

Serološka dijagnostika likvora

Jasna Pavela

Cerebrospinalna tekućina (CSF)

- Četiri glavne kategorije bolesti
 - CNS infekcije
 - Subarahnoidalno krvarenje
 - CNS malignosti
 - Demijelinizirajuće bolesti CNS

Infektivni agensi koji su povezani sa bolestima CNS

PATOGEN		DIJAGNOSTIKA
Bakterije		
<i>Neisseria meningitides</i>		Mikroskopija, kultura
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		Mikroskopija, kultura
<i>Staphylococcus aureus</i>		Mikroskopija, kultura
<i>Treponema pallidum</i>		serologija
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		PCR, kultura, tuberkulinski test
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>		Serologija
<i>Leptospira interrogans</i>		Kultura, serologija
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		Serologija

Infektivni agensi koji su povezani sa bolestima CNS

PATOGEN		DIJAGNOSTIKA	
Virusi			
Herpes symplex tip 1 i 2		PCR, serologija	
Varicella- Zoster		PCR, serologija	
HIV		PCR, serologija	
Tick- borne encephalitis virus		serologija	
Adenovirus		PCR, PCR, serologija	
Ospice		Serologija	
Rubella virus		Serologija	
Influenza virus		Serologija	

Infektivni agensi koji su povezani sa bolestima CNS

PATOGEN		DIJAGNOSTIKA
Gljivice		
Aspergillus fumigatus		biopsija
Candida sp.		antigen
Criptococcus neofrmans		India ink, antigen
Paraziti		serologija
Echinococcus granulosus		Serologija
Toxoplasma gondii		Serologija, PCR

Diferencijalna dijagnoza meningitisa

laboratorijski rezultati

Bakterijski	Virusni	Tuberkularni	Fungalni
VISOKI LEUKOCITI	VISOKI LEUKOCITI	VISOKI LEUKOCITI	VISOKI LEUKOCITI
Neutrofili	Limfociti	Limfo & Monociti	Limfo & Monociti
značajno povišeni proteini	umjereno povišeni proteini	umjereno povišeni proteini	umjereno povišeni proteini
značajno snižena glukoza	↔ normalna glukoza	snižena glukoza	Normalna do snižena glukoza
Laktat povišen	Laktat normalan	Laktat povišen	laktat povišen
+ bojanje po		fibrinska mrežica	+ Cryptococcus

Borrelia burgdorferi sensu lato

- ▶ bakterija iz roda spirocheta
- ▶ ***Borrelia burgdorferi sensu lato*** (opći naziv za sve *Borrelie* kojima nije definiran genospecijes, > od 20 genospecijesa)

Borrelia burgdorferi sensu strikto - (Sjeverna Amerika, Evropa

Borrelia afzelii (Evropa, Azija)

Borrelia garinii (Evropa, Azija)

Borrelia spielmanii

Borrelia bissetii

Borrelia valasiana

Borrelia lusitaniae

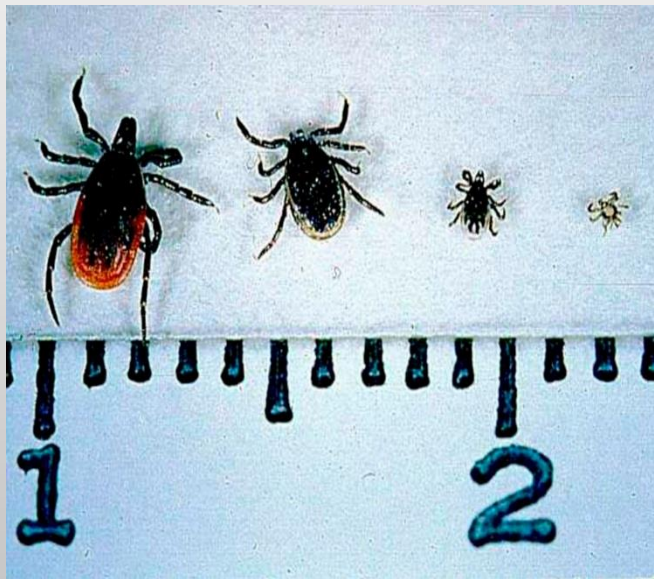
Borrelia burgdorferi sensu lato

- ▶ *Gram negativna Spiroheta*, oblik heliksa
- ▶ Motilna
- ▶ Ekstracelularni patogen
- ▶ Aerobna ili mikroaerofilna
- ▶ 7- 11 flagela
- ▶ Stanična i vanjska membrana
- ▶ Linearni kromosom i linearni i cirkularni plazmid
- ▶ Izaziva bolest Lajmsku boreliozu najzastupljeniju vektorski prenosivu bolest u umjerenom geografskom području



