

Metody detekce intrathekální syntézy antigen-specifických protilátek

Seminář infekční sérologie, Tábor 30. 5. 2019

David Zeman^{1,2,3}, Pavlína Kušnierová^{1,3}

¹ Katedra biomedicínských oborů, LF, Ostravská univerzita, ²Neurologická klinika a ³ Ústav laboratorní diagnostiky Fakultní nemocnice Ostrava

„Quantity vs. quality“

Odlišení lokální syntézy Ig v CNS od pasivního přestupu ze séra do likvoru je možné v zásadě dvěma způsoby:

- **Výpočet intrathekální syntézy:**
 - vychází ze změřených koncentrací **albuminu** (produkovan pouze v játrech \Rightarrow veškerý albumin v likvoru je krevního původu) a **Ig** v likvoru a séru
 - srovnání s referenční populací – statistický princip
 - německá likvorologická škola (prof. Reiber)
- **Oligoklonální Ig:**
 - v korektním provedení rovněž vychází ze změřených koncentrací Ig v likvoru a séru (nanášení stejného množství Ig v „párovém vzorku“ na gel)
 - individuální srovnání obrazu v likvoru s obrazem v séru téhož pacienta \Rightarrow zákonitě lepší výsledky!
 - bezvýhradně přijímáno pro IgG

Co potřebujeme vědět pro výpočet intrathekální syntézy

- Koncentrace albuminu v likvoru a séru
- Koncentrace IgG (IgM, IgA, volných lehkých řetězců) v likvoru a séru
- Kvocient albuminu:

$$Q_{Alb} = [Alb]_{CSF} / [Alb]_{serum}$$

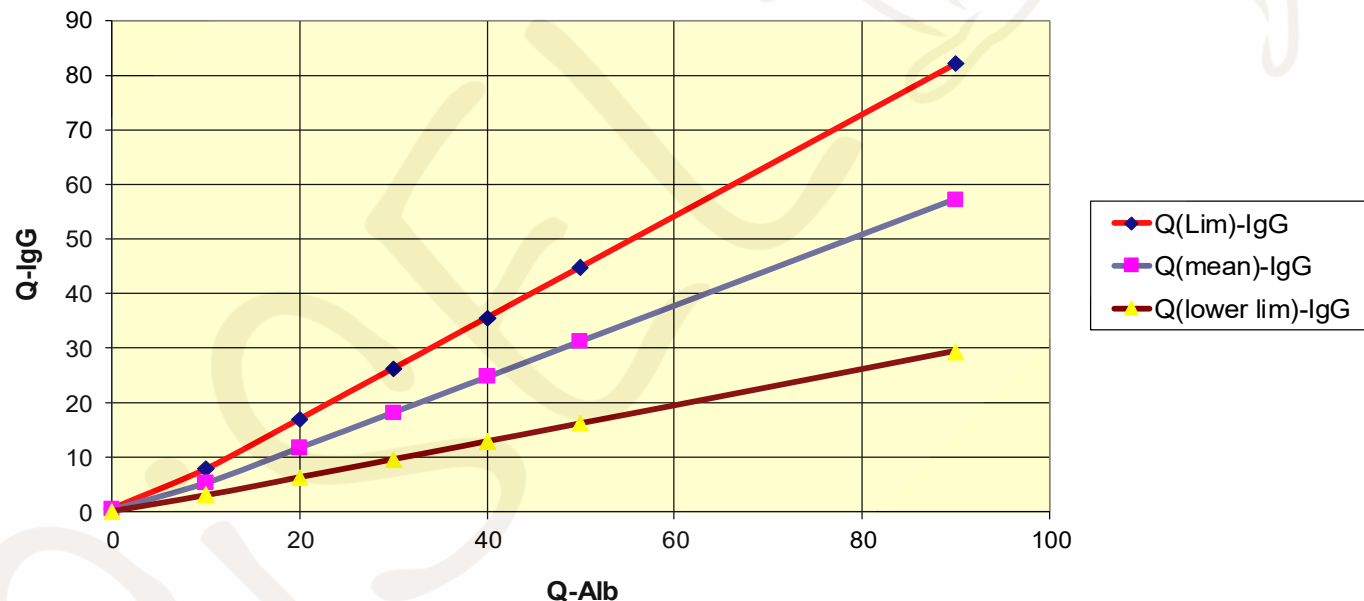
- Kvocient imunoglobulinu (např. IgG – obdobně IgM, IgA, ...)

$$Q_{IgG} = [IgG]_{CSF} / [IgG]_{serum}$$

***V nepřítomnosti ith. syntézy platí: $Q_{Alb} > Q_{IgG} > Q_{IgA} > Q_{IgM}$
obrácení některé z těchto nerovností svědčí pro ith.
syntézu – i při krevní příměsi !***

Výpočet intrathekální syntézy Ig – Reiberova hyperbolická funkce

Závislost Q-IgG na Q-Alb - parametry Reiberovy hyperbolické funkce pro Q-mean, Q-lim (+3SD) a Q-lower lim (-3SD)



$$Q_{Ig} = \frac{a}{b} \sqrt{(Q_{Alb})^2 + b^2} - c$$

$$Q_{LimIgG} = 0.93 \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 6 * 10^{-6}} - 1.7 * 10^{-3}$$

Parametry Reiberovy hyperbolické funkce

$$Q_{Ig} = \frac{a}{b} \sqrt{(Q_{Alb})^2 + b^2} - c$$

Ig	hodnota	a/b	b² · 10⁶	c · 10³
<i>IgG</i>	Q-Lim	0,93	6	1,7
	Q-Mean	0,65	8	1,4
	Q-lower lim	0,33	2	0,3
<i>IgA</i>	Q-Lim	0,77	23	3,1
	Q-Mean	0,47	27	2,1
	Q-lower lim	0,17	74	1,3
<i>IgM</i>	Q-Lim	0,67	120	7,1
	Q-Mean	0,33	306	5,7
	Q-lower lim	0,04	442	0,82

Alternativní vztahy

$$Ig\ index = Q_{Ig} / Q_{Alb}$$

Extendovaný Ig index (Öhman *et al.* 1989, 1993):

$$ext. Ig\ index = Q_{Ig} / Q_{Alb}^a$$

IgG: a = 1,12 (E-IgG index $\leq 1,24$)

IgA: a = 1,15 (E-IgA index $\leq 1,0$)

IgM: a = 1,9 (E-IgM index ≤ 15)

Auer M *et al.* Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis – a **new** empirical formula. *Eur J Neurol* 2016, 23: 713-721.

$$Q_{lim\ Ig} = a \cdot Q_{Alb}^b$$

	<i>a</i>	<i>b</i>
IgG*	0,882	1,035
IgA*	0,819	1,076
IgM*	1,845	1,340
fKLC**	0,9358	0,6687
fKLC***	3.1276	0.8001
fLLC***	2.1138	0.8650

(*Auer *et al.* 2016; ** Presslauer *et al.* 2014; *** Hegen *et al.* 2018)

Finální výpočet intrathekální syntézy Ig

- $Ig_{loc} = (Q_{Ig} - Q_{lim\ Ig}) \cdot Ig_{serum} \text{ [mg/l]}$
- $Ig_{IF} = 1 - \left(\frac{Q_{lim\ Ig}}{Q_{Ig}} \right) \cdot 100 \text{ (}\%)$
nebo: $Ig_{IF} = \frac{Ig_{loc}}{Ig_{CSF}} \cdot 100 \text{ (}\%)$
- Podle intrathekální frakce IgX_{IF} posuzujeme dominanci intrathekální syntézy příslušné Ig třídy (např. ith. IgM = 80 %, ith. IgG = 25 %: $IgM_{IF} > IgG_{IF}$)
- Pro sledování průběhu nemoci u konkrétního pacienta je preferován Ig_{loc}

Typy intrathekální protilátkové odpovědi u různých onemocnění

(Reiber, Peter: *J Neurol Sci* 2001, 184: 101-122)

Typ	Onemocnění
žádná	Časná fáze neuroinfekcí; AIDP
Dominance IgG	RS (IgM 25 %, IgA 9 %) Neurosyfilis (vzácně + IgM) Chronická HIV encefalitis
Dominance IgA	Neurotuberkulóza (+ IgG) Mozkový absces Adrenoleukodystrofie
Dominance IgM	Neuroborrelióza ($IgM_{IF} > IgA_{IF} > IgG_{IF}$) Meningoencefalitis při průušnicích Non-Hodgkinský lymfom s postiž. CNS ($IgM_{IF} > 0$)
IgG+IgA+IgM	Oportunní infekce (CMV, toxoplasmóza)

Specifita zkoumaných protilátek

- **Protilátky proti mikroorganismům**

- Viry: measles, rubella, VZV, HSV, CMV, EBV, virus příušnic, ...
- Baktérie: *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis* ...
- Protozoa: *Toxoplasma gondii*

- **Autoprotilátky**

- proti antigenům CNS (neurony, axony, glie, komponenty myelinu, ...)
- jiné
- **Specifita většiny i.th. syntezovaných protilátek u RS dosud neznámá (!)**
 - protilátky proti vzácným imunogenním idiotopům vzniklým následkem infekce a somatické hypermutace BCR V genů (závislé na spolupráci s T-lymfocyty)? (Holmøy et al., *Trends Immunol* 2010; 31(2): 56-62)
 - protilátky proti intracelulárnímu debris (MKNK1/2, FAM84A, AKAP17A) jako sekundární imunitní odpověď na poškození buněk (Brändle et al., *PNAS* 2016; 113: 7864-9)

Intrathekální syntéza specifických protilátek - metody

- „Kvantitativní“ – výpočet protilátkového indexu (AI, viz dále):
 - klasická ELISA
 - multiplex
 - nepřímá imunofluorescence: poměr titrů (1/ředění likvoru : 1/ředění séra)
- „Kvalitativní“:
 - detekce *specifických oligoklonálních pásů* – IEF + afinitní imunoblotting na membránu inkubovanou příslušným antigenem
 - *Western blot*: ředění likvoru a séra na stejnou koncentraci IgG (IgM, IgA)

