinačním antigenům. V atace

horečky je třeba doplnit mikrobiologické vyšetření, v případě přítomnosti tonzilofaryngitidy a/nebo krční lymfadenopatie výtěr z krku, eventuelně při chudém klinickém nálezů i kultivaci moči. Sérové koncentrace IgA a IgD a odpad mevalonátu v moči sebrané v začátku horečnaté epizody jsou orientačními vyšetřeními, podle kterých je možno posoudit míru rizika přítomnosti MAPS, který může syndrom PFAPA do určité míry napodobovat (Feder a Salazar 2010; Hofer et al. 2014; Krol et al. 2013). Při trvajícím podezření na monogenní horečku je pak indikováno provedení genetické analýzy (Gattorno et al. 2009), které je dostupné v Ústavu dědičných metabolických poruch a v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

1.3.1.3 Terapeutický algoritmus

Doporučení terapie se odvíjí od závažnosti klinického obrazu a míry zátěže pacienta i rodiny. Záleží tedy v první řadě na frekvenci a trvání febrilních atak. I když podávání antipyretik a/nebo nesteroidních antiflogistik neovlivní významně průběh ani délku febrilních epizod, při jejich krátkém trvání nebo nízké frekvenci někteří rodiče upřednostní pouze tuto symptomatickou léčbu. Nárazové podání prednisonu v jedné dávce 1-2mg/kg tělesné hmotnosti je empirickou léčbou, která vede u většiny pacientů k velmi rychlému ústupu všech projevů PFAPA syndromu (Krol et al. 2013; ter Haar et al. 2012). Praxe napovídá, že podání prednisonu je nejefektivnější co nejdříve v začátku epizody. Pouze výjimečně dojde k návratu teplot do několika dnů od podání. V takovém případě je třeba v první řadě přehodnotit stav dítěte s ohledem na projevy infekce. Obvykle se rozvine obraz infekce dýchacích cest s rýmou a kašlem, případně dorazí výsledek kultivace z krku s nálezem beta-hemolytického streptokoka, který je následně přeléčen antibiotikem (Krol et al. 2013). Jen výjimečně je třeba podání prednisonu zopakovat v jedné epizodě podruhé. Vzhledem k tomu, že není přesně známo, jaká nejmenší kumulativní dávka glukokortikoidů může vyvolat dlouhodobé nežádoucí účinky, doporučuje se prednison nepodávat dlouhodobě častěji než jednou za 3-4 týdny (Krol et al. 2013).

Při časté frekvenci epizod horečky nebo významněji zatěžujícím průběhu atak a nedostatečné odpovědi na podání prednisonu (cca 15 % pacientů) lze doporučit

alternativní léčebné postupy, například podávání kolchicinu nebo cimetidinu (Tasher et al. 2008; Feder 1992).

Tonzilektomie je nepochybně nejúčinnějším terapeutickým zásahem (Burton et al. 2010; Vigo et al. 2011). Odstranění krčních mandlí obvykle vede k plné remisi onemocnění, i když se objevují zprávy o možnosti přechodného návratu febrilních atak řadu měsíců i let po operaci (Peridis et al. 2010b; Garavello et al. 2011; Renko et al. 2007; Licameli et al. 2008).

Za hlavní charakteristiku PFAPA syndromu je považována jeho příznivá prognóza ve smyslu plné úzdravy bez jakýchkoli následků v průběhu měsíců až let od začátku projevů. Proto je dlouhodobé přetrvávání periodické horečky do školního věku dítěte nebo návrat potíží po tonzilektomii jasnou indikací k dalšímu diagnostickému přehodnocení (Krol et al. 2013; Lachmann 2015).

1.3.1.4 Patogeneze

Dosud se nepodařilo objasnit etiologii PFAPA syndromu. I když patří PFAPA syndrom k nejčastějším a klinicky dobře definovaným syndromům periodické horečky u předškolních dětí, neexistuje uniformní patofyziologický koncept pro vysvětlení etiologie nemoci (Lachmann 2015).

Jedna z prvních publikovaných studií zkoumajících patogenezi tohoto syndromu prokázala v periferní krvi u pacientů zvýšenou koncentraci prozánětlivých cytokinů jak vrozené (IL-6, TNF- α a IL-1 β), tak adaptivní imunity (IFN- γ) během febrilních atak, ale i v období mimo ataky v porovnání se zdravými kontrolami a signifikantně nižší hladiny protizánětlivého cytokinu IL-4 ve všech časových bodech u dětí s PFAPA syndromem v porovnání se zdravými kontrolami. Zjištěná elevace prozánětlivých cytokinů dle autorů podporuje teorii o dysregulaci imunitní odpovědi u dětí s PFAPA syndromem s kontinuální prozánětlivou aktivací cytokinů a redukovanou protizánětlivou odpovědí (Stojanov et al. 2006).

V další práci bylo poukázáno na změny v krevním obraze během febrilních a afebrilních period, zatímco hladiny prozánětlivých cytokinů nebyly zvýšeny proti kontrolám, s výjimkou IL-6 (Brown et al. 2010).

V poslední studii zkoumající patogenezi PFAPA syndromu byly pomocí genové

exprese a měření sérových hladin určených cytokinů zjištěny odchylky v některých složkách vrozené imunity jako např. komplement, IL-1 β a G-CSF, které by mohly sloužit jako vhodné biomarkery v atakách horečky u PFAPA syndromu. Poukazují také na důležitou efektorovou funkci aktivovaných CD4⁺ T lymfocytů (Stojanov et al. 2011). Výsledky vyšetření genů kódujících některé molekuly vrozené imunity včetně proteinů komplementu v průběhu ataky horečky společně s klinickým obrazem angíny s krční lymfadenopatií silně podporují teorii infekčního nebo jiného environmentálního spouštěče, který je možná zesílený u imunologicky nevyzrálého jedince v určitém stadiu vývoje (Stojanov et al. 2006; Stojanov et al. 2011; Long 1999).

I přes to, že v klinickém obrazu PFAPA syndromu dominuje zánět krčních mandlí jako hlavní příznak opakovaných atak, dosud neexistují studie zabývající se podrobnou imunologickou analýzou tonzilární tkáně, která pravděpodobně hraje ústřední roli v patogeneze PFAPA syndromu. Poruchu imunitního děje v tonzilární tkáni podporuje i opakovaný negativní kultivační nález ze stěrů z povrchu i mikrobiologických kultur tkáně po tonzilektomii. V histologickém obrazu tonzil byla popsána chronická zánětlivá aktivace, ale její původ se zatím nepodařilo potvrdit (Peridis et al. 2010a), také se zkoumá profil bakterií a virů, které by mohly být možným spouštěčem zánětlivých atak (Lantto et al. 2015).

U pacientů s PFAPA syndromem lze pozorovat vyšší rodinný výskyt opakovaných horeček s angínami v dětství, nejčastěji u rodičů. Objevují se i publikace o výskytu PFAPA syndromu u sourozenců těchto pacientů (Sampaio et al. 2009; Valenzuela et al. 2009). Je otázkou, jestli tento výskyt může být podkladem pro genetickou predispozici, která by přechodně vedla k vyšší vnímavosti k určitému spouštěči imunitního systému u imunologicky nevyzrálého jedince (Sampaio et al. 2009; Valenzuela et al. 2009).

Recentní práce poukazují na multifaktoriální činitele podílející se v patogenezi PFAPA syndromu. Monogenní typ dedičnosti podobný jako u ostatních typů syndromů periodických horeček je nepravděpodobný (Gioia et al. 2015).

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Předpokládá se, že tonzilární tkáň hraje ústřední roli v patogenezi PFAPA syndromu, protože u většiny pacientů dojde po tonzilektomii k remisi onemocnění (Krol et al. 2013; Peridis et al. 2010b; Garavello et al. 2011; Renko et al. 2007; Licameli et al. 2008). Vyšší vnímavost imunitního systému tonzilární tkáně k nespecifickému antigenu pravděpodobně vede k zánětu v oblasti orofaryngu spojeného se systémovou odpovědí organismu, přičemž není jasný podíl složek vrozené a získané imunity v tomto procesu. Příčinou by mohla být alterace v sekreci cytokinů spojená s neadekvátně zmnoženou subpopulací B- nebo T- lymfocytů deregulující imunitní mikrosystém tonzilární tkáně. Předpokládáme, že tento mechanismus patologické imunologické odpovědi je částečně ovlivněný i „vyzrálostí“ imunity, protože většina pacientů se v průběhu školního věku dostane do trvalé remise onemocnění (Stojanov et al. 2011).

Hlavním cílem práce je charakterizovat patofyziologické mechanismy v krvi a tonzilární tkáni u pacientů s PFAPA syndromem.

Cílem práce je přiblížit se odpovědi na tyto otázky:

- 1) Jsou rozdíly v zánětlivých parametrech a v cytokinovém profilu u dětí s PFAPA syndromem v horečce a mezidobí a jaký to má význam v klinické praxi?
- 2) Dokážeme podle těchto parametrů určit aktivitu onemocnění?
- 3) Mohou tyto parametry sloužit k predikci chronického zánětu s dalšími následky?
- 4) Jaký je profil bílé krevní řady u těchto pacientů v krvi a tonzilární tkáni a jakou hraje roli u tohoto onemocnění?
- 5) Které cytokiny jsou patologicky zvýšené/snížené v krvi a tonzilární tkáni a jakým způsobem přispívají k lokálnímu a celkovému zánětu u dětí s PFAPA syndromem?
- 6) Jsou opakované záněty tonzil v atakách horeček spojené s přítomností infekčního agens?
- 7) Jaký je efekt tonzilektomie jako potenciální léčebné metody u pacientů s PFAPA syndromem?

Očekávaným přínosem a možným praktickým dopadem projektu je charakteristika nových biomarkerů pro diagnostiku PFAPA syndromu a stanovení cíleného terapeutického postupu zaměřeného na léčbu nemoci.

3. MATERIÁL A METODIKA

Práce byla rozdělena na 3 části:

3.1 Klinická a epidemiologická část

3.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii

3.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii

3.1 Klinická a epidemiologická část

3.1.1 Pacienti

Do studie byli zahrnutí pacienti se suspektním syndromem periodické horečky, kteří byli v období let 2004-2011 opakovaně vyšetřeni v ambulanci pro periodické horečky, která je součástí revmatologické ambulance na Klinice dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK. Studie byla rozdělena na retrospektivní část, ve které jsme sbírali data u pacientů s PFAPA syndromem sledovaných v letech 2004-2007. Data jsme získali z ambulantních zpráv pacientů, kteří byli dlouhodobě sledováni v naší ambulanci. V retrospektivní části byla kritériem anamnéza opakovaných horečnatých epizod v průběhu předchozích 6 měsíců s vyloučením infekční etiologie, s přítomností dalších symptomů podle modifikovaných diagnostických kritérií (Tabulka 1). Rodiče pacientů, respektive pacienti, u kterých jsme chtěli sledovat data retrospektivně, podepsali informovaný souhlas při jedné z následujících rutinních kontrol na naší ambulanci. Prospektivní data byla získána v letech 2008-2011. V prospektivní části studie byly jedním z kritérií pro diagnózu PFAPA syndromu alespoň 3 horečnaté epizody v průběhu předchozích 6 měsíců. Klinická diagnóza PFAPA syndromu a informovaný souhlas byly hlavními vstupními kritérii. Studie byla schválena Etickou komisí Všeobecné Fakultní Nemocnice v Praze.

3.1.2 Diagnostický algoritmus

Hlavní složkou diagnózy PFAPA syndromu byla osobní a rodinná anamnéza, která byla součástí vytvořeného dotazníku (Příloha 1), který dostávali rodiče před nebo při první návštěvě v ambulanci. Dotazník byl určen k vyplnění rodičům ve spolupráci s praktickým lékařem pro děti a dorost (PLDD). Při první návštěvě pacienta s rodiči

byl dotazník, společně s klinickým vyšetřením, a doplněním další anamnézy aplikován na již existující upravená diagnostická kritéria pro PFAPA syndrom (Tabulka 1) (Thomas et al. 1999; Hofer et al. 2014; Dang et al. 2011).

V rámci první návštěvy byl navržen další vyšetřovací postup na základě předchozích vyšetření dítěte. Nedílnou součástí vyšetřovacího postupu byly základní akutní zánětlivé parametry (FW, CRP, SAA), které byly vyšetřeny alespoň jednou v horečnaté epizodě a v mezidobí horeček. Laboratorní skrínink základních imunodeficiencí a systémových chorob zahrnoval vyšetření krevního obrazu včetně manuálního rozpočtu, sérové imunoglobuliny, protilátky proti vakcinačním antigenům a autoprotiátky (antinukleární a skrínink celiakie). Anti-streptolyzin O a protilátky proti herpetickým virům byly součástí serologického vyšetření. Koncentrace sérových imunoglobulinů IgD a IgA a vyšetření kyseliny mevalonové ve sběru moči v prvních dnech horečnaté epizody sloužily jako skrínink MAPS.

V případě nutnosti byla použita i další laboratorní a paraklinická vyšetření k vyloučení dalších onemocnění. U dětí s podezřením na monogenní periodické horečky byla indikována DNA analýza. V rámci výzkumné části bylo u dětí, u kterých rodiče písemně potvrdili souhlas s odběrem krve navíc, provedeno i vyšetření cytokinového profilu z periferní krve v horečnaté atace a mezidobí horeček při příležitosti standardních odběrů (viz Kapitola 3.2). Po analýze klinických a laboratorních parametrů byla stanovena diagnóza PFAPA syndromu.

3.1.3 Definice klinického obrazu

PFAPA syndrom byl hodnocen jako **aktivní onemocnění**, pokud měl pacient typické rekurentní horečnaté epizody každých 2-6 týdnů po dobu minimálně 6 měsíců. **Plná remise** byla definována jako minimálně 12-ti měsíční interval bez typických horečnatých epizod. **Spontánní remise** byla charakterizována odezněním typických horečnatých epizod a dalších příznaků bez léčby, s výjimkou antipyretik a nesteroidních antirevmatik, a to minimálně 6 po sobě následujících horečnatých atak před dosáhnutím remise. Další typy remise zahrnovaly **remisi po kortikoterapii** a **po tonzilektomii** (Krol et al. 2013).

3.1.4 Terapeutické algoritmy

V okamžiku diagnózy byly rodičům pacientů navrženy následující možnosti terapie (Krol et al. 2013):

- 1) „sledovat a čekat“ (tzv. „watch-and-wait“) přístup: bez specifické terapie, doporučena byla jen antipyretika (paracetamol) nebo NSAID (obvykle ibuprofen) v průběhu horečnatých epizod. Bylo doporučeno vyhnout se antibiotické terapii, pokud nebyla indikace
- 2) prednison v jednorázové dávce 1mg/kg nebo jeho ekvivalent do 24 hodin od nástupu typické horečnaté epizody
- 3) další konzervativní terapeutické možnosti (cimetidin, kolchicin)
- 4) tonzilektomie

3.1.5 Sledování pacientů

Pacienti na konzervativní terapii i pacienti po tonzilektomii byli prospektivně sledováni v pravidelných intervalech každých 3-6 měsíců.

3.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii

V prospektivní části studie byly odběry krve u pacientů na konzervativní terapii prováděny dvakrát: v průběhu typické horečnaté epizody a v mezidobí horeček. Odběr krve v horečnaté epizodě byl proveden do 48 hodin od nástupu horeček ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$) a před podáním kortikoidů. Odběr krve v mezidobí horeček byl proveden nejméně 14 dní po odeznění poslední horečky. Vyšetření moči na mevalonát a jeho metabolity bylo provedeno ze sběru moči za 12-24 hodin v průběhu prvního dne typické horečnaté epizody.

3.2.1 Standardní zánětlivé parametry

Odběr zánětlivých parametrů byl prováděn v rámci odběrů v horečnaté epizodě a v mezidobí. Na vyšetření těchto parametrů (FW, krevní obraz včetně manuálního rozpočtu, CRP a SAA) byly použity rutinní biochemické metody.

3.2.2 Vyšetření mevalonaturie

Mevalonaturie byla kvantifikována použitím kapilární plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie, která je běžně používanou metodou pro stanovení organických kyselin v moči. Byla vyšetřena v laboratoři Ústavu dědičných metabolických poruch VFN v Praze. Cut-off hodnota pro mevalonolakton je 0.01 a pro poměr mevalonát/kreatinin 0.001 mg/g.

3.2.3 Vyšetření sérových hladin cytokinů

Pro vyšetření sérových hladin vybraných cytokinů byl u pacientů odebrán vzorek krve navíc v rámci standardních odběrů v horečnaté episodě a v mezidobí horeček. Centrifugací získané sérum bylo označeno a zamraženo při teplotě -80°C . Rozmražené vzorky byly následně použity k měření hladiny cytokinů pomocí metody Cytometry Bead Array (CBA, FlowCytomix, eBioscience) (Castillo a MacCallum 2012; Grelier et al. 2013).

Tato multiplexová “kuličková” imunoesej umožňuje měření až 20 proteinů v 25 ul vzorku séra současně. Princip eseje je založen na přítomnosti jednotlivých setů kuliček (specific beads) potažených specifickou protilátkou proti danému cytokinu. Pro lepší rozpoznání jednotlivých cytokinů byly vytvořeny skupiny kuliček o dvou velikostech, a to skupina kuliček A a B (4 a 5 μm). V těchto skupinách se jednotlivé sady kuliček mezi sebou rozlišují různou délkou intenzity fluorescence. Kombinace dvou skupin kuliček a různé intenzity fluorescence umožňuje měření až 20 proteinů najednou v jednom fluorescenčním kanálu (FL3/FL4 ev. FL8). Po navázání kuličky se specifickou protilátkou na cílový protein (inkubace 2 hodiny) se přidává biotin s konjugovanou protilátkou, která se naváže na protein. Po 1-hodinové inkubaci se přidává streptavidin-PE, který se naváže na biotin a je detekovatelný v kanálu FL2, což umožňuje kvantifikovat analyt.

Měření analytů proběhlo na průtokovém cytometru (Cyan, Revmatologický Ústav, Praha).

Byly vyšetřeny následující cytokiny:

1) *prozánětlivé*: IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ

2) *protizánětlivé*: IL-12, IL-10, IL-4

3) *další*: IL-2 a cytokinový receptor TNFR1

3.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii

V prospektivní části studie byli pacienti, kteří podstoupili tonzilektomii, zařazeni do samostatné skupiny, u které byla se souhlasem rodičů vyšetřena tonzilární tkáň a krev odebraná při výkonu.

3.3.1 Vyšetření profilu bílé krevní řady pomocí průtokové cytometrie

Z části odebrané tkáně obou tonzil a z periferní krve byly izolovány periferní mononukleární buňky pomocí Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Švédsko) centrifugace. Analýza průtokovou cytometrií byla provedena na cytometru BD FACS LSR II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). U všech vzorků byl vyšetřen profil bílé krevní řady pomocí následujících panelů (Vlková et al. 2010; Dytrich a et al. 2015):

- a) T-buněčný panel: celkem 9 znaků (CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD38, CD57, CD279)
- b) U jednotlivých podtypů T lymfocytů jsme dále měřili expresi PD-1 (programmed cell death protein 1, CD279), což je povrchový receptor exprimovaný na povrchu T lymfocytů a pro-B lymfocytů. Jedná se o imunitní checkpoint, který hraje významnou úlohu v regulaci imunitní odpovědi. PD-1 vede k apoptóze antigen-specifických T-lymfocytů v lymfatických uzlinách a zároveň snižuje apoptózu regulačních T-lymfocytů (supresorové T-lymfocyty).
- c) B-buněčný panel: 8 znaků (CD19, CD27, IgM, CD24, IgD, CD20, CD21, CD38).

Pomocí standardní kombinace monoklonálních protilátek, která je vyšetřena u všech vzorků přicházejících do laboratoře průtokové cytometrie, jsme získali i orientační přehled o stavu monocytární linie. Část z těchto vzorků byla dále stimulována monoklonální protilátkou anti-CD3 a lipopolysacharidem. Supernatanty těchto stimulovaných vzorků byly zamrazeny k analýze cytokinového spektra.

Data získaná pomocí průtokové cytometrie byla analyzována pomocí software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA).

Levé a pravé tonzily byli analyzovány samostatně.

3.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve

Po stimulaci anti-CD3 monoklonální protilátkou byly supernatanty zamraženy až do následného měření cytokinů pomocí metody CBA. Solubilní cytokiny byly měřeny v tonzilárních supernatantech (nestimulované vs. stimulované) a supernatantech z periferní krve (nestimulované vs. stimulované). Spektrum cytokinů zahrnovalo prozánětlivé cytokiny jako IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , protizánětlivých cytokinů IL-12, IL-10, IL-4, dále IL-2 a cytokinový receptor TNFR1. Tyto proteiny byly měřeny pomocí stejné metody jako cytokiny v sérech, a to CBA.

3.3.3 Histologické vyšetření tonzil

Po každé tonzilektomii byla část tonzilární tkáně odeslána k rutinnímu histologickému vyšetření (barvení hematoxylinem a eozinem) do Ústavu patologie a molekulární medicíny 2.LF UK a FN Motol.

3.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil

Část tonzilární tkáně po důkladném rozmělnění byla vyšetřena rutinním mikrobiologickým vyšetřením k průkazu běžně kultivovatelných bakterií.

3.3.5 Vyšetření DNA vybraných bakterií a virů

Část tonzilární tkáně byla zamražena k pozdějšímu vyšetření DNA vybraných bakterií včetně obtížně kultivovatelných (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Candida* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Haemophilus influenzae*) pomocí metody PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis – sekvenace DNA fragmentů bakterií, skupiny bakterií testované specifickým PCR primerem, posléze kvantifikace bakterií pomocí RT-PCR a FISH) (Fischer a Lerman 1983; Larsen et al. 1993; Muyzer et al. 1993) a virů (EBV, CMV, HHV-6 a Adenoviry) pomocí PCR (Kimura et al. 1999; Tanaka et al. 2000; Gautheret-Dejean et al. 2002; Claas et al. 2005). Virové nálože byly normalizovány ke kvantifikovanému albuminovému genu (Pongers-Willemsse et al. 1998) jak bylo popsáno dříve (Hubacek et al. 2009).

3.4 Kontrolní skupiny

Veškeré výsledky u pacientů s PFAPA syndromem byly pomocí standardních statistických metod korelovány s výsledky kontrolní skupiny.

V projektu byly celkem 3 kontrolní skupiny:

- 1) Kontrolní skupina (age- a sex-matched) pacientů s febriliemi s jasně prokázanou bakteriální infekcí (např. pneumonie, sinusitida, otitida, pyelonefritida, streptokoková angína) k porovnání s dětmi s PFAPA syndromem na konzervativní terapii.
- 2) Kontrolní skupina (age- a sex-matched) pacientů s hypertrofií tonzil (syndrom obstruktivní spánkové apnoe, OSAS) pro pacienty s PFAPA syndromem indikovaných k tonzilektomii.
- 3) Kontrolní skupina (age- a sex-matched) pacientů s chronickou streptokokovou tonzilitidou pro pacienty s PFAPA syndromem indikované k tonzilektomii.

3.5 Statistická analýza

Deskriptivní statistika pro charakteristiku populace byla vyjádřena mediánem (rozmezí). Neparametrický Mann-Whitney test byl použit k porovnání mezi pacienty a kontrolami, pro párové měření byl použitý Wilcoxon test. P-hodnoty < 0.05 byly považovány za statisticky signifikantní.

4. VÝSLEDKY

4.1 Klinická a epidemiologická část

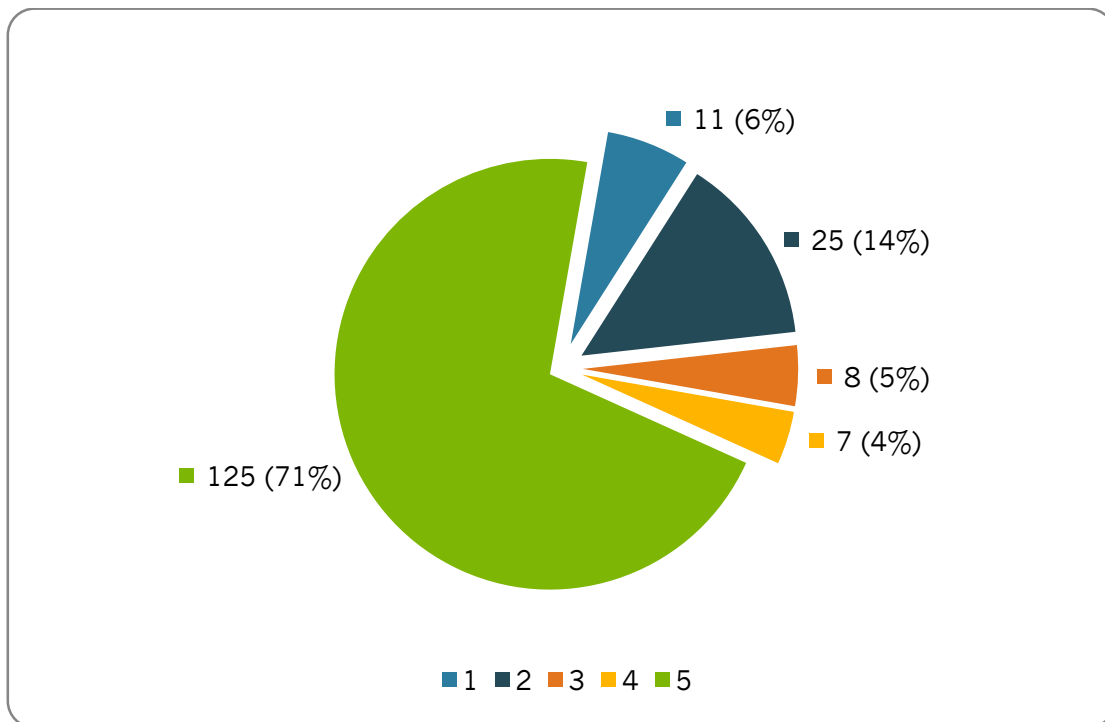
4.1.1 Pacienti se syndromem periodické horečky

Identifikovali jsme celkem 176 dětí se syndromem periodické horečky (Obrázek 1). Třicetšest pacientů (21%) mělo příznaky suspektní z monogenního typu periodické horečky.

Typické příznaky pro jednotlivé typy monogenních horeček:

- a) MAPS – nástup horeček před 1. rokem života, horečnaté reakce po očkováních a/nebo infekcích, zvýšené sérové hladiny IgD a/nebo IgA a mevalonátu v moči
- b) TRAPS – protrahovaná horečka (> 1 týden) a oční symptomy
- c) CAPS – nástup v novorozeneckém věku a vyrážka
- d) FMF – krátké horečnaté ataky (1-2 dny) s bolestí na hrudi nebo břicha a/nebo akutní artritida.

U všech 36 pacientů byla provedena genetická analýza, která byla pozitivní u 11 dětí, a to v MVK genu u 6 pacientů, v TNFR genu u 3 pacientů, u NLRP3 u 1 a MEFV u 1 pacienta. Všichni pacienti s MKD mutací měli zvýšenou mevalonaturii a vyšší koncentrace IgD a IgA v séru. Pacienti s diagnózou TRAPS měli periorbitální edém spojený s horečnatou atakou ve všech třech případech. U zbylých 25 pacientů nebyly nalezeny známé mutace. U 8 pacientů s klinickou charakteristikou PFAPA syndromu byla zaznamenána snížená koncentrace sérového IgA, tudíž možnost infekční příčiny nemohla být vyloučena. U dalších 7 pacientů detailní analýza jejich osobní anamnézy odpovídala infekční příčině horečnatých atak více než atakám periodických horeček. Všechny 36+8+7 pacientů bylo vyloučeno z další analýzy.



Obrázek 1. Distribuce pacientů se syndromem periodické horečky v naší kohortě: n (%):

- 1) pacienti s potvrzenou mutací pro monogenní syndrom periodické horečky (MAPS, TRAPS, FMF a CINCA) – 11 (6%)
- 2) pacienti s negativním výsledkem v DNA analýze pro známé mutace ve skupině monogenních periodických horeček – 25 (14%)
- 3) pacienti se sníženou hladinou IgA v séru a možným podílem infekčních příčin v některých epizodách horeček – 8 (5%)
- 4) pacienti s rekurentními infekcemi – 7 (4%)
- 5) pacienti s PFAPA syndromem – 125 (71%)

4.1.2 Klinická charakteristika dětí s PFAPA syndromem

Všechny děti s diagnostikovaným PFAPA syndromem (n=125; 63 chlapců) jsou kavkazské populace českého původu. 59/125 pacientů (47%) mělo pozitivní rodinnou anamnézu recidivujících horečnatých atak a/nebo tonzilitidy v předškolním věku. Největší část této skupiny tvořil hlavně jeden z rodičů (49/59), u zbývajících 10 pacientů měl pozitivní rodinnou anamnézu sourozenec nebo jeden z prarodičů. U 11 rodičů byla provedena tonzilektomie v dětství, která vedla ke kompletnímu odeznění symptomů, 38 rodičů uvedlo spontánní remisi symptomů v průběhu dětství.

U 31 pacientů byla diagnóza stanovena na základě retrospektivního sbírání dat, 94 dětí bylo zařazeno prospektivně. Z prospektivní části kohorty bylo 70% pacientů nejméně jedenkrát v období horečnaté ataky a v mezidobí na klinické kontrole v naší ambulanci. Ostatní pacienti byli na kontrole v mezidobí a přinesli s sebou výsledky klinického a laboratorního vyšetření v horečnaté atace od svého praktického lékaře.

Klinické nálezy a příznaky byly systematicky zaznamenávány do databáze v průběhu dalších návštěv a to společně s vývojovými daty jako důležitá monitorace zdravotního stavu pacienta v mezidobí. Frekvence návštěv byla vždy určena podle délky a intenzity horečnatých atak. Běžné kontroly pacientů v prvním roce sledování byly v průměru po 3 – 6 měsících a poté v prodlužujících se intervalech 6 – 12 měsíců až do odeznění nemoci podle kritérií pro plnou remisi.

Medián věku první manifestace onemocnění byl 23 měsíců s mediánem intervalu mezi atakami 4 týdny a trváním horečnaté ataky 3.5 dne (Tabulka 2).

Pravidelnost horečnatých atak jsme zaznamenali u cca 58% pacientů. Medián věku diagnózy byl 27 měsíců (rozmezí 18 – 58), interval mezi nástupem onemocnění a diagnózou byl v rozmezí 6 až 64 měsíců (medián 20).

	Medián	Rozmezí
Věk první manifestace (měsíce)	23	6 – 60
Trvání horeček (dny)	3,5	3 – 6
Mezidobí (týdny)	4	2 – 6
Maximální horečka (°C)	39,5	38.5 – 41
CRP (mg/l)	73	10 – 359
FW (mm/h)	35	7 – 95
Leukocytóza ($\times 10^9/L$)	13	3.8 – 24

Tabulka 2 Klinické a laboratorní charakteristiky u 125 pacientů s PFAPA syndromem

Distribuce hlavních klinických příznaků a jejich frekvence v kohortě je ukázána v Obrázku 2a.

Faryngitida byla téměř uniformně zastoupena a byla prakticky přítomná ve všech typických epizodách. U většiny případů byly nálezy v krku popsány jako “exudativní” tonzilofaryngitida. Krční lymfadenopatie popisovaná jako zvětšení horních předních krčních lymfatických uzlin ≥ 1 cm v průměru a/nebo signifikantní zvětšení oproti předchozímu vyšetření byla druhým častým příznakem (Obrázek 2a). U menšího počtu pacientů (9%), u kterých jsme faryngitidu nepozorovali, byla přítomná krční

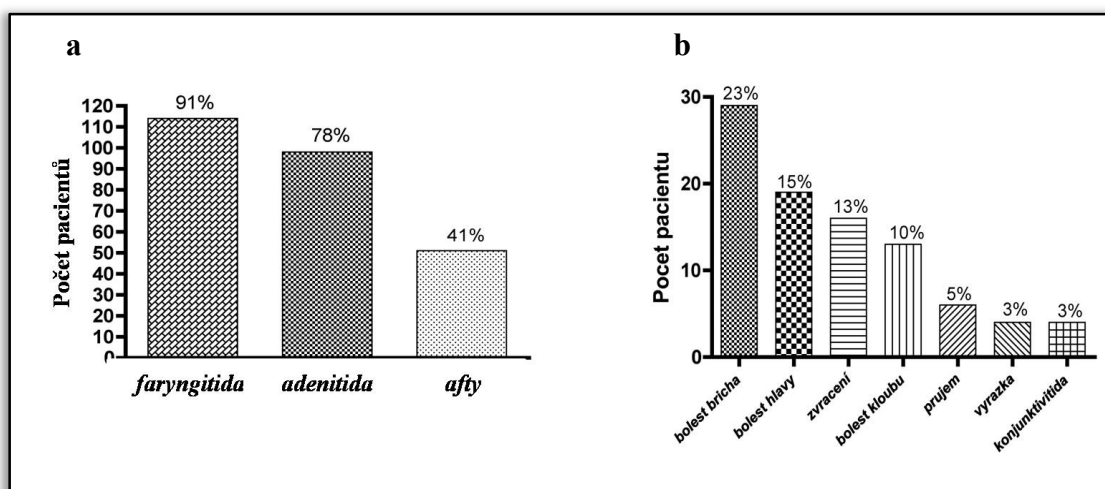
lymfadenopatie nebo aftozní stomatitida nebo kombinace obou těchto příznaků s dalšími příznaky jako např. změny nálady, únava nebo snížená chuť k jídlu.

Přítomnost dalších vedlejších příznaků je znázorněná v Obrázku 2b. V mezidobí měli všichni pacienti normální klinický nález včetně fyziologického vzhledu tonzil bez známek chronické tonzilitidy. V průběhu sledování našich pacientů byl zaznamenán normální vývoj a růst dětí.

Většina rodičů byla schopna jasně rozlišovat epizody PFAPA syndromu od běžných respiračních infekcí. Hlavními rozlišovacími znaky pro ostatní příčiny horečnatých epizod byla nižší teplota než u PFAPA syndromu, přítomnost rýmy a kašle, podobné respirační příznaky u jiných členů rodiny (nejčastěji u sourozence), bolest ucha, odlišná odpověď na terapii v porovnání s “typickou” epizodou.

Kolem 78% rodičů uvádělo celkově výborný stav jejich dítěte v průběhu horečnatých epizod u PFAPA syndromu, na rozdíl od klasických příznaků respiračního infektu, kde bylo dítě více alterované.

Někteří rodiče (34%) uváděli prodromy, které pravidelně předcházely každou horečnatou ataku PFAPA syndromu. Patřily k nim změny nálady, únava, zvýšená salivace, snížená chuť k jídlu nebo bolesti kloubů. PFAPA epizody měly u jednotlivých pacientů tendenci k udržení jedinečných klinických charakteristik v průběhu ataky.



Obrázek 2. Zastoupení (a) hlavních a (b) vedlejších klinických příznaků u 125 pacientů s PFAPA syndromem.

4.1.3 Terapie

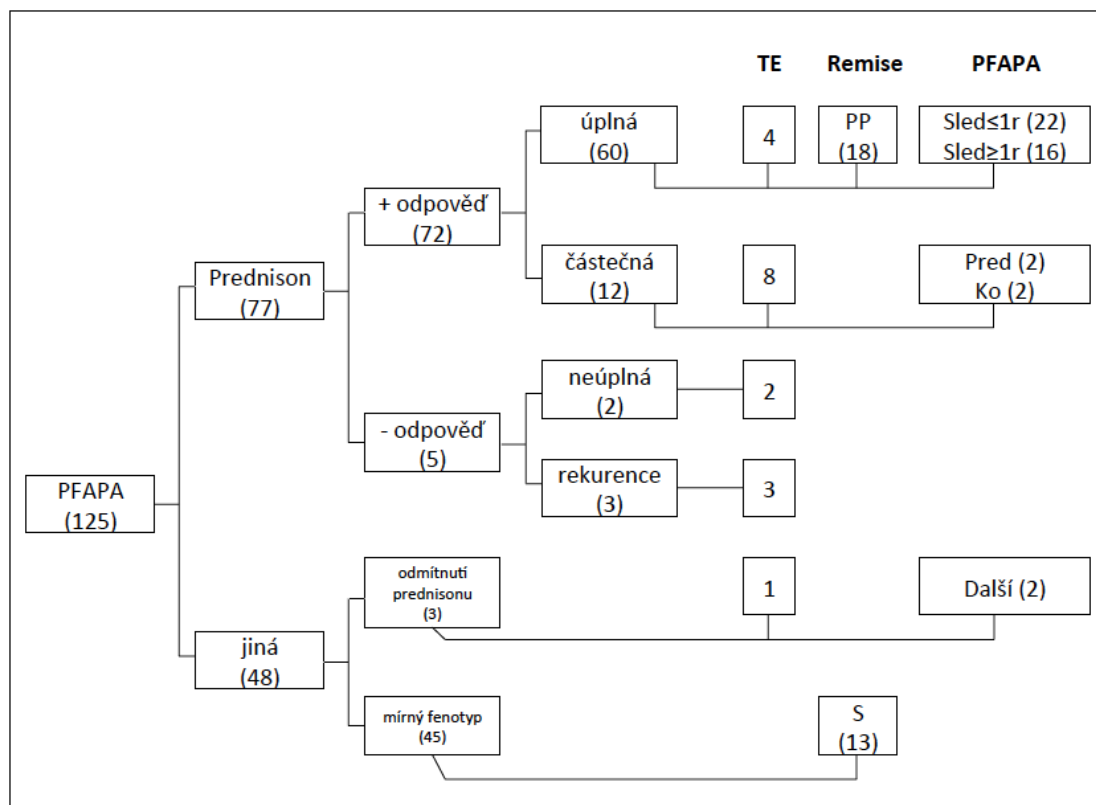
U 77 ze 125 pacientů (62%) byl podáván epizodicky prednison v jednorázové dávce 0.8 – 1.2 mg/kg vždy v začátku typické horečnaté epizody. Z těchto pacientů mělo příznivou odpověď na léčbu 72 dětí (94%). “Plná” odpověď byla zaznamenána u 60 (83%) dětí, 12 pacientů mělo jen “částečnou” odpověď. Druhou dávku prednisonu dostalo zbylých 5 pacientů. Přibližně u 10% pacientů léčených prednisonem pozorovali rodiče změny nálady nebo únavu trvající 2-3 dny po podání prednisonu, v té době již bez horečky a slizničních projevů. Zkracování mezidobí (na méně než 2 týdny) po podání prednisonu se vyskytlo u 11 dětí (14%) a vedlo k přerušení této terapie u 3 z nich. U 2 pacientů byla zahájena terapie kolchicinem (0.5 mg/den), která redukovala závažnost a frekvenci horečnatých epizod, ale nebyla dosažena remise onemocnění. Z 5 dětí, které neodpovídaly na prednison, 2 nedosáhly plného ústupu příznaků a u dalších 3 dětí po počátečním ústupu příznaků typických pro PFAPA syndrom se příznaky znovu objevily do 1 týdne od podání prednisonu. V těchto případech bylo vždy provedeno další klinické přehodnocení stavu k vyloučení možné infekční příčiny, které bylo negativní (Tabulka 3).

