

Neuroborrelióza a intratekální syntéza protilátek



Iva Stoklásková, TEST-LINE

Lenka Krbková, Klinika dětských infekčních nemocí, LF MU Brno

Jana Bednářová, Oddělení klinické mikrobiologie, FN Brno

Patogenní druhy borrelií

- ***Borrelia afzelii***
 - chronické kožní projevy (ACA)
- ***Borrelia garinii***
 - neurologické projevy
 - izolace z cerebrospinálního moku
- ***Borrelia burgdorferi sensu stricto***
 - kloubní postižení
- ***(B. bissettii, B. lusitaniae, B. spielmanii, B. bavariensis)***

Laboratorní metody

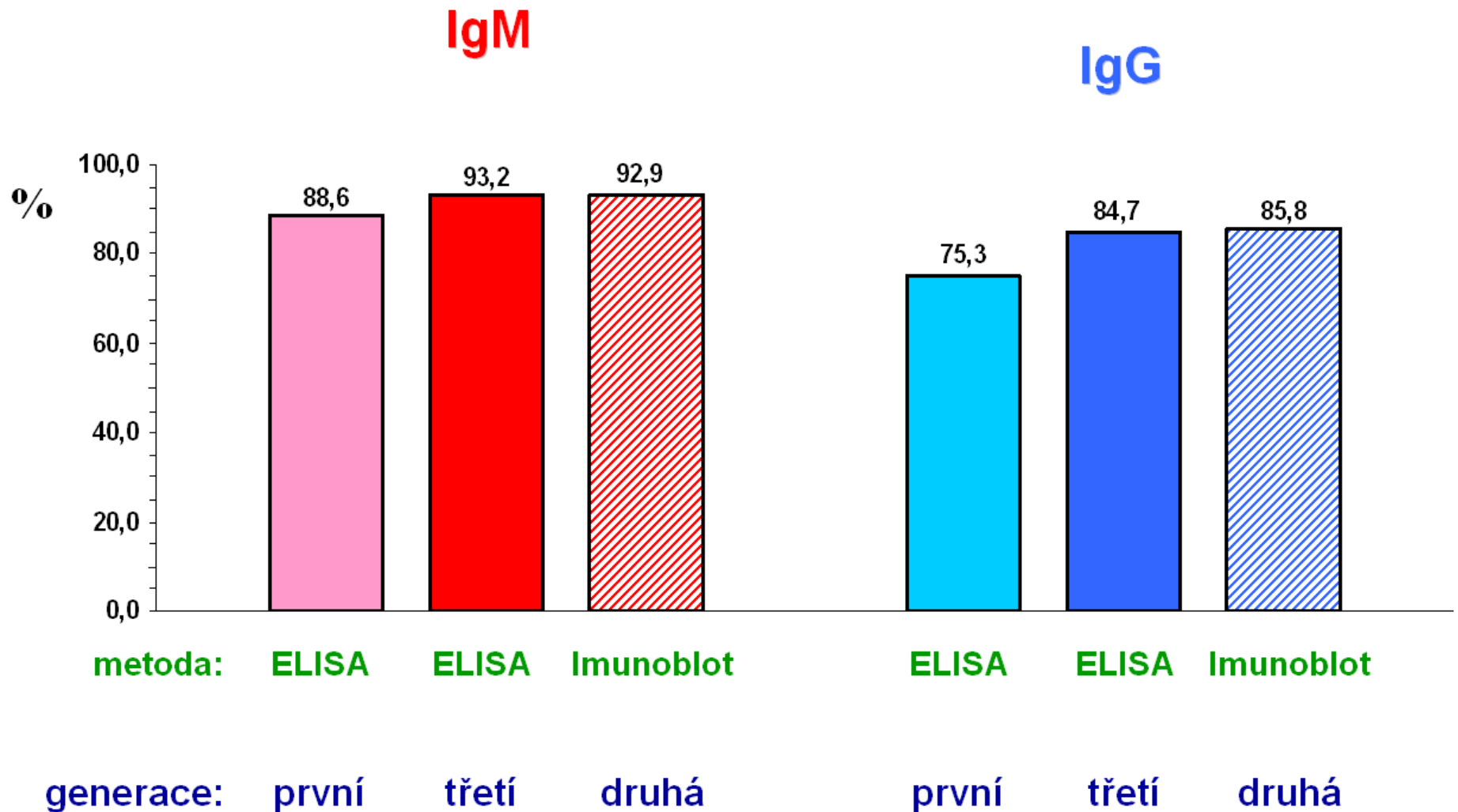
Vyšetřovací metody		Použití	Materiál
přímé	PCR	Upřesnění diagnózy, snadná kontaminace vzorku	Tkáně, likvor, synoviální tekutina, plná krev
	Kultivace	Průkaz živých borrelií, časově náročná metoda	Tkáně, likvor, plná krev
nepřímé	ELISA	Rutinní metoda (screening), průkaz intratekální syntézy	Sérum, synoviální tekutina, likvor
	Imunoblot	Konfirmační test, vysoká specifita	