Co je nutné vyšetřit, abychom mohli vypočítat protilátkový index

- Koncentrace **specifických** protilátek příslušné třídy (u MRZH reakce IgG) v likvoru i séru (arbitrární jednotky)
- Koncentrace **celkových** protilátek téže třídy (u MRZH reakce IgG) v likvoru i séru (mg/l)
- Koncentrace **albuminu** v likvoru i séru (mg/l)

Protilátkový index (AI)

(Reiber H, Lange P. *Clin Chem* 1991; 37(7): 1153-60)

- $AI = Q-Ig_{spec} / Q-Ig$, je-li $Q-Ig \leq Q_{lim}-Ig$
- $AI = Q-Ig_{spec} / Q_{lim}-Ig$, je-li $Q-Ig > Q_{lim}-Ig$ (Q_{lim} zde reprezentuje frakci IgG v likvoru krevního původu)
- $AI \geq 1.5$ svědčí pro lokální (intrathekální) syntézu specifických protilátek
- AI v rozmezí 1,3 – 1,5 (-2,0) je považován za hraniční

Interpretace výsledku – „nastavení“ v naší laboratoři

- Význam má pouze protilátkový index (AI):
normálně 0,6 – 1,4; pozitivní > 1,4
(hodnoty 1,4 – 1,6 jsou hraniční a je
nutné je interpretovat uvážlivě)
- Arbitrární koncentrace v moku a séru
nemají význam (nenahrazují sérologickou
diagnostiku)

Intrathekální frakce specifických protilátek, F_s

(Jacobi C, Lange P, Reiber H. Quantitation of intrathecal antibodies in cerebrospinal fluid of subacute sclerosing panencephalitis, herpes simplex encephalitis and multiple sclerosis: Discrimination between microorganism-driven and polyspecific immune response. *J Neuroimmunol* 2007, 187: 139-146. Dostupné na www.horeiber.de)

- $F_s = 100 \cdot IgX_{spec.-loc} / IgX_{loc} (\%)$
- $IgX_{loc} = (Q-IgX - Q_{mean}IgX) \cdot S-Ig$ [mg/l]
- $IgX_{spec.-loc} = (Q-IgX_{spec} - Q_{mean}IgX) \cdot S-IgX_{spec}$, [mg/l]
- F_s nelze vypočítat tam, kde $Q-IgX < Q_{mean}IgX$
- F_s má smysl počítat pouze při prokázané intrathekální syntéze ($AI \geq 1,5$)

Stanovení IgX_{spec}

- **??!** Kvantitativní stanovení (v mg/l) v S a CSF
- V sérových standardech je ve vysokém ředění změřena koncentrace celkového IgG (ELISA, potah protilátkou proti F_{ab} fragmentu, kalibrace: proteinový kalibrátor) a předpokládá se, že stejná OD těchto standardů v jamkách potažených anti-IgG protilátkou i v jamkách potažených příslušným antigenem odpovídá stejné koncentraci protilátky
- Tím je určen „konverzní faktor“ pro přepočet arbitrárních jednotek na koncentrace příslušných specifických protilátek v mg/l

Význam F_s

- U každého zánětlivého procesu je protilátková odpověď polyspecifická, i u neuroinfekcí má pouze část tvořených protilátek specifitu k antigenním strukturám příčinného činitele
- U kauzální protilátkové odpovědi (neuroinfekce) je F_s proti příčinnému činiteli cca 5-30 %
- U polyspecifické imunitní odpovědi při chronickém zánětu autoimunitního typu (RS) jsou $F_s < 5$ %
- Při úspěšné léčbě neuroinfekce F_s (a také R_s , tj. frakce specifických protilátek v séru) klesá, zatímco AI může i stoupat (rychlejší pokles koncentrace specifických protilátek v séru)

Které specifické protilátky v likvorové laboratoři ÚLD FNO t.č. vyšetřujeme?

- MRZ reakce (IgG protilátky proti **M**easles, **R**ubella, **Z**oster) – *kity firmy Virotech* (od r. 2009, oficiálně od března 2011)
 - IgG protilátky proti HSV 1/2 (oficiálně od července 2012)
 - při podezření na herpetickou encefalitidu (jasná, ale téměř nevyužívaná indikace)
 - Jako rozšíření MRZ reakce (tzv. MRZH reakce) – sporné, ale představuje naprostou většinu našich vyšetřených vzorků
 - IgG a IgM protilátky proti borreliím (oficiálně od července 2013)
 - *Kity firmy Euroimmun*

Stanovení $Q-Ig_{spec}$ metodou ELISA – požadavky na správné provedení metody

- Likvor a sérum ve stejné sérii, na stejné kalibrační křivce
- Likvor a sérum ředit na srovnatelné koncentrace celkového IgG, ředění likvoru (alespoň 1:2) (částečně) eliminuje efekt matrice
- Optimálně likvor a sérum ve 2 ředěních, výsledek z hodnot OD ležících blíže k sobě (CAVE! zejm. u neuroborreliózy: extrémně vysoké koncentrace CSF-IgM \Rightarrow IgM se naváže na antigen na destičce, takže už se nemůže navázat IgG \Rightarrow falešně nízký $Q-Ig_{spec}$)
- Hodnocení OD vztažené na kalibrační křivku (ve firemních kitech většinou kalibrátor obsažen nebo lze objednat zvlášť)
- Hodnotíme pouze OD v rozmezí kalibrační křivky
- Interní QC: směsný likvor a sérum
- Externí QC: M, R, Z, H, *Borrelie* (IgG) – INSTAND, 2 x ročně

Stanovení $Q-Ig_{spec}$ metodou ELISA

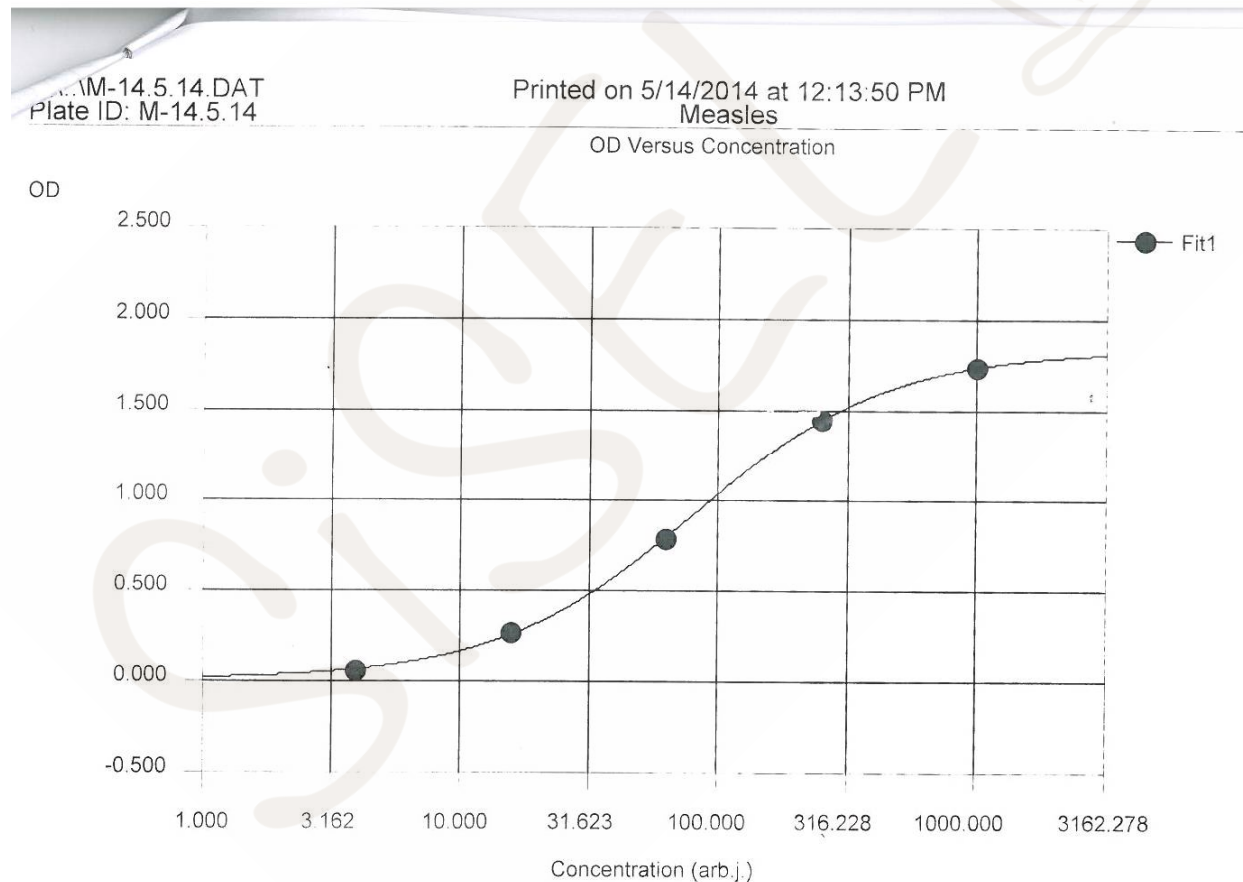
- Někteří výrobci používají „jednobodové“ ověření kalibrační křivky
- *Existují i složitější, sofistikovanější metody hodnocení založené na zjištění závislosti mezi koncentrací specifických protilátek a OD z více ředění vzorků likvorů a sér – v praxi zatím nevyužívané:*
- Osterman A, Späth P, Jäger G, Böhm S, Osterman P. Multiple-point evaluation algorithms for enhanced precision of pathogen-specific cerebrospinal fluid/serum antibody index calculation. *SLAS Technology* 2019; 24(1): 96-104

ELISA analyzátor DSX (Dynex)