Žádný z pacientů nedostával cimetidin.

Rodiče 48/125 pacientů (38%) žádali jiný typ léčby. U většiny byl zvolen přístup “watch – and – wait” s epizodickým podáváním antipyretické terapie, a to na základě domluvy rodiče s lékařem založené na mírném průběhu onemocnění (krátké horečnaté epizody trvající do 3 dnů, mezidobí > 6 týdnů). Odpověď na antipyretika byla krátkodobá a vyžadující opakované podávání v průběhu horečnatých atak. Přirozený průběh epizod zůstal nezměněný. Rodiče 3 pacientů odmítli terapii prednisonem.

U celkem 18 dětí (14%) byla provedena tonzilektomie (medián 34 měsíců od diagnózy; rozmezí 5 – 48). U 8 z dětí byl celkový průběh, trvání a/nebo frekvence epizod natolik obtížně zvladatelný, že vedl k rozhodnutí rodičů podstoupit výkon. U 4 pacientů byl operační zákrok zvolený z důvodu zkracování mezidobí po podávání prednisonu. Pět pacientů patřilo k těm, kteří neodpovídali na terapii prednisonem. Jedna rodina si vybrala tonzilektomii jako terapii první volby.

U všech 18 pacientů vedla tonzilektomie k vymizení příznaků ihned po operaci. Všechny 18 pacientů dosáhlo plné remise podle kritérií. Patnáct pacientů (83%) dosáhlo plné remise podle kritérií, 3 pacienti bez příznaků byli sledováni méně než 1 rok po zákroku. U 2 případů se objevily rekurentní horečky podobné PFAPA syndromu po 12 a 14 měsících od tonzilektomie. První pacient měl celkem 8 horečnatých epizod po tonzilektomii, které se odlišovaly od epizod před tonzilektomií přítomností gastrointestinálních příznaků. Původně pacient, který neodpovídal před tonzilektomií na prednison, měl v období po tonzilektomii úplnou odpověď na prednison. U druhého pacienta se objevily epizody podobné PFAPA syndromu s nižší frekvencí než před tonzilektomií, které byly úspěšně zvládnuty antipyretiky a občasným podáním prednisonu. U těchto pacientů bylo při kontrole v 21. a 10. měsíci po začátku relapsu zaznamenáno prodlužování afebrilního mezidobí (5 a 6 měsíců).



Tabulka 3. Přehled distribuce pacientů podle terapeutického efektu a průběhu onemocnění.

Pred (Prednison), Ko (Kolchicin), Jiná (Jiná terapie), + odpověď (plná odpověď na terapii), - odpověď (nekompletní odpověď –/ zkrácení intervalu mezi horečkami), Pred odm (odmítnutí Prednisonu), Mírný (Mírný fenotyp), Částečná (Částečná odpověď), Nekomp (nekompletní odpověď- nedosáhli plný ústup příznaků), Rekur (zkrácení interval mezi horečkami), PP (remise po Prednisonu), TE (remise po tonzilektomii), S (Spontánní remise), Sled \geq 1r (Sledování více než 1 rok), Sled \leq 1r (Sledování méně než jeden rok).

4.1.4 Dlouhodobý průběh

Medián sledování pacientů byl 25 měsíců (2 – 60). Medián trvání nemoci v čase poslední návštěvy byl 8 měsíců (6 – 57). Devadesátčtyři dětí (75%) bylo u nás sledováno déle než 12 měsíců.

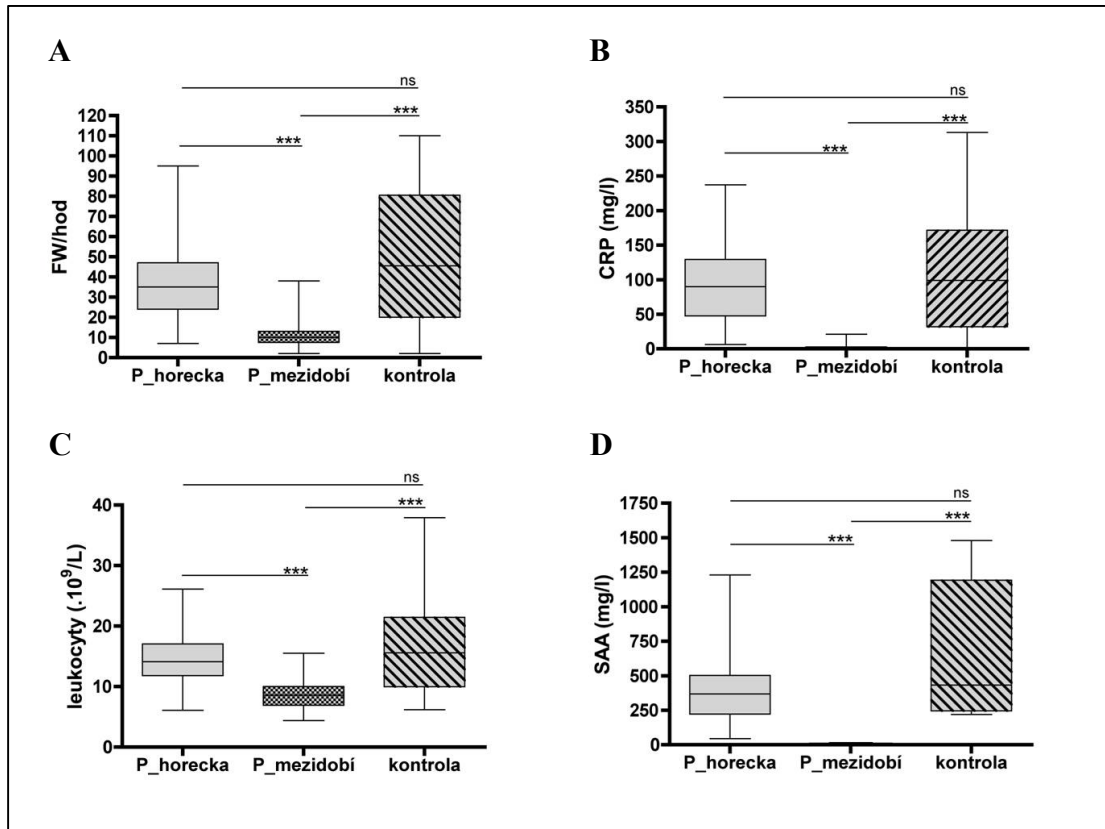
Z těchto pacientů 46 dětí (49%) dosáhlo plné remise. Remise byla spontánní u 13 (28%), po prednisonu u 18 (39%) a po tonzilektomii u 15 (33%) pacientů. Medián trvání nemoci do odeznění příznaků PFAPA syndromu byl 17 měsíců (8 – 58) u celé skupiny dětí, která dosáhla remisi a významně se nelišila mezi jednotlivými skupinami pacientů s remisí. Klinické charakteristiky pacientů se spontánní remisí se nelišily od zbylé části kohorty.

Zbýlých 48 pacientů mělo nadále více než rok trvající rekurentní epizody PFAPA syndromu. Jejich medián trvání nemoci byl 45 měsíců (18 – 72) od začátku onemocnění do poslední kontroly. V průběhu sledování se u žádného z pacientů neobjevilo jiné onemocnění, které by vysvětlovalo jejich příznaky.

4.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii

4.2.1 Standardní zánětlivé parametry

Všech 125 pacientů s PFAPA syndromem mělo v průběhu typické horečnaté epizody zvýšené nespecifické zánětlivé parametry (FW, CRP, leukocytóza), u kterých došlo v čase k normalizaci. Obrázky 3A,B,C,D ukazují jejich pokles k normálním hodnotám v mezidobí horeček u všech pacientů. Tyto zánětlivé parametry byly porovnány s kontrolní skupinou dětí s febrilním infektem a nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi pacienty s PFAPA syndromem v horečnaté epizodě a kontrolními pacienty s febrilním infektem v žádném z vybraných zánětlivých parametrů. Obrázek 3D ukazuje pokles SAA u 35 pacientů, u nichž jsme prospektivně vyšetřili párové vzorky krve v horečnaté atace a v mezidobí horeček.



Obrázek 3: Zánětlivé parametry u 125 pacientů s PFAPA syndromem v horečnaté epizodě a v mezidobí porovnané s febrilními kontrolami. A) FW u pacientů s PFAPA v atace horečky a v mezidobí a kontrolní skupiny. B) CRP u pacientů s PFAPA v atace horečky a v mezidobí a kontrolní skupiny. C) absolutní počet leukocytů u pacientů s PFAPA v atace horečky a v mezidobí a kontrolní skupiny. D) SAA u pacientů s PFAPA v atace horečky a v mezidobí a kontrolní skupiny.

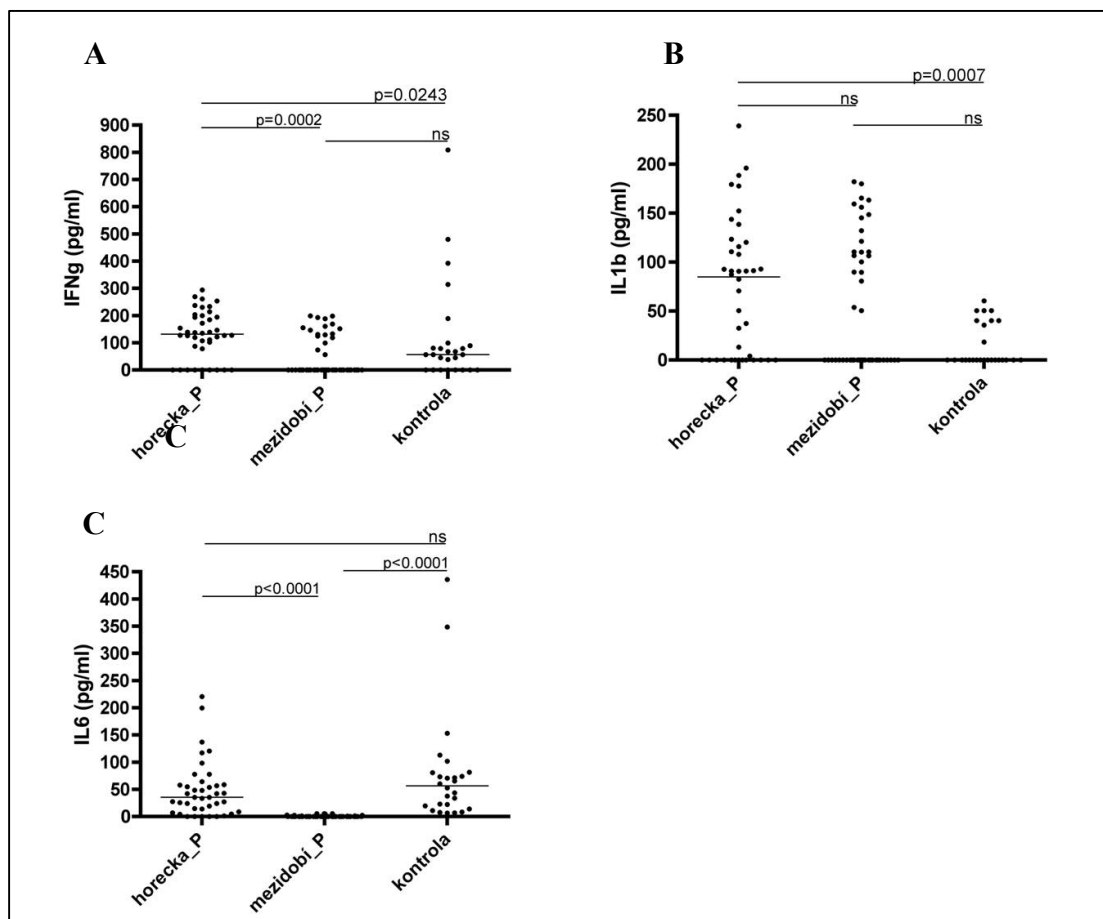
4.2.2 Vyšetření mevalonaturie

Profil organických kyselin včetně mevalonátu a mevalonolaktonu byl u všech pacientů s PFAPA syndromem ve fyziologickém rozmezí.

4.2.3 Vyšetření sérových hladin cytokinů

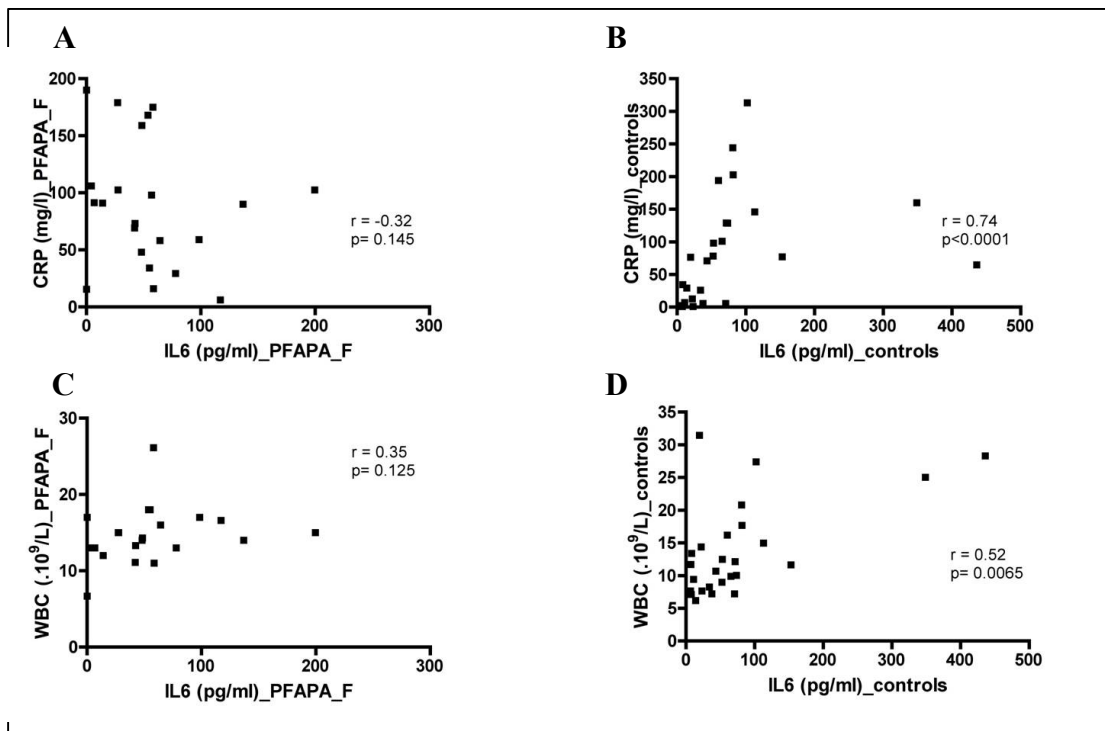
Sérové hladiny vybraných cytokinů byly změřeny u 67 pacientů, z toho u 23 pacientů párově v horečnaté epizodě a v mezidobí horeček. Tyto parametry byly také sledovány u 27 febrilních kontrol. Ve vyšetřovaných cytokinech jsme našli signifikantní rozdíly mezi koncentrací IFN- γ u pacientů s PFAPA syndromem v horečce a u febrilních kontrol ($p=0.0243$), se signifikantním poklesem hladiny IFN- γ v mezidobí ($p=0.0002$) (Obrázek 4A). Hladina cytokinu IL-1 β byla významně vyšší u pacientů v horečnaté epizodě v porovnání s febrilními kontrolami ($p=0.0007$) (Obrázek 4B). V mezidobí horeček u pacientů s PFAPA však nedošlo k signifikantnímu poklesu hladin IL-1 β , a to i přes to, že došlo k normalizaci základních

zánětlivých parametrů. Hladiny IL-6 se nelišily v horečnaté epizodě u pacientů s PFAPA a febrilních kontrol, ale zaznamenali jsme signifikantní pokles IL-6 k nulovým nebo téměř nulovým hodnotám v mezidobí horeček u PFAPA pacientů ($p < 0.0001$) (Obrázek 4C). U ostatních měřených cytokinů nebyly zjištěny významné rozdíly v porovnávaných sérech.



Obrázek 4 Sérové hladiny cytokinů u celkového počtu 67 pacientů s PFAPA v atace horečky, mezidobí a febrilních kontrol. A) IFN- γ , B) IL-1 β a C) IL-6.

Při korelaci standardních zánětlivých parametrů (FW, CRP a absolutní počet leukocytů) se sérovými hladinami cytokinů nebyla nalezena signifikantní korelace u pacientů s PFAPA (Obrázek 5A a 5B). U febrilních kontrol jsme našli signifikantní korelaci mezi IL-6 a leukocytózou (Obrázek 5C), respektive CRP (Obrázek 5D).



Obrázek 5 Korelace mezi standardními zánětlivými parametry (CRP a WBC) a IL-6 u pacientů s PFAPA a febrilních kontrol. Grafy A a B ukazují nesignifikantní korelace mezi IL-6 a CRP/WBC u PFAPA pacientů (n=23). Grafy C a D ukazují signifikantní korelaci mezi IL-6 a CRP/WBC febrilních kontrol.

4.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii

4.3.1 Imunofenotypizace lymfocytů z periferní krve a tonzil

Měření pomocí průtokové cytometrie bylo provedeno u 10 pacientů s PFAPA syndromem a u 10 kontrol (děti se syndromem obstrukční spánkové apnoe, OSAS). U všech pacientů byl k dispozici párový vzorek periferní krve a tonzilární tkáně. Výsledky z levých a pravých tonzil v rámci jednoho pacienta/kontroly se vzájemně nelišily.

4.3.1.1 T lymfocytární subpopulace

Měření ukázalo signifikantní rozdíl v zastoupení CD3^{pos} T lymfocytů v periferní krvi PFAPA pacientů (medián 66% u PFAPA vs 56% u kontrol, p=0.01, Obrázek 6A). Tento trend byl přítomný i u buněk z tonzil, ale nedosáhl statistického významu (medián 36% u PFAPA vs 31% u kontrol, p=0.08, Obrázek 6A).

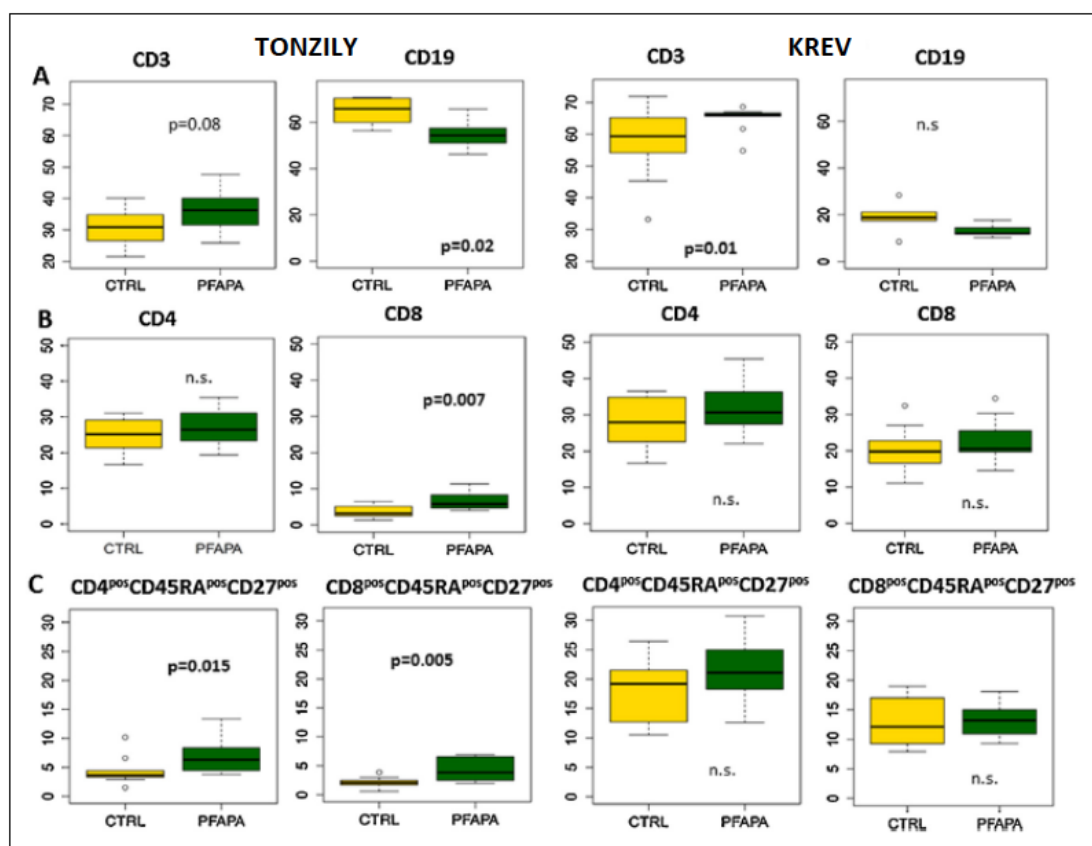
Tonzily PFAPA pacientů se lišily od kontrol v proporcí hlavních T lymfocytárních subpopulací (Obrázek 6B). PFAPA tonzily obsahovaly více CD8^{pos} cytotoxických T

lymfocytů (medián 6% všech lymfocytů u PFAPA; 3% u kontrol; $p=0.007$). Poměr CD4/CD8 byl signifikantně nižší u PFAPA pacientů (medián 4.7 u PFAPA; medián 7.2 u kontrol; $p=0.02$).

Proporce CD4/CD8-dvojitě negativních CD3^{high} buněk, které odpovídají zejména gamma/delta T lymfocytům, byla mírně zvýšená u PFAPA tonzil (rozmezí 0.6-2.1%, medián 1.2% CD3^{pos} buněk u PFAPA vs 0.3-1.5%, medián 0.56% u kontrol, $p=0.01$).

Naivní CD45RA^{pos}CD27^{pos} CD4^{pos} T lymfocyty byly signifikantně zvýšeny u PFAPA tonzil (median 6% všech lymfocytů u PFAPA; medián 4% u kontrol; $p=0.01$, Obrázek 6B). U paměťových CD45RA^{neg} CD4^{pos} T lymfocytů jsme nenalezli signifikantní rozdíl u pacientů s PFAPA proti kontrolám.

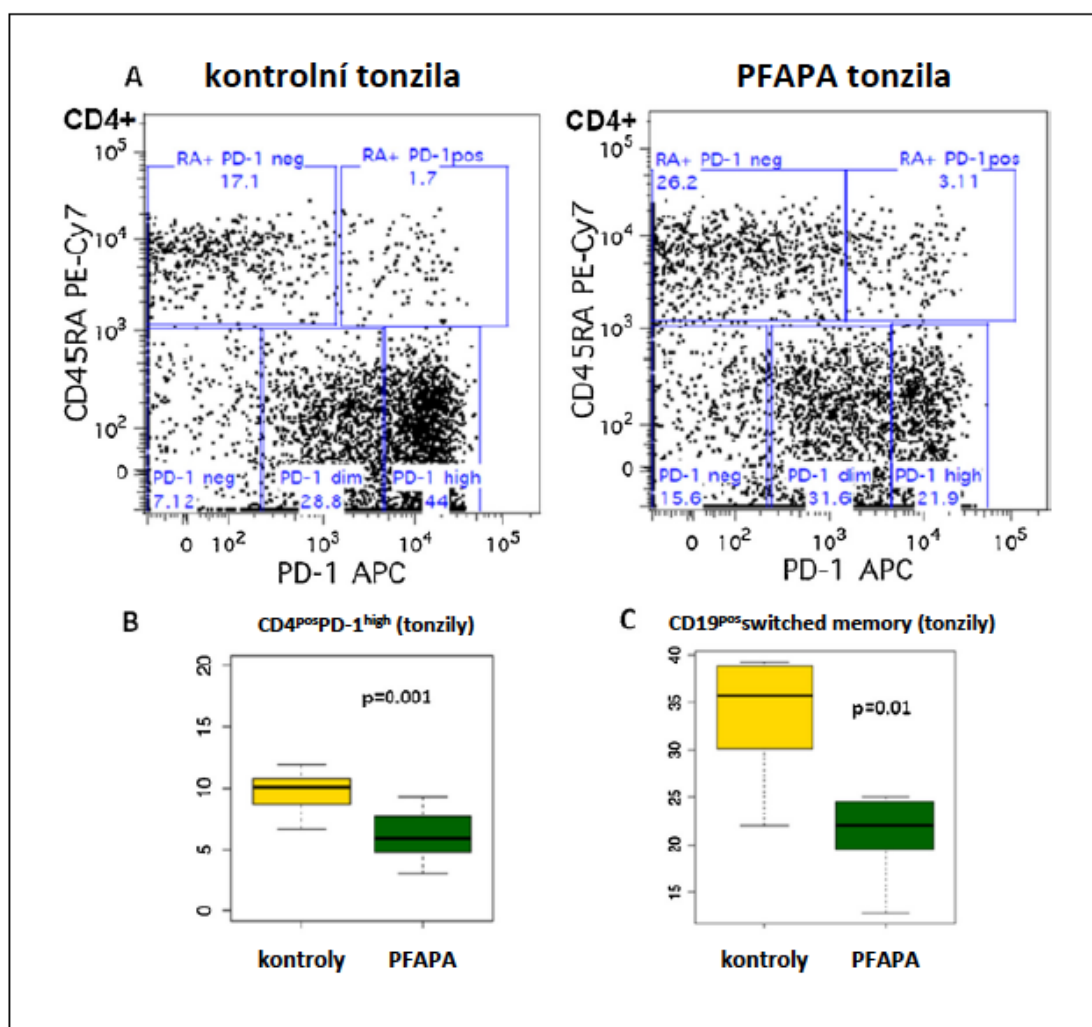
Procento naivních CD8^{pos} CD45RA^{pos}CD27^{pos} buněk bylo signifikantně zvýšené u PFAPA tonzil (medián 4% všech lymfocytů u PFAPA; medián 2% u kontrol; $p=0.005$, Obrázek 6C).



Obrázek 6. Subpopulace lymfocytů u PFAPA pacientů a kontrol v tonzích a periferní krvi. Procentuální zastoupení jednotlivých podtypů ze všech lymfocytů je ukázáno ve všech grafech. Grafy ukazují CD19^{pos} B lymfocyty a CD3^{pos} T lymfocyty (A), CD4^{pos} hepery a CD8^{pos} cytotoxické T

lymfocyty (B), naivní helper $CD4^{pos}CD45RA^{pos}CD27^{pos}$ T lymfocyty a naivní cytotoxické $CD8^{pos}CD45RA^{pos}CD27^{pos}$ T lymfocyty (C).

Měření ukázalo heterogenní expresi PD-1 (programmed death 1 protein) molekuly na $CD4^{pos}$ T lymfocytech (Obrázek 7A). Exprese PD-1 byla nejvyšší (PD-1^{high}) u paměťových $CD45RA^{neg}CD4^{pos}$ T lymfocytů. Procento $CD4^{pos}PD-1^{high}CD45RA^{neg}$ buněk bylo signifikantně nižší u PFAPA tonzil než u kontrol (medián 6% všech lymfocytů u PFAPA vs medián 10% u kontrol; $p=0.002$, Obrázek 7B).

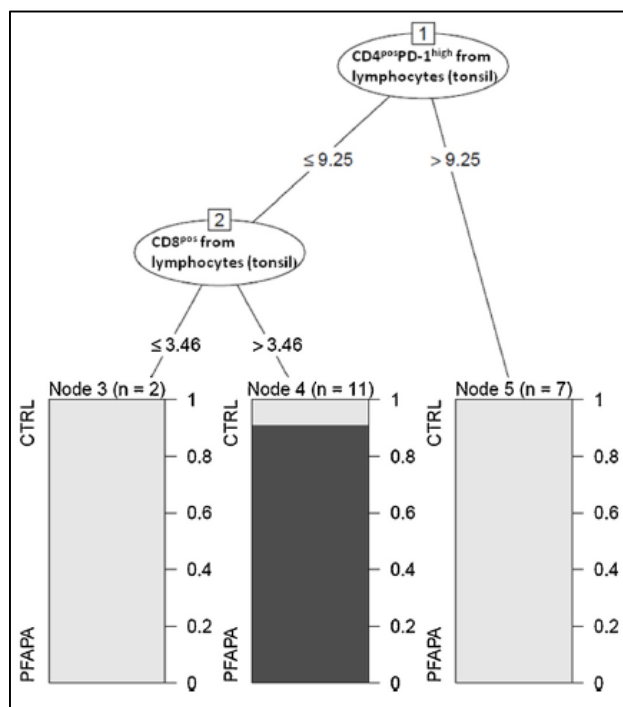


Obrázek 7. Exprese PD1 u PFAPA pacientů vs kontrol v tonzilách. (A) Vyhodnocení výsledků průtokové cytometrie u $CD4^{pos}$ buněk v tonzilách pacientů s PFAPA a kontrol. (B) Procentuální zastoupení $CD4^{pos}PD1^{high}$ T lymfocytů z celkového počtu lymfocytů. (C) Procentuální zastoupení switched paměťových B lymfocytů z celkového počtu lymfocytů.

Všechny pozorované rozdíly v T-lymfocytárních subpopulacích mezi PFAPA a kontrolami byly detekovatelné pouze v tonzilách. Vzorky periferní krve odebrané v den tonzilektomie neukázaly žádné signifikantní rozdíly v T-lymfocytárních

subpopulacích. Absolutní počty T lymfocytů v periferní krvi byly u kontrol podobné jako u PFAPA pacientů.

Protože jsme chtěli zjistit, zda existují T-lymfocytární subpopulace, které definují “PFAPA fenotyp”, vytvořili jsme nesupervidovaný klasifikační strom, který byl založen na informacích o všech změřených T-lymfocytárních subpopulacích v krvi a tonsilách. Nejlepším prediktorem “PFAPA fenotypu” bylo procentuální zastoupení CD4^{pos}PD-1^{high} buněk ze všech lymfocytů v kombinaci s procentuálním zastoupením CD8^{pos} buněk ze všech lymfocytů v tonsilách. Tento prediktor byl otestován následujícím algoritmem: CD4^{pos}PD-1^{high} T buňky z tonsilárních lymfocytů <9.25% a CD8^{pos} T buňky z tonsilárních lymfocytů >3.46% (Obrázek 8), který správně zařadil všechny pacienty s PFAPA/kontroly s výjimkou jednoho pacienta v naší limitované kohortě.



Obrázek 8. Klasifikační strom založený na informaci ze všech změřených T-lymfocytárních subpopulací.

4.3.1.2 B lymfocytární subpopulace

Procentuální zastoupení CD19^{pos} B lymfocytů bylo nižší v tonsilách pacientů s PFAPA než u kontrol (median 54.4% u PFAPA vs. 69.9% u kontrol, $p=0.02$, Obrázek 6A). Procentuální zastoupení CD19^{pos}CD27^{neg}CD24^{high}CD38^{high} transitional B

lymfocytů bylo signifikantně vyšší v PFAPA tonzilách, ačkoliv jejich počty u obou skupin (PFAPA a kontroly) byly extrémně nízké (median 0.5% z CD19^{pos} buněk u PFAPA vs. 0.1% u kontrol, p=0.035). Nenalezli jsme rozdíl v zastoupení naivních CD27^{neg} B lymfocytů u pacientů s PFAPA a kontrol.

Procentuální zastoupení plazmatických buněk (CD19^{pos}CD21^{neg}CD38^{high}), v tonzilách u PFAPA pacientů a kontrol se významně nelišilo (medián 1% CD19^{pos} buněk u PFAPA vs 1.5% u kontrol). Zastoupení plazmatických buněk v krvi pacientů s PFAPA bylo signifikantně vyšší než u kontrol (rozmezí 1.4-4.5%, medián 2.1% u PFAPA; rozmezí 0.4-1.5%, medián 1.2% u kontrol; p=0.002).

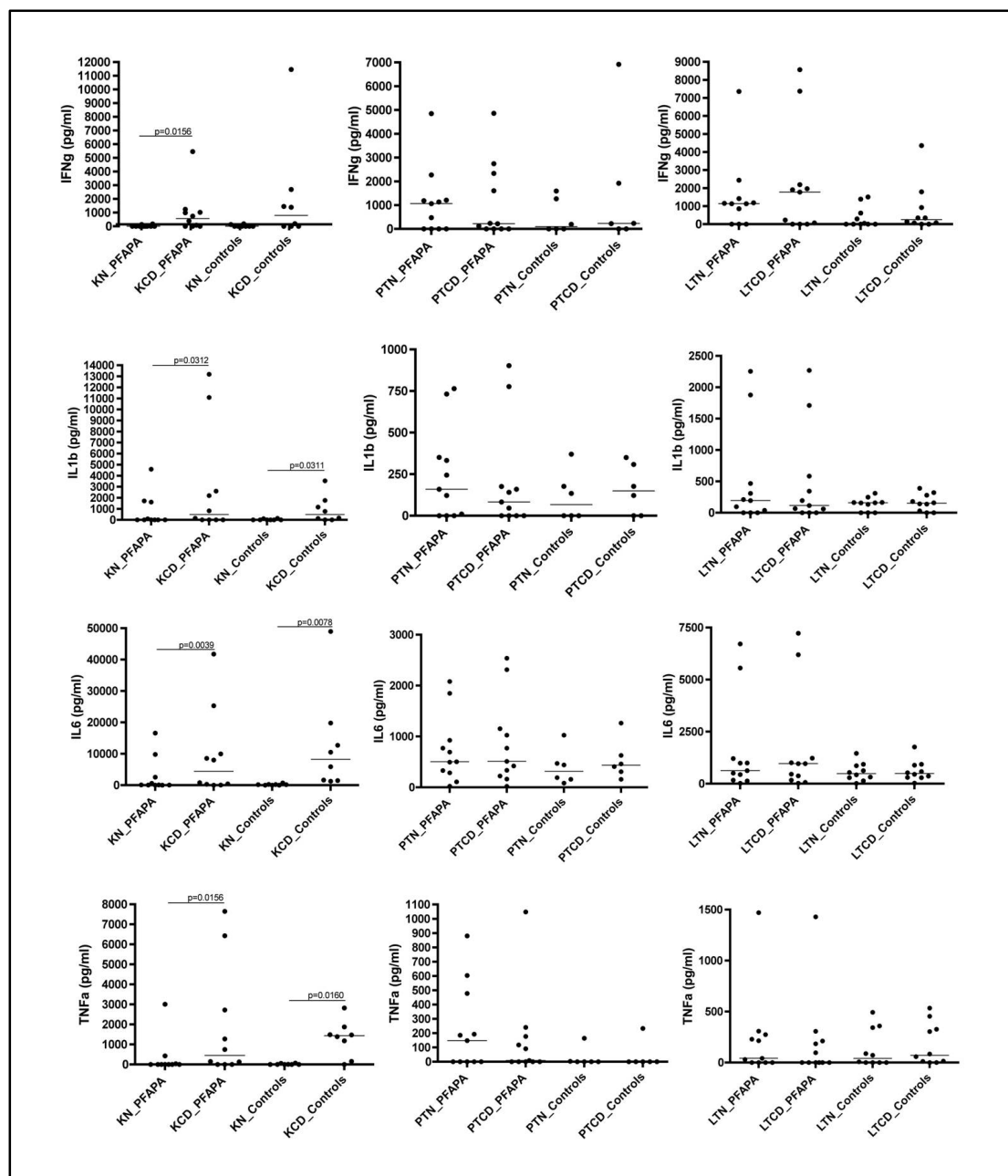
Procento switched paměťových B lymfocytů (CD19^{pos}IgM^{neg}IgD^{neg}) (Obrázek 7C) mezi CD19^{pos} B buňkami bylo signifikantně nižší u PFAPA tonzil (rozmezí 28-46%, medián 38% mezi CD19^{pos} u PFAPA vs 31-62%, medián 55% u kontrol; p=0.03, a medián 22% ze všech lymfocytů u PFAPA vs 36% u kontrol; p=0.01).