Specifita – tři generace testů

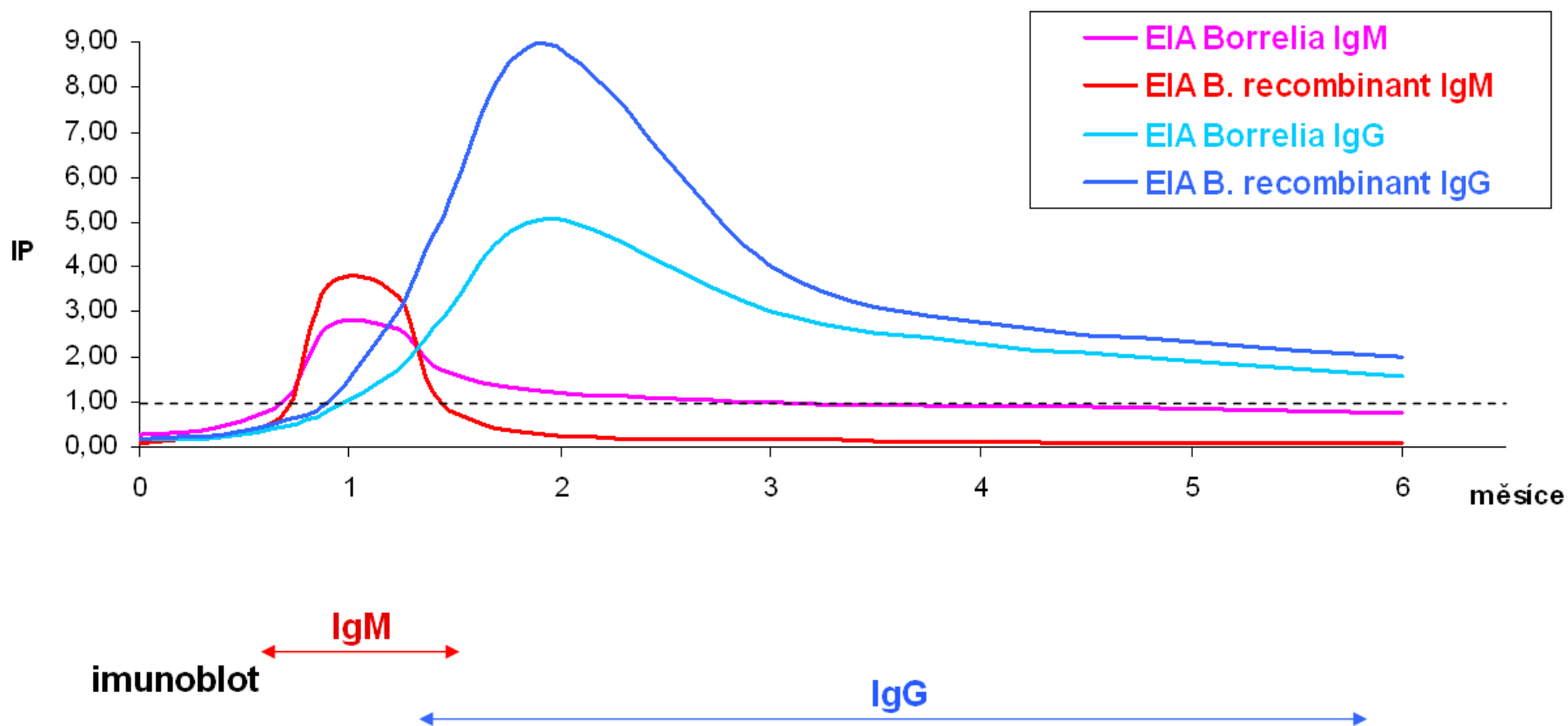
Testy		Specifita
první generace	EIA na sonifikovaném antigenu IFA na celobuněčném antigenu	80-90 %
druhé generace	EIA/IFA na extrahovaném antigenu Imunoblot na celobuněčném lysátu*	90-95 %
třetí generace	Rekombinantní EIA Rekombinantní imunoblot*	90-95 %

*pokud je použit jako konfirmační test, minimální specifita by měla být 95 %

Specifita, n = 352



Schematický průběh protilátkové odpovědi u souprav PRVNÍ a TŘETÍ generace v porovnání s reaktivitou v imunoblotech