MRZ reakce – kalibrační křivka (4-PL) modifikovaná přídavkem 5. kalibrátoru

- s použitím původní čtyřbodové křivky řada vzorků neměřitelně nízkých, zejm. u anti-measles IgG
- OD 4×řaděného nejnižšího kalibrátoru $> 10 \times (\text{OD blanku} + 3 \text{ SD})$ – ověřeno opakovaně pro všechny používané kity (measles, rubella, VZV, EBV)
- arb.j. znásobeny $\times 10$ (vzhledem k logaritmické ose koncentrací)



Kalibrační křivka (4PL) – VZV, Rubella (Virotech, modifikováno)

V 15.5.2019.DAT
D: VZV 15.5.2019
Printed on 5/14/2019 at 11:19:09 AM
VZV
Page 2 of 4

CURVE FITTING

Fit1

Log/lin axes scaling

Sigmoid with data extrapolation

A = -0.0202 B = 0.9065

C = 165.5113

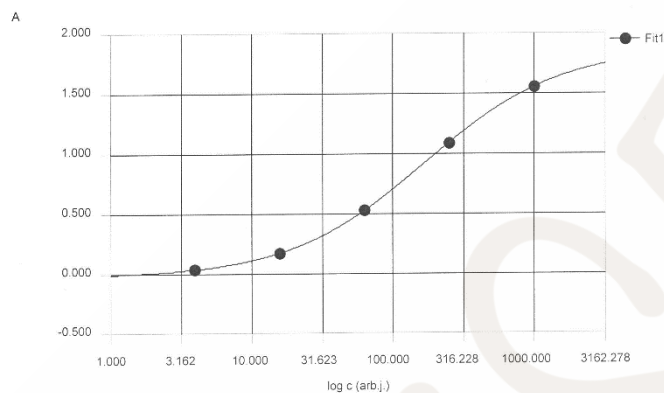
D = 1.8727

R-Squared = 0.9999

Curve fit Q.C.

: 0.9999 >= 0.9500

Measles kalibrace



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	863.855	****	1385.519	****	24.551	****	175.993	****	213.477	****
B	3.906	3.906	150.137	****	207.590	****	9.018	****	102.791	****	142.860	****
C	15.625	15.625	37.927	****	117.059	****	110.448	****	99.779	****	29.131	****
D	62.500	62.500	51.364	****	278.146	****	87.855	****	19.455	****	107.489	****
E	250.000	250.000	10.479	****	47.802	****	18.176	****	71.507	****	57.640	****
F	1000.000	1000.000	99.745	****	63.745	****	258.350	****	23.620	****	11.058	****
G	942.805	****	28.462	****	12.857	****	87.565	****	159.836	****	108.702	****
H	374.870	****	386.639	****	136.240	****	177.958	****	75.715	****	121.662	****

RESULTS

Sample ID	Location	(OD) Data	(OD) Mean	S.D.	C.V.	Dilution	(arb.j.) Conc.
[S1105/7.5.100X]	A3	1.535	1.527	0.012	0.779%	1	863.855
	A4	1.518					
[S1105/7.5.400X]	B3	0.890	0.884	0.008	0.957%	1	150.137
	B4	0.878					

86386
60055

RUBELLA 15.5.2019.DAT
D: RUBELLA 15.5.2019
Printed on 5/14/2019 at 11:09:30 AM
Rubella
Page 2 of 4

CURVE FITTING

Fit1

Log/lin axes scaling

Sigmoid with data extrapolation

A = -0.0281 B = 0.7177

C = 249.5644

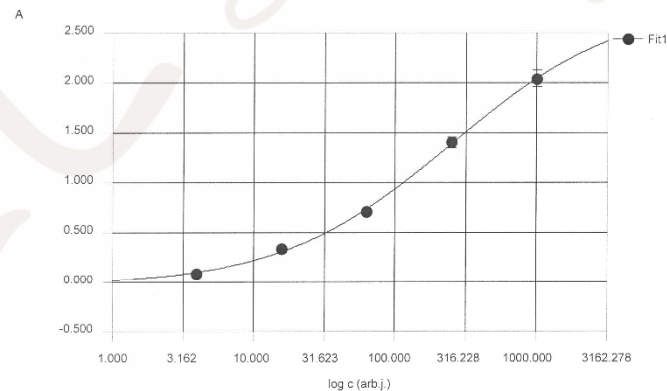
D = 2.8206

R-Squared = 0.9976

Curve fit Q.C.

: 0.9976 >= 0.9500

Measles kalibrace



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	361.109	****	575.325	****	72.439	****	5.672	****	58.764	****
B	3.906	3.906	80.884	****	132.468	****	21.939	****	87.024	****	30.757	****
C	15.625	15.625	16.537	****	333.267	****	30.686	****	86.357	****	4.967	****
D	62.500	62.500	14.825	****	560.731	****	23.961	****	12.552	****	4.494	****
E	250.000	250.000	2.699	****	130.875	****	3.785	****	99.535	****	17.987	****
F	1000.000	1000.000	12.688	****	218.006	****	66.010	****	20.350	****	3.141	****
G	229.612	****	3.348	****	36.582	****	17.045	****	115.636	****	72.886	****
H	486.271	****	340.795	****	368.105	****	10.290	****	56.007	****	61.835	****

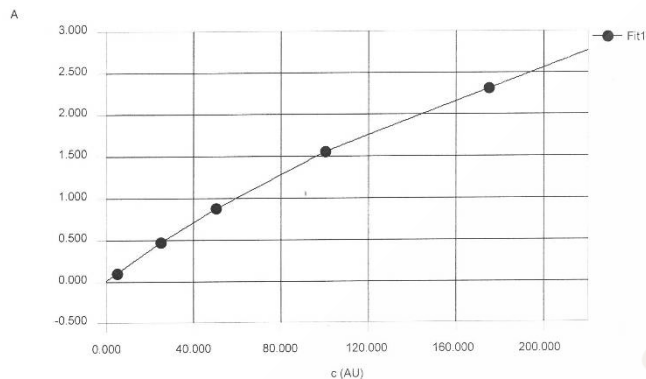
RESULTS

Sample ID	Location	(OD) Data	(OD) Mean	S.D.	C.V.	Dilution	(arb.j.) Conc.
[S1105/7.5.100X]	A3	1.592	1.584	0.012	0.735%	1	361.109
	A4	1.576					
[S1105/7.5.400X]	B3	0.838	0.850	0.016	1.926%	1	80.884
	B4	0.861					

36111
32354

Kalibrační křivka (polygon = „point-to-point“): Anti-Borrelia IgM, IgG (Euroimmun)

C:\BORR IGM 30.4.2019.DAT Printed on 4/30/2019 at 2:09:23 PM Page 2 of 3
Plate ID: BORR IGM 30.4.2019 Anti-borrelia IgM CSF anti-borrelia IgM CSF

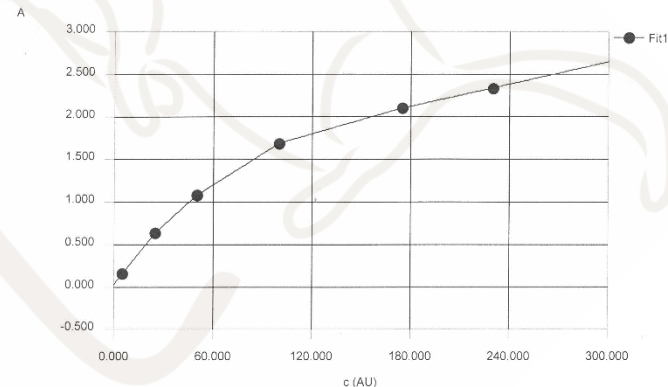


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	25.000	14.573	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B	BLANK	25.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
C	175.000	5.000	8.095	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
D	100.000	29.670	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
E	100.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
F	50.000	41.142	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
G	50.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H	50.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

RESULTS

Sample ID	Location	(OD) Data	(OD) Mean	S.D.	C.V.	(AU) Conc.
S1	C1	2.370	2.315	0.078	3.358%	175.000
	D1	2.260				
S2	E1	1.526	1.557	0.045	2.863%	100.000
	F1	1.589				
S3	G1	0.842	0.878	0.051	5.840%	50.000
	H1	0.914				
S4	A2	0.468	0.475	0.009	1.887%	25.000
	B2	0.481				
S5	C2	0.100	0.102	0.003	2.744%	5.000
	D2	0.104				
Sample ID	Location	(OD) Data	(OD) Mean	S.D.	C.V.	(AU) Conc.
[S750/250419-404XM]	A3	0.286	0.280	0.007	2.540%	14.573
	B3	0.275				
[L750/250419-2XM]	C3	0.164	0.160	0.005	3.251%	8.095
	D3	0.156				

C:\BORR IGG 10.5.2019.DAT Printed on 5/10/2019 at 12:51:52 PM Page 2 of 3
Plate ID: BORR IGG 10.5.2019 Anti-borrelia IgG CSF anti-borrelia IgG CSF



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	50.000	10.085	19.500	3.172	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B	BLANK	50.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
C	230.000	25.000	9.065	57.510	28.108	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
D	230.000	25.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
E	175.000	5.000	0.231	7.594	33.115	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
F	175.000	5.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
G	100.000	10.892	60.578	33.915	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H	100.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