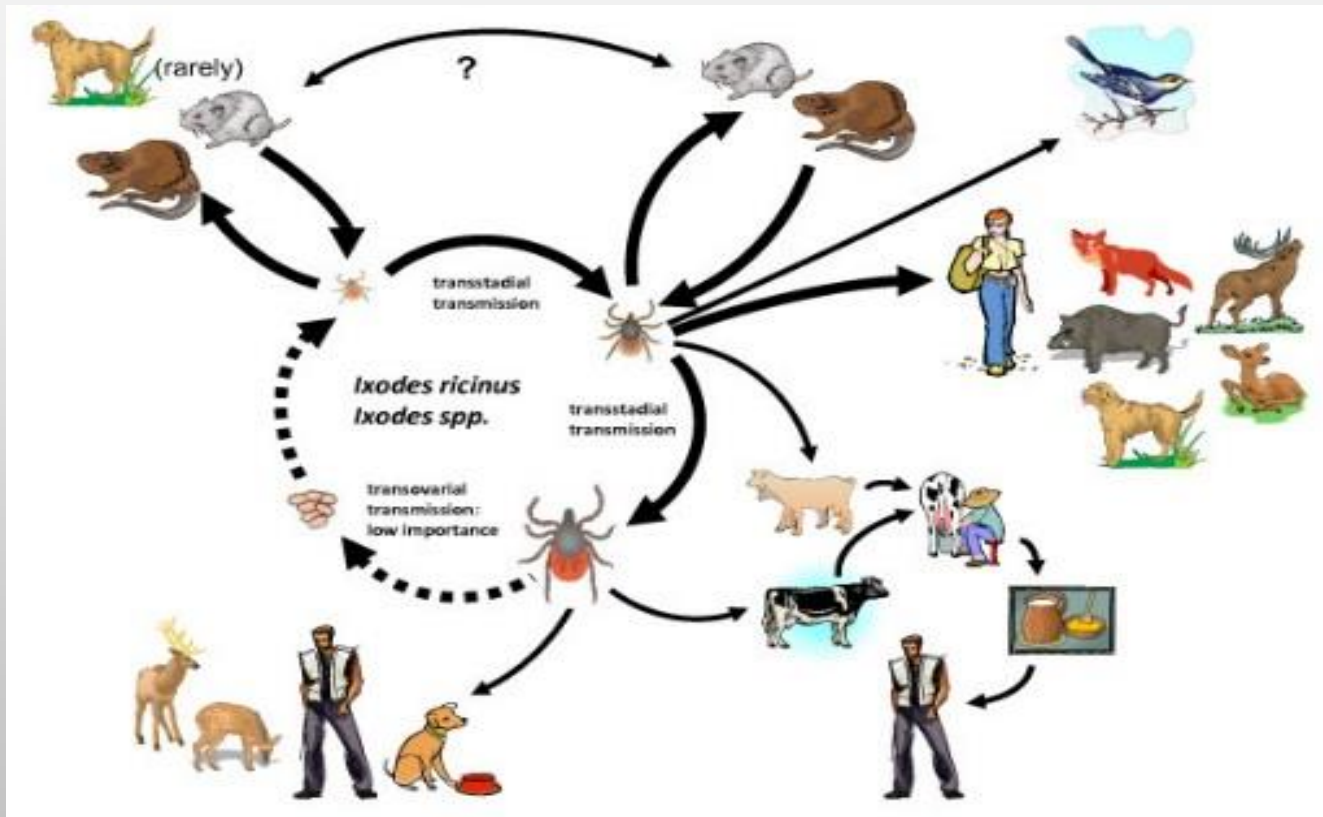
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/>

Epidemiologija



- ▶ Vektorska bolest koju prenose krpelji iz roda *Ixodes* (*Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes pacificus*)
- ▶ Krpelj ima tri razvojna stadija: larva, nimfa, odrasla jedinka
- ▶ Za sazrijevanje svakog stadija potrebno je hranjenje sa krvlju vertebrata.