Soupravy TŘETÍ generace v sortimentu fy. TEST-LINE

➤ EIA *Borrelia* recombinant **IgM**

- vybrané částí specifických antigenů **OspC**, p39 a vnitřního flagelinu (p41i) z druhů *Borrelia b. sensu lato*

➤ EIA *Borrelia* recombinant **IgG**

- vybrané části specifických antigenů **VlsE**, p83, p39, vnitřního flagelinu (p41i), OspC a p17 z druhů *Borrelia b. sensu lato*

- ❖ Vhodné pro screeningové stanovení
- ❖ Vysoká specifita při dosažení dostatečné citlivosti
- ❖ **Stanovení intratekální syntézy**

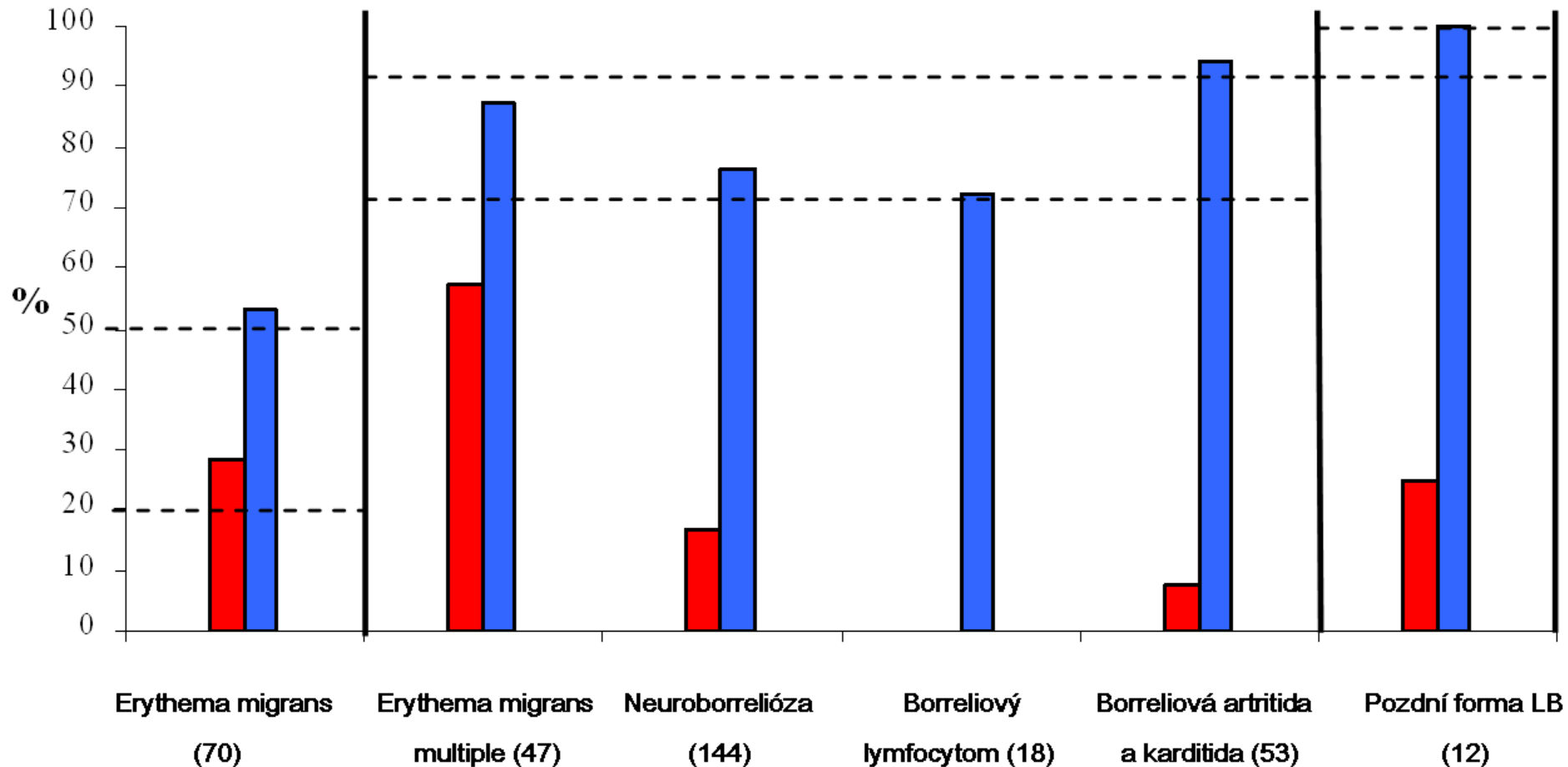
Citlivost – pro jednotlivá stádia infekce (n = 344 vzorků pacientů KDIN, 2004-5)