Všechny sledované rozdíly byly limitovány na tonzilární tkáň a nebyly přítomné v krvi (s výjimkou počtu plazmatických buněk (CD19^{pos}CD21^{neg}CD38^{high}).

4.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve

Měření cytokinů pomocí CBA v nestimulovaných a stimulovaných tonzilárních supernatantech a v supernatantech z periferní krve proběhlo u 11 pacientů s PFAPA syndromem a 10 kontrol (7 dětí s chronickou tonzilitidou/3 děti s OSAS). Ve vyšetřovaných cytokinech jsme našli signifikantní rozdíly v hladinách IFN- γ v stimulovaných supernatantech v porovnání s nestimulovanými supernatanty z periferní krve u pacientů s PFAPA syndromem (p=0.0156) (Obrázek 9). Porovnání nestimulovaných a stimulovaných supernatantů z tonzilární tkáně neukázalo signifikantní rozdíly u PFAPA pacientů. Nebyly pozorovány rozdíly mezi PFAPA a kontrolními tonzilami. Hladiny IL-1 β byly signifikantně vyšší u stimulovaných supernatantů z periferní krve v porovnání s nestimulovanými u PFAPA pacientů (p=0.0312) a u stimulovaných supernatantů z periferní krve vs nestimulovaných u kontrolní skupiny (p=0.0311). Hodnoty IL-1 β u nestimulovaných a stimulovaných supernatantů z tonzilární tkáně neukázaly signifikantní rozdíly. Nestimulované vs stimulované supernatanty z periferní krve u PFAPA pacientů ukázaly signifikantní rozdíly i u hladin IL-6 (p=0.039) a TNF- α (p=0.0156), u kontrolních skupin u IL-6

($p=0.078$) a $\text{TNF-}\alpha$ ($p=0.0160$). Hodnoty $\text{IL-1}\beta$ a $\text{TNF-}\alpha$ u nestimulovaných a stimulovaných supernatantů z tonzilární tkáně neukázaly signifikantní rozdíly.



Obrázek 9. Zobrazení cytokinového profilu u nestimulovaných a anti-CD3 stimulovaných supernatantů z periferní krve a tonzil. KN – krev nestimulovaná, KCD – krev stimulovaná anti-CD3, PTN/LTN – pravá tonzila/levá tonzila nestimulovaná, PTCD/LTCD – pravá tonzila/levá tonzila stimulovaná anti-CD3.

4.3.3 Histologické vyšetření tonzil

U všech 18 pacientů s PFAPA po tonzilektomii bylo provedeno histologické vyšetření, které prokázalo chronickou tonzilitidu nebo chronickou hypertrofickou tonzilitidu. Tento nálezn se nelišil od kontrolní skupiny. V histologickém nálezu byly popisovány tonzily s pravidelným dlaždicovým epitelem na povrchu, které v lakunách

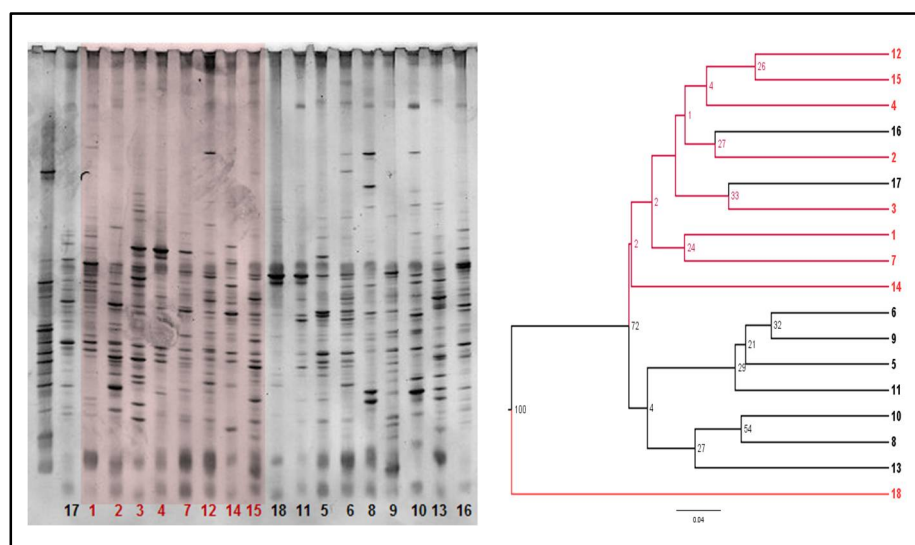
obsahovaly buněčný debridus. Dále byla tonzilární tkáň tvořena aktivovanou lymforetikulární tkání. Lůžko/spodina bylo tvořeno fibrotizací s vlákny příčně pruhované svaloviny.

4.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil

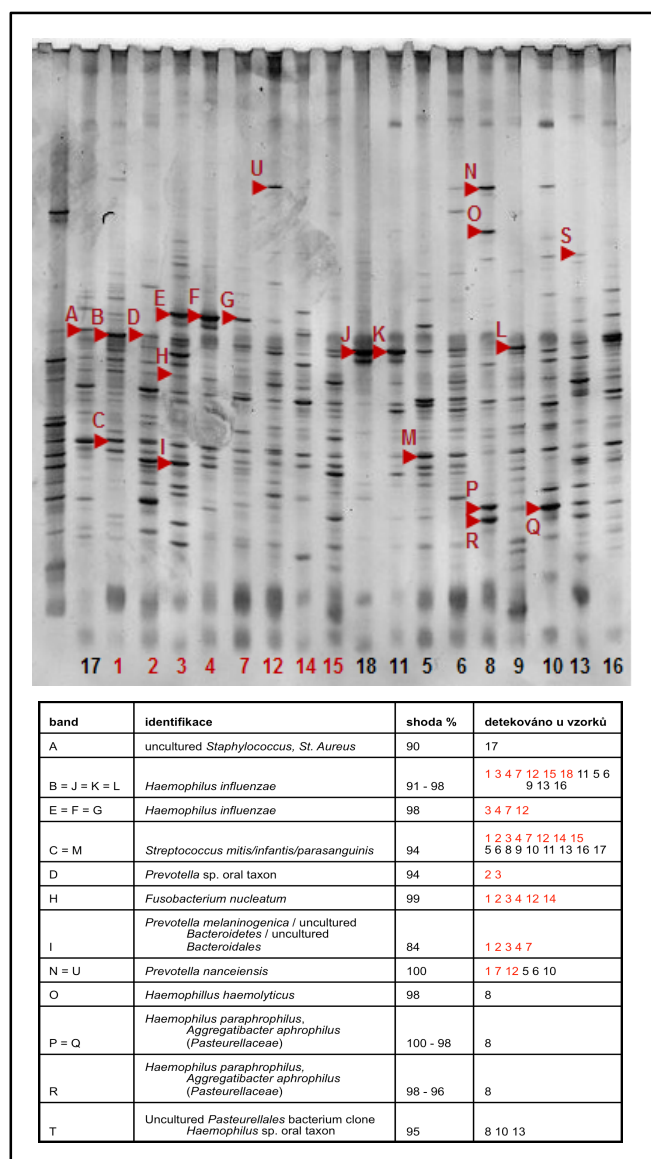
Mikrobiologické vyšetření bylo provedeno u všech 18 pacientů s diagnózou PFAPA po tonzilektomii. Ve vyšetřované části tonzilární tkáně rutinním mikrobiologickým vyšetřením byl u 2/18 pacientů potvrzen *Streptococcus pyogenes*, u 3 pacientů *Haemophilus influenzae* a u zbylých pacientů (n=13) byl nález viridujících streptokoků. U kontrolní skupiny (n=10) byl bakteriální profil různorodý (negativní výtěr, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria pharyngitis*, *Streptococcus pyogenes*, viridující streptokoky, *Citrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*).

4.3.5 Vyšetření DNA vybraných bakterií a virů

U 9 pacientů s PFAPA syndromem a 8 kontrol (7 pacientů s chronickou tonzilitidou/1 pacient s OSAS syndromem) bylo měřeno DNA vybraných bakterií pomocí metody DGGE-PCR (Obrázek 10 a 11). U všech pacientů s PFAPA syndromem a kontrol se porovnával profil bakterií získaný klasickou kultivací v mikrobiologické laboratoři s profilem získaným pomocí DGGE-PCR. Kultivace tonzil dětí s PFAPA syndromem ukázala přítomnost viridujících streptokoků. DGGE-PCR metoda prokázala přítomnost *Haemophilus influenzae* (n=7), viridujících streptokoků (n=8), *Prevotella* sp. (n=2), *Fusobacterium nucleatum* (n=6), *Prevotella melaninogenica/Bacteroidetes/Bacteroidales* (n=5), *Prevotella nanceiensis* (n=3) (Tabulka 4).



Obrázek 10. Výsledek vyšetření tonzil pomocí DGGE-PCR. Červeně označená skupina pacientů s PFAPA syndromem, černě kontrolní skupina. Použita metoda UPGMA, Nei-Li/Dice koeficient, bootstrap 1000.



Obrázek 11. Identifikace jednotlivých fragmentů pomocí DGGE.

Kultivace tonzil dětí z kontrolní skupiny ukázala přítomnost *Staphylococcus aureus*, *Neisseria pharyngitis*, *Streptococcus pyogenes*, viridující streptokoky, *Citrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, anaerobní kultivace – *Eubacterium* sp., *Streptococcus pneumoniae*.

Profil bakterií získaný pomocí DGGE-PCR u kontrolní skupiny byl následující: *Staphylococcus aureus* (n=1), *Haemophilus influenzae* (n=6), viridující streptokoky (n=8), *Prevotella nanceiensis* (n=3), *Haemophilus haemolyticus* (n=1), *Haemophilus*

paraphrophilus/Aggregatibacter aphrophilus (n=1), Haemophilus paraphrophilus/Aggregatibacter aphrophilus (n=1), Pasteurellaceae/Haemophilus sp. (n=3) (Tabulka 4).

Kvantitativní vyšetření pomocí PCR prokázalo nízké virové nálože alespoň jednoho vyšetřovaného viru u 7 z 10 PFAPA tonzil a u 7 z 9 kontrolních tonzil. Vyšetření virů v tonzilách PFAPA pacientů a kontrol neukázalo žádné signifikantní rozdíly. Cytomegalovirus nebyl detekován v žádném vzorku.

P	Diagnóza	Mikrobiologická kultivace z tonzil po výkonu
1	PFAPA syndrom	viridující streptokoky
2	PFAPA syndrom	
3	PFAPA syndrom	
4	PFAPA syndrom	
5	PFAPA syndrom	
6	PFAPA syndrom	
7	PFAPA syndrom	
8	PFAPA syndrom	
9	PFAPA syndrom	
1	Chronická tonzilitida	Staph.aureus, viridující streptokoky, Neisseria pharyngitis
2	Chronická tonzilitida	Strept.pyogenes masivně
3	Chronická tonzilitida	viridující streptokoky, citrobacter, pseudomonas aeruginosa, neisserie
4	Chronická tonzilitida	Strept. Beta hemolytický skupiny C
5	Chronická tonzilitida	viridující streptokoky, neisserie, Pseudomonas aeruginosa
6	Chronická tonzilitida	Strept.pyogenes, Staph.aureus, anaerobni kultivace - Eubacterium species
7	Chronická tonzilitida	Strept. Pyogenes
8	OSAS syndrom (hypertrofiie tonsil, tzv.“chrápači“)	Strept.pneumoniae

Tabulka 4. Soubor vyšetřených tonzil u dětí s PFAPA syndromem (n=9) a kontrolní skupiny dětí (n=8) pomocí metody DGGE.

5. DISKUZE

5.1 Klinická a epidemiologická data

Zájem o syndromy periodických horeček stoupl s rozvojem molekulárně-genetické diagnostiky většiny z nich. PFAPA syndrom je jediným syndromem, u kterého je jeho diagnóza stanovena klinicky, má nejasnou etiopatogenezi a nízkou průkaznost v laboratorních parametrech. K nejdůležitějším diagnostickým faktorům u PFAPA syndromu patří osobní a rodinná anamnéza a splnění modifikovaných klinických kritérií (Thomas et al. 1999; Feder a Salazar 2010; Hofer et al. 2014; Dang et al. 2011).

Ambulance pro periodické horečky působí v rámci dětské revmatologické ambulance na Klinice dětského a dorostového lékařství ve VFN v Praze od roku 2004 jako susperkonziliární pracoviště. Za dobu její existence, která je spojena s aktivní osvětovou a vzdělávací činností, stoupl počet dětí odeslaných s podezřením na rekurentní horečku více než 10-krát. V současné době jsou v ambulanci cca 2 noví pacienti každý týden a většina z nich má klinické charakteristiky PFAPA syndromu.

V porovnání s publikovanými daty je naše kohorta pacientů se syndromem PFAPA největším souborem pocházejícím z jednoho centra (Krol et al. 2013). V rámci diferenciální diagnostiky monogenních horeček bylo v indikovaných případech provedeno genetické testování v zahraničí v rámci mezinárodního projektu EUROFEVER (<http://www.printo.it/eurofever/>). U nás je genetická analýza k dispozici od roku 2012 (Mitolab 1.LFUK a Ústav dědičných metabolických poruch VFN)

Diagnóza PFAPA syndromu byla založena na důkladné analýze osobní a rodinné anamnézy, klinických a laboratorních datech, která byla systematicky sbírána v rámci prospektivní části naší práce. Ze 125 pacientů s PFAPA syndromem bylo sledováno 94 dětí prospektivně a u 31 pacientů jsme získali informace retrospektivně z lékařských záznamů vedených na naší klinice. Pacienti byli u nás sledováni dlouhodobě až do nástupu remise onemocnění. V rámci homogenizace skupiny pacientů s PFAPA syndromem jsme cíleně vyřadili pacienty s jiným typem onemocnění, které by mohlo zkreslit výsledky, např. pacienty s abnormálními

hodnotami IgA a/nebo IgD. U všech pacientů byla vyšetřena mevalonáurie k snížení rizika misdiagnózy MAPS.

Nástup onemocnění a distribuce základních klinických příznaků byla u našich pacientů podobná jako u předchozích publikovaných skupin (Padeh et al. 1999; Thomas et al. 1999; Feder a Salazar 2010; Wurster et al. 2011; Tasher et al. 2006). Bolesti břicha se vyskytovaly v relativně nízkém zastoupení (23%) v porovnání s ostatními skupinami (Thomas et al. 1999). I ostatní příznaky např. bolesti hlavy nebo bolesti kloubů měly různé zastoupení. Tato heterogenita příznaků může být vysvětlena problematickou spolehlivostí v hlášení obtíží a interpretaci bolesti a její lokalizace u dětí předškolního věku.

Z terapeutických možností u PFAPA syndromu se podle literatury a našich zkušeností nejvíc uplatňuje jednorázové podání prednisonu. V naší skupině pacientů byl tento přístup použit u více než 60% případů s obecně vysokou úspěšností. Na základě odpovědi na prednison jsme definovali tzv. „plnou“ a „částečnou“ odpověď na léčbu. Hodnocení plné odpovědi na prednison zahrnovalo vymizení horečky do 12 hodin od podání léku a další interval bez horečnatých epizod po dobu minimálně 2 týdnů od poslední horečky. Plné odpovědi dosáhlo 83% pacientů léčených prednisonem. Některé studie doporučují další dávku prednison v případě nedostatečné odpovědi (Thomas et al. 1999; Feder a Salazar 2010; Tasher et al. 2006). Většina našich pacientů vyžadovala jen jednu dávku prednisonu k dosažení plné odpovědi. Obecně jsme nedoporučovali podávání další dávky prednisonu dříve než po klinické kontrole, která by vyloučila případně probíhající infekci.

V současné době neexistují studie hodnotící riziko nežádoucích účinků prednisonu u pacientů s PFAPA syndromem. Na základě našich zkušeností a benigního charakteru PFAPA syndromu s výbornou prognózou předpokládáme, že jednorázová dávka 1mg/kg prednisonu na začátku typické horečnaté epizody v intervalu ne častějším než 3-4 týdny nezvyšuje riziko vzniku nežádoucích účinků. U 14% pacientů léčených prednisonem jsme pozorovali zkracování mezidobí horeček.

Používání kolchicinu a cimetidinu bylo popsáno u malého počtu dětí s různým, těžko interpretovatelným účinkem (Tasher et al. 2008; Feder 1992). Jen u 2 pacientů, kteří

neodpovídali na terapii prednisonem, jsme pozorovali pozitivní výsledky v terapii kolchicinem.

Terapeutická odpověď na tonzilektomii byla v naší skupině vysoká podobně jako v jiných publikovaných studiích (Peridis et al. 2010b; Garavello et al. 2011; Renko et al. 2007; Licameli et al. 2008). V dlouhodobém sledování se ukazuje tonzilektomie jako nejeefektivnější terapeutická možnost (Renko et al. 2007).

Téměř polovina našich pacientů sledovaných více než 1 rok dosáhla plné remise, z toho 28% dosáhlo spontánní remise. 51% dětí s PFAPA syndromem mělo přetrvávající obtíže po celou dobu sledování v rozmezí 2 – 6 let.

Zaznamenali jsme vyšší výskyt pozitivní rodinné anamnézy (47%), převážně u jednoho z rodičů, v porovnání s ostatními studiemi. Pozitivní rodinná anamnéza byla u pacientů s PFAPA syndromem pozorována i v dalších studiích (Thomas et al. 1999; Wurster et al. 2011) a byla důvodem k provedení genetické analýzy u 68 jedinců ze 14 rodin, u kterých byl u jednotlivců diagnostikován PFAPA syndrom (Gioia et al. 2015). V této studii bylo zjištěno, že u PFAPA syndromu se s největší pravděpodobností nejedná o monogenní typ dědičnosti.

5.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii

5.2.1 Standardní zánětlivé parametry

Měření základních zánětlivých parametrů u našich pacientů ukázalo podobné výsledky jako u ostatních studií (Thomas et al. 1999; Feder a Salazar 2010). V porovnání s febrilními kontrolami, které byly zastoupeny nejčastěji bakteriálním zánětem ledvin nebo plic, byly hodnoty CRP, FW nebo leukocytóza srovnatelné. Důležitým ukazatelem toho, že u PFAPA syndromu nedochází k trvalé aktivaci imunitního systému ve smyslu chronického zánětu, je normalizace hladin základních zánětlivých parametrů (CRP, FW a počet leukocytů) a SAA v mezidobí horeček. Normalizace SAA v mezidobí horeček svědčí o benigní povaze PFAPA syndromu ve smyslu rizika pozdějšího rozvoje amyloidózy, která patří k nejzávažnějším komplikacím u monogenních periodických horeček (Krol et al. 2013; Livneh et al. 1994; Livneh et al. 1992; Pastore et al. 2014; Lachmann et al. 2006; Bilginer et al. 2011).

5.2.2 Vyšetření sérových hladin cytokinů

V našich měřeních jsme zaznamenali signifikantně vyšší hladiny sérových cytokinů, a to IFN- γ a IL-1 β v průběhu epizody horečky u PFAPA pacientů v porovnání s kontrolní skupinou. Podobné zjištění publikovala i skupina Stojanov a kol., která porovnávala pacienty s PFAPA syndromem v horečce a v mezidobí se zdravými kontrolami (Stojanov et al. 2006). Zjistili, že hodnoty prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF- α a IL-12) zůstávají zvýšené v horečnaté epizodě, ale i v mezidobí horečky v porovnání se zdravou kontrolou.

V další svojí práci Stojanov a kol. měřili hladiny IL-1 β a IL-18 na mRNA a proteinové úrovni s podobným zjištěním, a to aktivací IL-1 β a IL-18 v průběhu horečnaté epizody (Stojanov et al. 2011).

5.2.2.1 IL-1 β a IFN- γ

IL-1 β hraje hlavní roli v horečnaté fázi zánětlivé odpovědi. Jeho zvýšená tvorba vede k horečce, neutrofilii a zvýšení hladin reaktantů akutní fáze včetně IL-6 (Dinarello 2004).

Tvorba IL-1 β a IL-18 je zprostředkována inflamazomem. Inflamazomy jsou cytoplazmatické makromolekulární proteinové komplexy, které kontrolují aktivaci kaspázy 1, která rozštěpí pro-IL-1 β a pro-IL-18 na biologicky aktivní formu, která je secernovaná buňkou (Martinon et al. 2002). Tento proces by mohl hrát roli ve zvýšené produkci IL-1 β u pacientů se syndromem PFAPA.

IL-1 β funguje jako kostimulátor T-buněčných funkcí, obvykle spolu s antigenem nebo mitogenem (Dinarello 2009). Aktivované T lymfocyty produkují IFN- γ , čímž zesilují stimulaci monocytů a makrofágů přes zpětnou vazbu – jsou detekovatelné vysoce elevované sérové hladiny interferonem indukovatelných chemokinů jako IP10/CXCL10 a MIG/CXCL9, stejně jako G-CSF, který je cytokinem indukujícím tvorbu neutrofilů. IP10/CXCL10 a MIG/CXCL9 jsou secernované monocyty a neutrofile a patří do stejné chemokinové rodiny, která rekrutuje aktivované T lymfocyty přes receptor CXCR3 (Farber 1997). Silná inverzní korelace IP10/CXCL10 a CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů v průběhu horečnatých epizod PFAPA pacientů, společně s relativní lymfopenií, dokazuje nábor aktivovaných T lymfocytů

do zánícených periferních tkání jako např. lymfatické uzliny nebo adenoidní tkáň (Stojanov et al. 2011).

Tyto nálezy vyšších hladin prozánětlivých cytokinů se shodují s výsledky naší práce, kde měření ukázala vyšší hladiny IL-1 β , IFN- γ a IL-6 v horečce, u IL-1 β a IFN- γ i v mezidobí.

Otázkou je, do jaké míry hraje vyšší hladina prozánětlivých cytokinů v mezidobí horeček důležitou roli v zánětlivém procesu. Mohlo by se pravděpodobně jednat o větší stimulaci imunitního systému, kterou nelze při měření standardních zánětlivých parametrů rozeznat (nesignifikantní rozdíly mezi PFAPA a kontrolami), ale při sledování prozánětlivých cytokinů je zřejmý.

Pokud by se jednalo o subklinický zánět, otázkou je, jestli je potřeba ho dále monitorovat i přes to, že ostatní běžně měřitelné parametry zánětu (CRP, leukocyty, FW, SAA) se v mezidobí normalizují. Toto zjištění by mohlo být důležité pro prognózu a další péči.

5.2.2.2 IL-6

Hladiny prozánětlivého cytokinu IL-6, který se využívá zejména v diagnostice bakteriálního zánětu, se nelišily v horečnaté epizodě u našich pacientů a febrilních kontrol stejně jako základní zánětlivé parametry, ale jeho pokles k nulovým nebo téměř nulovým hodnotám je nesporně důležitý (Belopolskaya et al. 2015). IL-6 se ukázal jako nespecifický parametr pro PFAPA syndrom – poukazuje spíše na probíhající nespecifický zánět.

Zaznamenali jsme signifikantní korelaci CRP/leukocytózy s IL-6 u kontrol.

Přímý vztah CRP a IL-6 je mnohokrát popsán u široké škály akutních a chronických zánětlivých onemocnění (např. bakteriální, virové, nebo mykotické infekce; revmatická a jiná zánětlivá onemocnění; maligní onemocnění; poškození tkáň a nekróza). U těchto onemocnění dochází v rámci akutní odpovědi na zánět/poškození k uvolnění IL-6 a dalších cytokinů z makrofágů nebo T lymfocytů, které potencují tvorbu CRP a fibrinogenu v játrech (Pepys a Hirschfield 2003; Lau et al. 2005). Fyziologickou rolí CRP je vazba na povrch mrtvých/umírajících buněk/některých

typů bakterií a aktivace komplementového systému přes C1Q komplex (Thompson et al. 1999).

Zajímavé je, že v naší práci jsme nezaznamenali korelaci mezi CRP a IL-6 u pacientů s PFAPA syndromem. Vysvětlením by mohlo být to, že produkce CRP může být stimulována i jinými cytokiny/faktory v játrech a nebo i v několika studiích popsána mimojaterní produkce CRP (Yeh ET. 2005; Gould a Weiser 2001; Jabs et al. 2003)

5.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii

5.3.1 Vyšetření profilu bílé krevní řady pomocí průtokové cytometrie

V nedávno publikované studii na tonzilách pacientů s PFAPA syndromem vyšetřovali mRNA expresi různých cytokinů a změřili podobné hodnoty pro IL-1 β , TNF- α , TGF β , IL-17 a IFN- γ u PFAPA a hypertrofičických tonzil, s výjimkou IL-4, který byl snížený u PFAPA tonzil (Valenzuela et al. 2013). Chen a kol. vyšetřovali tonzilární tkáň pacientů s autoinflamatorními syndromy, včetně jedné tonzily pacienta s PFAPA syndromem, a zjistili, že PFAPA tonzily obsahovaly více bazofilů s vázaným nebo internalizovaným IgD (Chen et al. 2009). Slizniční bazofily u autoinflamatorních syndromů mohly zvýšit zánětlivou odpověď pomocí uvolnění IL-1 β a LL-37 v odpovědi na mikrobiální antigeny s IgD vazebnou aktivitou. Plazmatické IgD^{pos}IgM^{neg} class switched buňky byly zvýšené v krvi a tonzilách u pacientů s autoinflamatorními syndromy.

Studie také podporují roli monocytů v potencování autoinflamatorní kaskády pomocí uvolňování IL-1 β (Kolly et al. 2013).

Naše měření ukázala zvýšené počty plazmatických buněk v periferní krvi PFAPA pacientů.

V měřeních jsme našli zvýšené hladiny naivních CD4 a CD8 T lymfocytů a přibližně 2-krát vyšší zastoupení CD8 T lymfocytů u PFAPA tonzil.

Všechny vyšetřované parametry byly stejné mezi páry tonzil u našich pacientů; patogenetický mechanismus zřejmě postihuje tonzily jako celek, a ne jako izolovaný fokální proces.

Práce Browna a kol. diskutuje snížené koncentrace IL-7, IL-17 a IFN- γ v afebrilním intervalu, které mohou poukazovat na defektní T buněčnou regulaci u PFAPA syndromu. V našich měřeních jsme našli přibližně 2-krát nižší zastoupení CD4^{pos} T lymfocytů s vysokou expresí inhibiční molekuly PD1 u PFAPA tonzil. Tyto T lymfocyty byly popsány jako lokalizované v okrajových částech germinálních center, mající hlavní funkci v pomáhání B lymfocytům, hlavně přes produkci různých faktorů včetně LFA3, CD40L, ICOS, OX40, a CD10 (Wang et al. 2011).

V naší práci jsme našli snížené počty switched memory B lymfocytů v PFAPA tonzilách, což je nález konzistentní s předešlou studií (Wang et al. 2011), který navíc podporuje fakt, že odlišnosti v T buněčném kompartmentu způsobují změny v B buněčných funkcích v tonzilách.

Stojanov a kol. popsala hladiny chemokinů, které jsou známými T buněčnými chemoatraktanty, které byly zvýšené v průběhu PFAPA epizody v porovnání s asymptomatickými intervaly.

Počty CD4 a CD8 T lymfocytů v periferní krvi byly snížené v průběhu PFAPA epizod (Stojanov et al. 2011). Toto by mohlo podporovat teorii zvýšeného počtu CD8 T lymfocytů v tonzilách v mezidobí, pocházejícího původně z krve v průběhu PFAPA epizod.

Stejná studie našla mírně zvýšené hladiny gammadelta T lymfocytů v průběhu mezidobí (Stojanov et al. 2011).

V tonzilách pacientů s PFAPA byly zvýšené počty gammadelta T-lymfocytů a CD8 T-lymfocytů, což vyvolává otázku, zda je horečnatá fáze syndromu PFAPA spouštěna virem. Doposud nebyla publikována studie zabývající se studiem virů v tonzilách pacientů s PFAPA. Naše data získaná z malého počtu tonzil tuto teorii nepodporují. Recentní studie popsala variantu genů inflamazomu u 15 z 57 pacientů, což podporuje hypotézu, že příčinou horečnatých epizod u syndromu PFAPA je imunitní dysregulace s neznámým spouštěčem (Kolly et al. 2013).

5.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve

V naší práci jsme našli signifikantní rozdíly v hladinách IFN- γ , IL-1 β , IL-6 a TNF- α v stimulovaných supernatantech v porovnání s nestimulovanými supernatanty z periferní krve u pacientů s PFAPA syndromem. Kolly a kol. měřili hladiny cytokinů v nestimulovaných/stimulovaných supernatantech z periferní krve, v kterých popsali signifikantně zvýšenou hladinu IL-1 β v průběhu horečnaté epizody v porovnání s mezidobím a zdravými kontrolami (Kolly et al. 2013).

Zaměřili jsme se na porovnání nestimulovaných a stimulovaných supernatantů z tonzilární tkáně, které neukázalo signifikantní rozdíly u žádného z vyšetřovaných cytokinů. Tento nález je ale podobný tomu, který popsala skupina Valenzuela a kol., kteří vyšetřili cytokinový profil pomocí genové exprese (Valenzuela et al. 2013). Analyzovali hladiny IL-1 β , TNF- α , TGF β , IL-17 a IFN- γ v odstraněné tonzilární tkáni pomocí rtPCR. Hladiny těchto měřených cytokinů byly podobné v porovnání s kontrolními tonzilami. Zjistili, že exprese IL-4 genu v tonzilách byla nižší u PFAPA pacientů v porovnání s kontrolami. Nižší hladina exprimovaného genu pro cytokin IL-4 v tonzilách a nižší hladiny eozinofilů v periferní krvi u PFAPA pacientů by mohly hrát roli v inhibici Th2 buněčné odpovědi.

K dnešnímu dni nebyla publikována data o měření cytokinového profilu v nestimulovaných/stimulovaných supernatantech z tonzilární tkáně u pacientů s PFAPA syndromem a kontrol jako funkční test k průkazu tvorby cytokinů. Naše práce jako jediná ukazuje výsledky tohoto měření. Je v souladu s nálezy získanými měřením na úrovni genové exprese (Valenzuela et al. 2013).

Toto zjištění podporuje teorii, kde IL-1 β funguje jako kostimulátor T-buněčné funkce, většinou spolu s antigenem/mitogenem. Aktivované/stimulované T lymfocyty secernují IFN- γ , čímž zesilují stimulaci monocyto-makrofágového systému. Jejich zvýšené hodnoty v periferní krvi jsme potvrdili jak v měřených sérových hladinách, tak po stimulaci antiCD3.

5.3.3 Histologické vyšetření tonzil

Histologické vyšetření u 18 pacientů s PFAPA i kontrolní skupiny ukázalo v obou případech chronickou tonzilitidu, respektive chronickou hypertrofickou tonzilitidu.

Náš nález je v souladu s publikovanými výsledky, které nenašly specifické změny u tonzil PFAPA pacientů (Lantto U et al. 2015; Valenzuela et al. 2013). Obě skupiny navíc pomocí imunohistochemického barvení pro B/T lymfocyty (CD20 a CD3) ukázaly přítomnost reaktivní lymfocytární tkáně. Aktivní zánět neukázal asociaci s PFAPA syndromem, ale faktem je, že tonzilektomie nebyla provedena v průběhu horečnaté epizody, tedy při aktivním onemocnění.

5.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil a vyšetření DNA vybraných bakterií pomocí PCR-DGGE a virů pomocí PCR

Mikrobiologické vyšetření ukázalo různorodý profil bakterií hlavně u kontrolní skupiny, ale i výsledky vyšetření u všech 18 tonzil PFAPA pacientů nebyly konzistentní (*Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, u většiny tonzil viridující streptokoky).

Bakteriální profil pomocí DGGE-PCR metody jsme změřili u 9 tonzil PFAPA pacientů, které měly v mikrobiologické kultivaci nález viridujících streptokoků. U zbylých 9 tonzil od ostatních pacientů jsme neměli dostatek materiálu na měření bakteriálního profilu pomocí DGGE-PCR.

Měření bakteriálního profilu ukázalo, že profily mikroflory na tonzilách jednotlivých dětí jsou individuální. Nenašli jsme žádnou souvislost mezi diagnózou a nálezy na tonzilách. Popsali jsme častý výskyt *Haemophilus influenzae*, *Prevotella* sp., *Streptococcus* sp.

V podobné studii Lantto et al. zabývající se mikrobiologickým průkazem bakterií v tonzilách prokázali vyšší výskyt *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae* a větší tvorbu biofilmu u tonzil PFAPA pacientů. Potvrdili častější výskyt *Haemophilus influenzae* u obou skupin.

Metoda qPCR neodhalila rozdíl mezi zkoumanými skupinami pacientů. Pomocí statistické analýzy UPGMA, Nei-Li/Dice koeficient, jsme chtěli odpovědět na otázku, jestli se dají profily rozdělit na dvě skupiny (PFAPA tonzily/kontrolní tonzily). Ukázalo se, že tato metoda je nedostačující z důvodu velké variability mezi vzorky i uvnitř skupin.

Limitem DGGE metody je nízká citlivost a problém s identifikací bandu. Ideální je při srovnání, kdy je jedinec sám sobě kontrolou, např. před/po léčbě.

Na druhou stranu, v porovnání s klasickou mikrobiologickou kultivací nám nabízí mnohem konkrétnější spektrum bakteriální flóry, které běžnou kultivací nezískáme možná i pro malý počet daných bakterií ve vzorku.

V současné době se k analýze mikrobiomu používá vysokokapacitní sekvenování (next generation sequencing, NGS), které ukáže relativní zastoupení přítomných bakterií. Nevýhodou je cena analýzy a náročnost zpracování dat.

Pomocí metody PCR byla zjištěna přítomnost EBV, HHV-6 a adenoviru u většiny PFAPA pacientů, ale také u většiny kontrol. Přítomnost CMV nebyla prokázána u žádného z vyšetřených vzorků.

Přítomnost viru jako potenciálního spouštěče se tedy vyloučit nedá, ale předpokládá se, že hraje roli jen u vnímavého jedince.

V naší práci jsme neprokázali signifikantní přítomnost specifické bakterie/bakterií nebo jednoho/více virů, které by mohly být příčinou systémové zánětlivé odpovědi. Tento fakt ale nevylučuje možnost nespecifické antigenní stimulace infekčním agens u predisponovaného jedince s nevyzrálou imunitní odpovědí na vnější stimulus.

6. ZÁVĚR

V české populaci dětí jsou syndromy periodických horeček postupně více rozpoznávány, ale přesnější incidence a prevalence těchto syndromů není známá. Lze však předpokládat analogickou frekvenci jako u kavkazské populace jiných evropských zemí. PFAPA syndrom je v ČR nejčastější periodickou horečkou. Její diagnostika není lehká i vzhledem k nízké specificitě klinických kritérií, ale její znalost může výrazně obohatit širokou diferenciální diagnostiku recidivujících teplot nejasné etiologie.

U dětí s autoinflamatorními syndromy, zejména PFAPA syndromem, pochopení patofyziologického děje a možnost jeho ovlivnění umožní časnější diagnostiku a vhodný terapeutický management, které mohou zamezit zbytečným vyšetřením a chránit pacienty před nadměrným užíváním antibiotik, stejně jako zlepšit kvalitu života postižených rodin.

Výsledky naší práce podporují všeobecnou znalost o PFAPA syndromu jako o onemocnění benigní povahy. V případě typické prezentace příznaků a citlivém vyloučení ostatních možných příčin rekurentních horeček (např. cyklická neutropenie nebo další imunodeficiencie, autoinflamatorní či autoimunitní onemocnění, maligní onemocnění) může být diagnóza PFAPA syndromu přímočará.

Diagnostický algoritmus u PFAPA syndromu zahrnuje pečlivou anamnézu, detailní analýzu prezentace příznaků a laboratorních vyšetření k vyloučení jiných příčin horeček a potvrzení plné normalizace zánětlivých parametrů v mezidobí horeček.

Prospektivní sledování pacientů pomůže vyhodnotit léčebnou odpověď a dlouhodobý průběh onemocnění. Přítomnost normálních laboratorních parametrů v mezidobí horeček, normální růst a vývoj dítěte společně s tendencí ke spontánnímu prodlužování afebrilních intervalů patří mezi základní rozpoznávací znaky pro diagnózu PFAPA syndromu. Jednorázové podávání prednisonu by mělo být navrženo jako léčba první volby s tonzilektomií jako druhou volbou u pacientů, kteří neodpovídají na prednison.

6.1 Patofyziologické děje.

Jeden z nejčastějších mechanismů diskutovaný u PFAPA syndromu je možná infekční příčina. Podobnost nálezů u PFAPA syndromu v geograficky a geneticky odlišných kohortách nabízí silný důkaz o tom, že patofyziologický mechanismus u těchto skupin je stejný (Brown et al. 2010; Stojanov et al. 2011; Thompson et al. 1999). Při hledání infekční příčiny by se mohlo jednat o jedno konkrétní infekční agens s celosvětovou prevalencí nebo o větší počet různých infekčních agens, které jsou schopné nastartovat příznaky PFAPA syndromu. Vrozená složka imunitního systému odpovídá na různé infekční činitěle podobnou cestou.

Odstraněním tonzilární tkáně s potenciálním bakteriálním/virovým/jiným spouštěčem u těchto pacientů dochází k vymizení rekurentních epizod horeček a přidružených příznaků.