RESULTS

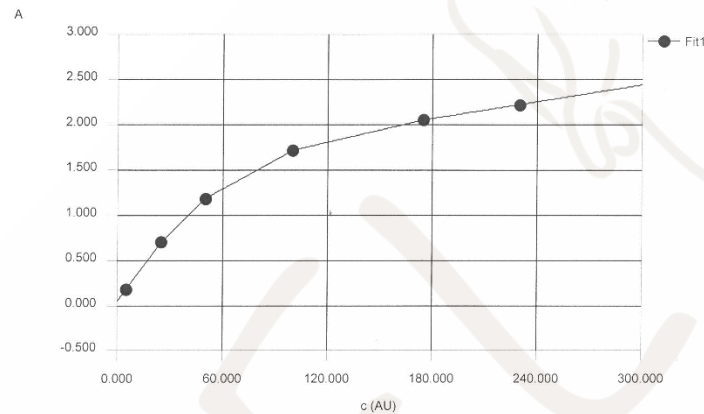
Sample ID	Location	(OD) Data	(OD) Mean	S.D.	C.V.	(AU) Conc.
S1	C1	2.336	2.346	0.015	0.635%	230.000
	D1	2.357				
S2	E1	2.088	2.107	0.027	1.278%	175.000
	F1	2.126				
S3	G1	1.705	1.691	0.020	1.184%	100.000
	H1	1.676				
S4	A2	1.078	1.080	0.006	0.515%	50.000
	B2	1.084				
S5	C2	0.645	0.641	0.006	0.922%	25.000
	D2	0.637				
S6	E2	0.152	0.154	0.003	1.638%	5.000
	F2	0.156				
Sample ID	Location	(OD) Data	(OD) Mean	S.D.	C.V.	(AU) Conc.
[S1098/070519-404X]	A3	0.281	0.278	0.005	1.766%	10.085
	B3	0.274				

Kalibrační křivka – anti-HSV1,2 IgG (Euroimmun)

C:\ANTI HSV 10.5.2019.DAT
Plate ID: ANTI HSV 10.5.2019

Printed on 5/10/2019 at 12:50:29 PM
Anti-HSV 1a2 IgG CSF Euroimmun
anti-HSV IgG CSF

Page 2 of 3



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	50.000	239.277	7.631	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B	BLANK	50.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
C	230.000	25.000	76.308	142.709	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
D	230.000	25.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
E	175.000	5.000	20.210	15.618	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
F	175.000	5.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
G	100.000	15.765	33.657	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H	100.000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

RESULTS

Sample ID	Location	(OD) Data	(OD) Mean	S.D.	C.V.	(AU) Conc.
S1	C1	2.217	2.227	0.015	0.664%	230.000
	D1	2.237				
S2	E1	2.055	2.056	0.002	0.080%	175.000
	F1	2.057				
S3	G1	1.711	1.720	0.012	0.689%	100.000
	H1	1.728				
S4	A2	1.208	1.190	0.026	2.202%	50.000
	B2	1.171				
S5	C2	0.715	0.706	0.012	1.698%	25.000
	D2	0.698				
S6	E2	0.189	0.182	0.010	5.716%	5.000
	F2	0.174				

Sample ID	Location	(OD) Data	(OD) Mean	S.D.	C.V.	(AU) Conc.	#
[S1105/070519-101X]	A3	2.259	2.256	0.004	0.173%	239.277	#
	B3	2.253					

(24164)

Inter-assay variační koeficienty (CV)

kontroly: směsný vzorek CSF, směsný vzorek séra (pro M, R, Z, H, E – jakékoliv vzorky; pro antiborrel.IgG, IgM nutno připravit zčásti ze vzorků s předem ověřenou pozitivitou příslušných Ab)

	CSF	S	Q	„Sérový“ kal.2 ředěný 1/4
Measles (n=26)	7.7 %	11.5 %	10.4 %	n/d
Rubella (n=26)	11.3 %	13.5 %	8.3 %	n/d
VZV (n=26)	5.4 %	9.0 %	8.0 %	n/d
HSV 1/2 (n=8)	7.6 %	6.8 %	8.5 %	10.8 % *
Borrelia IgG (n=24)	19.4 %	11.9 %	16.3 %	4.3 %
Borrelia IgM (n=20)	14.6 %	11.4 %	14.8 %	n/d
EBV (n=22)	8.6 %	13.2 %	10.6 %	n/d
* n=15				

Externí kontrola kvality – 2x ročně

INSTAND 2012



INSTAND e.V.
Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
in medizinischen Laboratorien e. V.
(vormals: Hämonetop-Prüfstelle)
Übersing. 25, D - 40223 Düsseldorf
Tel. +49 (0)211 15 92 13 0, Fax +49 (0)211 15 92 13 30



WHO Collaborating Centre for Quality Assurance
and Standardization in Laboratory Medicine



Akreditiert durch
Deutsches Institut
für Normisierung
und Standardisierung
DIN EN ISO 15189:2013
23.05.2013-08.12

RNDr., Ph.D. Zdenek Svagera
Fakultní nemocnice, ULĐ, OKB
Institute of Clinical Biochemistry
17. listopadu 1790
70852 Ostrava-Poruba
Czech Republic

Teilnehmer Nr.: 32320
Ringversuch: Mai 2012
Proben Nr.: 34

ZERTIFIKAT

Ringversuch Liquor IV (Nr. 463) - Spezifische Antikörper im ZNS
gültig bis: 3. Aug. 2013

Methodenbezogene Auswertung (AI-Werte)

	Methode				ZW		Quote		Teilnehmer - Ergebnis		
	Code	n	Median	Bereich	AI	%	AI	%	AI	Abw. vom ZW (%)	Zertifikat
Masern	VT	15	3,00	1,3-4,9	2,85	60	4,01	41	sein		
	VT	11	0,94	0,61-1,5	0,83	82	1,01	22	ja		
Röteln	VT	17	1,00	0,65-2,7	1,00	76	1,03	3	ja		
	ER	28	0,82	0,64-2,11	0,85	86	0,97	14	ja		

(Die Kategorie "ja" oder "sein" bescheinigt sich auf die maximal zulässige Abweichung von + 30% vom Zielwert)

Richtige Interpretation:

- ☐ Kein Hinweis auf intrathekale AK-Synthese
☒ Intrathekale Antikörper-Synthese
⊗ M ⊗ R ⊗ Z ⊗ H
☐ Chronisch-entzündl. Prozess
☐ Unplausibler AI-Wert
⊗ M ⊗ R ⊗ Z ⊗ H

Interpretation des Teilnehmers:

- ☐ Kein Hinweis auf intrathekale AK-Synthese
☒ Intrathekale Antikörper-Synthese
⊗ M ⊗ R ⊗ Z ⊗ H
☐ Chronisch-entzündl. Prozess
☐ Unplausibler AI-Wert
⊗ M ⊗ R ⊗ Z ⊗ H

Bemerkungen sind jeweils im Bericht mit Bezug auf Teilnehmer Nummern zu finden.

H. Reiber
gez.: Prof. Dr. H. Reiber



INSTAND e.V.
Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
in medizinischen Laboratorien e. V.
(vormals: Hämonetop-Prüfstelle)
Übersing. 25, D - 40223 Düsseldorf
Tel. +49 (0)211 15 92 13 0, Fax +49 (0)211 15 92 13 30



WHO Collaborating Centre for Quality Assurance
and Standardization in Laboratory Medicine

RNDr., Ph.D. Zdenek Svagera
Fakultní nemocnice, ULĐ, OKB
Institute of Clinical Biochemistry
17. listopadu 1790
70852 Ostrava-Poruba
Czech Republic

Teilnehmer Nr.: 32320
Ringversuch: Mai 2012
Proben Nr.: 35 L/S

ZERTIFIKAT

Ringversuch Neuroborreliose (Nr. 465)
gültig bis: 3. Aug. 2013

	Methode				ZW		Quote %		Teilnehmer - Ergebnis		
	Code	n	Median	Bereich	AI	%	AI	%	AI	Abw. vom ZW (%)	Zertifikat
BW	44	1,21	0,6-2,95	1,34	70						
	DO	22	1,40	0,9-1,89	1,34	91					
ER	26	1,34	0,82-1,76	1,34	86	1,73	29	ja			
	VT	20	1,40	0,77-1,7	1,34	95					
VR	17	1,28	0,6-1,5	1,34	94						
	MK	15	1,43	1,27-5,05	1,34	53					
Rest	25	1,40	0,56-7,2	1,34	44						

(Die Bewertung "ja" oder "sein" für das Zertifikat bescheinigt sich auf die maximal zulässige Abweichung von + 30% vom Zielwert)

Richtige Interpretation:

- ☒ Kein Hinweis auf intrathekale Borrelien-AK-Synthese
☐ Intrathekale Borrelien-Antikörper-Synthese
☐ Grenzwertiger Befund
☐ Unplausibler AI-Wert

Interpretation des Teilnehmers:

- ☐ Kein Hinweis auf intrathekale Borrelien-AK-Synthese
☒ Intrathekale Borrelien-Antikörper-Synthese
☐ Grenzwertiger Befund
☐ Unplausibler AI-Wert

Bemerkungen:

K.
gez.: Dr. K. Zimmermann

Problematické hodnocení EQA

INSTAND e.V.
Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
in medizinischen Laboratorien e. V.
(vormals Hämmeterprüfstelle)
Ullrichstr. 20, D - 40223 Düsseldorf
Tel. +49 (0)211 15 92 13 0, Fax +49 (0)211 15 92 13 30



Akkreditiert durch
Deutsches Institut
für Gesundheitswesen
und Medizinprodukte
D-IG-P-348.08.12

RNDr., Ph.D. Zdenek Svagera
Fakultní nemocnice, ULD, OKB
Institute of Clinical Biochemistry
17. listopadu 1790
70852 Ostrava-Poruba
Czech Republic

Teilnehmer Nr.: 32320
Ringversuch: Mai 2013
Proben Nr.: 33

ZERTIFIKAT

Ringversuch Liquor IV (Nr. 463) - Spezifische Antikörper im ZNS
gültig bis: 2. Mai 2014

Methoden bezogene Auswertung (AI-Werte)

	Methode				ZW		Quote		Teilnehmer - Ergebnis		
	Code	n	Median	Bereich	AI	%	AI	%	AI	Abw. vom ZW (%)	Zertifikat
Masern	VT	17	1,10	0,8-1,3	1,0	100	1,05	5	ja		
Röteln	VT	11	1,07	0,8-1,3	1,0	100	1,09	9	ja		
VZV	VT	19	1,01	0,5-1,7	1,0	89	1,01	1	ja		
HSV	ER	35	1,03	0,76-3,5	1,0	91	1,04	4	ja		

(Die Kategorien 'ja' oder 'nein' beziehen sich auf die maximal zulässige Abweichung von ± 30% vom Zielwert)

Richtige Interpretation:

- ☒ Kein Hinweis auf intrathekale AK-Synthese
☐ Intrathekale Antikörper-Synthese
O M O R O Z O H
☐ Chronisch-entzündl. Prozess
☐ Unplausibler AI-Wert
O M O R O Z O H

Interpretation des Teilnehmers:

- ☒ Kein Hinweis auf intrathekale AK-Synthese
☐ Intrathekale Antikörper-Synthese
O M O R O Z O H
☐ Chronisch-entzündl. Prozess
☐ Unplausibler AI-Wert
O M O R O Z O H

Bemerkungen sind jeweils im Bericht mit Bezug auf Teilnehmer Nummern zu finden.