EIA B. recombinant IgM ■
 EIA B. recombinant IgG ■

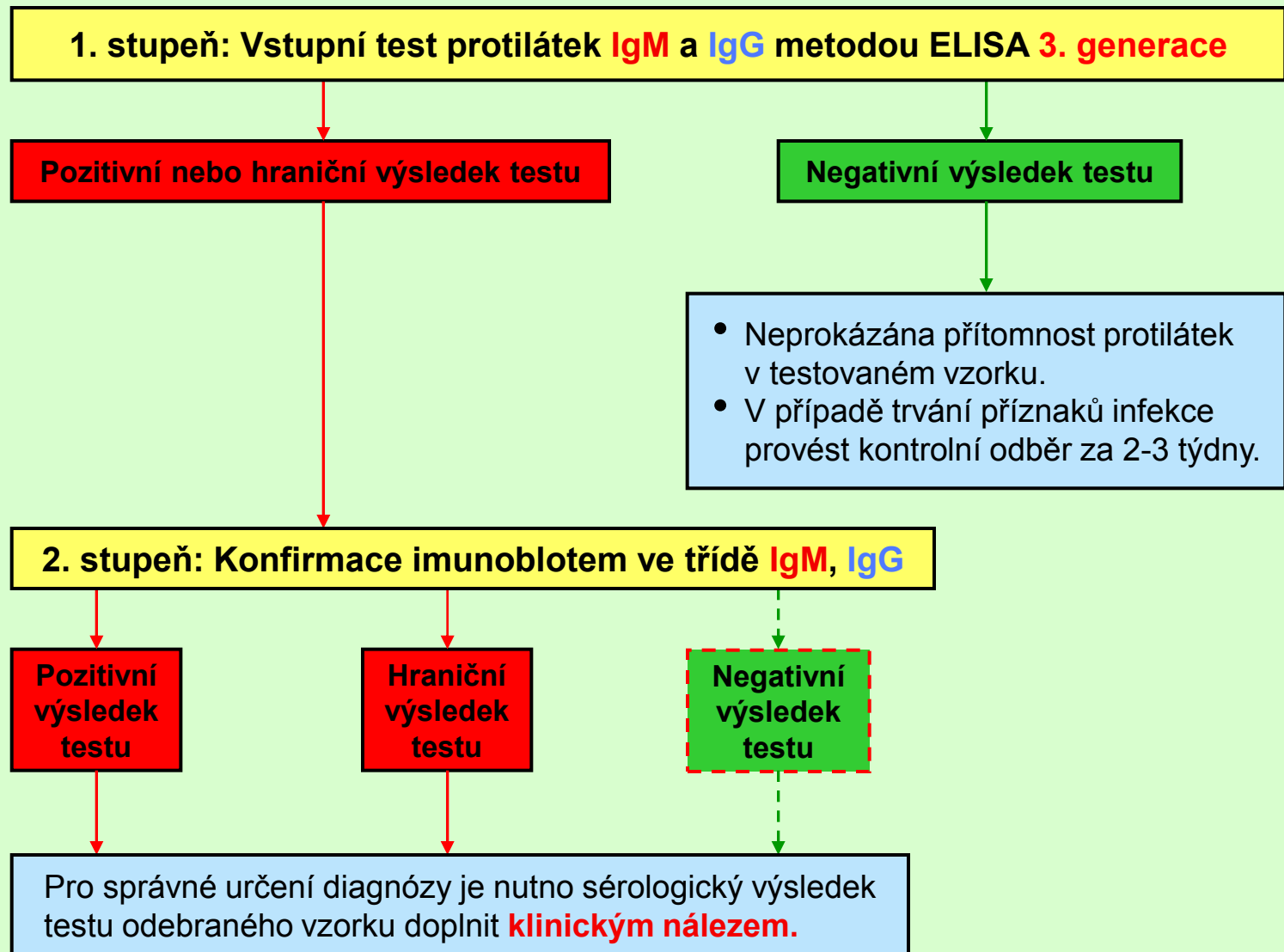
časná
lokalizovaná

časná
diseminovaná

pozdní forma
LB



Dvoustupňové sérologické stanovení protilátek



Interpretace výsledků sérologie

IgM		IgG		HODNOCENÍ
EIA	WB	EIA	WB	
-	-	-	-	přítomnost protilátek neprokázána
+	-	-	-	nespecifická reakce EIA, výsledek posuzovat jako negativní
-	-	+	-	
+	-	+	-	
+	+	+	-	pravděpodobně počáteční stadium onemocnění , časnější záchyt IgG protilátek v WB nebo EIA
+	+	-	+	
+	-	+	+	přetrvávající (zbytkové) protilátky zachycené EIA nebo WB v IgM
-	+	+	+	
-	-	-	+	ustupující zbytkové protilátky po léčbě , pouze WB v IgG
-	+	+	-	výjimečný záchyt přechodu protilátek mezi IgM a IgG
-	+	-	-	počáteční stadium onemocnění nebo heat-shock proteinová reakce nebo přetrvávající protilátky po léčbě pouze ve třídě IgM