Do současné doby bylo publikováno několik studií, které podporují teorii o zásadní roli IL-1 β v etiopatogenezi PFAPA syndromu (Stojanov et al. 2011; Kolly et al. 2013), který posiluje tvorbu Th1 chemokinů. Navržený model poukazuje na možnou existenci mikrobiálního spouštěče, který aktivuje kaskádu vrozené složky imunitního systému s následnou migrací aktivovaných T lymfocytů do periferie.

Pacient s PFAPA syndromem představuje pravděpodobně imunologicky nezralého jedince, který je vnímavý k vnějším faktorům. Po setkání s nespecifickým faktorem dojde k zesílení imunitní odpovědi s následnou kaskádou dějů vedoucích k systémovému zánětu.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AP-1	aktivační protein 1
CAPS	Periodické syndromy asociované s kryopyrinem (Cryopyrin Associated Periodic Syndromes)
CBA	Cytometry Bead Array
CD	diferenční skupina (cluster of differentiation)
CIAS1	Cold Induced Autoinflammatory Syndrome 1
CINCA/NOMID	Chronický infantilní neurologický, kožní a kloubní syndrom (Chronic Infantile Neurologic Cutaneous Articular Syndrome nebo-li Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease)
CMV	Cytomegalovirus
CRP	C-reaktivní protein
CXCR3	chemokine receptor CXCR3
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBV	Epstein-Barrové virus
FCAS	Familial Cold Autoinflammatory Syndrome
FL	fluorescenční kanál
FMF	Familiární středomořská horečka (Familiar Mediterranean Fever)
FW	sedimentace erytrocytů
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
HHV-6	Human herpesvirus 6
HIDS	Syndrom hyperimmunoglobulinemie D (Hyperimmunoglobulinemia D syndrome)
ICOS	inducible co-stimulator
IFN- γ	interferon gamma
Ig	imunoglobulin
IgG1	imunoglobulin G1
IL	interleukin
IL-1 β	interleukin 1 beta
IP10/CXCL10	interferon gamma-induced protein 10/C-X-C motif chemokine 10
LFA3	lymfocyte function-associated antigen 3

MAPS	Periodický syndrom asociovaný s mevalonátkinázou (Mevalonate kinase Associated Periodic fever Syndrome)
MEFV	mediterranean fever gen
MIG/CXCL9	monokine induced by gamma interferon/chemokine (C-X-C motif) ligand 9
MVK	gen pro mevalonátkinázu
MWS	Muckle-Wellsův syndrom (Muckle-Wells Syndrome)
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS	next generation sequencing
NLRs	NOD (nucleotide-binding oligomerization domain receptors)-like receptory
NLRP3/ NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3)
NSAID	nesteroidní antirevmatika
OSAS	Syndrom obstruktivní spánkové apnoe
PCR	polymerase chain reaction
PCR-DGGE	denaturing gradient gel
PD-1	programmed cell death protein 1
PFAPA	Syndrom periodické horečky s aftózní stomatitidou, faryngitidou a krční adenitidou (PFAPA; Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis a Adenitis)
PYPAF1	PYRIN-containing Apaf1-like protein 1
SAA	sérový amyloid A
TGF β	transforming growth factor beta
TNF	tumor nekrotizující faktor
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alpha
TNFR1	receptor 1 pro tumor nekrotizující faktor (extracelulární podjednotka membránového TNF receptoru)
TNFR2	receptor 2 pro tumor nekrotizující faktor
TNFRSF1A	gen pro receptor tumor-nekrotizujícího faktoru
TRAPS	Periodický syndrom asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (TNFR-Associated Periodic Syndrome)

8. LITERATURA

AKSENTIJEVICH, I, J GALON, M SOARES, E MANSFIELD, K HULL, H H OH, R GOLDBACH-MANSKY, J DEAN, B ATHREYA, J REGINATO, M HENRICKSON, B PONS-ESTEL, J J O'SHEA a D L KASTNER, 2001. The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *American journal of human genetics* [online]. roč. 69, č. 2, s. 301–314. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1086/321976

AMMOURI, W, L CUISSET, S ROUAGHE, MO ROLLAND, M DELPECH, G GRATEAU a N RAVET, 2007. Diagnostic value of serum immunoglobulinaemia D level in patients with a clinical suspicion of hyper IgD syndrome. *Rheumatology* [online]. roč. 46, č. September, s. 1597–1600. ISSN 14620324. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kem200

BADER-MEUNIER, B, B FLORKIN, J SIBILIA, C ACQUAVIVA, E HACHULLA, G GRATEAU, O RICHER, CM FARBER, M FISCHBACH, V HENTGEN, P JEGO, C LAROCHE, B NEVEN, T LEQUERRÉ, A MATHIAN, I PELLIER, I TOUITOU, D RABIER, AM PRIEUR, L CUISSET a P QUARTIER, 2011. Mevalonate kinase deficiency: a survey of 50 patients. *Pediatrics* [online]. roč. 128, č. 1, s. e152–e159. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2010-3639

BARSKI, L, L SHALEV, M ZEKTSER, H MALADA-MAZRI, D ABRAMOV, Y RAFAELY a A VON SCHEVEN-GÊTE, 2012. Large hemorrhagic pericardial effusion. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* [online]. roč. 14, s. 367–371. ISSN 1565-1088. Dostupné z: <http://www.ima.org.il/imag/ar12jun-15.pdf>
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=2012382213>
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NEWS=N&AN=22891398>

BELOPOLSKAYA, OB, TV SMELAYA, VV MOROZ, AM GOLUBEV a LE SALNIKOVA, 2015. Clinical associations of host genetic variations in the genes of cytokines in critically ill patients. *Clin Exp Immunol*. roč. 180, č. 3, s. 531–41.

BEN-CHETRIT, E a M LEVY, 1991. Colchicine prophylaxis in familial Mediterranean fever: Reappraisal after 15 years. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* [online]. roč. 20, č. 4, s. 241–246. ISSN 00490172. Dostupné z: doi:10.1016/0049-0172(91)90019-V

BERLUCCHI, M, A MEINI, A PLEBANI, M G BONVINI, D LOMBARDI a P NICOLAI, 2003. Update on treatment of Marshall's syndrome (PFAPA syndrome): report of five cases with review of the literature. *Ann Otol Rhinol Laryngol* [online]. roč. 112, č. 4, s. 365–369. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12731633>

BILGINER, Y, T AKPOLAT a S OZEN, 2011. Renal amyloidosis in children. *Pediatric Nephrology* [online]. roč. 26, s. 1215–1227. ISSN 0931041X. Dostupné z: doi:10.1007/s00467-011-1797-x

BODAR, EJ, JC VAN DER HILST, JP DRENTH, JW VAN DER MEER a A

SIMON, 2005. Effect of etanercept and anakinra on inflammatory attacks in the hyper-IgD syndrome: introducing a vaccination provocation model. *The Netherlands journal of medicine* [online]. roč. 63, č. 7, s. 260–4. ISSN 0300-2977. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16093577>

BOSCHAN, C, O WITT, P LOHSE, I FOELDVARI, H ZAPPEL a L SCHWEIGERER, 2006. Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID) Due to a Novel S331R Mutation of the CIAS1 Gene and Response to Interleukin-1 Receptor Antagonist Treatment. *American Journal of Medical Genetics* [online]. roč. 140, č. 8, s. 883–886. ISSN 1552-4825. Dostupné z: [doi:10.1002/ajmg.a](https://doi.org/10.1002/ajmg.a)

BROWN, KL, P WEKELL, V OSLA, M SUNDQVIST, K SAVMAN, A FASTH, A KARLSSON a S BERG, 2010. Profile of blood cells and inflammatory mediators in periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis (PFAPA) syndrome. *BMC Pediatr* [online]. roč. 10, s. 65. ISSN 1471-2431. Dostupné z: [doi:10.1186/1471-2431-10-65](https://doi.org/10.1186/1471-2431-10-65)

BURTON, MJ, AJ POLLARD a JD RAMSDEN, 2010. Tonsillectomy for periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis syndrome (PFAPA). *Cochrane database of systematic reviews (Online)* [online]. č. 9, s. CD008669. ISSN 1469-493X. Dostupné z: [doi:10.1002/14651858.CD008669](https://doi.org/10.1002/14651858.CD008669)

CASTILLO, L a DM MACCALLUM, 2012. Cytokine measurement using cytometric bead arrays. *Methods in Molecular Biology* [online]. roč. 845, s. 425–434. ISSN 10643745. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-61779-539-8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8)

CENTOLA, M, I AKSENTIJEVICH a DL KASTNER, 1998. The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Human Molecular Genetics* [online]. roč. 7, č. 10, s. 1581–1588. ISSN 0964-6906. Dostupné z: [doi:10.1093/hmg/7.10.1581](https://doi.org/10.1093/hmg/7.10.1581) [pii]

CLAAS, ECJ, MW SCHILHAM, CS DE BROUWER, P HUBACEK, M ECHAVARRIA, AC LANKESTER, MJD VAN TOL a CM KROES, 2005. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. roč. 43, č. 4, s. 1738–1744. ISSN 00951137. Dostupné z: [doi:10.1128/JCM.43.4.1738-1744.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1738-1744.2005)

COCHARD, M, J CLET, L LE, P PILLET, X ONRUBIA, T GUERON, M FAOUZI a M HOFER, 2010. PFAPA syndrome is not a sporadic disease. *Rheumatology (Oxford)* [online]. roč. 49, č. 10, s. 1984–1987. ISSN 1462-0332. Dostupné z: [doi:10.1093/rheumatology/keq187](https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq187)

CUISSET, L, JP DRENTH, A SIMON, MF VINCENT, S VAN DER VELDE VISSER, JW VAN DER MEER, G GRATEAU a M DELPECH, 2001. Molecular analysis of MVK mutations and enzymatic activity in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* [online]. roč. 9, č. 4, s. 260–266. ISSN 10184813. Dostupné z: [doi:10.1038/sj.ejhg.5200614](https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200614)

DANG, PM, M GATTORNO, R CAORSI a M HOFER, 2011. International consensus conference on PFAPA syndrome: Evaluation of a new set of classification

criteria. *Clinical and Experimental Rheumatology* [online]. roč. 29, č. 2, s. 407–408. ISSN 0392-856X. Dostupné z: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L70503836\http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=0392856X&id=doi:&title=International+consensus+conference+on+PFAPA+syndrome:+Evaluation+of+a+new+set+of+classification+cr>

DE JESUS, AA a R GOLDBACH-MANSKY, 2013. Monogenic autoinflammatory diseases: Concept and clinical manifestations. *Clinical Immunology* [online]. roč. 147, č. 3, s. 155–174. ISSN 15217035. Dostupné z: [doi:10.1016/j.clim.2013.03.016](https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.03.016)

DEMIRKAYA, E, MK CAGLAR, HR WATERHAM, R TOPALOGLU a S OZEN, 2007. A patient with hyper-IgD syndrome responding to anti-TNF treatment. *Clinical rheumatology* [online]. roč. 26, č. 10, s. 1757–9. ISSN 0770-3198. Dostupné z: [doi:10.1007/s10067-006-0501-1](https://doi.org/10.1007/s10067-006-0501-1)

DINARELLO, CA, 2004. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *Journal of endotoxin research* [online]. roč. 10, č. 4, s. 201–222. ISSN 09680519. Dostupné z: [doi:10.1179/096805104225006129](https://doi.org/10.1179/096805104225006129)

DINARELLO, CA, 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology* [online]. roč. 27, s. 519–50. ISSN 0732-0582. Dostupné z: [doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612)

DODÉ, C, N LE DÛ, L CUISSET, F LETOURNEUR, JM BERTHELOT, G VAUDOUR, A MEYRIER, R WATTS, DGI SCOTT, A NICHOLLS, B GRANEL, C FRANCES, F GARCIER, P EDERY, S BOULINGUEZ, JP DOMERGUES, M DELPECH a G GRATEAU, 2002. New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. *American journal of human genetics* [online]. roč. 70, č. 6, s. 1498–1506. ISSN 00029297. Dostupné z: [doi:10.1086/340786](https://doi.org/10.1086/340786)

DRENTH, JP, L CUISSET, G GRATEAU, C VASSEUR, SD VAN DE VELDE-VISSER, JG DE JONG, JS BECKMANN, JW VAN DER MEER a M DELPECH, 1999. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group. *Nature genetics* [online]. roč. 22, s. 178–181. ISSN 1061-4036. Dostupné z: [doi:10.1038/9696](https://doi.org/10.1038/9696)

DRENTH, JP, RJ POWELL, NS BROWN a JWM VAN DER MEER, 1995. Interferon-gamma and urine neopterin in attacks of the hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *European journal of clinical investigation*. roč. 25, s. 683–686. ISSN 0014-2972.

DRENTH, JPH, CJ HAAGSMA, JWM VAN DER MEER, CMR WEEMAES, JWJ BIJLSMA, ER DE GRAEFF-MEEDER, M ALCALAY, C CHAPELON-ABRIC, MF KAHN, AM PRIEUR, J SIBILIA, RJ POWELL, R TOPALOGLU, U SAATCI, R SCOLOZZI, P LAZZARIN, CM MONCIOTTI, J DEMONTY a D JILEK, 1994. Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. The clinical spectrum in a series of 50 patients. International Hyper-IgD Study Group. *Medicine (Baltimore)* [online]. roč. 73, č. 0025-7974 (Print), s. 133–144. ISSN 0025-7974. Dostupné z:

<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L24262409>
<http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00257974&id=doi:&title=Hyperimmunoglobulinemia+D+and+periodic+fever+syndrome.+The+clinical+spectrum+in+a+series+of+50+pat>

DREWE, E, EM MCDERMOTT, PT POWELL, JD ISAACS a RJ POWELL, 2003. Prospective study of anti-tumour necrosis factor receptor superfamily 1B fusion protein, and case study of anti-tumour necrosis factor receptor superfamily 1A fusion protein, in tumour necrosis factor receptor associated periodic syndrome (TRAPS): clinica. *Rheumatology (Oxford)*. roč. 42, č. 2, s. 235–9.

DRIESEN, O, PA VOUTE a A VERMEULEN, 1968. A description of two brothers with permanently raised non-esterified aetiocholanolone blood level. *Acta Endocrinol.* roč. 57, č. 2, s. 177–86.

DYTRYCH, P, P KROL, M KOTROVA, D KUZILKOVA, P HUBACEK, L KROL, R KATRA, O HRUSAK, Z KABELKA, P DOLEZALOVA, T KALINA a E FRONKOVA, 2015. Polyclonal, newly derived T cells with low expression of inhibitory molecule PD-1 in tonsils define the phenotype of lymphocytes in children with Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis (PFAPA) syndrome. *Mol Immunol.* roč. 65, č. 1, s. 139–47.

FARBER, JM, 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *Journal of leukocyte biology.* roč. 61, č. 3, s. 246–257. ISSN 0741-5400.

FEDER, HM, 1992. Cimetidine treatment for periodic fever associated with aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis. *Pediatr Infect Dis J.* roč. 11, č. 4, s. 318–21.

FEDER, HM, 2000. *Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, adenitis: a clinical review of a new syndrome.* [online]. 2000. ISBN 1040-8703. Dostupné z: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=ppvovftd&NEWS=N&AN=00008480-200006000-00014>

FEDER, HM a JC SALAZAR, 2010. A clinical review of 105 patients with PFAPA (a periodic fever syndrome). *Acta Paediatr* [online]. roč. 99, č. 2, s. 178–184. ISSN 08035253. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1651-2227.2009.01554.x](https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01554.x)

FEDERICI, S, MP SORMANI, S OZEN, HJ LACHMANN, G AMARYAN, P WOO, I KONÉ-PAUT, N DEWARRAT, L CANTARINI, A INSALACO, Y UZIEL, D RIGANTE, P QUARTIER, E DEMIRKAYA, T HERLIN, A MEINI, G FABIO, T KALLINICH, S MARTINO, AY BUTBUL, A OLIVIERI, J KUEMMERLE-DESCHNER, B NEVEN, A SIMON, H OZDOGAN, I TOUITOU, J FRENKEL, M HOFER, A MARTINI, N RUPERTO a M GATTORNO, 2015. Evidence-based provisional clinical classification criteria for autoinflammatory periodic fevers. *Annals of the rheumatic diseases* [online]. roč. 74, č. 5, s. 799–805. ISSN 1468-2060. Dostupné z: [doi:10.1136/annrheumdis-2014-206580](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206580)

FELDMANN, J, AM PRIEUR, P QUARTIER, P BERQUIN, S CERTAIN, E CORTIS, D TEILLAC-HAMEL, A FISCHER a G DE SAINT BASILE, 2002.

Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *American journal of human genetics* [online]. roč. 71, č. 1, s. 198–203. ISSN 0002-9297. Dostupné z: doi:10.1086/341357

FISCHER, SG a LS LERMAN, 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. roč. 80, č. 6, s. 1579–1583. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.80.6.1579

FONNESU, C, C CERQUAGLIA, M GIOVINALE, V CURIGLIANO, E VERRECCHIA, G DE SOCIO, M LA REGINA, G GASBARRINI a R MANNA, 2009. Familial Mediterranean Fever: a review for clinical management. *Joint, bone, spine* [online]. roč. 76, č. 3, s. 227–33. ISSN 1778-7254. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbspin.2008.08.004

FRENKEL, J, SM HOUTEN, HR WATERHAM, RJ WANDERS, GT RIJKERS, M DURAN, T W KUIJPERS, W VAN LUIJK, B T POLL-THE a W KUIS, 2001. Clinical and molecular variability in childhood periodic fever with hyperimmunoglobulinaemia D. *Rheumatology (Oxford, England)*. roč. 40, č. 5, s. 579–584. ISSN 1462-0324.

FRENKEL, J, GT RIJKERS, SH MANDEY, SW BUURMAN, SM HOUTEN, RJ WANDERS, HR WATERHAM a W KUIS, 2002. Lack of isoprenoid products raises ex vivo interleukin-1beta secretion in hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum* [online]. roč. 46, č. 10, s. 2794–2803. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.10550

GARAVELLO, W, L PIGNATARO, L GAINI, S TORRETTA, E SOMIGLIANA a R GAINI, 2011. Tonsillectomy in children with periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis syndrome. *J Pediatr* [online]. roč. 159, č. 1, s. 138–142. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2010.12.014

GATTORNO, M, R CAORSI, A MEINI, M CATTALINI, S FEDERICI, F ZULIAN, E CORTIS, G CALCAGNO, A TOMMASINI, R CONSOLINI, G SIMONINI, MA PELAGATTI, M BALDI, I CECCHERINI, A PLEBANI, J FRENKEL, MP SORMANI a A MARTINI, 2009. Differentiating PFAPA syndrome from monogenic periodic fevers. *Pediatrics* [online]. roč. 124, č. 4, s. e721–8. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2009-0088

GAUTHERET-DEJEAN, A, C MANICHANH, F THIEN-AH-KOON, AM FILLET, N MANGENEY, M VIDAUD, N DHEDIN, JP VERNANT a H AGUT, 2002. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* [online]. roč. 100, č. 1-2, s. 27–35. Dostupné z: doi:S0166093401003901 [pii]

GENY, B, C GRISCELLI a P MOZZICONACCI, 1974. Immunoglobulin D (IgD) in childhood. II. Serum IgD levels in juvenile rheumatoid arthritis. *Biomedicine*. roč. 20,

č. 2, s. 125–30.

GILLESPIE, J, R MATHEWS a MF MCDERMOTT, 2010. *Rilonacept in the management of cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS)* [online]. 2010. ISBN 1178-7031. Dostupné z: doi:10.2147/JIR.S8109

GIOIA, SA, N BEDONI, A VON SCHEVEN-GÊTE, F VANONI, A SUPERTI-FURGA, M HOFER a C RIVOLTA, 2015. Analysis of the genetic basis of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome. *Scientific Reports* [online]. B.m.: Macmillan Publishers Limited, 19.5., roč. 5, s. 10200. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/srep10200>

GLASER, RL a R GOLDBACH-MANSKY, 2008. The spectrum of monogenic autoinflammatory syndromes: understanding disease mechanisms and use of targeted therapies. *Current allergy and asthma reports* [online]. roč. 8, č. 4, s. 288–98. ISSN 1534-6315. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010

GOLDBACH-MANSKY, R, NJ DAILEY, SW CANNA, A GELABERT, J JONES, BI RUBIN, HJ KIM, C BREWER, C ZALEWSKI, E WIGGS, S HILL, ML TURNER, BI KARP, I AKSENTIJEVICH, F PUCINO, SR PENZAK, MH HAVERKAMP, L STEIN, BS ADAMS, TL MOORE, RC FUHLBRIGGE, B SHAHAM, JN JARVIS, K O'NEIL, RK VEHE, LO BEITZ, G GARDNER, WP HANNAN, RW WARREN, W HORN, JL COLE, SM PAUL, PN HAWKINS, TH PHAM, C SNYDER, RA WESLEY, SC HOFFMANN, SM HOLLAND, JA BUTMAN a DL KASTNER, 2006. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *The New England journal of medicine* [online]. roč. 355, č. 6, s. 581–92. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa055137

GOLDSTEIN, JL a MS BROWN, 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* [online]. roč. 343, č. 6257, s. 425–430. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/343425a0

GOULD, JM a JN WEISER, 2001. Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infection and Immunity* [online]. roč. 69, č. 3, s. 1747–1754. ISSN 00199567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.69.3.1747-1754.2001

GRATEAU, G, 2000. The relation between familial Mediterranean fever and amyloidosis. *Current opinion in rheumatology* [online]. roč. 12, č. 1, s. 61–64. ISSN 1040-8711. Dostupné z: doi:10.1097/00002281-200001000-00010

GRELIER, A, M Le GARFF-TAVERNIER, F NAUWELAERS, M SARFATI a H MERLE-BERAL, 2013. Soluble CD23 measurement by CBA: A convenient and reliable quantification method in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [online]. 1.10., s. n/a–n/a. ISSN 1552-4957. Dostupné z: doi:10.1002/cytob.21135

GUMUCIO, Deborah L, A DIAZ, P SCHANER, N RICHARDS, C BABCOCK, M SCHALLER a T CESENA, 2002. Fire and ICE: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clinical and Experimental Rheumatology*.

roč. 20, s. 45–53. ISSN 0392856X.

HAWKINS, PN, HJ LACHMANN, E AGANNA a MF MCDERMOTT, 2004. Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to anakinra. *Arthritis and rheumatism* [online]. roč. 50, č. 2, s. 607–12. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.20033

HEBERDEN, W, 1806. *Commentaries on history and care of disease*.

HOFER, M, P PILLET, MM COCHARD, S BERG, P KROL, I KONE-PAUT, D RIGANTE, V HENTGEN, J ANTON, R BRIK, B NEVEN, I TOUITOU, D KAISER, A DUQUESNE, C WOUTERS a M GATTORNO, 2014. International periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome cohort: Description of distinct phenotypes in 301 patients. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. roč. 53, č. 6, s. 1125–1129. ISSN 14620332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/ket460

HOFFMAN, HM, AA WANDERER a DH BROIDE, 2001. Familial cold autoinflammatory syndrome: phenotype and genotype of an autosomal dominant periodic fever. *The Journal of allergy and clinical immunology* [online]. roč. 108, č. 4, s. 615–20. ISSN 0091-6749. Dostupné z: doi:10.1067/mai.2001.118790

HOFFMANN, G, KM GIBSON, IK BRANDT, PI BADER, RS WAPPNER a L SWEETMAN, 1986. *Mevalonic aciduria--an inborn error of cholesterol and nonsterol isoprene biosynthesis*. [online]. 1986. ISBN 0028-4793 (Print)n0028-4793 (Linking). Dostupné z: doi:10.1056/NEJM198606193142504

HOUTEN, SM, J FRENKEL, GT RIJKERS, RJ WANDERS, W KUIS a HR WATERHAM, 2002. Temperature dependence of mutant mevalonate kinase activity as a pathogenic factor in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Human molecular genetics* [online]. roč. 11, č. 25, s. 3115–3124. ISSN 0964-6906. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/11.25.3115

HOUTEN, SM, J FRENKEL a HR WATERHAM, 2003. Isoprenoid biosynthesis in hereditary periodic fever syndromes and inflammation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* [online]. roč. 60, č. 6, s. 1118–34. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-003-2296-4

HOUTEN, SM, RJ WANDERS a HR WATERHAM, 2000. Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency. *Biochimica et biophysica acta*. roč. 1529, s. 19–32. ISSN 0006-3002.

HUBACEK, P, A VIRGILI, KN WARD, D POHLREICH, P KESLOVA, B GOLDOVA, M MARKOVA, M ZAJAC, O CINEK, EP NACHEVA, P SEDLACEK a P CETKOVSKY, 2009. HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *British journal of haematology* [online]. roč. 145, č. 3, s. 394–8. ISSN 1365-2141. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07622.x

HULL, KM, E DREWE, I AKSENTIJEVICH, HK SINGH, K WONG, EM

MCDERMOTT, J DEAN, RJ POWELL a DL KASTNER, 2002. The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): Emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine* [online]. roč. 81, č. 5, s. 349–368. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/01.md.0000031361.64336.03

CHAE, JJ, HD KOMAROW, J CHENG, G WOOD, N RABEN, PP LIU a DL KASTNER, 2003. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular cell* [online]. roč. 11, č. 3, s. 591–604. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(03)00056-X

CHAE, JJ, G WOOD, SL MASTERS, K RICHARD, G PARK, BJ SMITH a DL KASTNER, 2006. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. roč. 103, č. 26, s. 9982–9987. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0602081103

CHEN, K, W XU, M WILSON, B HE, NW MILLER, E BENGTÉN, ES EDHOLM, P SANTINI, P RATH, A CHIU, M CATTALINI, J LITZMAN, J B BUSSEL, B HUANG, A MEINI, K RIESBECK, C CUNNINGHAM-RUNDLES, A PLEBANI a A CERUTTI, 2009. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nature immunology* [online]. roč. 10, č. 8, s. 889–898. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1748

JABS, WJ, BA LÖGERING, P GERKE, B KREFT, EM WOLBER, MHF KLINGER, L FRICKE a J STEINHOFF, 2003. *The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo* [online]. 2003. ISBN 0014-2980 (Print)r0014-2980 (Linking). Dostupné z: doi:10.1002/immu.200390018

JANEWAY, TC a MO MOSENTHAL, 1908. An unusual paroxysmal syndrome, probably allied to recurrent vomiting, with a study of the nitrogen metabolism. *Trans Ass Am Phys.* roč. 23, s. 504–18.

JESUS, A, JB OLIVEIRA, I AKSENTIJEVICH, E FUJIHIRA, MMS CARNEIRO-SAMPAIO, AJS DUARTE a C SILVA, 2008. TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): description of a novel TNFRSF1A mutation and response to etanercept. *European journal of pediatrics* [online]. roč. 167, č. 12, s. 1421–1425. ISSN 1432-1076. Dostupné z: doi:10.1007/s00431-008-0685-2

KEES, S, P LANGEVITZ, D ZEMER, S PADEH, M PRAS a A LIVNEH, 1997. Attacks of pericarditis as a manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* [online]. roč. 90, č. 10, s. 643–7. ISSN 1460-2725. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415347>

KIMURA, H, M MORITA, Y YABUTA, K KUZUSHIMA, K KATO, S KOJIMA, T MATSUYAMA a T MORISHIMA, 1999. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology.* roč. 37, č. 1, s. 132–136. ISSN 0095-1137.

KOLLY, L, N BUSSO, A VON SCHEVEN-GETE, N BAGNOUD, I MOIX, D HOLZINGER, G SIMON, A IVES, G GUARDA, A SO, MA MORRIS a M HOFER, 2013. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome is linked to dysregulated monocyte IL-1 β production. *J Allergy Clin Immunol* [online]. roč. 131, č. 6, s. 1635–1643. ISSN 1097-6825. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2012.07.043

KONÉ-PAUT, I a C GALEOTTI, 2014. Anakinra for cryopyrin-associated periodic syndrome. *Expert review of clinical immunology* [online]. roč. 10, č. 1, s. 7–18. ISSN 1744-8409. Dostupné z: doi:10.1586/1744666X.2014.861325

KONÉ-PAUT, I a M PIRAM, 2012. Targeting interleukin-1 β in CAPS (cryopyrin-associated periodic) syndromes. What did we learn? *Autoimmunity Reviews* [online]. roč. 12, č. 1, s. 77–80. ISSN 15689972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2012.07.026

KROL, P, M BOHM, V SULA, P DYTRYCH, R KATRA, D NEMCOVA a P DOLEZALOVA, 2013. PFAPA syndrome: clinical characteristics and treatment outcomes in a large single-centre cohort. *Clin Exp Rheumatol* [online]. roč. 31, č. 6, s. 980–987. ISSN 0392-856X. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24237762

LACHMANN, HJ, 2015. Autoinflammatory syndromes as causes of fever of unknown origin. *Clinical medicine (London, England)* [online]. roč. 15, č. 3, s. 295–8. ISSN 1470-2118. Dostupné z: doi:10.7861/clinmedicine.15-3-295

LACHMANN, HJ, HJB GOODMAN, P ANDREWS, H GALLAGHER, J MARSH, S BREUER, DM ROWCZENIO, A BYBEE a PN HAWKINS, 2006. AA amyloidosis complicating hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome: a report of two cases. *Arthritis and rheumatism* [online]. roč. 54, č. 6, s. 2010–4. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.21901

LACHMANN, HJ, I KONE-PAUT, JB KUEMMERLE-DESCHNER, KS LESLIE, E HACHULLA, P QUARTIER, X GITTON, A WIDMER, N PATEL a PN HAWKINS, 2009. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *The New England journal of medicine* [online]. roč. 360, s. 2416–2425. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa0810787

LACHMANN, HJ, R PAPA, K GERHOLD, L OBICI, I TOUITOU, L CANTARINI, J FRENKEL, J ANTON, I KONE-PAUT, M CATTALINI, B BADER-MEUNIER, A INSALACO, V HENTGEN, R MERINO, C MODESTO, N TOPLAK, R BERENDES, S OZEN, R CIMAZ, A JANSSON, PA BROGAN, PN HAWKINS, N RUPERTO, A MARTINI, P WOO a M GATTORNO, 2014. The phenotype of TNF receptor-associated autoinflammatory syndrome (TRAPS) at presentation: a series of 158 cases from the Eurofever/EUROTRAPS international registry. *Annals of the rheumatic diseases* [online]. roč. 73, č. 12, s. 2160–7. ISSN 1468-2060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2013-204184

LANTTO, U, P KOIVUNEN, T TAPIAINEN, V GLUMOFF, P HIRVIKOSKI, M UHARI a M RENKO, 2015. Microbes of the tonsils in PFAPA (Periodic Fever,

Aphthous stomatitis, Pharyngitis and Adenitis) syndrome - a possible trigger of febrile episodes. *APMIS*. roč. 123, č. 6, s. 523–9.

LARSEN, N, GJ OLSEN, BL MAIDAK, MJ MCCAUGHEY, R OVERBEEK, TJ MACKE, TL MARSH a CR WOESE, 1993. The ribosomal database project. *Nucleic acids research* [online]. roč. 21, č. 13, s. 3021–3023. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/22.17.3485

LAU, DCW, B DHILLON, H YAN, PE SZMITKO a S VERMA, 2005. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* [online]. roč. 288, č. 5, s. H2031–H2041. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.01058.2004

LICAMELI, G, J JEFFREY, J LUZ, D JONES a M KENNA, 2008. Effect of adenotonsillectomy in PFAPA syndrome. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* [online]. roč. 134, č. 2, s. 136–140. ISSN 0886-4470. Dostupné z: doi:10.1001/archoto.2007.7

LIVNEH, A, JPH DRENTH, IS KLASSEN, P LANGEVITZ, J GEORGE, DA SHELTON, DL GUMUCIO, E PRAS, DL KASTNER, M PRAS a JM VAN DER MEER, 1997. Familial Mediterranean fever and hyperimmunoglobulinemia D syndrome: Two diseases with distinct clinical, serologic, and genetic features. *Journal of Rheumatology* [online]. roč. 24, č. 8, s. 1558–1563. ISSN 0315-162X. Dostupné z: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L27320698> \n<http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=0315162X&id=doi:&title=Familial+Mediterranean+fever+and+hyperimmunoglobulinemia+D+syndrome:+Two+diseases+with+distinct+cl>

LIVNEH, A, D ZEMER, P LANGEVITZ, A LAOR, E SOHAR a M PRAS, 1994. Colchicine treatment of AA amyloidosis of familial Mediterranean fever. An analysis of factors affecting outcome. *Arthritis & Rheumatism*. roč. 37, č. 12, s. 1804–1811. ISSN 0004-3591.

LIVNEH, A, D ZEMER, B SIEGAL, A LAOR, E SOHAR a M PRAS, 1992. Colchicine prevents kidney transplant amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Nephron*. roč. 60, č. 4, s. 418–422. ISSN 0028-2766.

LONG, SS, 1999. Syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis (PFAPA) – What it isn't. What is it? *J Pediatr*. roč. 135, s. 98–101.

MARSHALL, GS, 1989. PFAPA syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. roč. 8, č. 9, s. 658–9.

MARSHALL, GS, KM EDWARDS, J BUTLER a A R LAWTON, 1987. Syndrome of periodic fever, pharyngitis, and aphthous stomatitis. *J Pediatr* [online]. roč. 110, č. 1, s. 43–46. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(87)80285-8

MARTINON, F, K BURNS a J TSCHOPP, 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* [online]. roč. 10, č. 2, s. 417–426. ISSN 10972765. Dostupné z:

doi:S1097276502005993 [pii]

MATHEWS, RJ, MB SPRAKES a MF MCDERMOTT, 2008. NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis research & therapy* [online]. roč. 10, s. 228. ISSN 1478-6354. Dostupné z: doi:10.1186/ar2525

MCDERMOTT, MF a I AKSENTIJEVICH, 2002. The autoinflammatory syndromes. *Current opinion in allergy and clinical immunology* [online]. roč. 2, s. 511–516. ISSN 1528-4050. Dostupné z: doi:10.1097/00130832-200212000-00006

MCDERMOTT, MF, I AKSENTIJEVICH, J GALON, EM MCDERMOTT, BW OGUNKOLADE, M CENTOLA, E MANSFIELD, M GADINA, L KARENKO, T PETTERSSON, J MCCARTHY, DM FRUCHT, M ARINGER, Y TOROSYAN, M TEPPPO, M WILSON, HM KARAARSLAN, Y WAN, I TODD, G WOOD, R SCHLIMGEN, TR KUMARAJEEWA, SM COOPER, JP VELLA, CI AMOS, J MULLEY, K QUANE, MG MOLLOY, A RANKI, RJ POWELL, G HITMAN, JJ O'SHEA a DL KASTNER, 1999. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* [online]. roč. 97, č. 1, s. 133–144. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80721-7

MINDEN, K, E AGANNA, MF MCDERMOTT a A ZINK, 2004. Tumour necrosis factor receptor associated periodic syndrome (TRAPS) with central nervous system involvement. *Ann Rheum Dis*. roč. 63, č. 10, s. 1356–7.