FAKULTNÍ NEMOCNICE OSTRAVA
17. listopadu 1790-1792 Ostrava-Poruba
ODDĚLENÍ KLINICKÉ BIOCHEMIE
Tel.: +420 597 371 111
Fax: +420 596 917 340

gez.: Prof. Dr. H. Reiber

INSTAND e.V.
Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
in medizinischen Laboratorien e. V.
(vormals Hämmeterprüfstelle)
Ullrichstr. 20, D - 40223 Düsseldorf
Tel. +49 (0)211 15 92 13 0, Fax +49 (0)211 15 92 13 30



Akkreditiert durch
Deutsches Institut
für Gesundheitswesen
und Medizinprodukte
D-IG-P-348.08.12

RNDr., Ph.D. Zdenek Svagera
Fakultní nemocnice, ULD, OKB
Institute of Clinical Biochemistry
17. listopadu 1790
70852 Ostrava-Poruba
Czech Republic

Teilnehmer Nr.: 32320
Ringversuch: Mai 2013
Proben Nr.: 35 L/S

ZERTIFIKAT

Ringversuch Neuroborreliose (Nr. 465)
gültig bis: 2. Mai 2014

Code	n	Methode		VK %	ZW		Quote %		Teilnehmer - Ergebnis		
		Median	Bereich		AI	%	AI	%	AI	Abw. vom ZW (%)	Zertifikat
BW	40	0,64		17	0,67	65					
DO	27	0,92		12	0,94	81					
ER	35	1,00		10	0,94	91	0,98	4	ja		
VT	20	0,90		12	0,94	70					
VR	19	0,97		13	0,94	84					
MK	16	0,86		16	0,94	81					
Rest	19	0,92		16	0,94	74					

(Die Bewertung 'ja' oder 'nein' für das Zertifikat bezieht sich auf die maximal zulässige Abweichung von ± 30% vom Zielwert)

Richtige Interpretation:

- ☒ Kein Hinweis auf intrathekale Borrelien-AK-Synthese
☐ Intrathekale Borrelien-Antikörper-Synthese
☐ Grenzwertiger Befund
☐ Unplausibler AI-Wert

Interpretation des Teilnehmers:

- ☒ Kein Hinweis auf intrathekale Borrelien-AK-Synthese
☐ Intrathekale Borrelien-Antikörper-Synthese
☐ Grenzwertiger Befund
☐ Unplausibler AI-Wert

Bemerkungen:

FAKULTNÍ NEMOCNICE OSTRAVA
17. listopadu 1790-1792 Ostrava-Poruba
ODDĚLENÍ KLINICKÉ BIOCHEMIE
Tel.: +420 597 371 111
Fax: +420 596 917 340

gez.: Dr. K. Zimmermann

Problematické hodnocení EQA

INSTAND e.V.
Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
in medizinischen Laboratorien e. V.
(vormals Hämometerprüfstelle)
Übierstr. 20, D - 40223 Düsseldorf
Tel. +49 (0)211 15 92 13 0, Fax +49 (0)211 15 92 13 30



INSTAND e.V.
Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung
in medizinischen Laboratorien e. V.
(vormals Hämometerprüfstelle)
Übierstr. 20, D - 40223 Düsseldorf
Tel. +49 (0)211 15 92 13 0, Fax +49 (0)211 15 92 13 30



RNDr., Ph.D. Zdenek Svagera
Fakultni nemocnice, ULD, OKB
Institute of Clinical Biochemistry
17. listopadu 1790
70852 Ostrava-Poruba
Czech Republic

Teilnehmer Nr.: 32320
Ringversuch: Okt 2012
Proben Nr.: 65 L/S

RNDr., Ph.D. Zdenek Svagera
Fakultni nemocnice, ULD, OKB
Institute of Clinical Biochemistry
17. listopadu 1790
70852 Ostrava-Poruba
Czech Republic

Teilnehmer Nr.: 32320
Ringversuch: Okt 2012
Proben Nr.: 65 L/S

ZERTIFIKAT

Ringversuch Neuroborreliose (Nr. 465)

gültig bis: 8. Nov. 2013

Methode				ZW	Quote %	Teilnehmer - Ergebnis		
Code	n	Median	Bereich	AI	%	AI	Abw. vom ZW (%)	Zertifikat
BW	40	1,31	0,4-2,29	2,15	23			
DO	17	0,56	0,4-0,68	2,15	0			
ER	27	2,18	1,46-8,51	2,18	85	2,08	-5	ja
VT	20	4,0	1,81-9,69	4,0	85			
VR	15	1,73	1,36-2,3	2,15	73			
MK	14	0,38	0,21-4,15	2,15	7			
Rest	27	1,07	0,18-6,11	2,15	26			

Die Bewertung 'ja' oder 'nein' für das Zertifikat bezieht sich auf die maximal zulässige Abweichung von $\pm 30\%$ vom Zielwert

Richtige Interpretation:

- ☐ Kein Hinweis auf intrathekale Borrelien-AK-Synthese
- ☒ Intrathekale Borrelien-Antikörper-Synthese
- ☐ Grenzwertiger Befund
- ☐ Unplausibler AI-Wert

Interpretation des Teilnehmers:

- ☐ Kein Hinweis auf intrathekale Borrelien-AK-Synthese
- ☒ Intrathekale Borrelien-Antikörper-Synthese
- ☐ Grenzwertiger Befund
- ☐ Unplausibler AI-Wert

Bemerkungen:

Dr. K. Zimmermann

gez.: Dr. K. Zimmermann

KORREKTURZERTIFIKAT

Ringversuch Neuroborreliose (Nr. 465)

gültig bis: 8. Nov. 2013

Methode				ZW	Quote %	Teilnehmer - Ergebnis		
Code	n	Median	VK %	AI	%	AI	Abw. vom ZW (%)	Zertifikat
BW	40	1,31	13	1,31	70			
DO	17	0,56	18	0,56	100			
ER	27	2,17	11	2,18	85	2,08	-5	ja
VT	20	4,00	10	4,00	85			
VR	15	1,72	15	1,73	93			
MK	15	0,35	17	0,40	47			
Rest	26	0,99	15	1,08	-			

Die Bewertung 'ja' oder 'nein' für das Zertifikat bezieht sich auf die maximal zulässige Abweichung von $\pm 30\%$ vom Zielwert

Bemerkungen:

Dr. K. Zimmermann

gez.: Dr. K. Zimmermann

Likvorová koncentrace specifických protilátek pod hodnotou nejnižšího kalibrátoru

Kity firmy Virotech (kalibrační křivka „obohacená“ o 1 bod ředěním nejnižšího kalibrátoru 1/4)

- Measles: 26 %
- Rubella: 8 %
- VZV: 2 %

Kity firmy Euroimmun (kalibrační křivka přesně dle zadání výrobce)

- HSV: 10 %

ALE: žádný vzorek z kontrolních cyklů INSTAND v letech 2010-2019 (M, R, Z, H)!

Úskalí ELISA metody

- Nemožnost přímého zjištění séropozitivity (sérum v jiném ředění, u kitů Euroimmun navíc jiné inkubační doby)
– lze obejít nebo je nutné sérum analyzovat zvlášť?
- Non-parallelismus dilučních křivek: nízkoafinitní versus vysokoafinitní protilátky – různé směrnice dilučních křivek
 - non-parallelismus mezi likvorem a sérem: připustíme-li afinitní maturaci intrathekální protilátkové odpovědi, budou mít intrathekálně syntezované protilátky vyšší afinitu (aviditu)
 - non-parallelismus mezi likvorem/sérem a kalibrátorem

Úskalí metody – kdy nelze hodnotit ith. syntézu Ig kvantitativními metodami

- **Infúze albuminu** \Rightarrow vzestup S-Alb \Rightarrow pokles Q-Alb \Rightarrow pokles Q_{lim} -Ig \Rightarrow „falešně“ pozitivní ith. syntéza
- **Plazmaferéza** (se substitucí albuminu) \Rightarrow pokles S-Ig \Rightarrow vzestup Q-Ig \Rightarrow „falešně“ pozitivní ith. syntéza
- **Infúze imunoglobulinů** \Rightarrow pokles Q-IgG \Rightarrow „falešně“ negativní ith. syntéza „celkového“ IgG (u specifických Ig závisí efekt na obsahu specifických Ig v infundovaných IVIG – pokud jsou v nižší koncentraci než v séru /nebo zcela chybějí – zejm. specif. IgA, IgM/, může být efekt opačný)
- **Masívní (= makroskopická) krevní příměs:** vzestup CSF-Alb i CSF-Ig, ale různou měrou, relativně nejvíce u CSF-IgM \Rightarrow vzestup Q-IgM \Rightarrow „falešně“ pozitivní ith. syntéza (vzácněji i u IgA, nejméně často u IgG)

Úskalí metody – vliv krevní příměsi

- Krevní příměs v principu neznemožňuje hodnocení it. syntézy specifických protilátek:
 $AI = Q_{spec.IgG} / Q_{IgG}$ tj. vliv krevní příměsi je ve vzorci eliminován (specifické protilátky přicházejí v množství úměrném „celkovým“ protilátkám téže třídy)
- ALE: NELZE KORIGOVAT NA Q_{lim} !!
(korekce může poskytnout falešně pozitivní výsledek)
- Příklad:
Krvavý likvor, po centrifugaci čirý bezbarvý
 $Q-Alb\ 16,7 \cdot 10^{-3}$, $Q-IgG\ 11,7 \cdot 10^{-3}$ ($Q_{lim-IgG}\ 14,0 \cdot 10^{-3}$), $Q-IgM\ 9,6 \cdot 10^{-3}$ ($Q_{lim-IgM}\ 6,7 \cdot 10^{-3}$), $Q_{borr-IgG}\ 10,0 \cdot 10^{-3}$, $Q_{borr-IgM}\ 8,2 \cdot 10^{-3}$,
AI-borr. IgG: 0,85 = negativní ($Q_{spec.IgG} / Q_{IgG}$, protože $Q-IgG < Q_{lim-IgG}$)
AI-borr. IgM: 1,30 = hraniční ($Q_{spec.IgM} / Q_{lim-IgM}$, protože $Q-IgM > Q_{lim-IgM}$) – ALE
vzhledem k makroskopické krevní příměsi nelze tuto korekci použít. Při použití vzorce $Q_{spec.IgM} / Q_{IgM}$ dostaneme AI-borr. IgM 0,85 = negativní !