Shrnutí

- **ELISA** je nečastěji používaná screeningová metoda při stanovení antiborreliových protilátek
- **VlsE** je diagnosticky velmi významný protein pro IgG
- Při diagnostice je nutno dodržovat **dvoustupňové stanovení protilátek**
- Pacienta je nutno léčit podle jeho celkového klinického stavu, nikoli dle výsledků sérologie

EIA soupravy fy. TEST-LINE vhodné pro stanovení intratekální syntézy protilátek

Testy		Specifita
první generace	EIA na sonifikovaném antigenu: EIA <i>Borrelia garinii</i> IgG, IgM	80-90 %
třetí generace	Rekombinantní EIA: EIA <i>Borrelia recombinant</i> IgG, IgM	90-95 %

Diagnostická kritéria NB

Dle European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUICALB)

Klinické projevy	Laboratorní průkaz: nutný	Laboratorní/ klinický průkaz: podpůrný
<p>U dospělých hlavně meningoradiculoneuritida, meningitida s nebo bez obrny lícního nervu; vzácně encefalitida a myelitida; výjimečně cerebrální vaskulitida.</p> <p>U dětí nejčastěji meningitida a/nebo obrna lícního nervu.</p>	<p>Pleocytóza a intratekální syntéza specifických protilátek. (V časně fázi nemoci může být intratekální syntéza negativní.)</p>	<p>Stanovení <i>B. burgdorferi</i> s.l. kultivací a/nebo PCR z likvoru.</p> <p>Specifické oligoklonální pásy v likvoru.</p> <p>Intratekální syntéza celkových IgM a/nebo IgG a/nebo IgA.</p> <p>Specifické protilátky v séru.</p> <p>Nedávné nebo probíhající EM.</p>

Proč stanovovat intratekální syntézu?

Výsledky EIA testu		Nález intratekální syntézy	Stanovení AI dle Reibera
Sérum	Likvor		
-	+	Pozitivní	Potvrzení positivity dle EUCALB
+	+	Obvykle pozitivní, ale je možný pasivní přenos protilátek přes narušenou H-L bariéru	Nutné pro určení intratekální syntézy
+	-	Může být pozitivní, pokud jsou naměřené hodnoty blízké hraniční kontrole	
-	-		

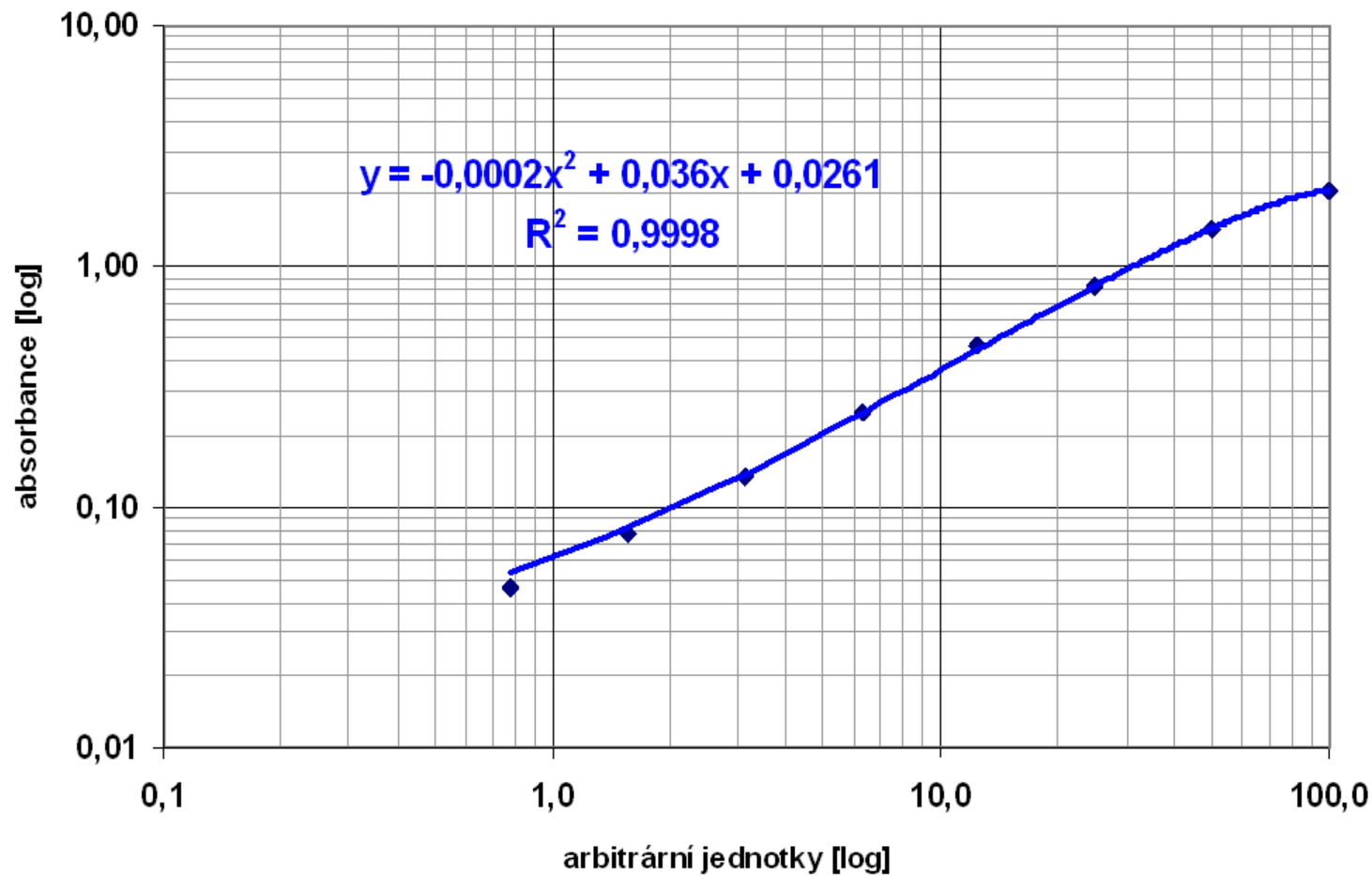
Antibody index (AI)