MOSER, Ch, G POHL, I HASLINGER, S KNAPP, D ROWCZENIO, T RUSSEL, HJ LACHMANN, U LANG a J KOVARIK, 2009. Successful treatment of familial Mediterranean fever with Anakinra and outcome after renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* [online]. roč. 24, č. 2, s. 676–678. ISSN 1460-2385. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfn646

MULLEY, J, K SAAR, G HEWITT, F RÜSCHENDORF, H PHILLIPS, a COLLEY, D SILENCE, a REIS a M WILSON, 1998. Gene localization for an autosomal dominant familial periodic fever to 12p13. *American journal of human genetics* [online]. roč. 62, č. 4, s. 884–9. ISSN 0002-9297. Dostupné z: doi:10.1086/301793

MUYZER, G, EC DE WAAL a G UITTERLINDEN, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. roč. 59, č. 3, s. 695–700. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:0099-2240/93/030695-06\$02.00/0

O'CONNOR, W, JA HARTON, X ZHU, MW LINHOFF a JP TING, 2003. Cutting Edge: CIAS1/Cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 Is and Inducible Inflammatory Mediator with NF-KB Suppressive Properties. *The Journal of Immunology* [online]. roč. 12, č. 171, s. 6329–6333. ISSN 00221767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/171/12/6329>

OBICI, L, C MANNO, AO MUDA, P PICCO, A D'OSUALDO, G PALLADINI,

MA AVANZINI, D TORRES, S MARCIANO a G MERLINI, 2004. First report of systemic reactive (AA) amyloidosis in a patient with the hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome. *Arthritis and rheumatism* [online]. roč. 50, č. 9, s. 2966–9. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.20490

OSTUNI, PA, P LAZZARIN, G ONGARO, R GUSI, S TODESCO a PF GAMBARI, 1988. Hyper-IGD syndrome: A new case treated with colchicine. *Clinical Rheumatology* [online]. roč. 7, č. 3, s. 398–401. ISSN 0770-3198. Dostupné z: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L19235980> \n <http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=07703198&id=doi:&title=Hyper-IGD+syndrome:+A+new+case+treated+with+colchicine&stitle=CLIN.+RHEUMATOL.&title=Clinical+Rheu>

OZEN, S, HM HOFFMAN, J FRENKEL a DL KASTNER, 2006. Familial Mediterranean fever (FMF) and beyond: a new horizon. Fourth International Congress on the Systemic Autoinflammatory Diseases held in Bethesda, USA, 6-10 November 2005. *Ann Rheum Dis* [online]. roč. 65, č. 7, s. 961–964. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/ard.2006.052688

OZKAYA, N a F YALÇINKAYA, 2003. Colchicine treatment in children with familial Mediterranean fever. *Clinical rheumatology* [online]. roč. 22, č. 4-5, s. 314–7. ISSN 0770-3198. Dostupné z: doi:10.1007/s10067-003-0739-9

PADEH, S, N BREZNIAK, D ZEMER, E PRAS, A LIVNEH, P LANGEVITZ, A MIGDAL, M PRAS a JH PASSWELL, 1999. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome: clinical characteristics and outcome. *J Pediatr* [online]. roč. 135, č. 1, s. 98–101. ISSN 0022-3476. Dostupné z: doi:10.1016/s0022-3476(99)70335-5

PASTORE, S, G PALONI, R CAORSI, L RONFANI, A TADDIO a L LEPORE, 2014. Serum amyloid protein A concentration in cryopyrin-associated periodic syndromes patients treated with interleukin-1 beta antagonist. *Clinical and experimental rheumatology* [online]. ISSN 0392-856X. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069027>

PEPYS, MB a GM HIRSCHFIELD, 2003. *C-reactive protein: a critical update* [online]. 2003. ISBN 00219738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI18921

PERIDIS, S, E KOUDOUMNAKIS, A THEODORIDIS, K STEFANAKI, G HELMIS a M HOULAKIS, 2010a. Surgical outcomes and histology findings after tonsillectomy in children with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. *Am J Otolaryngol* [online]. roč. 31, č. 6, s. 472–475. ISSN 0196-0709. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjoto.2009.06.005

PERIDIS, S, G PILGRIM, E KOUDOUMNAKIS, I ATHANASOPOULOS, M HOULAKIS a K PARPOUNAS, 2010b. PFAPA syndrome in children: A meta-analysis on surgical versus medical treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* [online]. roč. 74, č. 11, s. 1203–1208. ISSN 1872-8464. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijporl.2010.08.014

PONGERS-WILLEMSE, MJ, OJ VERHAGEN, GJ TIBBE, J WIJKHUIJS, V DE HAAS, E ROOVERS, CE VAN DER SCHOOT a JJ VAN DONGEN, 1998. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* [online]. roč. 12, č. 12, s. 2006–2014. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/sj.leu.2401246

PRIEUR, AM a C GRISCELLI, 1984. Nosologic aspects of systemic forms of very-early-onset juvenile arthritis. Apropos of 17 cases. *La semaine des hopitaux : organe fonde par l'Association d'enseignement medical des hopitaux de Paris*. roč. 60, s. 163–167. ISSN 0066-2097.

PRIEUR, AM, C GRISCELLI, F LAMPERT, H TRUCKENBRODT, MA GUGGENHEIM, DJ LOVELL, P PELKONNEN, J CHEVRANT-BRETON a BM ANSELL, 1987. A chronic, infantile, neurological, cutaneous and articular (CINCA) syndrome. A specific entity analysed in 30 patients. *Scand.J.Rheumatol.Suppl* [online]. roč. 66, č. SUPPL. 66, s. 57–68. ISSN 0300-9742. Dostupné z: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L18137140> \n[http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=03009742&id=doi:&atitle=A+chronic,+infantile,+neurological,+cutaneous+and+articular+\(CINCA\)+syndrome.+A+specific+entity+an](http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=03009742&id=doi:&atitle=A+chronic,+infantile,+neurological,+cutaneous+and+articular+(CINCA)+syndrome.+A+specific+entity+an)

REIMANN, HA, 1948. Periodic disease. Probable syndrome including periodic fever, benign paroxysmal peritonitis, cyclic neutropenia and intermittent arthralgia. *JAMA*. roč. 141, s. 239–44.

RENKO, M, E SALO, A PUTTO-LAURILA, H SAXEN, PS MATTILA, J LUOTONEN, O RUUSKANEN a M UHARI, 2007. A Randomized, Controlled Trial of Tonsillectomy in Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, and Adenitis Syndrome. *Journal of Pediatrics* [online]. roč. 151, č. 3, s. 289–292. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2007.03.015

ROLDAN, R, M RUIZ, MD MIRANDA a E COLLANTES, 2008. Anakinra: New therapeutic approach in children with Familial Mediterranean Fever resistant to colchicine. *Joint Bone Spine* [online]. roč. 75, č. 4, s. 504–505. ISSN 1297-319X. Dostupné z: doi:10.1007/s00431-007-0547-3.

SAATCI, U, S OZEN, S OZDEMIR, A BAKKALOGLU, N BESBAS, R TOPALOGLU a S ARSLAN, 1997. Familial Mediterranean fever in children: report of a large series and discussion of the risk and prognostic factors of amyloidosis. *Eur J Pediatr*. roč. 156, s. 619–623. ISSN 0340-6199.

SAMPAIO, ICRM, MJ RODRIGO a JGDP MONTEIRO MARQUES, 2009. Two siblings with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, adenitis (PFAPA) syndrome. *The Pediatric infectious disease journal* [online]. roč. 28, č. 3, s. 254–5. ISSN 0891-3668. Dostupné z: doi:10.1097/INF.0b013e31818c8ea5

SAULSBURY, FT, 2003. Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome (HIDS) in a child with normal serum IgD, but increased serum IgA concentration.

Journal of Pediatrics [online]. roč. 143, č. 03, s. 127–129. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(03)00212-9

SIEBERT, S, N AMOS, C FIELDING, ECY WANG, I AKSENTIJEVICH, BD WILLIAMS a P BRENNAN, 2005. Reduced tumor necrosis factor signaling in primary human fibroblasts containing a tumor necrosis factor receptor superfamily 1A mutant. *Arthritis and rheumatism* [online]. 4., roč. 52, č. 4, s. 1287–92. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.20955

SIEWERT, R, J FERBER, RD HORSTMANN, Ch SPECKER, PJ HEERING a Ch TIMMANN, 2006. Hereditary Periodic Fever With Systemic Amyloidosis: Is Hyper-IgD Syndrome Really a Benign Disease? *American Journal of Kidney Diseases* [online]. roč. 48, č. 3, s. 41–45. ISSN 02726386. Dostupné z: doi:10.1053/j.ajkd.2006.05.027

SIMON, A, E DREWE, JWM VAN DER MEER, RJ POWELL, RI KELLEY, AFH STALENHOF a JPH DRENT, 2004a. Simvastatin treatment for inflammatory attacks of the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Clinical pharmacology and therapeutics* [online]. roč. 75, č. 5, s. 476–83. ISSN 0009-9236. Dostupné z: doi:10.1016/j.clpt.2004.01.012

SIMON, A, HPH KREMER, R WEVERS, H SCHEFFER, JG DE JONG, JWM VAN DER MEER a JPH DRENT, 2004b. Mevalonate kinase deficiency: Evidence for a phenotypic continuum. *Neurology* [online]. roč. 62, s. 994–997. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/01.WNL.0000115390.33405.F7

SIMON, A, JWM VAN DER MEER a JPH DRENT, 2005. Familial Mediterranean fever--a not so unusual cause of abdominal pain. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* [online]. roč. 19, č. 2, s. 199–213. ISSN 1521-6918. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpg.2004.11.009

STOJANOV, S, F HOFFMANN, A KERY, ED RENNER, D HARTL, P LOHSE, K HUSS, P FRAUNBERGER, JD MALLEY, S ZELLERER, MH ALBERT a BH BELOHRADSKY, 2006. Cytokine profile in PFAPA syndrome suggests continuous inflammation and reduced anti-inflammatory response. *Eur Cytokine Netw* [online]. roč. 17, č. 2, s. 90–97. ISSN 1148-5493. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840027>

STOJANOV, S a DL KASTNER, 2005. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol* [online]. roč. 17, č. 5, s. 586–599. ISSN 1040-8711. Dostupné z: doi:10.1097/bor.0000174210.78449.6b

STOJANOV, S, S LAPIDUS, P CHITKARA, H FEDER, JC SALAZAR, TA FLEISHER, MR BROWN, KM EDWARDS, MM WARD, RA COLBERT, HW SUN, GM WOOD, BK BARHAM, A JONES, I AKSENTIJEVICH, R GOLDBACH-MANSKY, B ATHREYA, KS BARRON a DL KASTNER, 2011. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) is a disorder of innate immunity and Th1 activation responsive to IL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* [online]. roč. 108, č. 17, s. 7148–7153. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1103681108

STOJANOV, S a MF MCDERMOTT, 2005. The tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: current concepts. *Expert reviews in molecular medicine* [online]. roč. 7, č. 22, s. 1–18. ISSN 1462-3994. Dostupné z: doi:10.1017/S1462399405009749

TANAKA, N, H KIMURA, Y HOSHINO, K KATO, T YOSHIKAWA, Y ASANO, K HORIBE, S KOJIMA a T MORISHIMA, 2000. Monitoring four herpesviruses in unrelated cord blood transplantation. *Bone marrow transplantation* [online]. roč. 26, č. September, s. 1193–1197. ISSN 0268-3369. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bmt.1702710

TASHER, D, E SOMEKH a I DALAL, 2006. PFAPA syndrome: new clinical aspects disclosed. *Archives of disease in childhood* [online]. roč. 91, č. 12, s. 981–984. ISSN 0003-9888. Dostupné z: doi:10.1136/adc.2005.084731

TASHER, D, M STEIN, I DALAL a E SOMEKH, 2008. Colchicine prophylaxis for frequent periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis episodes. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* [online]. roč. 97, č. 8, s. 1090–1092. ISSN 0803-5253. Dostupné z: doi:10.1111/j.1651-2227.2008.00837.x

TER HAAR, N a J FRENKEL, 2014. Treatment of hereditary autoinflammatory diseases. *Current opinion in rheumatology* [online]. roč. 26, č. 3, s. 252–8. ISSN 1531-6963. Dostupné z: doi:10.1097/BOR.0000000000000059

TER HAAR, N, H LACHMANN, S OZEN, P WOO, Y UZIEL, C MODESTO, I KONE-PAUT, L CANTARINI, A INSALACO, B NEVEN, M HOFER, D RIGANTE, S AL-MAYOUF, I TOUITOU, R GALLIZZI, E PAPADOPOULOU-ALATAKI, S MARTINO, J KUEMMERLE-DESCHNER, L OBICI, N IAGARU, A SIMON, S NIELSEN, A MARTINI, N RUPERTO, M GATTORNO a J FRENKEL, 2012. Treatment of autoinflammatory diseases: results from the Eurofever Registry and a literature review. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. s. 678–685. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2011-201268

TER HAAR, N, M OSWALD, J JEYARATNAM, J ANTON, KS BARRON, P BROGAN, L CANTARINI, C GALEOTTI, G GRATEAU, V HENTGEN, M HOFER, T KALLINICH, I KONE-PAUT, HJ LACHMANN, H OZDOGAN, S OZEN, R RUSSO, A SIMON, Y UZIEL, C WOUTERS, BM FELDMAN, SJ VASTERT, NM WULFFRAAT, SM BENSELER, J FRENKEL, M GATTORNO a JB KUEMMERLE-DESCHNER, 2015. Recommendations for the management of autoinflammatory diseases. *Annals of the rheumatic diseases* [online]. s. 1–9. ISSN 1468-2060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2015-207546

THOMAS, KT, HM FEDER JR., AR LAWTON a KM EDWARDS, 1999. Periodic fever syndrome in children. *J Pediatr* [online]. roč. 135, č. 1, s. 15–21. ISSN 0022-3476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(99)70321-5

THOMPSON, D, MB PEPYS a SP WOOD, 1999. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure London England 1993*. roč. 7, s. 169–177.

TOUITOU, I, 2003. Familial Mediterranean fever (FMF). *Orphanet Encyclopedia* [online]. Dostupné z: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-fmf.pdf>

VALENZUELA, PM, A ARAYA, CI PÉREZ, X MAUL, C SERRANO, C BELTRÁN, PR HARRIS a E TALESNIK, 2013. Profile of inflammatory mediators in tonsils of patients with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome. *Clinical rheumatology* [online]. roč. 32, č. 12, s. 1743–9. ISSN 1434-9949. Dostupné z: [doi:10.1007/s10067-013-2334-z](https://doi.org/10.1007/s10067-013-2334-z)

VALENZUELA, PM, D MAJERSON, JL TAPIA a E TALESNIK, 2009. Syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) in siblings. *Clin Rheumatol* [online]. roč. 28, č. 10, s. 1235–1237. ISSN 0770-3198. Dostupné z: [doi:10.1007/s10067-009-1222-z](https://doi.org/10.1007/s10067-009-1222-z)

VAN DER BURGH, R, NM TER HAAR, ML BOES a J FRENKEL, 2013. Mevalonate kinase deficiency, a metabolic autoinflammatory disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* [online]. roč. 147, č. 3, s. 197–206. ISSN 15217035. Dostupné z: [doi:10.1016/j.clim.2012.09.011](https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.09.011)

VAN DER MEER, JWM, JM VOSSSEN, J RADL, JA VAN NIEUWKOOP, CJ MEYER, S LOBATTO a R VAN FURTH, 1984. Hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever: a new syndrome. *Lancet* [online]. roč. 1, č. 0140-6736 (Print), s. 1087–1090. ISSN 0140-6736. Dostupné z: [doi:10.1016/S0140-6736\(84\)92505-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)92505-4)

VIGO, G, G MARTINI, S ZOPPI, F VITTADELLO a F ZULIAN, 2011. Tonsillectomy efficacy is comparable to the standard medical treatment in PFAPA syndrome. *Pediatric Rheumatology* [online]. roč. 9. ISSN 1546-0096. Dostupné z: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L70985382\&nhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=15460096&id=doi:&atitle=Tonsillectomy+efficacy+is+comparable+to+the+standard+medical+treatment+in+PFAPA+syndrome&stitle=Pe>

VLKOVÁ, M, E FRONKOVÁ, V KANDEROVÁ, A JANDA, S RUZICKOVÁ, J LITZMAN, A SEDIVÁ a T KALINA, 2010. Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naive human B cells marked by CD24 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [online]. roč. 185, č. 11, s. 6431–6438. ISSN 1550-6606. Dostupné z: [doi:10.4049/jimmunol.0903876](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903876)

WANG, C, P HILLSAMER a CH KIM, 2011. Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. *BMC Immunol.* roč. 12, č. 53.

WILLIAMSON, LM, D HULL a R MEHTA, 1982. Familial hibernian fever. *Quarterly Journal of Medicine* [online]. roč. 51, č. 204, s. 469–480. ISSN 0033-5622. Dostupné z: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L13224401\&nhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=&id=doi:&atitle=Familial+hibernian+fever&stitle=Q.+J.+MED.&title=Quarterly+Journal+of+Medicine&volume=51&issue=204&spage=4>

WURSTER, VM, JG CARLUCCI, HM FEDER a KM EDWARDS, 2011. Long-term follow-up of children with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. *Journal of Pediatrics* [online]. roč. 159, č. 6, s. 958–964. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2011.06.004

YEH, ET, 2005. A new perspective on the biology of C-reactive protein. *Circ Res*. roč. 97, č. 7, s. 609–11.

YOUNES, M, MF KAHN a O MEYER, 2002. Hip involvement in patients with familial Mediterranean fever. A review of ten cases. *Joint Bone Spine* [online]. roč. 69, č. 6, s. 560–565. ISSN 1297-319X. Dostupné z: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L36050357>[http://dx.doi.org/10.1016/S1297-319X\(02\)00452-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1297-319X(02)00452-9)[http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=1297319X&id=doi:10.1016/S1297-319X\(02\)00452-9&atitle=Hip+involvement+in+p](http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=1297319X&id=doi:10.1016/S1297-319X(02)00452-9&atitle=Hip+involvement+in+p)

YU, JW, J WU, Z ZHANG, P DATTA, I IBRAHIMI, S TANIGUCHI, J SAGARA, T FERNANDES-ALNEMRI a ES ALNEMRI, 2006. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ* [online]. roč. 13, č. 2, s. 236–249. ISSN 1350-9047. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4401734

ZEMER, D, M PRAS, E SOHAR, M MODAN, S CABILI a J GAFNI, 1986. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *The New England journal of medicine* [online]. roč. 314, č. 16, s. 1001–5. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM198604173141601

9. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace k tématu dizertační práce

S IF:

KROL, P, M BOHM, V SULA, P DYTRYCH, R KATRA, D NEMCOVA a P DOLEZALOVA, 2013. PFAPA syndrome: clinical characteristics and treatment outcomes in a large single-centre cohort. *Clin Exp Rheumatol* [online]. roč. 31, č. 6, s. 980–987. (IF 2.724)

DYTRYCH, P, P KROL, M KOTROVA, D KUZILKOVA, P HUBACEK, L KROL, R KATRA, O HRUSAK, Z KABELKA, P DOLEZALOVA, T KALINA a E FRONKOVA, 2015. Polyclonal, newly derived T cells with low expression of inhibitory molecule PD-1 in tonsils define the phenotype of lymphocytes in children with Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis (PFAPA) syndrome. *Mol Immunol*. roč. 65, č. 1, s. 139–47. (IF 2.973)

HOFER, M, P PILLET, MM COCHARD, S BERG, P KROL, I KONE-PAUT, D RIGANTE, V HENTGEN, J ANTON, R BRIK, B NEVEN, I TOUITOU, D KAISER, A DUQUESNE, C WOUTERS a M GATTORNO, 2014. International periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome cohort: Description of distinct phenotypes in 301 patients. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. roč. 53, č. 6, s. 1125–1129. (IF 4.435)

BEZ IF:

KRÓL P a P DOLEŽALOVÁ, 2013. Recidivující febrilie u dětí. *Pediatr. praxi*. roč. 14, č. 4, s. 221-224.

KRÓL P a DOLEŽALOVÁ P, 2011. Horečka jako hlavní projev nemoci. *Pediatr. praxi*. roč. 12, č. 2, s. 111-114.

DOLEŽALOVÁ P a P KRÓL, 2010. Recidivující horečky u dětí. *VOX Paediatricae*. roč. 10, č. 3, s.16-20.

KRÓL P, KATRA R, DOLEŽALOVÁ P, 2009. Syndromy periodických horeček. *Čes.-slov. Pediat*. roč. 64, č. 10, s. 480-487

Publikace bez vztahu k dizertační práci

S IF:

NISTALA K, VARSANI H, WITTKOWSKI H, VOGL T, KROL P, SHAH V, MAMCHAOUI K, BROGAN PA, ROTH J, WEDDERBURN LR, 2013. Myeloid related protein induces muscle derived inflammatory mediators in juvenile dermatomyositis. *Arthritis Res Ther*. roč. 15, č. 5, s. R131. (IF 4.120)

DOLEZALOVA P, PRICE-KUEHNE FE, OZEN S, BENSELER SM, CABRAL DA, ANTON J, BRUNNER J, CIMAZ R, O'NEIL KM, WALLACE CA, WILKINSON N, ELEFThERIOU D, DEMIRKAYA E, BOHM M, KROL P, LUQMANI RA, BROGAN PA, 2013. Disease activity assessment in childhood vasculitis: development and preliminary validation of the Paediatric Vasculitis Activity Score (PVAS). *Ann Rheum Dis*. roč. 72, č. 10, s. 1628-33. (IF 9.270)

FMARTIN N, KROL P, SMITH S, MURRAY K, PILKINGTON CA, DAVIDSON JE, WEDDERBURN LR: Juvenile Dermatomyositis Research Group, 2011. A national registry for juvenile dermatomyositis and other Paediatric idiopathic inflammatory myopathies: 10 years' experience: the Juvenile Dermatomyositis National (UK and Ireland) Cohort Biomarker Study and Repository for Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Rheumatology (Oxford)*. roč. 50, č. 1, s. 137-45. (IF 4.435)

MARTIN N, KROL P, SMITH S, BEARD L, PILKINGTON CA, DAVIDSON J, WEDDERBURN LR: Juvenile Dermatomyositis Research Group, 2012. Comparison of children with onset of juvenile dermatomyositis symptoms before or after their fifth birthday in a UK and Ireland juvenile dermatomyositis cohort study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. roč. 64, č. 11, s. 1665-72. (IF 4.039)

BEZ IF:

KRYŠTŮFKOVÁ O, HULEJOVÁ H, KRÓL P, PAVELKA K, ŠENOLT L, VENCOVSKÝ J, 2011. Elevation of NK a NKT cells in patients with rheumatoid arthritis after rituximab therapy. *Rheumatologia*. roč. 25, č.1, s. 21-27.

10. PODĚKOVÁNÍ

Moje největší poděkování patří celé mé rodině, zejména mým dětem a manželovi za jejich velkou podporu a pomoc.

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. MUDr. Pavle Doležalové, CSc. z Kliniky dětského a dorostového lékařství, 1. LF UK a VFN, za inspirující vedení, pomoc při postgraduálním studiu a profesním růstu.

Dále můj dík patří Prof. MUDr. Jiřímu Zemanovi, DrSc, přednosta KDDL, a MUDr. Pavlu Frühaufovi, CSc., primář KDDL, za podporu a umožnění všech stáží, a to včetně studijních pobytů v Revmatologickém ústavu 1. LF UK a VFN a Institute of Child Health, UCL, Londýn. V souvislosti s těmito pobyty bych ráda poděkovala Prof. MUDr. Jiřímu Vencovskému, DrSc., MUDr. Olze Kryštůfkové a kolektivu Revmatologického ústavu za skvělé vedení, pomoc a spolupráci při optimalizaci metody měření cytokinů pomocí CBA. Dále bych chtěla poděkovat Prof. Dr. Paulovi Broganovi PhD a jeho kolektivu v Institute of Child Health, UCL London, za rozšíření mého obzoru v oblasti studia nových imunologických metod (cirkulující endoteliální buňky, nové metody měření cytokinů), za jejich dlouholetou podporu a spolupráci.

Děkuji MUDr. Ladislavovi Królovi, MUDr. Evě Froňkové PhD. a Danielu Thurnerovi z laboratoří CLIP, 2. LF UK za spolupráci v cytometrické části projektu a MUDr. Petře Dytrych a MUDr. Ramimu Katrovi z Kliniky dětské ORL, 2. LF UK a FN Motol za provedení tonzilektomií a zpracování tonzilární tkáně. Děkuji Ing. Janu Kopečnému, DrSc. a Ing. Jakubovi Mrázkovi PhD. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, AVČR a MUDr. Petrovi Hubáčkovi PhD. z Mikrobiologického ústavu 2. LF UK a FN Motol za spolupráci v mikrobiologické části projektu (PCR-DGGE bakterií a PCR virů).

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu zdravotních sester z KDDL za jejich pomoc a ochotu při odběru a manipulaci se vzorky a všem kolegům za podporu v mé práci. Ráda bych poděkovala pacientům a jejich rodičům za účast ve studii, protože bez nich by tento projekt nebylo možné realizovat.

Projekt by nebylo možné realizovat bez finanční podpory následujících institucí: grant GAUK (52608/2008), grant GAČR (305/08/H037) a grant GAUK č.266411.

11. PŘÍLOHY

Součástí přílohy jsou publikace k tématu dizertační práce.

Seznam příloh

1) Dotazník horeček

2) KROL, P, M BOHM, V SULA, P DYTRYCH, R KATRA, D NEMCOVA a P DOLEZALOVA, 2013. PFAPA syndrome: clinical characteristics and treatment outcomes in a large single-centre cohort. *Clin Exp Rheumatol* [online]. roč. 31, č. 6, s. 980–987.

3) D DYTRYCH, P, P KROL, M KOTROVA, D KUZILKOVA, P HUBACEK, L KROL, R KATRA, O HRUSAK, Z KABELKA, P DOLEZALOVA, T KALINA a E FRONKOVA, 2015. Polyclonal, newly derived T cells with low expression of inhibitory molecule PD-1 in tonsils define the phenotype of lymphocytes in children with Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis (PFAPA) syndrome. *Mol Immunol*. roč. 65, č. 1, s. 139–47.

4) HOFER, M, P PILLET, MM COCHARD, S BERG, P KROL, I KONE-PAUT, D RIGANTE, V HENTGEN, J ANTON, R BRIK, B NEVEN, I TOUITOU, D KAISER, A DUQUESNE, C WOUTERS a M GATTORNO, 2014. International periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome cohort: Description of distinct phenotypes in 301 patients. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. roč. 53, č. 6, s. 1125–1129.



Klinika dětského a dorostového lékařství UK 1. LF a VFN
Ambulance periodických horeček
Ke Karlovu 2
121 08 Praha 2
tel.: 224 967 798

PFAPA dotazník

Milí rodiče,
prosíme Vás o pečlivé vyplnění tohoto dotazníku, který je součástí studie zabývající se optimalizací diagnosticko-terapeutických kritérií periodické horečky PFAPA.

1. začátek onemocnění			
a) začátek příznaků v měsících věku			
b) jaké byly příznaky na začátku onemocnění			
<input type="checkbox"/> horečka	<input type="checkbox"/> angína	<input type="checkbox"/> zvětšené uzliny	<input type="checkbox"/> afty
<input type="checkbox"/> bolesti hlavy	<input type="checkbox"/> bolesti břicha	<input type="checkbox"/> zvracení	<input type="checkbox"/> průjem
<input type="checkbox"/> kožní vyrážka	<input type="checkbox"/> zánět spojivek	<input type="checkbox"/> bolesti svalů	<input type="checkbox"/> bolesti kloubů
<input type="checkbox"/> únava	<input type="checkbox"/> nechutenství	<input type="checkbox"/> další.....	
c) jaké příznaky jsou nyní			
<input type="checkbox"/> horečka	<input type="checkbox"/> angína	<input type="checkbox"/> zvětšené uzliny	<input type="checkbox"/> afty
<input type="checkbox"/> bolesti hlavy	<input type="checkbox"/> bolesti břicha	<input type="checkbox"/> zvracení	<input type="checkbox"/> průjem
<input type="checkbox"/> kožní vyrážka	<input type="checkbox"/> zánět spojivek	<input type="checkbox"/> bolesti svalů	<input type="checkbox"/> bolesti kloubů
<input type="checkbox"/> únava	<input type="checkbox"/> nechutenství	<input type="checkbox"/> další.....	
d) očkování a případné reakce po očkování			
<input type="checkbox"/> TBC	reakce: <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne		
jaká.....			
<input type="checkbox"/> hexavakcína	reakce: <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne		
jaká.....			
<input type="checkbox"/> spalničky, zarděnky, příušnice	reakce: <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne		
jaká.....			
<input type="checkbox"/> záškrt, tetanus, dáivý kašel	reakce: <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne		
jaká.....			
<input type="checkbox"/> dětská obrna	reakce: <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne		
jaká.....			
<input type="checkbox"/> hepatitida B	reakce: <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne		
jaká.....			
<input type="checkbox"/> jiné.....	reakce: <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne		
jaká.....			

e) prodělaná infekční onemocnění (kdy a jaká)

streptokoková angína kdy? prokázána výtěrem ano
 ne
léčena antibiotiky ano ne jakými?

zápal plic (pneumonie) kdy? prokázána RTG ano
 ne
léčen antibiotiky ano ne jakými?.....

Zaškrtnutí políčko je správně vyplněno, vypadá-li takto:

zánět středního ucha kdy? prokázáný ORL vyš.
 ano ne
léčen antibiotiky ano ne jakými?.....

zánět dutin kdy? prokázáný RTG
 ano ne
léčen antibiotiky ano ne jakými?

infekce močových cest kdy? prokázána kultivací ano ne
léčena antibiotiky ano ne jakými?

zánět ledvin kdy? prokázáný kultivací ano ne
léčen antibiotiky ano ne jakými?

infekční průjem kdy? prokázáný kultivací ano ne
léčen antibiotiky ano ne jakými?

f) další onemocnění

artritida lupénka

2. průběh horečky

a) interval mezi horečkami dny týdny měsíce

b) trvání horečky dny týdny

c) maximální horečka °C, naměřena v hodin

d) hlavní příznaky

angína při každé horečce? ano ne když ne, jak často?.....
 afty při každé horečce? ano ne když ne, jak často?.....

zvětšené uzliny při každé horečce? ano ne když ne, jak často?.....

e) vedlejší příznaky

- bolest hlavy při každé horečce? ano ne
když ne, jak často?.....
- zvracení při každé horečce? ano ne
když ne, jak často?.....
- bolest břicha při každé horečce? ano ne
když ne, jak často?.....
- průjem při každé horečce? ano ne
když ne, jak často?.....
- kožní vyrážka při každé horečce? ano ne
když ne, jak často?.....
- zánět spojivek při každé horečce? ano ne
když ne, jak často?.....
- bolesti kloubů při každé horečce? ano ne
když ne, jak často?.....
- bolesti svalů při každé horečce? ano ne
když ne, jak často?.....

Zaškrtnutí políčko je správně vyplněno, vypadá-li takto:

3. průběh v období mezi horečkami

a) má dítě některý z těchto příznaků

- angína zvětšené uzliny afty bolesti hlavy
- bolesti břicha zvracení průjem kožní vyrážka
- zánět spojivek bolesti svalů bolesti kloubů únava
- další
-
-

b) má dítě chuť k jídlu? ano ne

c) přibývá dítě na váze? ano ne

d) maximální teplota °C, naměřená v mezidobí

4. sledování

a) je dítě v horečce kontrolováno obvodním pediatrem? ano ne

b) je dítě v každé atace horečky kontrolováno obvodním pediatrem? ano ne

c) jsou při každé atace provedeny výtěry z krku? ano ne

d) kolikrát v životě bylo dítě léčeno antibiotiky?krát
e) jsou antibiotika podávána při každé atace horečky?	<input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne

5. zařazení do kolektivu	
a) je dítě zařazeno do kolektivu? <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne	když ano, jak často?.....
b) kolik dní v měsíci je dítě nepřítomno ve školce/škole?dní

6. rodinná anamnéza	
a) hořčnaté onemocnění v dětství u některého z rodinných příslušníků? <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne	pokud ano, jaké a u koho?
b) opakované angíny v dětství? <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne	když ano, u koho?.....
c) opakované infekce? <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne	pokud ano, jaké a u koho?
d) kožní onemocnění? <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne	pokud ano, jaké a u koho?
e) kloubní onemocnění? <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne	pokud ano, jaké a u koho?
f) další onemocnění? <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne	pokud ano, jaké a u koho?

PFAPA syndrome: clinical characteristics and treatment outcomes in a large single-centre cohort

P. Król¹, M. Böhm¹, V. Šula², P. Dytrych³, R. Katra³, D. Němcová¹, P. Doležalová¹

¹Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic; ²Department of Paediatrics, Hospital České Budějovice, Czech Republic; ³Department of ENT, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic.

Abstract

Objectives

This paper aims to describe clinical and laboratory features and disease outcome in a single-centre cohort of patients with PFAPA syndrome (Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis, and Adenitis) and to test performance of diagnostic and therapeutic algorithms.

Methods

Patients fulfilling criteria were selected from the fever clinic population. Prospective follow-up together with recruitment of newly diagnosed patients followed pre-defined guidelines. Diagnostic and therapeutic algorithms and definitions of outcome and therapy response were formulated. Paired blood samples during febrile and afebrile periods were compared.

Results

Out of 176 patients referred for suspected periodic fever 125 children fulfilled criteria. Their age at onset was 23 months, median episode duration 3.5 days at 4-week intervals. Fever was associated with pharyngitis (91%), cervical adenitis (78%) and aphtae (41%). Among therapeutic options, episodic prednisone proved to be the most common first-line treatment. Administered to 77 patients, it reduced symptoms in 94%. Tonsillectomy led to the full symptom resolution in all 18 patients. Forty-six patients reached disease remission.

Conclusion

Distribution of typical symptoms, response to therapies and disease outcome in a large patient cohort were documented. We offer diagnostic and therapeutic algorithms that have proven effective during this prospective trial. Our findings support the general belief of benign nature of this aetiologically unclear condition, despite proportion of patients having persistent disease for years. Maintenance of normal findings in afebrile intervals, striking response to a single dose of prednisone and normal growth and development together with spontaneous tendency towards prolongation of afebrile intervals are important confirmatory features of PFAPA syndrome.

Key words

periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis syndrome, diagnostic algorithm, outcome

Petra Król, MD
Marek Böhm, MD, PhD
Viktor Štula, MD
Petra Dytrych, MD
Rami Katra, MD
Dana Němcová, MD
Pavla Doležalová, MD, PhD, Prof.

Please address correspondence
and reprint requests to:

Dr Pavla Doležalová, PhD,
Prof. of Paediatrics,
Department of Paediatrics and Adolescent
Medicine, 1st Faculty of Medicine,
Charles University,
Ke Karlovu 2,
12100 Prague 2, Czech Republic.
E-mail: dolezalova.pavla@vfn.cz

Received on November 4, 2012; accepted
in revised form on April 11, 2013.

© Copyright CLINICAL AND
EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2013.

Funding: this work was supported by
the Charles University Grant no. GAUK
52608/2008.

Competing interests: none declared.

Introduction

Recurrent fever in childhood often presents a differential diagnostic puzzle. Besides well-recognised entities such as infections, immune deficiencies, idiopathic inflammatory and neoplastic disorders, autoinflammatory diseases have become an important player. While monogenic periodic fevers can be confirmed by molecular-genetic analysis, syndrome of Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis and cervical Adenitis (PFAPA) is a clinical entity diagnosis which requires exclusion of other potential causes of recurrent fever (1-3). In a preschool child, regular short (3–6 days) febrile episodes are accompanied by at least one of: culture-negative tonsillopharyngitis, oral aphthae and cervical lymphadenitis. Additional features such as fatigue, headache, nausea, vomiting, abdominal pain or arthralgia may occur (4-6). Affected children are healthy between attacks (5). Elevation of non-specific inflammatory parameters during attacks can barely differentiate PFAPA syndrome from infections as well as other inflammatory and neoplastic disorders. Its diagnosis is based on clinical symptoms according to the Marshall's criteria, later modified by Hofer *et al.* (Table I) (2, 5, 7). Antibiotics do not change the course of the febrile attack which is typically aborted by a single dose of prednisone (4, 5, 8). Other treatment options include cimetidine, colchicine and tonsillectomy (9-13).

In this study, we aimed to analyse clinical and laboratory features as well as disease outcome of patients attending our fever clinic with a diagnosis of PFAPA syndrome. Testing the performance of pre-defined diagnostic and therapeutic algorithms was our secondary objective.

Patients and methods

Patients

Consecutive patients referred to the fever clinic of Paediatric Rheumatology Unit, General University Hospital in Prague for suspected periodic fever were considered for recruitment. In the retrospective part of the study charts of patients referred during 2004–2007 were reviewed. Prospective data col-

lection was conducted from January 2008 to July 2011. In order to become eligible to enter the prospective part, patients must have had at least 3 fever episodes over the previous 6 months. Clinical diagnosis of PFAPA syndrome was the main inclusion criterion. The study was approved by the institutional Ethics Committee and informed consent was obtained from parents/guardians of all participants.

Diagnostic algorithm

– Medical history

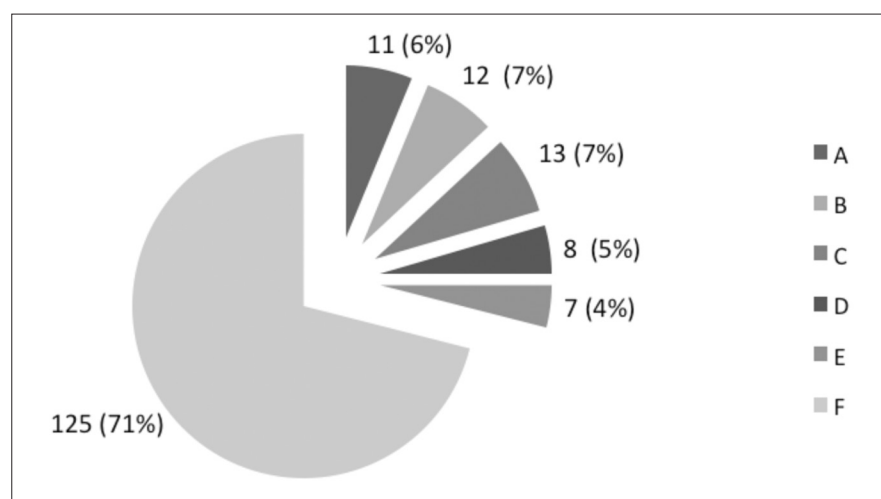
Patient and family history was a major diagnostic component. Data were collected by 2 means. A questionnaire was administered to parents at the first clinic visit or via email prior to the appointment. Parents were advised to consult their child's primary care physician for data they were not able to supply. Family history of recurrent fevers, reaction to vaccinations, overall infectious morbidity, age at onset of periodic fevers, detailed description of typical presentations and duration of afebrile interval were of particular importance.

– Initial clinical evaluation

Existing modified diagnostic criteria (7) were applied in order to establish the working diagnosis of PFAPA syndrome (Table I). Where neutrophil count (to exclude cyclic neutropenia) and throat culture results (at least 2 negative) were not available they became part of the investigations list. Acute inflammatory parameters included ESR, CRP and serum amyloid A (SAA), screening for immune deficiencies consisted of the full blood count with differential, serum immune globulins and antibodies against vaccination antigens. Serum IgD and A concentrations and mevalonic acid in urine collected on the first day of the febrile episode were used as a screening for Hyper-IgD Syndrome (HIDS). Where appropriate, further laboratory tests and imaging were applied to exclude other diseases. When the child displayed features suggestive of a monogenic fever, DNA analysis was requested. An experienced physician (PD, PK) confirmed the final diagnosis of PFAPA syndrome upon review of all above information.