Epidemiologija



Lajmska borelioza

- ▶ Prvi put zamijećena 1977. god. U gradu Lyme, SAD
- ▶ Velik broj slučajeva „juvenilnog reumatoidnog artritisa”
- ▶ 1982. izolirana *B. Burgdorferi sensu stricto*
- ▶ Nalazi se u crijevima krpelja i Prenosi na čovjeka ugrizom krpelja kada bakterija difundira iz crijeva do žlijezda slinovnica i prelazi na novog domaćina

Kliničke manifestacije

- ▶ Stupanj 1 - akutna lokalizirana bolest
- ▶ Stupanj 2 - subakutna, diseminirana bolest
- ▶ Stupanj 3 - kronična ili kasna perzistentna infekcija

1. Rana LB

- ▶ Krpelj se mora hraniti 12-48 sati
- ▶ Inkubacija 5-40 dana
- ▶ Kožne manifestacije
 - Erythema migrans (EM)-specifičan znak u 65 % pacijenata
 - Borelijski limfocitom-rjeđe
- ▶ Opći simptomi: nalik gripi

Erythema migrans



2. Rana diseminirana LB

- ▶ 2-12 tjedana
- ▶ Erythema migrans disseminata (višestruki EM)
- ▶ Neuroborelioza - Bannwarthov syndrom-meningopoliradikulitis, facijalna pareza
- ▶ Srce - srčani blok, karditis
- ▶ Zglobovi - artritis velikih zglobova posebno koljena

EM disseminata



3. Kasna LB

► Nekoliko mjeseci do godina nakon inicijalne infekcije

1. Dermatoboreliza

-ACA - Acrodermatitis chronica atropicans

2. Neuroboreliza

-ACA povezani-mono/poli neuritis

- progresivni encefalomijelitis

3. Artritis

Dijagnostika LB

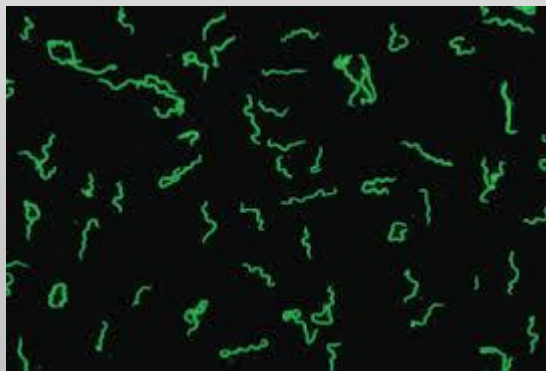
- ▶ Anamneza i klinička slika
- ▶ Mikrobiološka dijagnostika:
 - **kultivacija**- zlatni standard, vrlo specifična ali nedovoljno osjetljiva
 - **-PCR** - specifičan ali također malo osjetljiv u uzorcima CSF ali osjetljiv u uzorcima sinovijske tekućine
- ▶ **-serološka dijagnostika**-Određivanje specifičnih protutijela IgM i IgG klase
- ▶ Uzorci: serum, likvor, sinovijska tekućina
- ▶ Protutijela se javljaju relativno kasno, nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci nakon inicijalne infekcije
- ▶ IgM se javljaju prva u roku od nekoliko tjedana a IgG od 6 tjedna do nekoliko mjeseci kasnije
- ▶ Neki pacijenti ne razvijaju imunosti odgovor (slabi reaktori)
- ▶ Oko 5% zdrave populacije također može imati pozitivna

Protutijela na B. burgdorferi u odnosu na faze bolesti

Faza LB	Osjetljivost	Klasa protutijela
I	20-50%	IgM
II	70-90%	IgM i IgG
III	Gotovo 100%	IgG

Metode određivanja specifičnih protutijela

- ▶ Serološki testovi nisu standardizirani i imaju različitu specifičnost i osjetljivost, a razlikuju se prema antigenu kojeg koriste (cijela bakterija, pročišćeni antigeni, rekombinantni antigeni)
- ▶ Indirektni imnfluorescentni test