- V případech klinicky suspektních neuroborrelióz se stanovuje intratekální produkce specifických antiborreliových protilátek ve třídě IgG a IgM.
- AI - poměr koncentrace specifických protilátek v likvoru a séru ve vztahu ke stavu hematolikvorové bariéry a koncentraci celkových imunoglobulinů v likvoru a séru.

Stanovení antibody indexu (AI)

- **Materiál a vstupní data**
 - vzorky séra a likvoru odebrané současně
 - koncentrace albuminu, imunoglobulinů (IgG, IgM) v likvoru i v séru
 - Standardní sérum s absorbancí cca 2,0 při ředění 1:101 pro konstrukci kalibrační křivky

Kalibrační křivka standardního séra



Výpočet antibody indexu (AI) dle Reibera

Převedení absorbancí vzorků na arbitrární jednotky (AU)

$$Q_{\text{Spec(IgG)}} = \frac{\text{AU IgG v likvoru}}{\text{AU IgG v séru}} \quad Q_{\text{IgG}} = \frac{\text{IgG v likvoru}}{\text{IgG v séru}}$$

$$Q_{\text{Alb}} = \frac{\text{albumin v likvoru}}{\text{albumin v séru}}$$

$$Q_{\text{Lim(IgG)}} = 0,93 \times \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + (6 \times 10^{-6})} - 1,7 \times 10^{-3}$$

Je-li $Q_{\text{Lim(IgG)}} > Q_{\text{IgG}}$, pak $\text{AI(IgG)} = Q_{\text{Spec(IgG)}} / Q_{\text{IgG}}$

Je-li $Q_{\text{Lim(IgG)}} < Q_{\text{IgG}}$, pak $\text{AI(IgG)} = Q_{\text{Spec(IgG)}} / Q_{\text{Lim(IgG)}}$

AI $\geq 1,5$ indikuje pozitivní nález intratekální syntézy

$$Q_{\text{Lim(IgM)}} = 0,67 \times \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + (120 \times 10^{-6})} - 7,1 \times 10^{-3}$$

Závěrečný protokol

Intratekální syntéza - Borrelia IgG a IgM (Antibody index)

Vyšetření

Pacient	Horký Josef	Sérum č.	16
Rodné č.	2121212121	Likvor č.	15
Oddělení	KDIN	Odděb vzorku	11.12.2007

Laboratorní výsledky

	Albumin	IgG	IgM	Jednotka
Sérum	50,90	15,90	1,89	g/l
Likvor	893,00	248,00	35,80	mg/l

Hematolikorová bariéra

QAlb	17,54
------	-------

Hodnota QAlb	Stav hematolikorové bariéry
< 5	normální
5 - 10	lehká porucha
10 - 15	střední porucha
> 15	těžká porucha

Specifické protilátky

	Absorbance		Arbitrární jednotky	
	IgG	IgM	IgG	IgM
Sérum	1,624	1,797	41,58	48,88
Likvor	2,557	0,577	100,00	10,68