Table I. Modified diagnostic criteria for PFAPA syndrome (7).

- 1) Regularly recurring fevers with an early age of onset (<5 years of age).
- 2) Constitutional symptoms in the absence of upper respiratory tract infection with at least 1 of the following clinical signs:
 - a) aphthous stomatitis;
 - b) cervical lymphadenitis;
 - c) pharyngitis;
- 3) Exclusion of cyclic neutropenia.
- 4) Completely asymptomatic interval between episodes.
- 5) Normal growth and development.
- 6) Exclusion of monogenic periodic fevers mainly in patients with gastrointestinal symptoms and rash.

**Fig. 1.** Distribution of patients with periodic fever syndromes in our cohort: n (%):

- A: Genetically confirmed monogenic periodic fevers
 B: Suspected monogenic fevers with negative DNA analysis
 C: Suspected monogenic fevers with pending genetic results
 D: Low serum IgA
 E: Recurrent infections
 F: PFAPA syndrome

– Laboratory tests

In the prospective part of the study, blood sampling was performed twice: during the typical fever episode and at afebrile interval. Timing of the “febrile” blood test was within 48 hours from fever ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$) onset, prior to the corticosteroid administration. “Afebrile” tests were performed at least 14 days after the most recent fever detected. For detection of mevalonate and its metabolites urine was collected over 12–24 hours of the first day of the episode. CRP, ESR, full blood count (FBC) and SAA were measured using routine methodologies. Mevalonuria was quantified using capillary gas chromatography/mass spectrometry, the commonly used method for profiling urinary organic acids, with cut-off values for mevalonolacton and mevalonate/creatinine ratio of 0.01 and 0.001 mg/g, respectively.

Therapeutic algorithms and disease assessment

At the time of diagnosis patients were offered the following options: a) watch-and-wait with antipyretics as required; avoidance of antibiotics was recommended; b) prednisone in a single dose of 1 mg/kg or its equivalent administered within up to 24 hours from fever onset; c) other conservative treatment options (cimetidine, colchicine); and d) tonsillectomy. Parents received the printed form (“fever diary”) and were instructed to record fevers, associated symptoms and treatments administered. Assessment of the drug treatment efficacy was based on the interval from administration to symptom resolution and on duration of the upcoming afebrile interval. Full response was defined as a complete resolution of all symptoms within up to 12 hours. In partial

responders the full effect was reached within 24–48 hours with or without the need for an additional prednisone dose. Responders (both full and partial) must have remained symptom-free for at least 2 weeks following treatment and a similar response must have been noticed in the majority of typical attacks. Patients in whom full resolution was not achieved or who had an early fever recurrence in a minimum of 2 treated PFAPA episodes or who had differing responses in more than 50% of typical episodes were considered non-responders.

For the purpose of clinical status and outcome evaluation the following definitions were applied: active disease, characterised by typical recurrent fever attacks at least every 2–6 weeks over the 3 months prior to the assessment; and full remission, with a minimum of 12-month fever-episode free interval (10). Infections with features different from prior PFAPA episodes were not considered.

Statistical analysis

Descriptive statistics for the characterisation of the population was expressed in median (range). The nonparametric Mann-Whitney U-test was used for comparisons between febrile episodes and afebrile intervals. *p*-values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

Patients with periodic fever syndromes
 Total of 176 patients were referred for suspected periodic fever. The distribution of their diagnoses is shown in Figure 1. Only 125 patients with the final diagnosis of PFAPA syndrome underwent further analysis.

Clinical characteristics of children with PFAPA syndrome

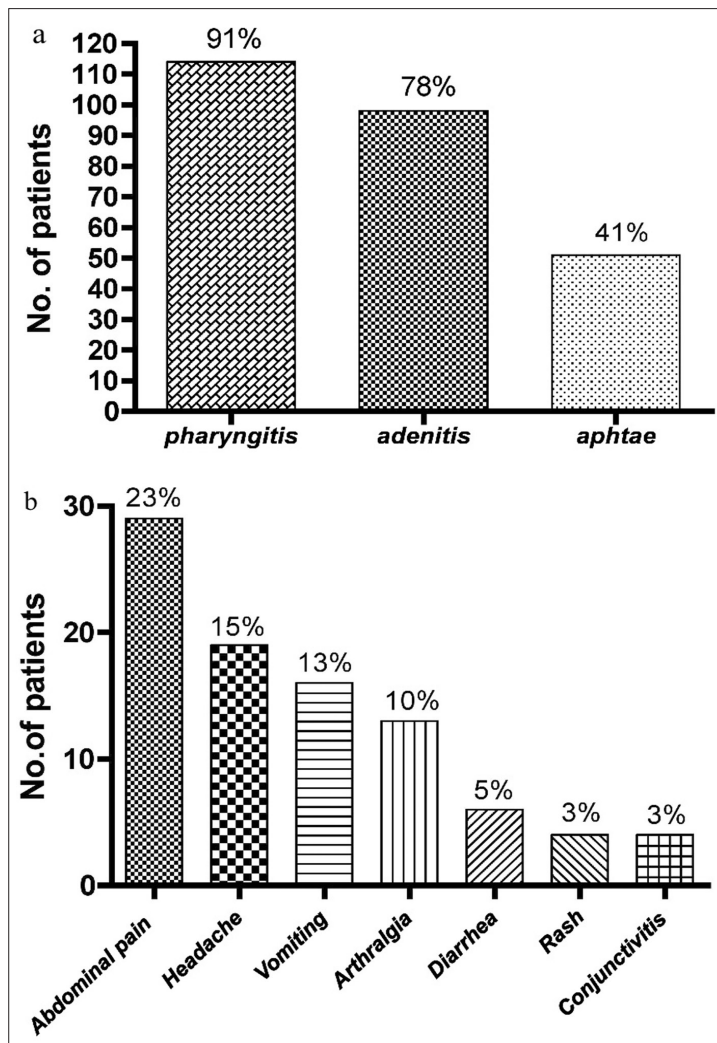
All children with PFAPA syndrome (n=125; 63 boys) were Caucasians of the Czech origin. Of 59 patients (47%) with positive family history, recurrent fevers and/or tonsillitis in pre-school age were reported mainly in one of the parents (49/59), in remaining 10 patients their siblings or grandparents were affected. In 11 parents, tonsillec-

tomy in early childhood lead to complete resolution of symptoms, while 38 parents reported spontaneous remission during childhood. None of family members displayed features suggestive of ongoing periodic syndrome.

In 31 patients, diagnosis was made prior to the onset of prospective data collection, 94 were enrolled prospectively. From the prospective cohort, 70% of patients were seen at least once during both febrile episode and afebrile interval at our clinic. Remaining patients were seen at afebrile interval and brought results of their physical examination and laboratory tests in febrile episode from their local physician. Clinical findings as reported by parents were systematically recorded during the follow-up visits together with growth and developmental data. Patients were usually seen in 3–6-month intervals during the first year and then in prolonged intervals until their disease fully subsided.

Median age at the first manifestation was 23 months (range 6–60), with median interval between attacks of 4 weeks (range 2–6) and fever duration 3.5 days (range 2–6), with maximal fever 39.5°C. Regularity of episodes (predictability within ± 1 week) was reported in approximately 58% of patients. Median age at diagnosis was 27 months (range 18–58), interval between onset and diagnosis ranged between 6 to 64 months (median 20). Distribution of individual clinical features is shown in Figure 2a. In the majority of cases, throat findings were described as “exudative” tonsillopharyngitis. Cervical lymphadenopathy was defined as the size of upper anterior cervical lymph nodes ≥ 1 cm in diameter and/or significant enlargement from the previous examination. A minority of patients in whom pharyngitis was not observed (9%) had either cervical lymphadenopathy or oral aphtae or combination of both usually with non-specific symptoms such as mood change, fatigue or decreased appetite. The presence of other than the main diagnostic features noticed in the majority of episodes is shown in Figure 2b. At afebrile intervals, all patients had normal physical findings, including physiological appearance of tonsils with no

Fig. 2. Presence of the (a) main and (b) other symptoms in 125 patients with PFAPA syndrome.



signs suggestive of chronic tonsillitis. Normal linear growth and development were noticed during the follow-up in all children.

All 125 PFAPA patients had elevated non-specific inflammatory parameters – median CRP 73 mg/l (range 10–359), ESR 35 mm/hour (range 7–95) and WBC 13.10⁹/L (range 3.8–24) – at febrile episodes and reported their subsequent normalisation. Figure 3 illustrates a drop in these parameters as well as SAA in 35 patients, where paired blood samples in fever episode and in afebrile interval were prospectively collected.

Therapy

Episodic prednisone administration in a single dose of 0.8–1.2 mg/kg at fever onset was the most frequently used therapeutic option. Out of 77/125 patients (62%) treated, 72 (94%) were responders. Full response was noticed

in 60 (83%), while 12 patients had partial response. A second prednisone dose was needed in 5 of these patients. About 10% of patients receiving prednisone observed mood change or fatigue lasting 2–3 days after prednisone administration, despite resolution of fever and mucosal symptoms. Shortening of afebrile intervals (to no less than 2 weeks) following prednisone administration occurred in 11 children (14%) and led to discontinuation of this treatment in 3 of them. Two subsequently received colchicine (0.5 mg/day), which reduced severity and frequency of febrile attacks but was not able to induce remission. Of 5 prednisone non-responders, 2 children did not attain full symptom resolution and in 3 cases after initial resolution typical PFAPA symptoms returned within 1 week from the administration. In these cases, clinical re-assessment of

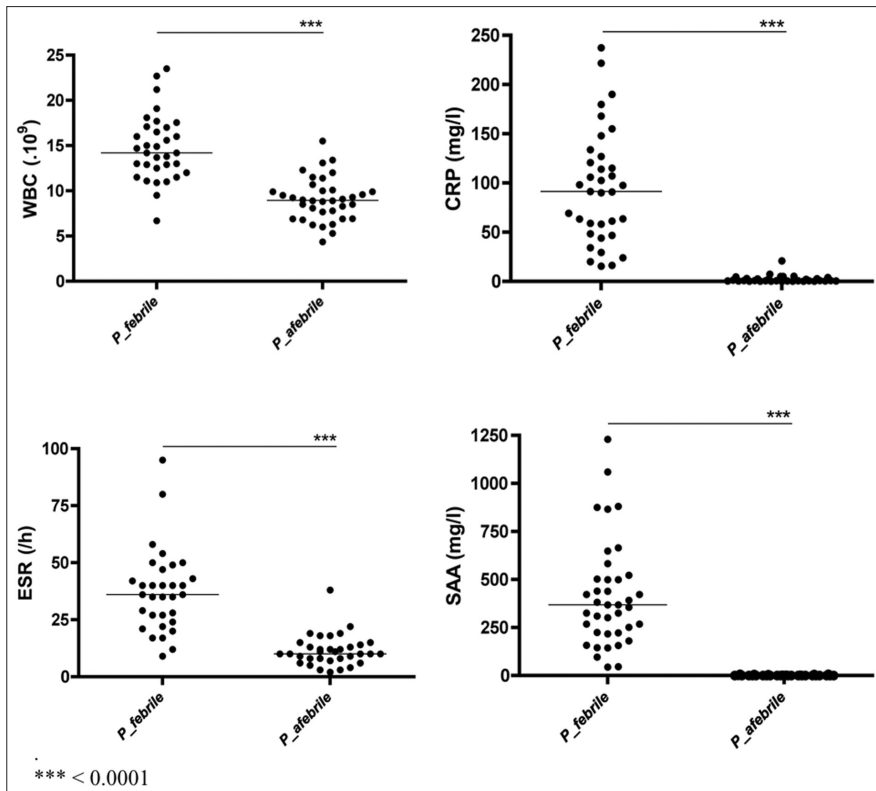


Fig. 3. Inflammatory parameters in patients with PFAPA syndrome (P) in febrile vs. afebrile condition.

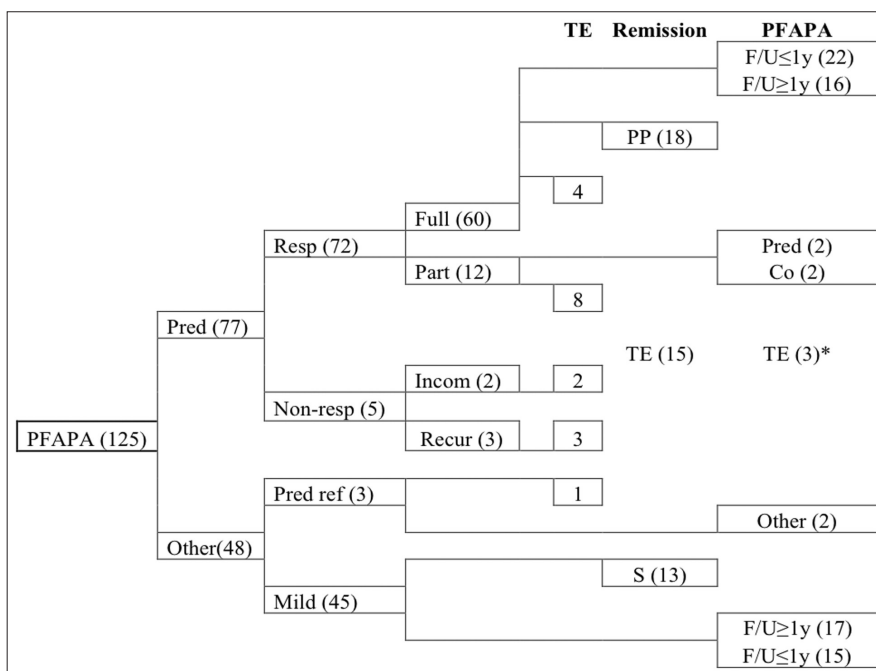


Fig. 4. Overview of distribution of patients according to the therapy effect and disease outcome. Pred: prednison; Co: colchicine; Other: other therapy; Resp: responders; Non-resp: non-responders; Pred ref: prednisone refusal; Mild: mild phenotype; Part: partial; Incom: incomplete; Recur: early recurrence; PP: post-prednisone remission; TE: post-tonsillectomy remission; S: spontaneous remission; F/U $\geq 1y$: follow-up more than one year; F/U $\leq 1y$: follow-up less than one year.

possible infectious cause was always performed and it was negative (Fig. 4). None of the patients received cime-

tidine. In addition, from two fever episodes in two different patients, pyogenic streptococcus was cultured from

the throat swab performed just before prednisone administration in one case and at the recurrence of low-grade fever the day after prednisone administration in the other. In both cases, penicillin treatment was then given with full resolution of symptoms. In other 8 patients, single episodes of insufficient prednisone response were subsequently re-assessed as a consequence to the parents' incorrect evaluation of that particular fever episode which subsequently evolved features of upper respiratory tract infection (URTI). The majority of parents who opted for episodic prednisone administration used it on the basis of their own decision. In the majority of cases, prednisone was not administered in all typical episodes, mainly when parents had doubts about the possible presence of URTI. Children with a higher frequency of typical episodes often received prednisone in every other episode in order to avoid any potential risk of corticosteroid side effects. Our general recommendation was to avoid regular long-term dosing in intervals shorter than 3–4 weeks.

Parents of 48/125 patients (38%) opted for other treatment modalities. In the majority of them, the “watch-and-wait” approach with episodic antipyretic treatment was an agreement between the family and the treating physician based on the mild disease course (short-lasting attacks up to 3 days, afebrile intervals >6 weeks). The parents of 3 patients refused prednisone treatment in principle. The response to antipyretics was short-lived requiring repeated dosing. The natural course of episodes remained unchanged.

In a total of 18 children (14%) tonsillectomy was performed after median of 34 months (range 5–48) from the diagnosis. In 8 of them, overall disease duration and/or episode frequency were considered a significant burden hardly acceptable for the family. In 4 patients, the surgical option was chosen because afebrile intervals shortened after prednisone administration. All 5 prednisone non-responders opted for tonsillectomy while one family preferred tonsillectomy, as a first line treatment. In all 18 patients, tonsillectomy led to the full resolution of symptoms imme-

diately after the procedure. Fifteen patients (83%) reached the full remission, while 3 were followed for less than one year after tonsillectomy at the time of the data analysis. In 2 cases, recurrent fevers similar to the previous PFAPA episodes re-appeared after 12 and 14 months post tonsillectomy. The first patient had 8 febrile attacks over 16 months that differed from the pre-tonsillectomy episodes by the presence of abdominal symptoms. Originally, prednisone non-responder, in post-tonsillectomy relapse he responded fully to episodic prednisone administration. In the second patient, PFAPA-like episodes of lower frequency than before were managed successfully with antipyretics and occasional prednisone administration. At the most recent clinic visit 21 and 10 months from the relapse onset, respectively, both children had a prolonged afebrile period (5 and 6 months, respectively), suggesting upcoming remission.

Overview of the outcome

The median follow-up time was 25 months (2–60). The median disease duration at the time of the last follow-up was 8 months (6–57). Ninety-four patients (75%) were followed for longer than 12 months. Out of these, 46 patients (49%) reached the full remission, in 15 cases after tonsillectomy. There was no difference in the remission rate between patients who were untreated (n=13) and those who were taking episodic prednisone (n=18). Median disease duration prior to the PFAPA resolution was 17 months (8–58) in the whole remission group. Clinical characteristics of patients who reached remission did not differ from the rest of the cohort.

The remaining 48 patients followed for over 1 year continued to have recurrent PFAPA episodes. Their median disease duration was 45 months (range 18–72) from the onset to the last visit. Their clinical characteristics, namely the presence of other than oropharyngeal symptoms, did not differ from the remission group (data not shown). During the follow-up, none of them developed other diseases explaining their symptoms.

Discussion

The number of publications have raised awareness of PFAPA syndrome among paediatricians of various subspecialties and led to its better recognition. Although its aetiopathogenesis remains unclear and laboratory confirmation is not available, existing modification of clinical criteria and careful history have become the most important diagnostic factors. Since the establishment of the “fever clinic” as a part of the paediatric rheumatology service at our Department in 2004, the number of patients referred for recurrent fevers increased more than 10 times.

Unlike other studies, we report the so far largest single-centre experience with this generally most common periodic fever on the background of the wider spectrum of diseases. Since genetic testing had not been available in the Czech Republic, it was performed only in highly suspicious clinically cases at European laboratories mostly as a part of the EUROFEVER project (<http://www.printo.it/eurofever/>). Although we did not apply the recently suggested Gaslini diagnostic score (14), the genetic analysis in patients clinically suspected of hereditary disease yielded 48% positive results.

The diagnosis of PFAPA syndrome was based on the meticulous analysis of the medical history, clinical and laboratory data. Data were collected systematically as a part of a prospective study in patients attending our clinics. Patients were followed long-term, until achievement of disease remission. Therefore, the clinical data represent first-hand information. Majority of published series either combine retrospective chart review, physician or parent questionnaires and prospective clinic and/or telephone follow-up or do not fully describe data collection methodologies (15–18). Our report shows laboratory data in the paired fashion (febrile *versus* afebrile). In order to create as homogeneous as possible cohort, we excluded patients with PFAPA phenotype who exhibited features that might have suggested presence of other diseases. Therefore, children with, for example, abnormal concentration of IgA and/or IgD were excluded. Additionally, in all our patients, urine mevalonic acid was assessed in

order to further reduce the risk of misdiagnosing HIDS. Immunoglobulin concentration is not systematically reported in the published series (14, 18) or has been performed in part of the patients only (5, 16, 17), while mevalonuria is not mentioned in any of them.

Our patients exhibited similar age at onset as well as distribution of the main clinical features as in published series (Table II) (5, 6, 15–18). Abdominal pain was present in a relatively lower proportion of our patients (23%) than in others (5, 14). Also reports on headaches and arthralgia varied. This heterogeneity may be explained by the problematic reliability of reporting and interpreting pain and its localisation in toddlers. Normalisation of SAA levels in afebrile interval supported the idea of the benign nature of PFAPA syndrome in terms of the risk of amyloidosis (19). Our patients had similar extent of elevation of inflammatory parameters as in other studies. (5, 20–22).

Among therapeutic options reported in the literature, single-dose prednisone appears the most popular. In our cohort, it was used in over 60% of cases with generally high success rate. Its use in the published reports is summarised in Table II. We applied objective measures of efficacy assessment that were based on the interval to fever resolution and its subsequent maintenance. Based on these evaluations, the extent of response was defined as “full” or “partial”. Methodology of efficacy evaluation varies among the published series. Our cut-off point for considering prednisone “fully effective” was fever decline within 12 hours from ingestion and maintenance of symptom-free period for at least 2 weeks and this was achieved by 83% of patients treated. This result cannot be directly compared to the published data where means and/or range of the time to fever resolution are presented. Nevertheless, prednisone led to fever deference within the mean of 10 (range 0.5–96) (16) or 2–24 hours (17).

Some authors report the use of additional prednisone doses in case of insufficient response (5, 16, 17). The majority of our patients required only one prednisone dose to achieve the full response. We generally did not recom-

Table II. Characteristics of febrile episodes in children with PFAPA syndrome in different studies.

Publication year	Study	n	Onset (m)	Time from O to R	F/U	Therapy						FH (n)		
						Pred		TE		CI/CO				
						n/%	Effect+	n/%	Effect+	n/%	Effect+			
Wurster <i>et al.</i>	2011	R	60	32	6.3 years	12–21 years	44/73	42	2/3	NA	CI 25/42	CO 2/3	12/1	6
Feder <i>et al.</i>	2010	R	105	39.6	33.2 months	NA	72/69	70	11/10	11	CI 26/25		7	NA
Tasher <i>et al.</i>	2006	R	54	23	NA	2.2 years	48/89	48	6/11	6	NA	NA	NA	NA
Thomas <i>et al.</i>	1999	R/P	83	34	4.5 years	3.3 years	49/59	44	11/39	7	CI 8/29	CO 1/4	8/0	5
Padeh <i>et al.</i>	1999	R	28	50.4	*8 years	5.0 years	23/82	23	3/11	3	CI 10/36		♦10	NA
Król <i>et al.</i>	2013	P/R	125	23	17 months	25m (2.1 years)	77/62	72	18/14	18	CO 2/2		2	59

n: number of patients; Onset (m): age at disease onset in months; Time from O to R: time from onset to remission; F/U: follow-up; Pred: prednisone; TE: tonsillectomy; CI/CO: cimetidine/colchicine; n/%: number of patients/percentage of patients; Effect+: positive effect; FH (n): number of patients with positive family history.

*in 9 patients; ♦heterozygote for FMF.

mend repeated dosing without prior medical re-assessment in order to exclude infection. The well-known heterogeneity of the type and rate of corticosteroid side-effect occurrence does not allow to predict the highest safe long-term prednisone dosing in an individual patient. As PFAPA syndrome is a benign condition, the side-effect risk should be close to zero. Therefore, we believe that one single dose of prednisone around 1mg/kg at the typical PFAPA episode onset should be recommended in the frequency not exceeding 3–4 weeks. Using this regimen, none of our patients exhibited corticosteroid side-effects. Proportion of patients with shortening of afebrile intervals after prednisone (14%) was similar in some studies (16, 17), while others reported even a higher rate of increased febrile attack frequency (4).

The use of both colchicine and cimetidine has been reported in small numbers of children with variable efficacy difficult to interpret (5, 9, 17, 18). Only two of our prednisone non-responders received colchicine with promising results. The rate of disease resolution after tonsillectomy was very high, similar to published reports (5, 10, 15–17). The recently published meta-analysis has showed comparable effectiveness of both corticosteroids and tonsillectomy, but in long-term only tonsillectomy was effective (23).

Nearly half of the patients followed for over 1 year reached the full remission, suggesting favourable outcome,

similarly to the reported series (18, 23). Proportion of spontaneous remission (28%) also did not differ from the published reports, where it ranged between 20–30%. Nevertheless, after the mean follow-up ranging between 2 and 6 years, there remained 57–63% of patients whose disease had not resolved (4, 5, 17), while our relevant number was 51%. The longest follow-up information published by Wurster *et al.* reported complete disease resolution in 50/59 patients whose disease lasted for the mean of 6.3 years (18). In 9 patients, symptoms persisted for up to 18.8 years, although these patients experienced remissions longer than 1 year and the overall frequency of episodes decreased. A few recent reports suggest possibility of PFAPA syndrome onset in adult patients (24, 25).

In comparison to other series (Table II) we observed a higher proportion of patients with positive family history. This result might support the possibility of yet unknown genetic background of PFAPA syndrome (26–28).

The results of this as well as other recent studies further support the common belief that PFAPA syndrome is a condition of benign nature. In case of typical presentation and sensible exclusion of other possible causes, the diagnosis of this relatively common syndrome appears straightforward. Nevertheless, conditions like immune deficiencies as well as inflammatory disorders and malignancies presenting with recurrent fever have to be carefully evaluated. A

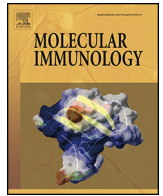
high degree of suspicion is needed in order to identify rare monogenic periodic syndromes, mainly in association with mevalonatekinase mutations and R92Q mutation of TNFRSF1A gene that can both present with PFAPA-like phenotype (14, 29).

Clinically sensible diagnostic algorithm of PFAPA syndrome includes careful medical history, detailed analysis of the disease presentations and laboratory tests to exclude other conditions and to confirm the full normalisation of inflammatory parameters. Prospective follow-up supplied with data from the parent-reported diary helps to evaluate treatment response as well as the overall disease outcome. Single-dose episodic prednisone should be offered as a first-line treatment with tonsillectomy as a second-line option in prednisone non-responders. Maintenance of normal findings in afebrile intervals, normal growth and development together with spontaneous tendency towards lowering episode frequency belong to the most important confirmatory features of PFAPA syndrome.

References

- MARSHALL GS, EDWARDS KM, BUTLER J, LAWTON AR: Syndrome of periodic fever, pharyngitis, and aphthous stomatitis. *J Pediatr* 1987; 110: 43–6.
- MARSHALL GS, EDWARDS KM, LAWTON AR: PFAPA syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: 658–9.
- FEDER HM JR, BIALECKI CA: Periodic fever associated with aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: 186–7.

4. PADEH S, BREZNIAK N, ZEMER D *et al.*: Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome: clinical characteristics and outcome. *J Pediatr* 1999; 135: 98-101.
5. THOMAS KT, FEDER HM, LAWTON AR, EDWARDS KM: Periodic fever syndrome in children. *J Pediatr* 1999; 135: 15-21.
6. LONG SS: Syndrome of Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, and Adenitis (PFAPA) -- what it isn't. What is it? *J Pediatr* 1999; 135: 1-5.
7. HOFER M, COCHARD M, ANTON J *et al.*: PFAPA (periodic fever, oral aphthae, pharyngitis and cervical adenitis) syndrome: a new consensus on diagnostic criteria. *Ann Rheum Dis* 2009; 68 (Suppl. 3): 705.
8. BERLUCCHI M, MEINIA, PLEBANIA, BONVINI MG, LOMBARDI D, NICOLAI P: Update on treatment of Marshall's syndrome (PFAPA syndrome): report of five cases with review of the literature. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112: 365-9.
9. FEDER HM JR: Cimetidine treatment for periodic fever associated with aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 318-21.
10. RENKO M, SALO E, PUTTO-LAURILAA *et al.*: A randomized, controlled trial of tonsillectomy in periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis syndrome. *J Pediatr* 2007; 151: 289-92.
11. LICAMELI G, JEFFREY J, LUZ J, JONES D, KENNA M: Effect of adenotonsillectomy in PFAPA syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134: 136-40.
12. GARAVELLO W, PIGNATARO L, GAINI L, TORRETTA S, SOMIGLIANA E, GAINI R: Tonsillectomy in children with periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis syndrome. *J Pediatr* 2011; 159: 138-42.
13. PINTO A, LINDEMAYER RG, SOLLECITO TP: The PFAPA syndrome in oral medicine: differential diagnosis and treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 35-9.
14. GATTORNO M, CAORSI R, MEINI A *et al.*: Differentiating PFAPA syndrome from monogenic periodic fevers. *Pediatrics* 2009; 124: e721-8.
15. LEE WI, YANG MH, LEE KF *et al.*: PFAPA syndrome (Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis, Adenitis). *Clin Rheumatol* 1999; 18: 207-13.
16. TASHER D, SOMEKH E, DALAL I: PFAPA syndrome: new clinical aspects disclosed. *Arch Dis Child* 2006; 91: 981-4.
17. FEDER HM, SALAZAR JC: A clinical review of 105 patients with PFAPA (a periodic fever syndrome). *Acta Paediatr* 2010; 99: 178-84.
18. WURSTER VM, CARLUCCI JG, FEDER HM JR, EDWARDS KM: Long-term follow-up of children with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. *J Pediatr* 2011; 159: 958-64.
19. YALÇINKAYA F, ÇAKAR N, ACAR B *et al.*: The value of the levels of acute phase reactants for the prediction of familial Mediterranean fever associated amyloidosis: a case control study. *Rheumatol Int* 2007; 27: 517-22.
20. STOJANOV S, HOFFMANN F, KÉRY A *et al.*: Cytokine profile in PFAPA syndrome suggests continuous inflammation and reduced anti-inflammatory response. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 90-7.
21. BROWN KL, WEKELL P, OSLA V *et al.*: Profile of blood cells and inflammatory mediators in periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis (PFAPA) syndrome. *BMC Pediatr* 2010; 10: 65.
22. STOJANOV S, LAPIDUS S, CHITKARAP *et al.*: Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) is a disorder of innate immunity and Th1 activation responsive to IL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 7148-53.
23. PERIDIS S, PILGRIM G, KOUDOUNAKIS E, ATHANASOPOULOS I, HOULAKIS M, PAPPONAS K: PFAPA syndrome in children: A meta-analysis on surgical versus medical treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74: 1203-8.
24. CANTARINI L, VITALE A, GALEAZZI M, FREDIANI B: A case of resistant adult-onset periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis (PFAPA) syndrome responsive to anakinra. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30: 593.
25. CANTARINI L, VITALE A, BARTOLOMEI B, GALEAZZI M, RIGANTE D: Diagnosis of PFAPA syndrome applied to a cohort of 17 adults with unexplained recurrent fevers. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30: 269-71.
26. HOFER MF, PILLET P, BERG S *et al.*: International PFAPA syndrome registry: cohort of 214 patients. *Pediatric Rheumatology* 2008; 6 (Suppl. 1): 182.
27. COCHARD M, CLET J, LE L *et al.*: PFAPA syndrome: is it a family history? *Pediatric Rheumatology* 2008; 6 (Suppl. 1): 185.
28. COCHARD M, CLET J, LE L *et al.*: PFAPA syndrome is not a sporadic disease. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49: 1984-7.
29. PELAGATTI MA, MEINI A, CAORSI R *et al.*: Long-term clinical profile of children with the low-penetrance R92Q mutation of the TNFRSF1A gene. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1141-50.



Polyclonal, newly derived T cells with low expression of inhibitory molecule PD-1 in tonsils define the phenotype of lymphocytes in children with Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis (PFAPA) syndrome

Dytrych Petra^a, Krol Petra^b, Kotrova Michaela^c, Kuzilkova Daniela^c, Hubacek Petr^{c,d}, Krol Ladislav^c, Katra Rami^a, Hrusak Ondrej^c, Kabelka Zdenek^a, Dolezalova Pavla^b, Kalina Tomas^{c,1}, Fronkova Eva^{c,*,1}

^a Department of ENT, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague and University Hospital Motol, Czech Republic

^b Pediatric Rheumatology Unit, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Charles University Prague, and General University Hospital in Prague, 1st Faculty of Medicine, Czech Republic

^c CLIP, Department of Paediatric Haematology/Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and University Hospital Motol, Czech Republic

^d Department of Medical Microbiology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and University Hospital Motol, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2014

Received in revised form

15 December 2014

Accepted 8 January 2015

Available online 3 February 2015

Keywords:

PFAPA

Autoinflammatory disease

Flow cytometry

T lymphocyte

PD-1

TREC

KREC

T-cell receptor gene rearrangement

Tonsillectomy

Chemokine

ABSTRACT

Purpose: PFAPA syndrome is a benign, recurrent inflammatory disease of childhood. Tonsillectomy is one of the therapeutic options with a yet unexplained biological mechanism. We tested whether specific lymphocyte subsets recruited from blood to human tonsils participate in PFAPA pathogenesis.

Methods: Paired tonsils/peripheral blood (PB) samples were investigated (a) from children with PFAPA that successfully resolved after tonsillectomy ($n = 10$) (b) from children with obstructive sleep apnoea syndrome as controls ($n = 10$). The lymphocyte profiles were analysed using 8-colour flow cytometry, immunoglobulin (IGH) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements via PCR and next generation sequencing; a TREC/KREC analysis was performed using qPCR.

Results: The PFAPA tonsils in the asymptomatic phase had a lower percentage of B-lymphocytes than controls; T-lymphocyte counts were significantly higher in PB. The percentages of cytotoxic CD8pos T-lymphocytes were approximately 2-fold higher in PFAPA tonsils; the transitional B cells and naïve stages of both the CD4pos and CD8pos T-lymphocytes with a low expression of PD-1 molecule and high numbers of TREC were also increased. With the exception of elevated plasmablasts, no other differences were significant in PB. The expression levels of CXCL10, CXCL9 and CCL19 genes were significantly higher in PFAPA tonsils. The IGH/TCR pattern showed no clonal/oligoclonal expansion. DNA from the Epstein-Barr virus, Human Herpesvirus-6 or adenovirus was detected in 7 of 10 PFAPA tonsils but also in 7 of 9 controls. **Conclusions:** Our findings suggest that the uninhibited, polyclonal response of newly derived lymphocytes participate in the pathogenesis of PFAPA. Because most of the observed changes were restricted to tonsils and were not present in PB, they partly explain the therapeutic success of tonsillectomy in PFAPA syndrome.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

PFAPA syndrome in children ranks among the most common periodic autoinflammatory diseases. In 1987, PFAPA was

first described by Marshall according to its most characteristic symptoms: periodic fever, pharyngitis, aphthous stomatitis and cervical lymphadenitis. The diagnosis is made partly by exclusion; the diagnostic criteria for PFAPA syndrome modified by Thomas et al. (Thomas et al., 1999) include the following: (1) onset of disease prior to 5 years of age, (2) the absence of upper respiratory tract infection with at least one of the following symptoms: aphthous stomatitis, cervical lymphadenitis, pharyngitis, (3) asymptomatic interval between episodes, (4) exclusion of cyclic neutropenia and

* Corresponding author. Tel.: +420 224436489.

E-mail address: eva.fronkova@lfmotol.cuni.cz (F. Eva).

¹ Contributed equally.

(5) normal growth and development. Additional features such as vomiting, nausea, fatigue, abdominal pain and arthralgia may occur (Hofer et al., 2014). The aetiology and pathogenesis of the syndrome remains unknown; a dysregulation of the immune system or abnormal response to an unknown infection trigger is suspected. Laboratory findings in peripheral blood (PB) during fever flares revealed elevated white blood cell counts (WBC) that was caused mostly by the increased neutrophil and monocyte counts accompanied by decrease in lymphocytes and eosinophils. Elevation of erythrocyte sedimentation rate, of C-reactive protein and of serum amyloid A was recorded during PFAPA flares (Thomas et al., 1999; Brown et al., 2010; Feder and Salazar, 2010; Kolly et al., 2013; Stojanov et al., 2006; Stojanov et al., 2011). Investigation of classic proinflammatory cytokines in sera revealed elevated serum concentration of IL-6, but unchanged levels of TNF-alpha and IL1 β approximately 15 h after the onset of the fever (Brown et al., 2010). The levels of lymphocyte activator IL-7 and Th17-associated cytokine IL17 were decreased both in febrile and in afebrile sera compared to controls in the same study (Brown et al., 2010). Another study exploring cytokine production came to slightly different results, showing increased plasma concentration of IL-1 β , IL-6, TNF-alpha and IL-12p70 after fever onset, but also in asymptomatic periods compared to controls (Stojanov et al., 2006). Increased percentages of CD4⁺ and CD8^{pos} T cells produced IFN- γ after stimulation compared to controls (Stojanov et al., 2006). Both studies concluded that the cytokine pattern is typical for an IFN γ -dependent (Th1) inflammatory response. A study by Stojanov et al. (Stojanov et al., 2011) was able to distinguish PFAPA flares from asymptomatic period samples, control samples and also from hereditary periodic fever (HPF) flares based solely on the gene expression profile. During PFAPA flares, complement, IL-1-related and IFN-induced genes were significantly overexpressed. The gene expression profile during asymptomatic periods was indistinguishable from that of healthy children. PFAPA flares were accompanied by increased protein levels of chemokines known as the T cell chemoattractants IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9 and MIP-1 β /CCL4. The most recent study suggested that dysregulated IL-1 β monocyte production is linked to PFAPA syndrome (Kolly et al., 2013).