MRZ reakce

ve FN Ostrava zásluhou prim. RNDr. L. Nováčkové (1957-2011) od konce r.2009, počátkem r.2010 zakoupen ELISA analyzátor DSX (Dynex), v nabídce metod laboratoře od 3/2011

- Detekce intrathekální syntézy IgG protilátek proti virům spalniček (measles – M), zarděnek (rubella – R) a varicella zoster (Z), popř. ještě proti viru herpes simplex (H) („MRZH reakce“)
- Výskyt u chronických zánětlivých onemocnění autoimunitního typu, u neuroinfekcí jen velmi vzácně
- První popis: Reiber H, Lange P. *Clin Chem* 1991; 37: 1153-60

MRZ reakce

- **MRZ reakce:** průkaz **polyspecifické** imunitní odpovědi – RS, systémová autoimunita s postižením CNS (zde dif. dg.: autoprotilátky v séru), větší specifita pro RS než u oligoklonálního IgG (negat. u chron. neuroinfekcí, NMO, PND)
- U pacientů s RS jsou podle literárních údajů zvýšené hodnoty AI:
M 78 %, R 65 %, Z 55 %; MRZ > 90 % (pozitivita protilátek k 1-3 antigenům)
- V průběhu RS se může pozitivita objevit nově a
- zvýšený M-AI je spojen s rychlejší progresí nemoci (*Petereit, Reske 2005*) a koreluje s počtem lézí v T2w MR obraze (*Rosche et al. 2012*)
- M a R protilátky významnější pro diagnostiku RS než Z (relativní význam 9 : 8 : 1) (*Brettschneider a kol. 2009*)
- **Intrathek. syntéza antiborreliových protilátek (AI):** dif. dg. význam (může však být i v rámci polyspecifické imunitní odpovědi u RS)

Vlastní soubor 2009-2013 (n=738)

Diagnostická skupina	MRZ (počet pozitivních specifit)				<i>Celkem</i>
	0	1	2	3	
1: RS	44	21	18	22	105
2: CIS	74	29	20	15	138
3: neuroinfekce	36	10	3	0	49
4: jiná zánětlivá onem.CNS	38	7	2	0	47
5: nezánětlivá onem. CNS	182	16	0	0	198
6: „kontroly“	59	2	0	0	61
9: neznámá dg.	130	9	0	1	140

MRZ jako prediktor konverze CIS do RS

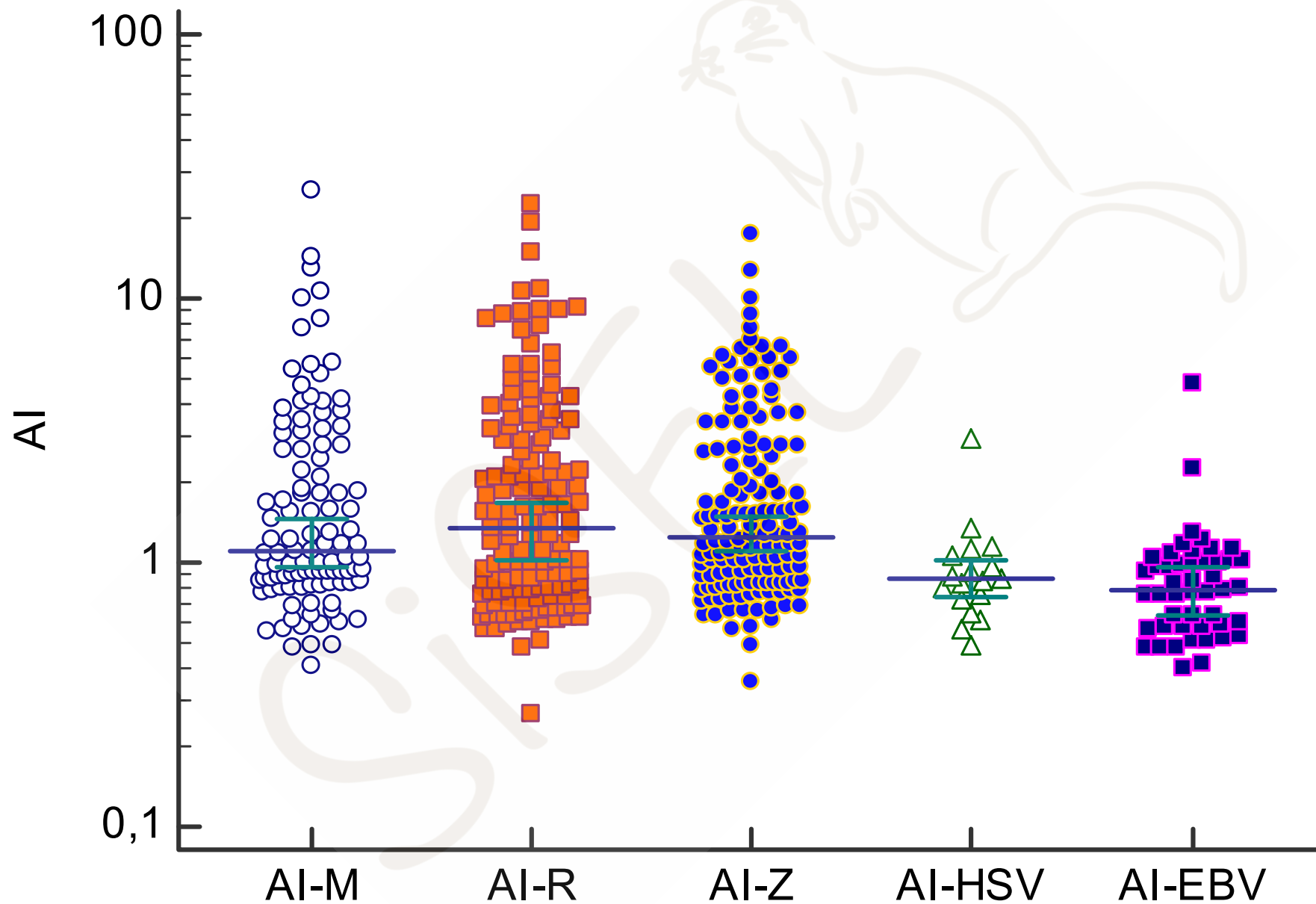
(obecně lze očekávat, podobně jako u OCB, fLC, MRI apod.!) 

- 42 % pacientů s CIS dále sledovaných na naší ambulanci progredovalo po LP do RS
- Tito pacienti měli významně častěji pozitivní MRZ reakci ($P=0,0335$) a vyšší počet pozitivních specifit ($P=0,0102$) než pacienti (dosud) neprogredující do RS
- Tito pacienti měli významně častěji pozitivní anti-Rubella AI ($P=0,0040$), ale jen nevýznamně častěji pozitivní anti-Measles AI ($P=0,3454$) a anti-VZV AI ($P=0,1423$)
- Pro výpočet senzitivity a specifity do skupiny „RS“ zahrnutí i pacienti dg. skupiny 2 (CIS), kteří po LP konvertovali do RS