Výsledky

Antibody index	Intratekální syntéza		
	AI (IgG)	3,22	POZITIVNÍ výsledek
AI (IgM)	0,64	negativní výsledek	

Vzorky z Kliniky dětských infekčních nemocí FN Brno

Děti (182 párových vzorků likvorů a sér)

Soubor byl prezentován na 12. ICLB, Ljubljana, září 2010

Diagnóza	Kritéria	Počet sér	Počet likvorů	Skupina
NEUROBORRELIÓZA	Pozitivní intratekální syntéza v prvním nebo druhém odběru	86	86	PACIENTI 1
VYLOUČENÁ NB	Intratekální syntéza vyloučena, jiná forma Lymeské nemoci	30	30	PACIENTI 2
JINÉ INFEKCE	jiné diagnózy	66	66	KONTROLY

Vzácné reakce v souboru 86 vzorků pacientů s potvrzenou NB

Výsledky EIA testu		AI	IgM		IgG	
Sérum	Likvor		n	%	n	%
+	-	+	8	9,3	8	9,3
-	-	+	10	11,3	6	7,0

Pacientka č. 1 s NB - skupina 1

Intratekální syntéza - Borrelia IgG a IgM (Antibody index)

Vyšetření

Pacient	84-22/2009	Sérum č.	S
Rodné č.	1994	Likvor č.	L
Oddělení	KDIN	Odběr vzorku	18.9.2009

Laboratorní výsledky

	Albumin	IgG	IgM	Jednotka
Sérum	39,50	10,27	1,76	g/l
Likvor	148,00	22,00	3,21	mg/l

Hematolikorová bariéra	
QAlb	3,75

Hodnota QAlb	Stav hematokorové bariéry
< 5	normální
5 - 10	lehká porucha
10 - 15	střední porucha
> 15	těžká porucha

Specifické protilátky

	Absorbance		Arbitrární jednotky	
	IgG	IgM	IgG	IgM
Sérum	0,984	0,723	25,48	21,21
Likvor	0,455	0,167	9,11	1,71

Výsledky

			Intratekální syntéza
Antibody index	AI (IgG)	3,31	POZITIVNÍ výsledek
	AI (IgM)	2,43	POZITIVNÍ výsledek

Pacient č. 2 s NB - skupina 1

Intratekální syntéza - Borrelia IgG a IgM (Antibody index)

Vyšetření

Pacient	103-22/04	Sérum č.	103
Rodné č.	1994	Likvor č.	94
Oddělení	KDIN	Odběr vzorku	3.6.2005

Laboratorní výsledky

	Albumin	IgG	IgM	Jednotka
Sérum	46,20	10,53	1,85	g/l
Likvor	117,00	14,70	0,38	mg/l

Hematolikorová bariéra	
QAlb	2,53

Hodnota QAlb	Stav hematokorové bariéry
< 5	normální
5 - 10	lehká porucha
10 - 15	střední porucha
> 15	těžká porucha

Specifické protilátky

	Absorbance		Arbitrární jednotky	
	IgG	IgM	IgG	IgM
Sérum	0,277	0,179	4,25	2,09
Likvor	0,285	0,009	4,47	-3,14

Výsledky

		Intratekální syntéza	
Antibody index	AI (IgG)	14,89	POZITIVNÍ výsledek
	AI (IgM)	-	negativní výsledek (AI nelze vypočítat)

Pacientka č. 3 s vyloučenou NB skupina 2

Intratekální syntéza - Borrelia IgG a IgM (Antibody index)

Vyšetření

Pacient	25-22/2008	Sérum č.	25/22-08
Rodné č.	1999	Likvor č.	72/22-08
Oddělení	KDIN	Odběr vzorku	6.8.2008

Laboratorní výsledky

	Albumin	IgG	IgM	Jednotka
Sérum	48,70	9,80	1,32	g/l
Likvor	1980,00	381,00	61,27	mg/l

Hematolikorová bariéra

QAlb	40,66
------	-------

Hodnota QAlb Stav hematokorové bariéry

< 5	normální
5 - 10	lehká porucha
10 - 15	střední porucha
> 15	těžká porucha

Specifické protilátky

	Absorbance		Arbitrární jednotky	
	IgG	IgM	IgG	IgM
Sérum	0,623	0,321	13,96	6,68
Likvor	0,550	0,300	11,82	5,99

Výsledky

Antibody index	Intratekální syntéza		
	AI (IgG)		
	AI (IgG)	0,46	negativní výsledek
	AI (IgM)	0,84	negativní výsledek

Pacient č. 4 - jiné onemocnění, negativní lymfocytární pleocytóza

Intratekální syntéza - Borrelia IgG a IgM (Antibody index)