The optimal treatment method for PFAPA syndrome remains a matter of debate. The administration of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory agents has been considered ineffective (Thomas et al., 1999). A single dose of prednisone aborts PFAPA flares but does not prevent their recurrence (Feder and Salazar, 2010; Berlucchi et al., 2003; Wurster et al., 2011). The administration of the recombinant IL-1R antagonist anakinra was successful in all five patients (based on the findings of above mentioned study) (Stojanov et al., 2011). A positive effect of tonsillectomy has been documented in several studies (Feder and Salazar, 2010; Stojanov et al., 2011; Garavello et al., 2009; Krol et al., 2013; Peridis et al., 2010a), although the pathogenetic background for this therapeutic intervention is unknown. Because tonsils are primarily a lymphoid tissue and because the gene expression profiles revealed the involvement of adaptive immunity, we decided to evaluate the perturbation of lymphocyte composition and function within tonsils removed as a treatment for PFAPA treatment. As anticipated in a previous study describing elevated levels of T cell chemoattractants in peripheral blood (Stojanov et al., 2011), we show that T cells, especially early developmental stages of CD8^{pos} cytotoxic and CD4^{pos} helper T cells with low expressions of inhibitory molecule PD-1, are more abundant in the tonsils of patients with PFAPA. The activation of the immune system by a virus could be a tempting explanation of tonsillar pathology; we found the DNA of common viruses in most PFAPA tonsils. However, the same viruses were also present in control tonsils. Interestingly, most of the observed differences in

our study were limited to tonsils and were not present in the blood.

2. Patients and methods

2.1. Ethics statement

This study was approved by the Institutional Review Board of 2nd Faculty of Medicine and Motol University Hospital in Prague, Czech Republic. The parents of the patients were informed about the aim of the study and gave their written consent. All clinical investigation was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

2.2. PFAPA and control samples

Ten children with PFAPA syndrome (5 boys, 5 girls) and 10 children with obstructive sleep apnoea syndrome (control group) underwent elective tonsillectomy with or without adenoidectomy at the ENT Department of the 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, between October 2010 and May 2013. The identification of PFAPA patients, diagnosis and follow up of the children with PFAPA syndrome were performed in cooperation with the Periodic Fever Clinic of the Pediatric Rheumatology Unit, General University Hospital in Prague. The children with tonsillectomy due to PFAPA syndrome consisted of three groups: (1) the patients whose parents opted for tonsillectomy as a first line treatment (3 patients); (2) the patients treated with episodic prednisone whose disease duration and episode frequency were an unacceptable burden for the family (4 patients) and (3) the patients treated with prednisone with increasingly frequent episodes (3 patients). Tonsillectomy was performed during symptom-free intervals. The cold knife method for tonsillectomy was employed, and adenoidectomy was performed if needed. The patients were followed for a minimum of 6 months after tonsillectomy: initially during common postoperative ENT follow up then via telephone contact. A sample of the peripheral blood was obtained during the tonsillectomy procedure.

2.3. Diagnostic algorithm

In order to exclude other causes of recurrent fevers all patients underwent general pediatric and ENT assessments.

The case history inquired was:

- age at the first manifestation of the symptoms
- age at diagnosis
- duration of fever episodes
- interval between fever episodes
- clinical findings during fever episodes: pharyngitis, cervical lymphadenopathy, aphthous stomatitis, arthralgia, abdominal pain and vomiting.
- clinical status during afebrile intervals

Laboratory evaluation:

- erythrocyte sedimentation rate, full blood count with differential, liver and kidney function tests, anti streptolysin O.
- nose and throat culture
- serum immunoglobulin (Ig) levels (namely IgG, IgA, IgD), herpetic virus serology and mevalonic acid in urine collected during the febrile episode (Krol et al., 2013).

Finally, clinical diagnosis of PFAPA syndrome was confirmed by a pediatric rheumatologist in the Periodic Fever Clinic.

2.4. Flow cytometry

Peripheral blood was collected into EDTA. Mononuclear cells were isolated via Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) density centrifugation or isolated via gentle shaking from manually dissociated tonsillar tissue. Dry pellets of the mononuclear cells were stored at -80°C for subsequent DNA analysis. Flow cytometry (FC) analysis was performed on a modified BD LSR II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) instrument equipped with a standard blue laser (488 nm, 20 mW), a red laser (633 nm, 25 mW) and an upgraded diode violet laser (405 nm, 120 mW, Omicron Laserage Laserprodukte GmbH, Rodgau, Germany). The lymphocyte subsets were evaluated using the following antibody combinations: T-cell panel: CD27 Pacific Blue, CD8 Horizon-V500, CD28 Alexa488, CD38 PE, CD3 ECD, CD45RA PE-Cy7, CD279 APC and CD4 Alexa700). B-cell panel: (CD27 Pacific Blue, IgM FITC, CD24 PE, IgD Qdot605, CD20 PerCP, CD19 PE-Cy7, CD21 APC and CD38 Alexa700) as described previously (Vlkova et al., 2010). The data were analysed using FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA). The left and right tonsils were analysed separately, and average values were used for further statistical evaluation because we observed no lateral skewing of the lymphocyte proportions.

2.5. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements

DNA from the whole blood and from tonsils was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The clonality of the immunoglobulin heavy chain (IGH), TCR beta (TCRB) and TCR gamma (TCRG) rearrangements were assessed using multiplex PCR as described previously (Pongers-Willemse et al., 1999; van Dongen et al., 2003). The PCR products were analysed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). TCRG rearrangement profiling was performed on the DNA level via Immunoseq (Adaptive Biotechnologies, Seattle, USA) using next generation sequencing and the cloud-based analysis of multiplex PCR products as described previously (Sherwood et al., 2011).

2.6. TREC and KREC detection

The albumin gene level was quantitatively detected in isolated samples using qPCR (Pongers-Willemse et al., 1998) and standard dilution series derived from Human Genomic DNA with a known starting concentration of 200 ng/ μl (Roche, Basel, Switzerland). The T-cell receptor excision circles (TREC) and kappa-deleting element recombination circles (KREC) were used to detect proliferation history of T and B lymphocytes, respectively. TREC and KREC levels were assessed separately using cloned plasmid standards as previously described (van Zelm et al., 2007; Weinberg et al., 2001). The results were expressed as the number of TREC (KREC) copies per 1 microgram of DNA (Fronkova et al., 2014).

2.7. Detection of viral DNA

The viral loads of EBV, CMV, HHV-6 and adenoviruses were detected after DNA extraction using previously published qPCR assays based on a dilution series of cloned plasmid standards (Claas et al., 2005; Gautheret-Dejean et al., 2002; Kimura et al., 1999; Tanaka et al., 2000), and viral loads were normalised to quantified albumin genes (Pongers-Willemse et al., 1998) as described previously (Hubacek et al., 2009).

2.8. Gene expression analysis

Total RNA from frozen tonsils (8x PFAPA, 7x controls) was isolated using MELTTM Total Nucleic Acid Isolation System (Life

Technologies, Waltham, MA, USA). Real-time PCR was performed in duplicates using a dilution series of mixed PB cDNA's from five healthy donors. TaqMan[®] gene expression assays for CXCL1, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13 and CCL19 with an ABI PRISM[®] 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) were used and the results were related to the level of *abl* control gene expression.

2.9. Statistical analysis

All statistical analyses and graphs were generated using the R statistical environment. The distribution of variables between groups was assessed using Fisher's exact test. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to estimate the significance of the differences concerning continuous values. A classification tree based on information from all measured T-lymphocyte populations was created; the classification attributes and their thresholds were chosen using a C4.5 algorithm implemented in the R package RWeka (Ian et al., 2005; Hornik et al., 2009). This algorithm chooses the decision node so that the resulting splitting maximises the normalised information gain.

3. Results

3.1. Clinical course pre-and post-tonsillectomy

The median age at the first manifestation of the PFAPA symptoms was 27 months (range 18–60), and the median age at diagnosis was 39 months (range 14–78). The median duration of fever flare was 4.5 days (range 2–7) with a median interval between attacks of 4 weeks (range 2–7). Tonsillectomy was performed at a median age of 66 months (range 36–96). Pharyngitis was observed in all 10 patients, aphthous stomatitis in 4 patients (40%) and cervical adenitis in 5 patients (50%) during PFAPA flares. Arthralgia was observed in 3 patients (30%), abdominal pain in 1 patient (10%) and vomiting in none of the patients. 100% of the PFAPA patients had complete remission of the symptoms for at least 8 months after surgery. The median length of post-tonsillectomy follow up was 18.5 months (range 8–29). None of the patients had postoperative complications. The PFAPA tonsils were macroscopically similar to controls and the histology results of both PFAPA tonsils and controls were reported as chronic tonsillitis or chronic lacunar tonsillitis. The PFAPA tonsil cultivations were negative for bacteria in all patients.

3.2. T lymphocyte subsets

All measured values were highly concordant for tonsil pairs; therefore, we used the average values for further analyses. Compared with the controls, there was a slightly higher percentage of CD3^{pos} T lymphocytes in the peripheral blood of PFAPA patients (median 66% in PFAPA vs. 59% in controls, $p=0.01$, Fig. 1A). This trend was also present in tonsils but did not reach statistical significance (median 36% in PFAPA vs. 31% in controls, $p=0.08$, Fig. 1A).

The tonsils of PFAPA patients differed from those of controls in the proportion of the main T lymphocyte subsets (Fig. 1B). The PFAPA tonsils contained more CD8^{pos} cytotoxic T lymphocytes (PFAPA: median 6% of all lymphocytes; controls: median 3%; $p=0.007$). The CD4/CD8 ratio was significantly lower in PFAPA (PFAPA: median 4.2; controls: median 6.1, $p=0.02$). The proportion of CD4/CD8 double negative CD3^{high} cells corresponding mainly to gamma delta T lymphocytes was slightly increased in the PFAPA tonsils (median 1.2% of the CD3^{pos} cells in PFAPA vs. median 0.57% in controls, $p=0.02$, Table 1).

Supplementary Fig. 1 shows the gating strategy for defining four developmental stages of CD4^{pos} and CD8^{pos} T lymphocytes based

Table 1

	TONSIL - CTRL			TONSIL - PFAPA			Wilcoxon test	BLOOD - CTRL			BLOOD - PFAPA			Wilcoxon test					
	Median	(10–90 percentile)		Median	(10–90 percentile)		<i>p</i> -value	Median	(10–90 percentile)		Median	(10–90 percentile)		<i>p</i> -value					
Abs Lymphocytes (x 10e6/ml)	NA	NA		NA	NA		NA	Abs Lymphocytes (x 10e6/ml)	2.70	(2.36–3.86)		<i>n</i> = 7	3.30	(2.66–4.08)		<i>n</i> = 7	n.s.		
CD19+ of Lymph	65.9	(58.2–72.53)		<i>n</i> = 6	54.4	(47.53–61.34)		<i>n</i> = 7	0.022	CD19+ of Lymph	18.9	(11.02–31.55)		<i>n</i> = 8	12.2	(11.4–17.18)		<i>n</i> = 9	n.s.
CD3+ of Lymph	30.9	(25.38–36.01)		<i>n</i> = 10	36.3	(27.57–44.5)		<i>n</i> = 10	n.s.	CD3+ of Lymph	59.4	(44.09–66.32)		<i>n</i> = 10	66.2	(61.01–67.16)		<i>n</i> = 10	0.019
CD4+ of Lymph	25.1	(20.84–30.65)		<i>n</i> = 10	26.4	(20.53–32.03)		<i>n</i> = 10	n.s.	CD4+ of Lymph	27.9	(17.96–35.69)		<i>n</i> = 10	30.7	(23.72–40.18)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD8+ of Lymph	3.14	(2.31–5.53)		<i>n</i> = 10	5.78	(4.02–8.65)		<i>n</i> = 10	0.007	CD8+ of Lymph	19.8	(12.54–27.54)		<i>n</i> = 10	20.6	(17.03–30.71)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD4/CD8	6.1	(4.77–9.28)		<i>n</i> = 10	4.2	(2.38–6.26)		<i>n</i> = 10	0.019	CD4/CD8	1.4	(0.92–2.16)		<i>n</i> = 10	1.4	(0.88–2.14)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD3 + DN of T-cells	0.57	(0.37–1.22)		<i>n</i> = 8	1.22	(0.91–1.74)		<i>n</i> = 9	0.021	CD3 + DN of T-cells	7.75	(3.72–9.85)		<i>n</i> = 10	7.85	(6.15–13.5)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD4+ Naive of Lymph	3.6	(2.76–6.94)		<i>n</i> = 10	6.3	(4.31–9.39)		<i>n</i> = 10	0.015	CD4+ Naive of Lymph	19.2	(11.8–25.68)		<i>n</i> = 10	21.1	(15.75–29.26)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD4+ Central Memory of Lymph	21.9	(16.06–29.02)		<i>n</i> = 10	20.0	(17.65–22.09)		<i>n</i> = 10	n.s.	CD4+ Central Memory of Lymph	7.62	(4.64–10.3)		<i>n</i> = 10	8.34	(6.5–10.32)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD4+ Effector Memory of Lymph	1.1	(0.55–1.71)		<i>n</i> = 10	0.9	(0.55–2.52)		<i>n</i> = 10	n.s.	CD4+ Effector Memory of Lymph	1.0	(0.59–1.72)		<i>n</i> = 10	1.1	(0.34–2.34)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD4+ TEMRA of Lymph	0.08	(0.05–0.29)		<i>n</i> = 10	0.06	(0.04–0.19)		<i>n</i> = 10	n.s.	CD4+ TEMRA of Lymph	0.04	(0.02–0.08)		<i>n</i> = 10	0.07	(0.03–0.3)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD4 + PD1hi of Lymph	10.1	(7.53–11.59)		<i>n</i> = 10	5.9	(4.42–8.91)		<i>n</i> = 10	0.001	CD4 + PD1hi of Lymph	0.0	(0–0.07)		<i>n</i> = 10	0.0	(0–0.06)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD8+ Naive of Lymph	2.085	(1.43–3.1)		<i>n</i> = 10	3.84	(2.4–6.8)		<i>n</i> = 10	0.005	CD8+ Naive of Lymph	12.2	(7.97–17.38)		<i>n</i> = 10	13.1	(9.51–15.49)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD8+ Central Memory of Lymph	1.2	(0.73–2.36)		<i>n</i> = 10	1.5	(1.05–4.43)		<i>n</i> = 10	n.s.	CD8+ Central Memory of Lymph	3.8	(2.09–8.25)		<i>n</i> = 10	4.8	(3.39–8.17)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD8+ Effector Memory of Lymph	0.12	(0.03–0.21)		<i>n</i> = 10	0.08	(0.06–0.35)		<i>n</i> = 10	n.s.	CD8+ Effector Memory of Lymph	0.48	(0.12–1.02)		<i>n</i> = 10	0.78	(0.32–1.5)		<i>n</i> = 10	n.s.
CD8+ TEMRA of Lymph	0.0	(0.02–0.07)		<i>n</i> = 10	0.0	(0.02–0.13)		<i>n</i> = 10	n.s.	CD8+ TEMRA of Lymph	1.2	(0.48–3.17)		<i>n</i> = 10	1.9	(0.26–7.53)		<i>n</i> = 10	n.s.
Transitional of B-cells	0.12	(0.04–0.2)		<i>n</i> = 6	0.54	(0.07–1.04)		<i>n</i> = 7	0.035	Transitional of B-cells	5.19	(2.32–7.9)		<i>n</i> = 8	7.07	(2.92–13.96)		<i>n</i> = 9	n.s.
Naive/Immature of B-cells	63.0	(59.2–65.83)		<i>n</i> = 6	69.7	(57.89–76.79)		<i>n</i> = 7	n.s.	Naive/Immature of B-cells	57.0	(52.57–59.62)		<i>n</i> = 8	61.1	(53.04–69.2)		<i>n</i> = 9	n.s.
Ig switched of B-cells	53.5	(40.9–60.6)		<i>n</i> = 6	38.2	(31.22–45.02)		<i>n</i> = 7	0.035	Ig switched of B-cells	19.3	(11.81–36.44)		<i>n</i> = 7	16.2	(11.24–29.07)		<i>n</i> = 8	n.s.
Plasmablasts of B-cells	2.0	(1.5–2.73)		<i>n</i> = 6	1.1	(1.02–1.53)		<i>n</i> = 7	0.012	Plasmablasts of B-cells	1.2	(0.49–2.08)		<i>n</i> = 8	3.0	(1.22–4.98)		<i>n</i> = 9	0.018
IgM negative CD27 negative of B-cells	29	(20–38.525)		<i>n</i> = 6	18.8	(17.45–25.27)		<i>n</i> = 7	0.035										

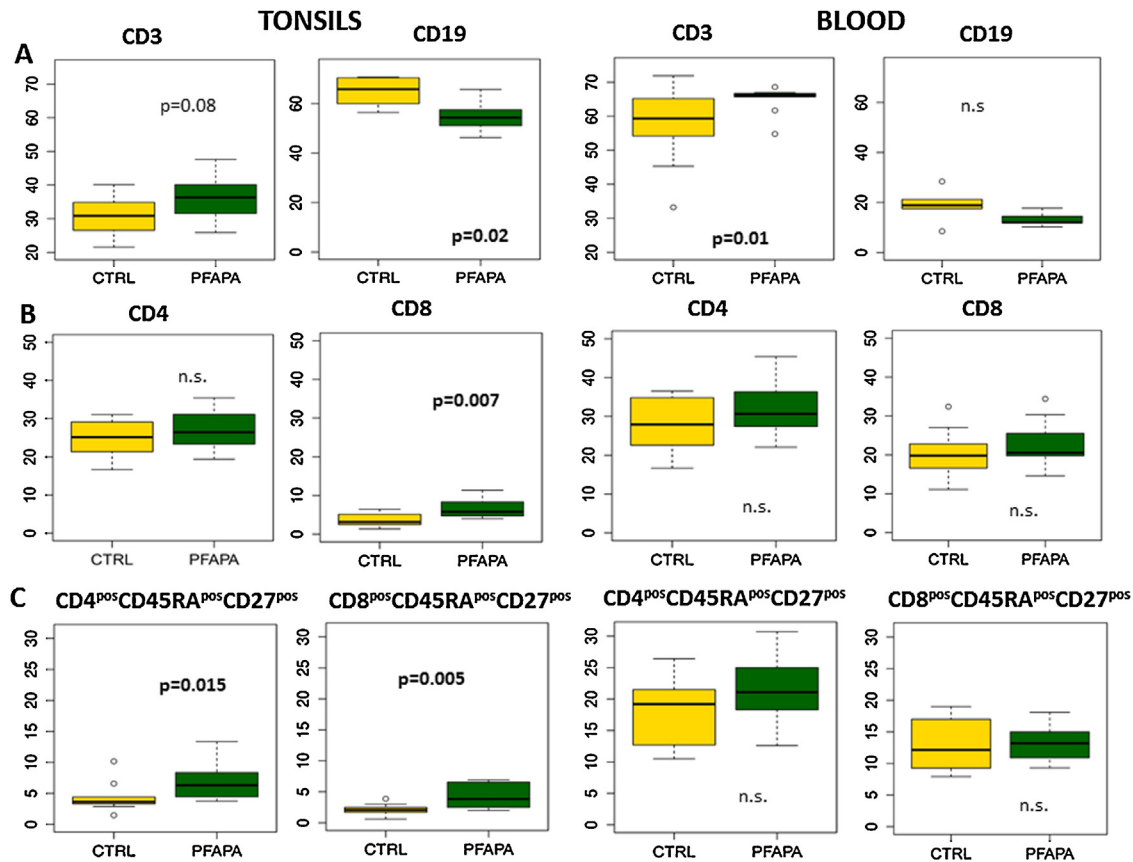


Fig. 1. Lymphocyte subsets in PFAPA vs. controls. Percentages from all lymphocytes are shown in all graphs. CD19^{pos} B lymphocytes and CD3^{pos} T lymphocytes (A), CD4^{pos} helper and CD8^{pos} cytotoxic T lymphocytes (B), naïve helper CD4^{pos} CD45RA^{pos}CD27^{pos} T cells and naïve cytotoxic CD8^{pos}CD45RA^{pos}CD27^{pos} T cells (C) are shown.

on the expression of CD45RA and CD27 markers in both tonsils and blood (Mahnke et al., 2013). The helper T cell lymphocyte pool was primarily composed of memory CD45RA^{neg} cells in both the PFAPA and controls, but the proportion of naïve CD45RA^{pos}CD27^{pos} cells was significantly higher in the PFAPA tonsils (PFAPA: median 6% of all lymphocytes; controls: median 4%, $p=0.015$, Fig. 1C). The percentage of naïve CD8^{pos} CD45RA^{pos}CD27^{pos} cells was significantly elevated in PFAPA tonsils (PFAPA: median 4% of all lymphocytes; controls: median 2%, $p=0.005$, Fig. 1C). The proportion of activated HLA-DR^{pos} cells in the PFAPA tonsils was comparable with that of controls for both the CD4^{pos} and CD8^{pos} T lymphocytes (data not shown).

In agreement with the study of Wang et al. (Wang et al., 2011), we found a heterogeneous expression of PD-1 molecule on CD4^{pos} T lymphocytes (Fig. 2A) in tonsils, being the highest (PD-1^{high}) in memory CD45RA^{neg} cells. The percentage of CD4^{pos} PD-1^{high} CD45RA^{neg} cells was significantly lower in the PFAPA tonsils than in the controls (median 6% of all lymphocytes in PFAPA vs. 10% in controls, $p=0.001$, Fig. 2B). Importantly, all observed differences in the T lymphoid subpopulations between PFAPA and controls were limited to tonsils. The blood samples taken during tonsillectomy did not show any significant differences regarding T lymphocyte subsets. Absolute lymphocyte counts in PB were similar to controls in PFAPA (Table 1). Analysis of total cell numbers in each T cell population confirmed higher numbers of PB T lymphocytes in PFAPA ($p=0.04$, Wilcoxon test, data not shown). Similarly to relative numbers, absolute counts of all analysed T lymphocyte subsets did not differ from controls (data not shown). In order to understand which parameters were different in PFAPA vs. controls an unsupervised classification tree based on information from all measured T-lymphocyte populations both in blood and tonsils was created.

The algorithm chose the CD4^{pos}PD-1^{high} percentage of all lymphocytes in tonsils combined with the percentage of CD8^{pos} cells of all lymphocytes in tonsils as the best predictor of PFAPA phenotype. The following classification was suggested: CD4^{pos}PD-1^{high} T cells from tonsillar lymphocytes < 9.25% and CD8^{pos}T cells from tonsillar lymphocytes > 3.46% (Fig. 3). This classification correctly assigned all but one patient to the respective categories (PFAPA vs. controls) in our limited cohort.

We asked whether the elevated numbers of respective T cell subsets were caused by their proliferation. The numbers of TREC per microgram of DNA did not differ between PFAPA and controls (Supplementary Fig. 3), which indicates that there are no large changes in the relative contribution of thymic generation versus proliferation to the T-cell compartment of tonsillar cells in PFAPA patients.

3.3. B lymphocyte subsets

The proportion of CD19^{pos} B lymphocytes was lower in the PFAPA tonsils than in the controls (median 54.4% in PFAPA vs. 65.9% in controls, $p=0.02$, Fig. 1A and Supplementary Fig. 2A). There was a significantly higher proportion of CD19^{pos}CD27^{neg}CD24^{high}CD38^{high} transitional B cells in the PFAPA tonsils, yet the numbers of those cells in both the PFAPA and control groups were extremely low (median 0.5% of CD19^{pos} cells in PFAPA vs. 0.1% in controls, $p=0.035$, Table 1). There was no difference in the proportion of naïve CD27^{neg} B lymphocytes in the PFAPA tonsils compared with that of the controls (Table 1). The percentage of switched B lymphocytes defined as CD19^{pos}IgM^{neg}IgD^{neg} (Supplementary Fig. 2C) among CD19^{pos} B cells was significantly lower in the PFAPA tonsils (median 38% among CD19^{pos} in PFAPA vs. median 54% in controls, $p=0.035$, Table 1 and median 22% from

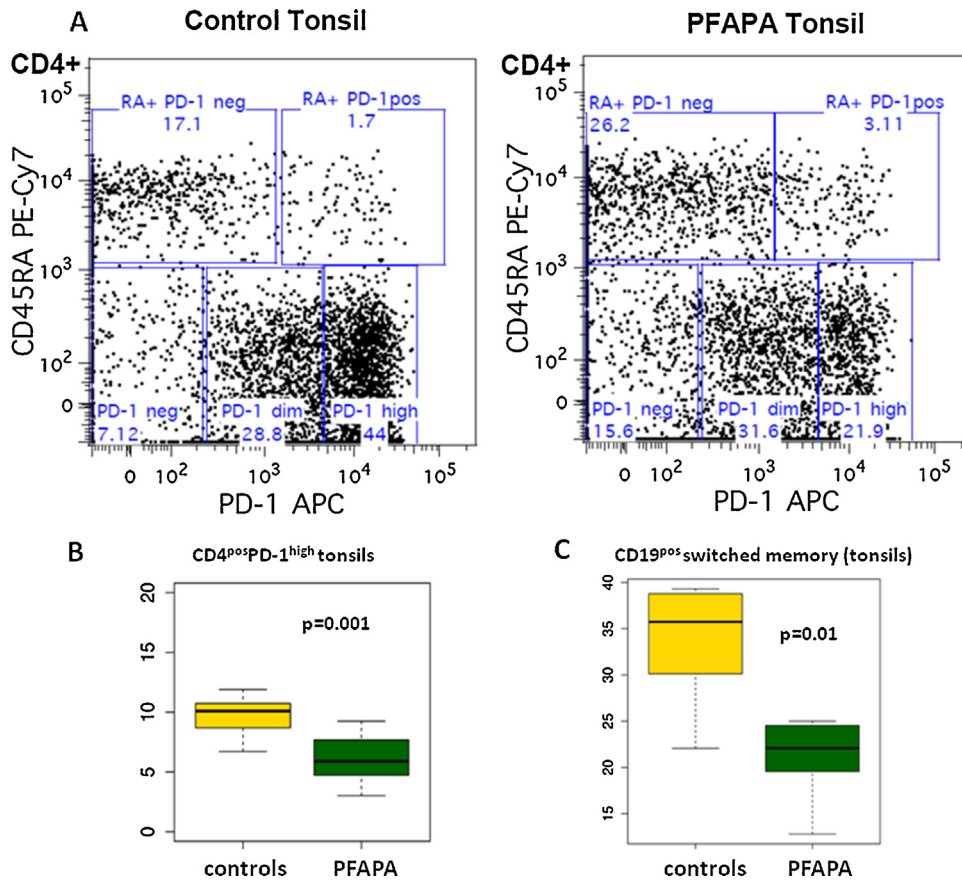


Fig. 2. PD-1 expression in PFAPA vs. controls in tonsils. (A) Flow cytometry evaluation of the CD4^{pos} cells in the tonsils of patients with PFAPA and in control tonsils. (B) The percentage of CD4^{pos}PD-1^{high} T lymphocytes from all lymphocytes. (C) The percentage of switched memory B cells from all lymphocytes.

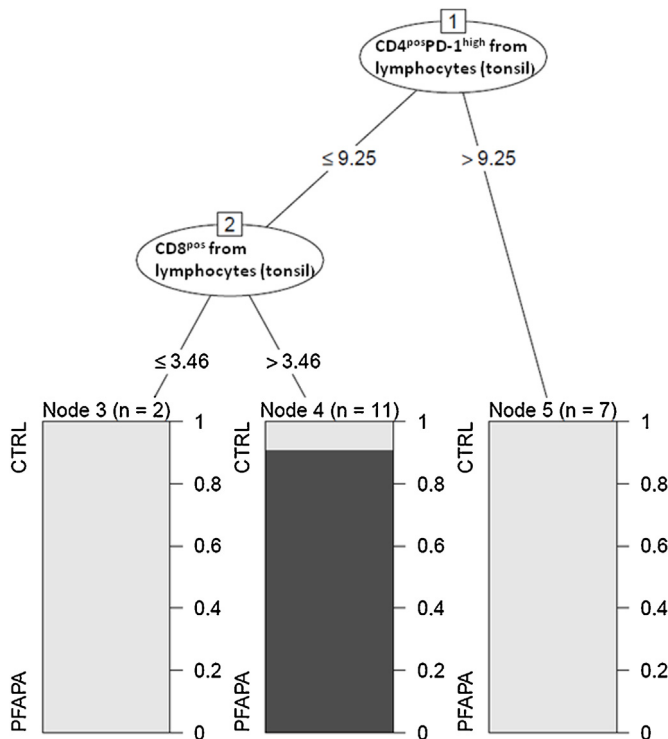


Fig. 3. Classification tree based on information from all measured T-lymphocyte populations.

all lymphocytes in PFAPA vs. 36% in controls, $p = 0.01$, Fig. 2C). The lower numbers of switched B cells in PFAPA tonsils were attributed to a reduction in the CD27^{neg} switched compartment ($p = 0.035$, Table 1).

Again, the observed differences were limited to tonsils and were not present in the blood (Table 1). The only exceptions were the numbers of plasma B cells (defined as CD19^{pos} CD27^{high}/CD38^{high}, Supplementary Fig. 2D), the numbers of which were lower in the PFAPA tonsils (median 1.1% of CD19^{pos} cells in PFAPA vs. 2% in controls) but which were slightly higher in the blood of patients with PFAPA (median 3%) compared with the blood of the control patients (median 1.2%, $p = 0.02$). Absolute counts of all analysed B cell subpopulations did not differ between PFAPA and controls. The numbers of KREC were not significantly different in PFAPA tonsils (Supplementary Fig. 3).

3.4. Both PFAPA and control tonsils contain DNA of common viruses

Based on the higher levels of cytotoxic T lymphocytes in the PFAPA tonsils, we speculated that a common viral infection may be the trigger for T lymphocyte recruitment. Quantitative PCR for adenovirus, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) and Human herpes virus 6 (HHV6) were performed. CMV was not detected in any of the samples. A low viral load of at least one of the investigated species was present in 7 of 10 of the PFAPA tonsils but also in 7 of 9 of the investigated control tonsils (Table 2). The positive detection of viruses did not differ between the PFAPA cases and controls.

Table 2

Normalised copies of viral DNA (per 10,000 copies of human albumin gene) assessed via qPCR in PFAPA and control tonsils.

Patient	EBV	CMV	HHV6	adeno
PFAPA	0	0	0	0
PFAPA	1.4	0	0	0
PFAPA	0	0	6.4	110
PFAPA	0	0	0	18
PFAPA	0	0	1.7	0
PFAPA	6.4	0	0	0
PFAPA	0	0	3.8	0
PFAPA	0	0	6	440
PFAPA	0	0	0	0
CTRL	3.3	0	0	78.1
CTRL	0	0	0	0
CTRL	8.3	0	0	0
CTRL	30	0	0	0
CTRL	1.6	0	2.4	0
CTRL	0	0	6.7	9
CTRL	0	0	0	0
CTRL	0.71	0	0	0
CTRL	0	0	1.5	0

3.5. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement analysis reveals a polyclonal pattern in PFAPA tonsils

The patterns of the rearrangements of IGH, TCRB and TCRG were evaluated using DNA from blood and tonsils in search for a putative clonal/oligoclonal proliferation. Patients with PFAPA showed a normal Gaussian distribution of PCR fragment sizes with no traces of clonality/oligoclonality (data not shown). The PFAPA tonsils had slightly elevated numbers of gamma delta T lymphocytes. We explored the sequence motifs of multiple TCRG rearrangements generated via multiplex PCR and next generation sequencing in four PFAPA tonsils and three control tonsils aiming at finding a possible subset of gamma delta T lymphocytes shared in PFAPA and not present in controls. Interestingly, the clone CALWEVYYKKL, which was highly represented in PFAPA patient no. 3, has been previously detected in the peripheral blood of a patient with periodic fever syndrome (Jouen-Beades et al., 1999). Nevertheless, the highly sensitive NGS method detected the same clone (weakly represented, 0.001%–0.1%) in all of the PFAPA and control tonsils. Also the other public TCRG rearrangements were present in both PFAPA and controls (Supplementary Material and Supplementary Table 1).

Most of TCRG rearrangements in unsorted T lymphocytes are non-functional, accompany productive TCRB rearrangements in TCR $\alpha\beta$ lymphocytes and are present in virtually all T lymphocytes (Sherwood et al., 2011; Fronkova et al., 2005). Consistent with this, most of the TCRG rearrangements in tonsils were non-functional (unproductive or using pseudogene), apparently corresponding to TCR $\alpha\beta$ lymphocytes, and did not show any larger (>1%) clonal/oligoclonal expansion.

3.6. PFAPA tonsils have a higher expression of T cell chemoattractant genes

The expression levels of CXCL1, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13 and CCL19 genes in PFAPA tonsils are shown in Fig. 4. The levels of CXCL9, CXCL10 and CCL19 were significantly higher in PFAPA tonsils ($p=0.0006$, $p=0.001$ and $p=0.01$, respectively). There was a similar yet not significant trend for CXCL12 ($p=0.08$). There was no difference in CXCL1 and CXCL13 gene expression.

4. Discussion

To our knowledge, our study is the first to explore in detail the lymphocyte subsets in PFAPA tonsils. A recently published study exploring the tonsils of patients with PFAPA examined mRNA

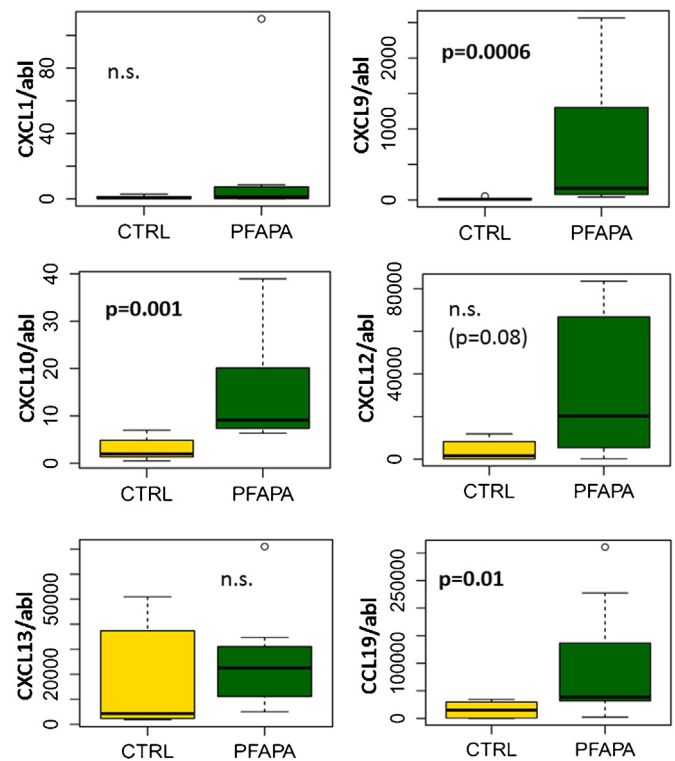


Fig. 4. The gene expression levels of CXCL1, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13 and CCL19 genes in PFAPA tonsils are shown relatively to the expression levels in mixed peripheral blood of five healthy donors.

expression of various cytokines and found IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-17 and IFN- γ mRNA levels that were similar to control hypertrophic tonsils, with the only exception of IL-4 being lower in the PFAPA tonsils (Valenzuela et al., 2013). Chen et al. (Chen et al., 2009) investigated the tissue sections of patients with autoinflammatory syndromes including one tonsil from a patient with PFAPA and found that the tonsil of the PFAPA patient contained more basophils with bound or internalised IgD. Mucosal basophils in autoinflammatory syndromes could enhance inflammation by releasing IL-1 β and LL-37 in response to microbial antigens with IgD-binding activity. The plasma IgD^{pos}IgM^{neg} class switched cells were elevated in both the blood and tonsils of patients with autoinflammatory syndromes. In our study, we found increased numbers of plasma cells in the peripheral blood of PFAPA patients. However, we could not assess their IgD production, as we only measured the surface (not intracellular) IgD in our study. IgD isolated from human serum has been demonstrated to enhance the release of IL-1 β , TNF- α and interleukin-1 receptor antagonist from human mononuclear cells (Drenth et al., 1996). A recent study suggests that monocytes trigger the autoinflammatory cascade through the release of IL-1 β (Kolly et al., 2013). In the experimental setting of our study, we could only indirectly assess the numbers of monocytes, which did not differ between the PFAPA and control tonsils (data not shown).

In our study, we observed elevated levels of the naïve stages of both CD4 and CD8T cells and an approximately 2-fold increase in the CD8T cell proportion in the PFAPA tonsils. Because the TREC levels were the same or even higher in the PFAPA tonsils, the increased numbers of T lymphocytes were not due to homeostatic proliferation but instead corresponded to newly arrived cells. All investigated parameters were concordant among the tonsil pairs in our patients; the pathogenetic mechanism apparently affects the tonsils as a whole instead of through an isolated focal process. A study by Brown et al. (Brown et al., 2010) speculated that reduced concentrations of IL-7, IL-17 and IFN γ in the afebrile interval may

indicate defective T cell regulation in PFAPA syndrome. We found an approximately 2-fold lower percentage of CD4^{POS} T cells with a high expression of the inhibitory molecule PD-1 in the PFAPA tonsils. CD4^{POS} T cells have been described to be localised in the rim of germinal centres and to have the main primary function of helping B cells, mostly via producing various factors including LFA3, CD40L, ICOS, OX40, and CD10. Neutralising antibodies against CD40L or ICOS abolished the increased antibody production by B cells cocultivated with CD4^{POS}PD-1^{high} T cells (Wang et al., 2011). Consistent with this finding, we found a decreased number of switched memory B cells in the PFAPA tonsils, suggesting that variations in the T cell compartment cause perturbations in the B cell functions in tonsils. Three studies (Brown et al., 2010; Stojanov et al., 2011; Forsvoll et al., 2013) found increased levels of chemokines that are known T-cell chemoattractants during PFAPA flares compared with asymptomatic intervals. The levels of CXCL10 protein remained increased in afebrile period in the plasma in one study (Forsvoll et al., 2013), while CXCL9 protein was found increased, yet lower than during PFAPA flares, in another study (Stojanov et al., 2011). The numbers of both the CD4 and CD8T cells in PB were reduced during PFAPA flares (Stojanov et al., 2011). This could indicate that the elevated numbers of CD8T cells in tonsils taken in asymptomatic periods in our study originate from their recruitment to tonsils from blood during PFAPA flares. We found significantly higher levels of CXCL9, CXCL10 and CCL19 gene expression in PFAPA tonsils even in afebrile period. All three proteins participate in T cell chemoattraction. CXCL1, a chemokine with neutrophil chemoattractant activity, was found increased in PB during PFAPA flares, but the gene expression was normal in afebrile period (Stojanov et al., 2011). Consistent with this, we found no difference in tonsillar CXCL1 expression between attacks. The gene expression levels of CXCL13, a known chemoattractant for B lymphocytes, did not differ in PFAPA tonsils. This further supports our findings that B cells are not as important as T cells in PFAPA pathogenesis.