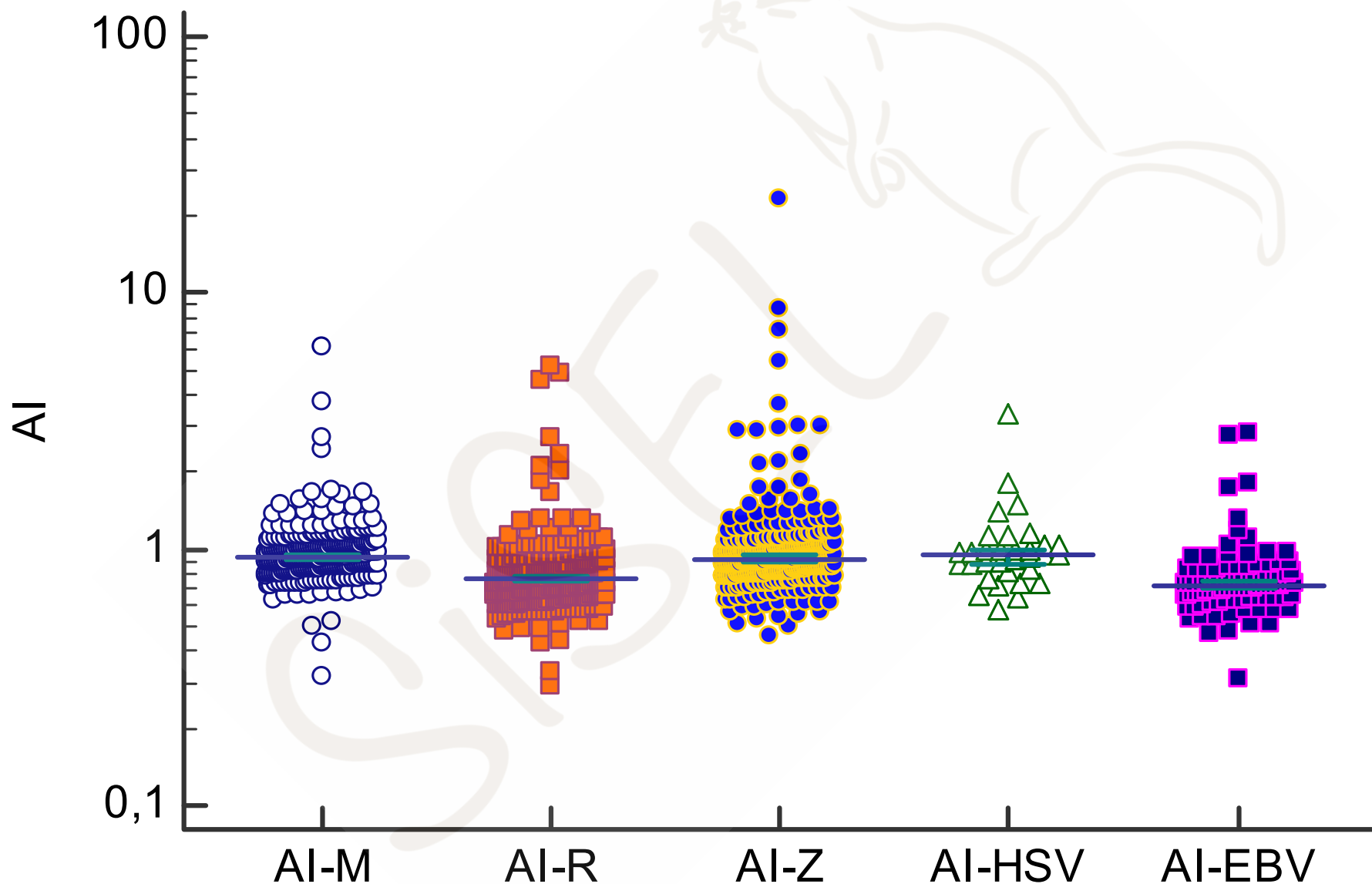
Intrathekální syntéza jednotlivých antivirových protilátek u RS u našich pacientů

- Measles: 47/152 (30,9 %)
- Rubella: 68/152 (44,7 %)
- Zoster: 66/152 (43,4 %)
- -----
- HSV: 1/24 (4,2 %) (+ 2/18 CIS)
- EBV: 2/48 (4,2 %)
- Borrelie (IgG): 2/10 (20 %)

Hodnoty protilátkových indexů (AI) u pacientů s RS



Hodnoty protilátkových indexů (AI) u pacientů s potvrzenou diagnózou jinou než RS



Korelace mezi pozitivitou OCB a pozitivitou MRZ reakce

$P < 0,0001$

	OCB negat.	OCB pozit.	Celkem
MRZ negat.	411	150	561 (76,1 %)
MRZ pozit.	21	155	176 (24 %)
celkem	432 (58,9 %)	305 (41,1 %)	737

Korelace mezi pozitivitou OCB a pozitivitou MRZ reakce u RS

$P < 0,0001$

	OCB negat.	OCB pozit.	Celkem
MRZ negat.	15	47	62 (40,8 %)
MRZ pozit.	1	89	90 (59,2 %)
celkem	16 (10,5 %)	136 (89,5 %)	152

Diagnostický význam MRZ reakce ve sledovaném souboru

	OCB	MRZ	MRZ polyspecif.
Senzitivita	89,3 %	59,2 %	38,8 %
Specificita	77,8 %	88,7 %	98,6 %
Pozitivní prediktivní hodnota	62,3 %	68,7 %	92,2 %
Negativní prediktivní hodnota	94,7 %	83,8 %	79,3 %

Intrathekální syntéza jednotlivých antivirových IgG protilátek u RS ve srovnání s literárními údaji

	Reiber <i>et al.</i> 1998	Bednářová <i>et al.</i> 2005	Bednářová a Štourač 2009	Robinson-Agramonte <i>et al.</i> 2007	Kula-kowska <i>et al.</i> 2012	Rosche <i>et al.</i> 2012	MS centrum FN Ostrava 2009-2013 (2009-4/2012)
Measles	78 %	68 %	32 % (RR) 20 % (PP)	78 %	55 %	46 %	30,9 % (31 %)
Rubella	60 %	40 %	24 % (RR) 0 % (PP)	30 %	63 %	54 %	44,7 % (43 %)
VZV	55 %	36 %	24 % (RR) 0 % (PP)	59 %	50 %	69 %	43,4 % (45 %)
MRZ	89 %	86 %	56 % (RR) 20 % (PP)	100 %	81 %		59,2 % (62 %)
MRZ polyspec	67 %			48 %		58 %	38,8 % (37 %)

Recentní metaanalýza: význam MRZ reakce jako
nejspecifičtějšího „rule-in“ testu pro podporu dg. RS (na rozdíl od
o-IgG, který je nejsenzitivnějším „rule-out“ testem)

J Neurol (2017) 264:453–466
DOI 10.1007/s00415-016-8360-4



ORIGINAL COMMUNICATION

The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature

S. Jarius¹ · P. Eichhorn² · D. Franciotta³ · H. F. Petereit⁴ · G. Akman-Demir⁵ ·
M. Wick² · B. Wildemann¹

Received: 3 November 2016 / Revised: 1 December 2016 / Accepted: 2 December 2016 / Published online: 22 December 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Intrathekální syntéza jednotlivých antivirových IgG protilátek u RS ve srovnání s jinými diagnózami – novější práce

	Hottenrott et al. 2017			Hottenrott et al. 2018		Feki et al. 2018 (Tunisko)	
	PP-RS n=103	RR-RS n=100	OIND n=48	PCNSL n=37	Psychiatrické dg. n=78	RS n=60	Non-RS n=37
Measles	62 %	48 %	6 %	14 %	3 %	58 %	24 %
Rubella	57 %	43 %	12 %	5 %	0 %	65 %	16 %
VZV	48 %	39 %	15 %	19 %	10 %	63 %	11 %
MRZ	84 %	69 %	23 %	32 %	10 %	n.s.	n.s.
MRZ polyspec	54 %	43 %	8 %	8 % (všechny AI <2.0)	3 % (všechny AI <2.0)	65 %	8 % (3 pacienti – NMO, neuro-Behçet, neuro-Sjögren)

Dif. Dg. RS x systémová autoimunitní onem.s postižením CNS

Venhoff N, ... Hottenrott T. *Front Immunol* 2019; 10: 514

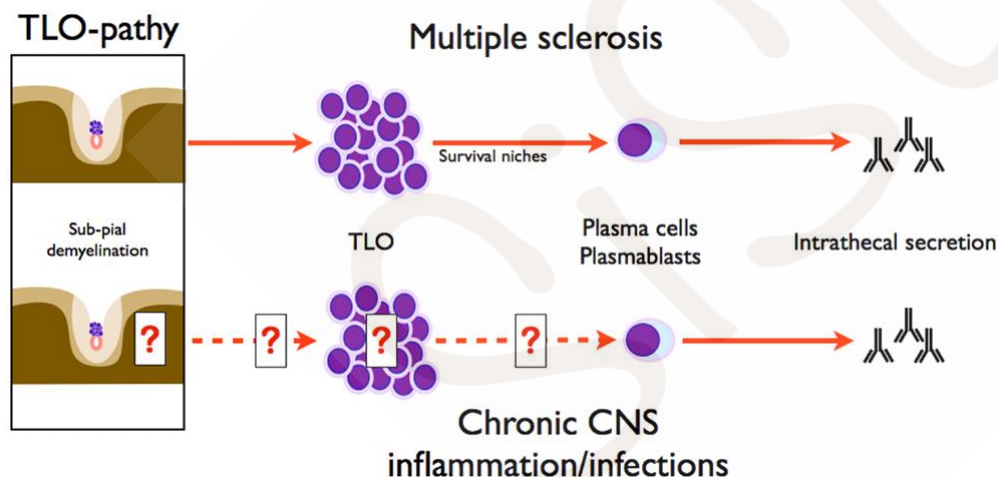
	RDwCNS (n=40)	ANA+ RS (n=68)*
M	10 %	59 %
R	10 %	48 %
Z	12.5 %	44 %
MRZ	20 % (AI > 2.0: 12.5 %)	69 % (AI > 2.0: 69 %)
MRZ polyspec.	12.5 % (AI > 2.0: 5 %)	54 % (AI > 2.0: 37 %)
IgG OCB	32.5 %	90 %
ANA-titr: medián (rozmezí)	800 (200 – 6400)	400 (100 – 3200)

RDwCNS = revmatická onemocnění s postižením CNS (32 SLE, 6 ANCA-asociovaná vaskulitida, 1 Coganův syndrom, 1 Behçetova nemoc)

* 68/149 RS (45.6 %) s pozit. ANA (NIF); oproti RDwCNS měli tito pacienti jen vzácně další autoprotilátky (např. ANCA – 1/68 vs. 5/40 pacientů s RDwCNS; APLA – 2/68 vs. 12/40 pacientů s RDwCNS; anti-dsDNA – 3/68 vs. 22/40 pacientů s RDwCNS)

Intrathekální protilátková odpověď u RS jako nevyčerpatelný zdroj teoretických hypotéz

- **Mikhael Bonnan** (Service de Neurologie, Centre Hospitalier F. Mitterand, Pau, France): Does disease-irrelevant intrathecal synthesis in multiple sclerosis make sense in the light of tertiary lymphoid organs? www.frontiersin.org, 2014; 5: Article 27.
- *MRZ chápe jako součást širší nespecifické ith. reakce namířené proti řadě cílů včetně většiny běžných infekčních agens*
- *ALE: velmi nízká frekvence ith. syntézy anti-EBV IgG, anti-CMV IgG aj.*