Vyšetření	51278/11	Sérum č.	S4
Pacient	1942	Likvor č.	L4
Rodné č.	Neuro. Třinec	Odběr vzorku	22.3.2011
Oddělení			

Laboratorní výsledky

	Albumin	IgG	IgM	Jednotka
Sérum	40,10	9,63	-	g/l
Likvor	360,00	35,10	-	mg/l

Hematolikorová bariéra		Hodnota QAlb	Stav hematokorové bariéry
QAlb	8,98	< 5	normální
		5 - 10	lehká porucha
		10 - 15	střední porucha
		> 15	těžká porucha

Specifické protilátky

	Absorbance		Arbitrární jednotky	
	IgG	IgM	IgG	IgM
Sérum	0,281	-	4,36	-
Likvor	0,225	-	2,88	-

Výsledky

			Intratekální syntéza
Antibody index	AI (IgG)	1,85	POZITIVNÍ výsledek
	AI (IgM)	-	nelze určit (netestováno)

Závěr

Intratekální syntézu protilátek lze stanovit pomocí souprav:

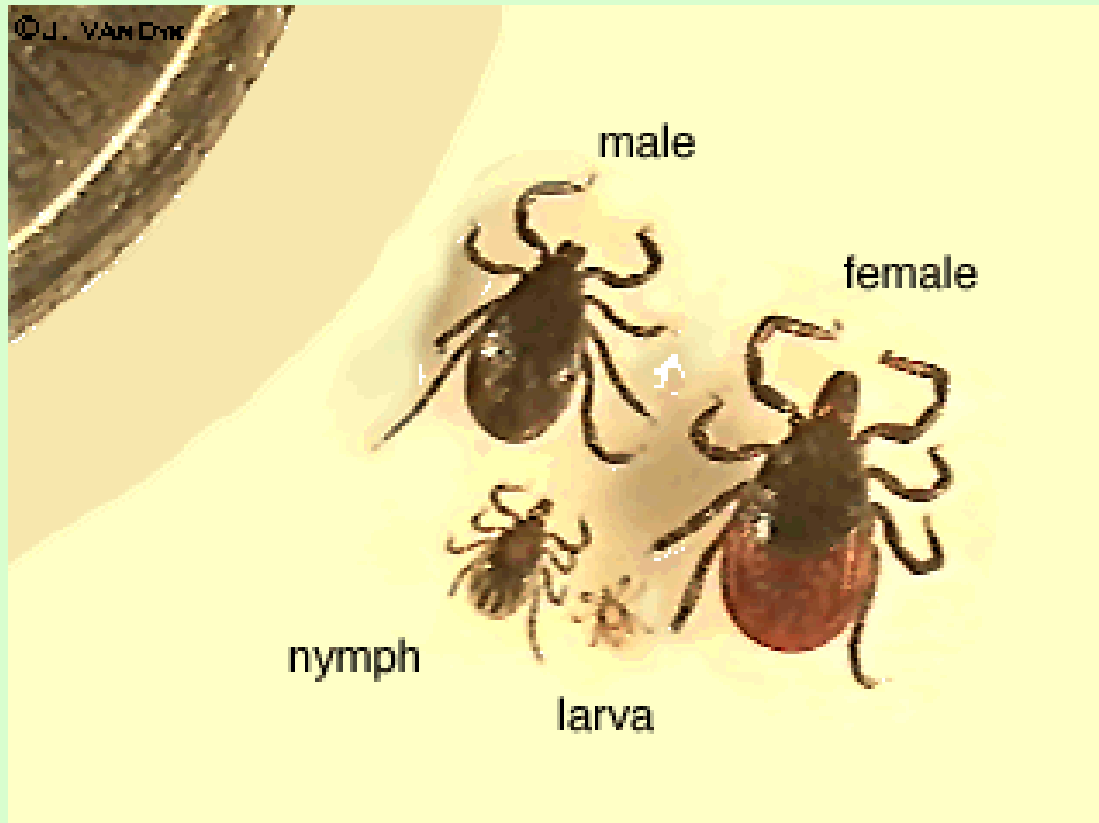
- EIA *Borrelia garinii* IgG, IgM
- EIA *Borrelia recombinant* IgG, IgM

Pro potvrzení neuroborreliózy jsou nutné:

- Klinické projevy
- Zánětlivé změny v likvoru (lymfocytární pleocytóza)
- Pozitivní intratekální syntéza

Negativní výsledek EIA testu v likvoru nebo i v séru neznamena automaticky negativní intratekální syntézu protilátek

Výpočetní program Antibody index firmy TEST-LINE umožňuje snadné, přesné a rychlé určení intratekální syntézy antiborreliových protilátek třídy IgG i IgM



Děkuji za pozornost.