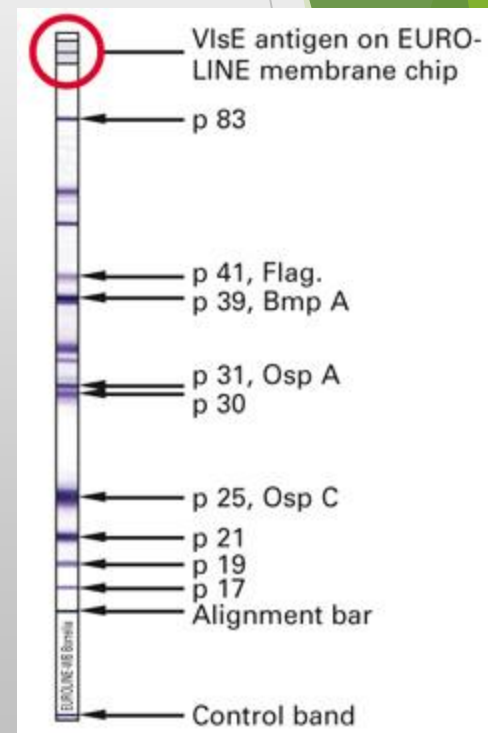


Metode određivanja specifičnih protutijela

- ▶ Enzimski imunotest (EIA) - ELISA,
- ▶ CLIA
- ▶ Imunoblot testovi - Western blot

Preporučeno testiranje u dva koraka

1. EIA ili IFA - granične i pozitivne provjeriti sa
2. Western blot



Specifični borelijski antigeni

- ▶ OspA (outer surface protein A) - 31 kDa-ekspresija proteina unutar crijeva krpelja, sedam različitih tipova, specifičan za vrstu
- ▶ OspC (outer surface protein C) 31,22,23,24,25 kDa - ekspresija u organizmu domaćina, 13 tipova, najspecifičniji za IgM odgovor
- ▶ Osp B, Osp E, Osp D slabi imunski odgovor
- ▶ Flagelin - (41 kDa) vrlo imunogen u ranoj fazi bolesti ali moguće križne reakcije sa drugim spirohetama
- ▶ Dekorin vezujući protein DbpA (21kDa) - vezivanje na proteoglikane
- ▶ VlsE (variable major protein-like sequence expressed)

ključna uloga u izbjegavanju imunološkog organizma domaćina. Javlja se isključivo in vivo stoga se u testovima koristi rekombinantni antigen.

Sastoji se od tri dijela: - konzervirana regija unutar bakterijske stanice

-nevarijabilna regija koja okružuje varijabilnu regiju.

Indeks protutijela (Antibody Indeks) AI

- ▶ Sva protutijela koja se određuju u likvoru potrebno je paralelno određivati i u serumu
- ▶ Intratekalna sinteza protutijela
- ▶ Reiber diagram- omjer serumskih albumina i CSF albumina te serumskog IgG i CSF IgG-a
- ▶ **AI** - omjer količine protutijela likvora i seruma prema razini imunoglobulina iz uzoraka seruma i likvora
- ▶ **AI**= omjer protutijela/ omjer IgG, IgM
- ▶ Pozitivno >1.5

Lažno pozitivni rezultati testa

- ▶ Autoimune bolesti
- ▶ Infekcija EBV, CMV
- ▶ Križne reakcije sa treponemama, drugim borelijama, leptospirama

Zaključak

- ▶ Seropozitivnost ne dokazuje uzročnost bolesti
- ▶ Rezultati se moraju interpretirati poznavajući kriterije za pozitivan rezultat
- ▶ Rezultati se moraju interpretirati zajedno sa anamnezom i kliničkom slikom

Literatura

- 1 Agüero-Rosenfeld, M.E., Wang G, Schwartz I., Wormser G.P. 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev.* 18(3): 484-509.
- 2 Arnez, M., E. Ruzic- Sabljic, J. Ahcan, A. Radsel- Medvescek, D. Pleterški-Rigler, F. Strle. 2001. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of children with solitary erythema migrans. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20:251-255.
- 3 Magnarelli, L. A., M. Lawrenz, S. J. Norris, E. Fikrig. 2002. Comparative reactivity of human sera to recombinant VlsE and other *Borrelia Burgdorferi* antigens in class-specific enzyme- linked immunosorbent assays for Lyme borreliosis. *J. Med. Microbiol.* 51:649-655.
- 4 Hildenbrand P., D.E. Craven, R. Jones and P. Nemeskal. 2009. Lyme Neuroborreliosis: Manifestation of a Rapidly Emerging Zoonosis. *American Journal of Neuroradiology.* 30(6) 1079-1087.