A study by Stojanov et al. (Stojanov et al., 2011) found slightly elevated levels of gamma delta T lymphocytes during the asymptomatic period. Using the numbers of CD3^{high}DN cells, we set the approximate value of gamma delta T cells to be slightly elevated in the PFAPA tonsils. However, the compartment of CD3^{high}DN cells does not contain solely gamma delta T cells. A T cell receptor gamma with a CALWEVYYKLL CDR3 amino acid sequence was previously described in a patient with recurrent fever and was abundant in tonsil of one PFAPA patient (Jouen-Beades et al., 1999), but it was also present in all remaining PFAPA and control tonsils. Additionally, the spectrum of other TCRG rearrangements overlapped among the PFAPA and controls. Thus, the gamma delta T cells respond to some unspecific stimuli rather than a specific antigen in PFAPA patients. The composition of the lymphocyte subsets with an elevation of CD8 cells in our study raised the question of whether a viral antigen could be a trigger of PFAPA flares. There have been no studies examining viral loads in PFAPA patients thus far. We found DNA from EBV, HHV-6 and adenovirus but not cytomegalovirus in most PFAPA and also in most control tonsils. Very recently, a study exploring transcriptome of 6 PFAPA tonsils and 8 controls in search of infectious triggers of PFAPA has found human coxsackievirus, parechovirus and adenovirus C RNA at low abundance in a subset of samples but again without enrichment of any of these viruses in PFAPA cases (Freeman et al., *In press*). Therefore, a virus as a potential trigger of PFAPA flare is not excluded; however, other cooperating factors are probably necessary. Two recent studies found variants in inflammasome-related genes in a part of PFAPA patients (Kolly et al., 2013 Jun; Kubota et al., 2014), which supports the hypothesis of a dysregulated immune response to a yet unidentified trigger.

The tonsillectomies have been curative in all of the patients in our PFAPA group, a result that is similar to other published

reports (Feder and Salazar, 2010; Garavello et al., 2009; Peridis et al., 2010a). There were no further episodes of PFAPA after tonsillectomy in these patients over an 8-month follow up period. Our case series is similar to others in the literature regarding most frequent clinical symptoms (Feder and Salazar, 2010 Feb; Marshall et al., 1987; Tasher et al., 2006). A recurrence of aphthous stomatitis in PFAPA patients after surgery has been previously described in some studies (Valenzuela et al., 2013; Pignataro et al., 2009; Vigo et al., 2014), but this was not a finding of our study. The median age at surgery in PFAPA patients was also similar to that reported in other series (Feder and Salazar, 2010; Valenzuela et al., 2013). In line with previously published findings, the histology results of all of the PFAPA tonsils corresponded with the signs of chronic tonsillar inflammation, and the PFAPA tonsils cultivation examinations were negative for bacteria in all patients (Peridis et al., 2010b; Pignataro et al., 2009). The optimal treatment of PFAPA syndrome remains a matter of a debate. The administration of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory agents has been judged to be ineffective (Thomas et al., 1999). The most effective non-surgical treatment is episodic administration of a corticosteroid with positive clinical effects in 80–90% of the patients (Feder and Salazar, 2010; Berlucci et al., 2003; Wurster et al., 2011; Krol et al., 2013). Nevertheless, a single dose of prednisone administered at the febrile episode onset does not prevent the recurrence of fevers. The shortening of afebrile intervals in up to 50% of prednisone-treated patients was also described in some studies (Feder and Salazar, 2010). The use of additional prednisone doses in cases of insufficient response has been reported by some authors (Thomas et al., 1999; Tasher et al., 2006); however, other authors did not recommend this method without prior medical re-assessment to exclude infection (Krol et al., 2013). The recently published meta-analysis reported equal effects of corticotherapy and tonsillectomy, but tonsillectomy (+/- adenoidectomy) was the most effective intervention for the long-term resolution of PFAPA syndrome (Peridis et al., 2010a). There is no apparent difference in patient outcome regarding whether an adenoidectomy is performed alongside the tonsillectomy (Wong et al., 2008). In a recent study (Stojanov et al., 2011), five PFAPA patients were treated with the recombinant IL-1 receptor antagonist anakinra with a prompt clinical response. According to the literature, PFAPA syndrome resolves spontaneously after several years; the study with the longest follow up described disease remission in 50/59 patients whose disease lasted for a mean of 6.3 years (Wurster et al., 2011).

5. Conclusion

A positive effect of tonsillectomy was proven in 100% of the PFAPA patients in our study. Most of the observed differences comprised T lymphocyte compartments and were limited to tonsils. This can partially explain the mechanism for therapeutic success in tonsillectomy. The increased numbers of polyclonal and early developmental stages of T lymphocytes accompanied by an elevation in gene expression of T cell chemoattractants in PFAPA tonsils suggest their recruitment from the PB to the tonsils via impaired chemokine expression in PFAPA.

Acknowledgements

This work was supported by GAUK 266411. T.K. and J.T. were supported by the GACR Centre of Excellence P302/12/G101. E.F. received the LíOreal for Women in Science Fellowship in 2013. M.K. was supported by IGA NT/14343-3. We thank Jan Stuchly for help with the data analysis. The authors are most grateful to doc. Zdeněk Kabelka, Ph. D. (passed away on 24 March 2014) for his expertise

and invaluable help with all aspects of the study. The authors wish to dedicate this paper to his memory.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.004>.

References

- Berlucchi, M., Meini, A., Plebani, A., Bonvini, M.G., Lombardi, D., Nicolai, P., 2003. Update on treatment of Marshall's syndrome (PFAPA syndrome): report of five cases with review of the literature. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 112 (4 (April)), 365–369.
- Brown, K.L., Wekell, P., Osla, V., Sundqvist, M., Savman, K., Fasth, A., et al., 2010. Profile of blood cells and inflammatory mediators in periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis (PFAPA) syndrome. *BMC Pediatr.* 10, 65.
- Claas, E.C., Schilham, M.W., de Brouwer, C.S., Hubacek, P., Echavarría, M., Lankester, A.C., et al., 2005. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 43 (4 (April)), 1738–1744.
- Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengten, E., et al., 2009. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10 (8 (August)), 889–898.
- Drenth, J.P., Goertz, J., Daha, M.R., van der Meer, J.W., 1996. D. Immunoglobulin enhances the release of tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β as well as interleukin-1 receptor antagonist from human mononuclear cells. *Immunology* 88 (3 (July)), 355–362.
- Feder, H.M., Salazar, J.C., 2010. A clinical review of 105 patients with PFAPA (a periodic fever syndrome). *Acta Paediatr.* 99 (2 (February)), 178–184.
- Freeman S, Bhatt A, Pedomallu C, King S, Duke F, Jung J, et al. A121: in search of infectious triggers of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis syndrome. *Arthritis Rheumatol. Mar;66 Suppl 11:S158*.
- Forsvoll, J., Kristoffersen, E.K., Oymar, K., 2013. Elevated levels of CXCL10 in the Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis and cervical Adenitis syndrome (PFAPA) during and between febrile episodes; an indication of a persistent activation of the innate immune system. *Pediatr. Rheumatol. Online J.* 11 (1), 38.
- Fronkova, E., Krejci, O., Kalina, T., Horvath, O., Trka, J., Hrusak, O., 2005. Lymphoid differentiation pathways can be traced by TCR delta rearrangements. *J. Immunol.* 175 (4 (August)), 2495–2500.
- Fronkova, E., Klocperk, A., Svaton, M., Novakova, M., Kotrova, M., Kayserova, J., et al., 2014. The TREC/KREC Assay for the Diagnosis and Monitoring of Patients with DiGeorge Syndrome. *PLOS One* 9 (12 (December)), e114514.
- Garavello, W., Romagnoli, M., Gaini, R.M., 2009. Effectiveness of adenotonsillectomy in PFAPA syndrome: a randomized study. *J. Pediatr.* 155 (2 (August)), 250–253.
- Gautheret-Dejean, A., Manichanh, C., Thien-Ah-Koon, F., Fillet, A.M., Mangeney, N., Vidaud, M., et al., 2002 Feb. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J. Virol. Methods* 100 (1–2 (February)), 27–35.
- Hofer, M., Pillet, P., Cochard, M.M., Berg, S., Krol, P., Kone-Paut, I., et al., 2014. International periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome cohort: description of distinct phenotypes in 301 patients. *Rheumatology (Oxford)* 53 (6 (June)), 15–21.
- Hornik, K., Buchta, Ch, Zeileis, A., 2009. Open-Source Machine Learning: R Meets Weka. *Computational Statistics* 24 (2), 225–232.
- Hubacek, P., Virgili, A., Ward, K.N., Pohlreich, D., Keslova, P., Goldova, B., et al., 2009. HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *Br. J. Haematol.* 145 (3 (May)), 394–398.
- Witten, I.H., Frank, E., 2005. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques*, 2nd ed. Morgan Kaufmann, San Francisco.
- Jouen-Beades, F., Halary, V., Drouot, L., Peyrat, M.A., Paris, E., Joly, P., et al., 1999. Expansion of circulating V gamma 9/V delta 1 T cells in a patient with a syndrome of recurrent fever: evidence for an unusual antigen-driven process leading to selection of recurrent motifs within TCR junctional loops of diverse lengths. *Eur. J. Immunol.* 29 (10 (October)), 3338–3349.
- Kolly, L., Busso, N., von Scheven-Gete, A., Bagnoud, N., Moix, I., Holzinger, D., et al., 2013. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome is linked to dysregulated monocyte IL-1 β production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (6 (June)), 1635–1643.
- Krol, P., Bohm, M., Sula, V., Dytrych, P., Katra, R., Nemcova, D., et al., 2013. PFAPA syndrome: clinical characteristics and treatment outcomes in a large single-center cohort. *Clin. Exp. Rheumatol.* 31 (6 (November–December)), 980–987.
- Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., et al., 1999. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 37 (1 (January)), 132–136.
- Kubota, K., Ohnishi, H., Teramoto, T., Kawamoto, N., Kasahara, K., Ohara, O., et al., 2014. Clinical and genetic characterization of Japanese sporadic cases of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis syndrome from a single medical center in Japan. *J. Clin. Immunol.* 34 (5 (July)), 584–593.
- Mahnke, Y.D., Brodie, T.M., Sallusto, F., Roederer, M., Lugli, E., 2013. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 43 (11 (November)), 2797–2809.
- Marshall, G.S., Edwards, K.M., Butler, J., Lawton, A.R., 1987. Syndrome of periodic fever, pharyngitis, and aphthous stomatitis. *J. Pediatr.* 110 (1 (January)), 43–46.
- Peridis, S., Koudounnakis, E., Theodoridis, A., Stefanaki, K., Helmis, G., Houlakis, M., 2010a. Surgical outcomes and histology findings after tonsillectomy in children with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. *Am. J. Otolaryngol.* 31 (6 (November–December)), 472–475.
- Peridis, S., Pilgrim, G., Koudounnakis, E., Athanopoulos, I., Houlakis, M., Parpounas, K., 2010b. PFAPA syndrome in children: A meta-analysis on surgical versus medical treatment. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 74 (11 (November)), 1203–1208.
- Pignataro, L., Torretta, S., Pietrogrande, M.C., Dellepiane, R.M., Pavesi, P., Bossi, A., et al., 2009. Outcome of tonsillectomy in selected patients with PFAPA syndrome. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 135 (6 (June)), 548–553.
- Pongers-Willemsse, M.J., Verhagen, O.J., Tibbe, G.J., Wijkhuijs, A.J., de Haas, V., Roovers, E., et al., 1998 Dec. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 12 (12 (December)), 2006–2014.
- Pongers-Willemsse, M.J., Seriu, T., Stolz, F., d'Aniello, E., Gameiro, P., Pisa, P., et al., 1999. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13 (1 (January)), 110–118.
- Sherwood, A.M., Desmarais, C., Livingston, R.J., Andriessen, J., Haussler, M., Carlson, C.S., et al., 2011. Deep sequencing of the human TCRgamma and TCRbeta repertoires suggests that TCRbeta rearranges after alphabeta and gammadelta T cell commitment. *Sci. Transl. Med.* 3 (90 (July)), 90ra61.
- Stojanov, S., Hoffmann, F., Kery, A., Renner, E.D., Hartl, D., Lohse, P., et al., 2006. Cytokine profile in PFAPA syndrome suggests continuous inflammation and reduced anti-inflammatory response. *Eur. Cytokine Netw.* 17 (2 (June)), 90–97.
- Stojanov, S., Lapidus, S., Chitkara, P., Feder, H., Salazar, J.C., Fleisher, T.A., et al., 2011. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) is a disorder of innate immunity and Th1 activation responsive to IL-1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (17 (April)), 7148–7153.
- Tasher, D., Somekh, E., Dalal, I., 2006. PFAPA syndrome: new clinical aspects disclosed. *Arch. Dis. Child.* 91 (12 (December)), 981–984.
- Thomas, K.T., Feder Jr., H.M., Lawton, A.R., Edwards, K.M., 1999. Periodic fever syndrome in children. *J. Pediatr.* 135 (1 (July)), 15–21.
- Tanaka, N., Kimura, H., Hoshino, Y., Kato, K., Yoshikawa, T., Asano, Y., et al., 2000. Monitoring four herpesviruses in unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26 (11 (December)), 1193–1197.
- Vlkova, M., Fronkova, E., Kanderova, V., Janda, A., Ruzickova, S., Litzman, J., et al., 2010. Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naive human B cells marked by CD24 expression. *J. Immunol.* 185 (11 (December)), 6431–6438.
- van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., et al., 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17 (12 (December)), 2257–2317.
- van Zelm, M.C., Szczepanski, T., van der Burg, M., van Dongen, J.J., 2007. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J. Exp. Med.* 204 (3 (March)), 645–655.
- Valenzuela, P.M., Araya, A., Perez, C.I., Maul, X., Serrano, C., Beltran, C., et al., 2013. Profile of inflammatory mediators in tonsils of patients with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome. *Clin. Rheumatol.* 32 (12 (December)), 1743–1749.
- Vigo, G., Martini, G., Zoppi, S., Vittadello, F., Zulian, F., 2014. Tonsillectomy efficacy in children with PFAPA syndrome is comparable to the standard medical treatment: a long-term observational study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 32 (January), S156–S159.
- Wurster, V.M., Carlucci, J.G., Feder Jr., H.M., Edwards, K.M., 2011. Long-term follow-up of children with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. *J. Pediatr.* 159 (6 (December)), 958–964.
- Weinberg, K., Blazar, B.R., Wagner, J.E., Agura, E., Hill, B.J., Smogorzewska, M., et al., 2001. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* (5 (March)), 1458–1466.
- Wang, C., Hillsamer, P., Kim, C.H., 2011. Phenotype effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. *BMC Immunol.* 12, 53.
- Wong, K.K., Finlay, J.C., Moxham, J.P., 2008. Role of Tonsillectomy in PFAPA Syndrome. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 134 (1 (January)), 16–19.

Concise report

International periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome cohort: description of distinct phenotypes in 301 patients**Michaël Hofer^{1,2}, Pascal Pillet³, Marie-Madeleine Cochard¹, Stefan Berg⁴, Petra Krol⁵, Isabelle Kone-Paut⁶, Donato Rigante⁷, Véronique Hentgen⁸, Jordi Anton⁹, Riva Brik¹⁰, Bénédicte Neven¹¹, Isabelle Touitou¹², Daniela Kaiser¹³, Agnès Duquesne¹⁴, Carine Wouters¹⁵ and Marco Gattorno¹⁶****Abstract**

Objectives. The aims of this study were to describe the clinical features of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis (PFAPA) and identify distinct phenotypes in a large cohort of patients from different countries.

Methods. We established a web-based multicentre cohort through an international collaboration within the periodic fevers working party of the Pediatric Rheumatology European Society (PReS). The inclusion criterion was a diagnosis of PFAPA given by an experienced paediatric rheumatologist participating in an international working group on periodic fever syndromes.

Results. Of the 301 patients included from the 15 centres, 271 had pharyngitis, 236 cervical adenitis, 171 oral aphthosis and 132 with all three clinical features. A total of 228 patients presented with additional symptoms (131 gastrointestinal symptoms, 86 arthralgias and/or myalgias, 36 skin rashes, 8 neurological symptoms). Thirty-one patients had disease onset after 5 years and they reported more additional symptoms. A positive family history for recurrent fever or recurrent tonsillitis was found in 81 patients (26.9%). Genetic testing for monogenic periodic fever syndromes was performed on 111 patients, who reported fewer occurrences of oral aphthosis or additional symptoms. Twenty-four patients reported symptoms (oral aphthosis and malaise) outside the flares. The CRP was >50 mg/l in the majority (131/190) of the patients tested during the fever.

Conclusion. We describe the largest cohort of PFAPA patients presented so far. We confirm that PFAPA may present with varied clinical manifestations and we show the limitations of the commonly used diagnostic criteria. Based on detailed analysis of this cohort, a consensus definition of PFAPA with better-defined criteria should be proposed.

Key words: PFAPA, child, autoinflammatory disease, recurrent fever, cohort.

¹Paediatric Rheumatology Unit of Western Switzerland, Department of Paediatrics, CHUV, University Hospital of Lausanne, Lausanne, ²Department of Paediatrics, HUG, Geneva, Switzerland, ³Paediatric Rheumatology, Department of Paediatrics, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France, ⁴Paediatric Rheumatology, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden, ⁵Paediatric Rheumatology, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ⁶Paediatric Rheumatology, Department of Paediatrics, CEREMAI, CHU de Bicêtre, APHP, Paris SUD, Faculty of Medicine, Le Kremlin-Bicêtre, France, ⁷Paediatric Rheumatology, Department of Paediatric Sciences, Università Cattolica Sacro Cuore, Rome, Italy, ⁸CEREMAI (National Centre for Auto-Inflammatory Diseases), Department of Paediatrics, Hôpital Mignot, Versailles, France, ⁹Paediatric Rheumatology, Department of Paediatrics, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ¹⁰Paediatric Rheumatology, Meyer Children's

Hospital of Haifa Rambam Medical Center, Faculty of Medicine, Technion Haifa, Israel, ¹¹Paediatric Rheumatology, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France, ¹²Unité Médicale des Maladies Auto-Inflammatoires, Hôpital A de Villeneuve, Montpellier, France, ¹³Paediatric Rheumatology, Kantonspital, Lucerne, Switzerland, ¹⁴Paediatric Rheumatology, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Lyon, France, ¹⁵Paediatric Rheumatology, Department of Paediatrics, University Hospital Leuven, Leuven, Belgium and ¹⁶UO Pediatria 2, Rheumatology Unit, G. Gaslini Institute, Genoa, Italy.

Submitted 19 December 2012; revised version accepted 28 November 2013.

Correspondence to: Michaël Hofer, Paediatric Rheumatology, Department of Paediatrics, BH11-CHUV, CH-1011 Lausanne, Switzerland. E-mail: Michael.Hofer@chuv.ch

Introduction

Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis (PFAPA) is a recurrent fever syndrome diagnosed according to previously published criteria (supplementary Table S1, available at *Rheumatology* Online) [1–5] and clinician usually rely on these criteria. However, because PFAPA is not a well-defined disease and there are no specific confirmatory tests, the power of these criteria remains limited.

Since the first description by Marshall in 1987 [6], 10 cohorts with >25 PFAPA patients per cohort (supplementary Table S2, available at *Rheumatology* Online) have been published [1, 2, 5, 7–13] with different sets of diagnostic criteria. The clinical manifestations differed in frequency between the studies [14], suggesting that these cohorts may not represent exactly the same population of patients. In 2007 we created an international cohort to describe the complete clinical and laboratory spectrum of PFAPA syndrome and identify distinct phenotypes.

Methods

We established a cohort (<http://www.pfapa.net>) with the participation of 15 centres from eight countries (supplementary Table S3, available at *Rheumatology* Online). Only physicians with expertise in the field of recurrent fever syndromes and PFAPA (publication or participation in an international working group) were allowed to participate.

The PFAPA patients were divided in complete cluster (all three cardinal symptoms) and incomplete cluster (one or two cardinal symptoms) groups. Exclusion of monogenic autoinflammatory (MAI) diseases was performed according to the centres' policy on clinical evaluation or molecular analysis. The previously published diagnostic criteria [1] were applied to our cohort and three distinct phenotypes were described: complete vs incomplete cluster, disease onset before vs after 5 years of age and patients who underwent genetic testing or not. Consecutive PFAPA patients were included using a web-based form (Access, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) asking for demographic and clinical information, laboratory investigations, treatment and outcome. Only anonymous (de-identified) retrospective clinical data were entered. The Commission cantonale (VD) d'éthique de la recherche sur l'être humain, CHUV, Lausanne, Switzerland approved the study and the parents/caregivers gave their informed consent according to the local ethical regulations.

Statistical methods

Ninety-five per cent CIs were calculated based on the Poisson distribution for the relative risk (RR) of reported symptoms comparing subgroups of patients (three distinct phenotypes).

Results

From January 2007 to October 2009, 301 PFAPA patients were included: 161 boys and 140 girls (1.15 male/1 female); median age at inclusion, 6.8 years (range 0.5–34); median age at disease onset, 1.7 years (range 0.1–12); median age at diagnosis, 4.0 years (range 0.8–32). The median interval between fever attacks was 4 weeks (range 1–12) and the median duration was 4 days (range 1–10). By definition, all patients presented with at least one cardinal symptom (Table 1): pharyngitis (271, exudative 113), cervical adenitis (236, bilateral 205) and oral aphthosis (171). Additional symptoms were reported by 228 patients (Table 2): abdominal pain, arthralgias, myalgias and headache were present during all or most flares in the majority of the patients who reported them; the other symptoms occurred only in some flares.

A positive family history was reported in 81/301 patients [recurrent fever, 47; recurrent tonsillitis, 15; PFAPA, 11; FMF, 8]. In the eight patients with a family history of FMF, the clinical picture and genetic testing were non-contributory for FMF. Parents originated mainly from countries participating in the study (88% of the mothers and 86% of the fathers; supplementary Table S4, available at *Rheumatology* Online), which corresponds to the rate of foreigners living in European countries, suggesting the absence of a specific ethnic background for PFAPA. We are aware that the rates of foreign origin are only an estimate of the rates of children with different ethnic backgrounds.

According to the first of the current criteria [1], onset of fever flares should occur before age 5 years (supplementary Fig. S1, available at *Rheumatology* Online), which was not the case in 31 patients. Most of them (21/31) experienced their first symptoms before age 6 years. In the 31 patients with later disease onset, pharyngitis, aphthae, abdominal pain, diarrhoea, arthralgias and headache were more frequent, and vomiting, nausea and cervical adenitis less frequent (Tables 1 and 2).

Fifty-four patients (17.9%) reported only one cardinal symptom, 115 (38.2%) two symptoms and 132 (43.9%) all three symptoms; the latter, considered as a complete PFAPA cluster, was more often found in patients with disease onset after 5 years (Table 1). Patients with the complete cluster were more often girls [73/132 (52%)] than boys [59/132 (45%), RR=1.88, 95% CI 1.6, 2.2, $P < 0.001$] (supplementary Fig. S2, available at *Rheumatology* Online) and presented more frequently with myalgias (24.4% vs 16.6%, RR=1.63, 95% CI 1.25, 2.0, $P < 0.01$), arthralgias (34.6% vs 26.9%, RR=1.44, 95% CI 1.1, 1.77, $P < 0.05$), osteoarticular symptoms (46.2% vs 32.5%, RR=1.78, 95% CI 1.45, 2.11, $P < 0.001$), diarrhoea (22.5% vs 11.5%, RR=2.23, 95% CI 1.84, 2.62, $P < 0.001$), abdominal symptoms (66.4% vs 53.6%, RR=1.71, 95% CI 1.39, 2.04, $P < 0.001$) and skin rash (19.4% vs 7.7%, RR=2.87, 95% CI 2.45, 3.28, $P < 0.001$).

In 145/301 patients, exclusion of MAI diseases was done only on a clinical basis. Genetic testing was done on 111 patients (36.9%) and was negative in 97 patients

TABLE 1 Frequency of the cardinal symptoms

Symptom	All tested (n = 301)	Genetically tested (n = 111)	Non-genetically tested (n = 190)	P-value	<5 years (n = 270)	≥5 years (n = 31)	P-value
Pharyngitis	271 (90)	93 (85)	178 (94)	P < 0.001	241 (90)	30 (97)	<0.001
Cervical adenitis	236 (78)	87 (80)	149 (78)	ns (P > 0.50)	213 (79)	23 (74)	<0.05
Oral aphthosis	171 (57)	70 (64)	101 (53)	P < 0.01	151 (56)	20 (65)	<0.01
All three symptoms (complete cluster)	132 (44)	56 (51)	76 (40)	P < 0.001	115 (43)	17 (55)	<0.001

Values are the number of patients (%). The frequency of the cardinal symptoms is shown in all 301 patients, in genetically tested vs non-genetically tested patients and in patients with disease-onset <5 years vs ≥5 years. ns: not significant.

(supplementary Table S5, available at *Rheumatology* Online). In some centres, mevalonic aciduria was measured during fever flares and mevalonate kinase (MVK) deficiency (MKD) gene mutation analyses were performed in patients with positive results. Genetic testing was more frequently performed in patients with disease onset after 5 years [15/31 (48.4%), RR = 1.70, 95% CI 1.37, 2.03, $P < 0.001$] than in patients with earlier disease onset [96/270 (35.6%)]. We compared the clinical presentation in patients who had genetic testing and patients without genetic testing (supplementary Fig. S2, available at *Rheumatology* Online).

In our cohort, 24 patients (8%) presented at least one symptom between flares: malaise (4) and aphthous stomatitis (20). These patients did not present any other symptoms, suggesting an alternative diagnosis such as Behçet's disease. All patients but one (height at -3 s.d.) had normal growth.

CRP and neutrophil count showed a marked increase during fever flares. CRP was >30 mg/l in 155 patients, >50 mg/l in 131 and >100 mg/l in 77; outside the flare the median value was 5 mg/l, and only 12 patients had a level >10 mg/l. After a single dose of steroids (average dose 1 mg/kg) at fever flare onset, resolution of the fever occurred in 93/147 patients (63%), 46 (32%) were partially improved and only 8 (5%) were non-responders.

Discussion

We report the largest cohort of PFAPA patients so far described, aiming to describe particular PFAPA phenotypes and to evaluate how expert paediatricians applied the current diagnostic criteria on a large number of patients. The modified Marshall's criteria remain highly unspecific [15], and the lack of consensus on the PFAPA definition is illustrated by differences in the criteria used in previously published cohorts [16]. The diagnosis of PFAPA is generally based on a number of variables (dramatic onset of attacks, lack of response to antibiotics, repetitive presence of cardinal symptoms and prompt response to steroids) that are much more complex than the mere satisfaction of the current diagnostic criteria. For these reasons, in order to avoid possible bias of selection, we considered expert opinion as the gold standard.

Since the complete cluster (all three cardinal symptoms) could represent the true typical PFAPA, we were surprised to see more additional symptoms reported. We can explain it by a better awareness of additional symptoms, such as pain, presented by these children, or by the increase in systemic symptoms in patients with more systemic inflammation. Based on our findings, we cannot challenge the current criteria, and conclude that more than one cardinal symptom is needed for the diagnosis [15].

In our cohort we reported disease onset before 5 years of age in 90% of patients [15]. There is no reason not to believe that the 31 patients with later-onset disease have PFAPA. A recently published observation of a series of PFAPA patients with adult-age onset [17] challenges the rationale for an age cut-off as a criterion. To record the

TABLE 2 Frequency of different symptoms during flares among the 301 patients

	Present	Always	Often	Sometimes	≥ 5 years	P-value	RR (95% CI)
Abdominal symptoms (at least one of below)	176 (59)	52	56	68	23 (74)		
Pain	136 (45)	47 (15.8)	40 (13.5)	49 (16.5)	19 (61)	<0.001	2.45 (2.13, 2.78)
Vomiting	53 (18)	3 (1.0)	16 (5.4)	34 (11.5)	2 (6)	<0.001	0.31 (0, 0.71)
Nausea	32 (11)	2	11	19	1 (3)	<0.01	0.28 (0, 0.75)
Diarrhoea	48 (16)	3 (1.0)	10 (3.4)	35 (11.9)	6 (19)	<0.001	1.74 (1.32, 2.15)
Osteoarticular symptoms (at least one of below)	118 (39)	23	48	47	16 (52)		
Arthralgias	90 (30)	13 (4.4)	37 (12.5)	40 (13.4)	14 (45)	<0.001	2.20 (1.85, 2.55)
Myalgias	56 (20)	12	23	21	8 (26)	<0.01	1.59 (1.19, 1.99)
Arthritis	8 (3)	0	2	6	1 (3)	ns (>0.50)	1.30 (0.51, 2.08)
Headache	85 (29)	19	35	31	12 (39)	<0.05	1.72 (1.36, 2.07)
Skin rash	38 (13)	6 (2.0)	10 (3.4)	22 (7.4)	4 (13)	ns (>0.50)	1.59 (1.19, 1.99)
Conjunctivitis	16 (5)	0	2	14	2 (6)	ns (<0.30)	1.35 (0.75, 1.95)
Neurological symptoms	11 (4)	1	1	9	0 (0)	ns (>0.50)	0.00 (−0.69, 0.69)

Values are number of patients (%). ns: not significant.

exact date of disease onset may be difficult in young children with recurrent infections, and because of the long diagnostic delay (median 2.3 years). In our study, late-onset PFAPA patients showed a higher frequency of some symptoms, such as abdominal and osteoarticular pain. A higher pain reporting capability in older children can explain this difference, but also a selection bias, as patients not meeting the age criterion would need to be more convincing to the doctor. Since FMF and TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) may have a later onset, genetic testing was more frequently performed in this subgroup of patients. Our observation shows similar clinical features in PFAPA patients with later disease onset compared with other PFAPA patients, suggesting that age is not a reason to exclude the diagnosis. In any case, in patients with disease onset after 5 years of age, we recommend intensifying the search for other diagnoses, such as MAI, autoimmune disorders and malignancies.

Because of the strict periodicity of fever attacks described by Thomas *et al.* [1], only cyclic neutropenia was considered as an exclusion in the criteria [15]. Since a significant percentage of patients with MAI show regularly recurrent attacks [7], they represent a relevant differential diagnosis [3, 8]. MKD has the highest degree of clinical overlap with PFAPA [8], however, a PFAPA-like phenotype can also be observed in children with FMF and TRAPS [8, 18]. The patients who underwent genetic testing presented more additional symptoms, which could be a good reason for more frequent genetic testing. One of our patients was affected by MKD and 14 patients showed heterozygosis or polymorphisms in the *MEFV* or *MVK* gene. In a recent study on 94 *MEFV* heterozygous patients (mainly of Jewish or Arabic origin) with recurrent fevers, only 4 patients presented a clear PFAPA phenotype [18]. We believe that the exclusion of MAI should be included in a new version of the criteria. Recently a

diagnostic score based on the high frequency of specific clinical manifestations was shown to be able to distinguish those PFAPA-like patients at higher risk of carrying mutation of genes associated with inherited periodic manifestations [8].

In our cohort, the frequency of the different symptoms was similar to previously published studies [3, 8]. In the current diagnostic criteria, the description of the fever episodes is rather vague and the characteristics of the cardinal symptoms are not defined. The frequency and duration of fever and a minimal number of episodes were described but were not included in the original criteria [1]. In our opinion, a more detailed description of these variables in the criteria would help to better identify PFAPA patients.

The presence of high CRP is uncommon in viral infections of the respiratory tract, another important differential diagnosis of PFAPA. As reported previously [19], our results showed high CRP values during PFAPA flares, with normalisation between fever episodes in the vast majority of the patients, which strongly suggests PFAPA and should be included in the criteria.

Symptoms (mainly aphthae) were reported outside flares in 24 patients. In these patients a careful differential diagnosis should be carried out, in particular Behçet's disease. A good response to steroids, as confirmed in our cohort, may be used as an additional criterion for diagnosis. However, other MAI such as MVK may also respond well to this treatment.

Due to lack of consensus on precise classification criteria and the absence of a definite diagnostic marker, our study presents some limitations. We had to rely on the expert interpretation of current PFAPA criteria as a gold standard for the diagnosis. Every centre had its own policy for exclusion of MAI, leading to great variability, but there is currently no evidence on this and at the time of collection no low-risk score was present.

The periodicity of fever attacks was not recorded, and it was not clearly required in the diagnostic criteria. Finally, our cohort was recruited retrospectively to collect a relevant number of patients.

With this study we report the largest cohort of PFAPA patients published so far and we describe three distinct phenotypes. Previous studies have suggested the low specificity of the present PFAPA diagnostic criteria [8], and we attempted to verify their possible pitfalls, identify possible sources of misunderstanding and propose modifications. Even if paediatricians are able to recognize PFAPA patients, the absence of a validated classification is problematic for further evaluation of treatment efficacy and outcome. A classification system for PFAPA syndrome based on a consensus among experts followed by a validation process should be undertaken until we have a better knowledge of the aetiology of PFAPA syndrome.

Rheumatology key messages

- The large cohort of patients describes different periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis syndrome phenotypes.
- This study emphasizes the need for validated classification criteria for periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology* Online.

References

- 1 Thomas KT, Feder HM Jr, Lawton AR *et al.* Periodic fever syndrome in children. *J Pediatr* 1999;135:15–21.
- 2 Tasher D, Somekh E, Dalal I. PFAPA syndrome: new clinical aspects disclosed. *Arch Dis Child* 2006;91:981–4.
- 3 Hofer MF, Mahlaoui N, Prieur AM. A child with a systemic febrile illness—differential diagnosis and management. *Best Practice Res Clin Rheumatol* 2006;4:627–40.
- 4 Long S. Syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis (PFAPA)—what it isn't What is it? *J Pediatr* 1999;135:1–5.
- 5 Cochard M, Clet J, Le L *et al.* PFAPA syndrome is not a sporadic disease. *Rheumatology* 2010;49:1984–7.
- 6 Marshall GS, Edwards KM, Butler J *et al.* Syndrome of periodic fever, pharyngitis, and aphthous stomatitis. *J Pediatr* 1987;110:43–6.
- 7 Padeh S. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome: clinical characteristics and outcome. *J Pediatr* 1999;135:98–101.
- 8 Gattorno M, Caorsi R, Meini A *et al.* Differentiating PFAPA syndrome from monogenic periodic fevers. *Paediatrics* 2009;124:e721–8.
- 9 Renko M, Salo E, Putto-Laurila A *et al.* A randomized, controlled trial of tonsillectomy in periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis syndrome. *J Pediatr* 2007;151:289–92.
- 10 Feder HM, Salazar JC. A clinical review of 105 patients with PFAPA (a periodic fever syndrome). *Acta Paediatr* 2010;99:178–84.
- 11 Dagan E, Gershoni-Baruch R, Khatib I *et al.* MEFV, TNF1 α , CARD15 and NLRP3 mutation analysis in PFAPA. *Rheumatol Int* 2010;30:633–6.
- 12 Garavello W, Romagnoli M, Gaini RM. Effectiveness of adenotonsillectomy in PFAPA syndrome: a randomized study. *J Pediatr* 2009;155:250–3.
- 13 Licameli G, Jeffrey J, Luz J *et al.* Effect of adenotonsillectomy in PFAPA syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:136–40.
- 14 Caorsi R, Pellagatti MA, Federici S *et al.* Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:579–84.
- 15 Marshall GS, Edwards KM. PFAPA syndrome [letter]. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:658–9.
- 16 Hofer MF. Letter to the editor. Cured by tonsillectomy: was it really a PFAPA syndrome? *J Pediatr* 2008;153:298.
- 17 Padeh S, Stoffman N, Berkun Y. Periodic fever accompanied by aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis syndrome (PFAPA syndrome) in adults. *Isr Med Assoc J* 2008;10:358–60.
- 18 Koné-Paut I, Hentgen V, Guillaume-Czitrom S *et al.* The clinical spectrum of 94 patients carrying a single mutated MEFV allele. *Rheumatology* 2009;48: 840–2.
- 19 Førsvoll JA, Oymar K. C-reactive protein in the periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis (PFAPA) syndrome. *Acta Paediatr* 2007; 96:1670.