„EBV serum-CSF paradox“

- Osoby s infekční mononukleózou v anamnéze mají 2,17krát vyšší riziko rozvoje RS ve srovnání s osobami, které neprodělaly symptomatickou EBV infekci
- Prevalence EBV-séropozitivních osob mezi RS pacienty dosahuje téměř 100 % (je výrazně vyšší, než prevalence M, R, Z, H – séropozitivních osob mezi RS pacienty)
- Přesto je intrathekální syntéza anti-EBV protilátek detekována jen vzácně (kolem 15 %)

Intrathekální syntéza antivirových protilátek u pacientů s RS – korekce na séroprevalenci

Ruprecht K, Wildemann B, Jarius S. *J Neurol* 2018; 265: 239-53

	M	R	Z	H	EBV	EBNA-1	VCA
Dospělí:							
séroprevalence (%)	88.3	96.2	81.0 (95.6)	76.1	96.6	97.6	96.6
pozitivní AI (%)	66.4	56.5	51.0	26.8	15.6	9.7	4.3
pozitivní AI _{SC}	75.2	58.7	63.0 (53.4)	35.2	16.2	9.9	4.5
Děti:							
séroprevalence (%)	85.6	82.5	87.1	43.3	89.3*	88.1	89.3
pozitivní AI (%)	48.7	34.9	46.1	28.6	16.7	20.9	14.0
pozitivní AI _{SC}	56.9	42.3	53.0	66.1	18.7	23.7	15.7

„EBV serum-CSF paradox“ – možné vysvětlení

- B buňky produkující protilátky pronikají do CNS v době primární EBV infekce (kdy zpravidla ještě neprobíhá tvorba protilátek proti EBV)
- Repertoár buněk produkujících protilátky v CNS u pacientů s RS je tak „otiskem“ („fingerprint“, „snapshot“) repertoáru buněk produkujících protilátky v periférii v době primární EBV infekce
- Otto C, Hofmann J, Ruprecht K. *Med Hypotheses* 2016; 91: 109-13

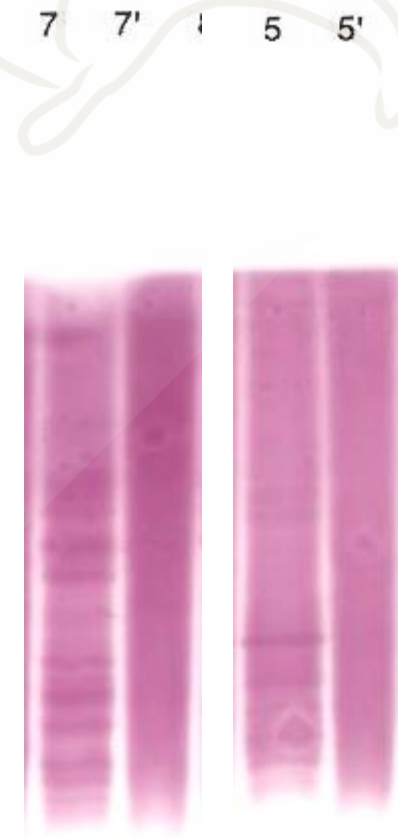
MRZ reakce v dif.dg. RS x NB

Bednářová J, Štourač P, Adam P. *Acta Neurol Scand* 2005, 112: 97-102

	MRZ (≥ 1 Ag)	B.b. AI ($>1,4$)	OCB	↑ Elem ($\geq 15/3$)	↑ Q-Alb
RS (n=42)	88,0 %	26,2 %	81 %	33,3 %	31,0 %
NB (n=27)	7,4 %	89,0 %	74 %	92,6 %	81,5 %

OCB u pacientky s RS (vlevo) a NB (vpravo)

- **Pacientka č. 1: CIS→RS (neuritis n. II)** CSF: Q-Alb $3.68 \cdot 10^{-3}$, intrathek. syntéza IgG 45 %, IgA 4 %, IgM 88 %, OCB 19/0 (typ 2)
- **Pacientka č. 2: NB (PNP)** CSF: 9/3 elem, CB 0,277 g/l, cytologie norm., Q-Alb $3,61 \cdot 10^{-3}$, intrathek. syntéza IgM 10 %, IgG a IgA výpočtem negat., IgG-OCB: 12/0 (typ 2)
- *V obou případech pozitivní antiborrel. IgG v séru*



Pacientka č. 1 Diff. dg. roztroušená skleróza (CIS) x neuroborrelióza

Protilátky IgG anti-	CSF (arb.j.)	Sérum (arb.j.)	Q CSF/S · 10³	Anti- body index	Komentář
Measles	71,43	7637	9,353	3,88	i.th. syntéza
Rubella	169,62	31841	5,327	2,21	i.th. syntéza
VZV	860,47	269691	3,191	1,32	Negativní
EBV	114,12	21023	5,428	2,25	i.th. syntéza
Borrelie	24,06	5756,2	4,180	1,73	i.th. syntéza

Pacientka č. 2 Diff. dg. roztroušená skleróza x neuroborrelióza

Protilátky IgG anti-	CSF (arb.j.)	Sérum (arb.j.)	Q CSF/S * 10³	Anti-body index	Komentář
Measles	12,80	7634	1,677	0,82	Negativní
Rubella	20,28	18392	1,103	0,54	Negativní
VZV	98,80	59591	1,658	0,81	Negativní
EBV	30,26	28740	1,053	0,51	Negativní
Borrelie	238,70	6313,7	37,807	18,40	i.th. syntéza !

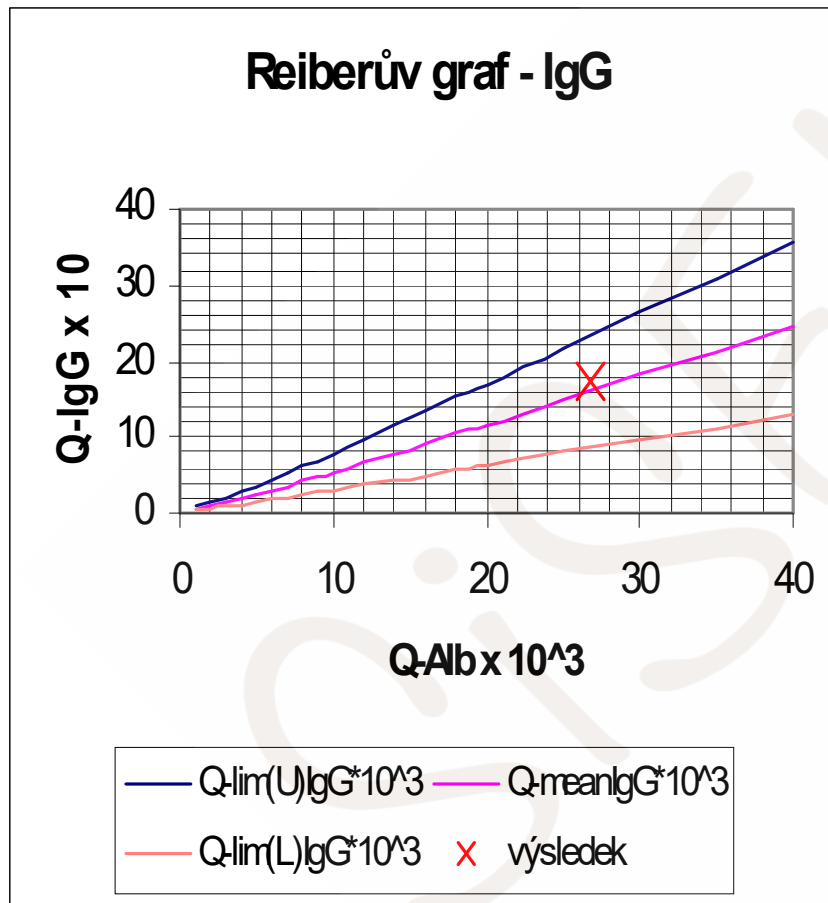
Závěry: MRZ reakce

- MRZ reakce je méně senzitivní, ale více specifická pro dg. RS než IgG-OCB
- Polyspecifická intrathekální protilátková odpověď (pozitivita MRZ reakce proti ≥ 2 Ag) je ještě méně senzitivní a ještě více specifická pro dg. RS
- MRZH varianta se nejeví jako výtěžnější než MRZ (racionální indikace jen je-li v dif.dg. herpetická infekce)
- Pravděpodobnost positivity MRZ(H) reakce při absenci IgG-OCB je nízká (u RS 15 – 30 % OCB-negativních pacientů); přesto má její provedení i za těchto okolností své oprávnění, zejména v diagnosticky nejasných případech

ZÁVĚRY: kvantitativní metody detekce ith. syntézy specifických protilátek obecně

- Detekce intrathekální syntézy specifických protilátek je cennou metodou v diagnostice neuroinfekcí (protilátky proti příčinnému činiteli) i roztroušené sklerózy (MRZ/H/ reakce)
- AI nelze vypočítat, pokud je koncentrace IgG (IgM u antiborrel. IgM) v likvoru „méně než“ – v takovém případě je výsledek „arbitrárně“ negativní (ith. syntézu neprokazujeme)!
- Analytické provedení zůstává poněkud problematické: původní doporučení dvojího ředění likvorů a sér ustoupilo ekonomickým zájmům; použitím jediného ředění se a) ušetří, b) nepřijde se na možné problémy, které mohou výsledek zpochybnit. Korektní provedení testu pro diagnostické i výzkumné účely je také otázkou etickou
- Ošetřující lékař musí respektovat omezení testu a výsledky interpretovat v kontextu klinického stavu a ostatních vyšetření

IgG: „Quantity versus quality“



CSF

Serum

CSF

Serum

Hodnocení: Typ 2 – intrathékální syntéza.

Komentář: V moku 3 pásy v peri-neutr. oblasti bez sérového korelátu. Prokázána lokální produkce oligoklon. IgG.

„Kvalitativní“ metody detekce intrathekální syntézy antigen-specifických protilátek

- ***Antigen-specifické oligoklonální pásy***
(IgG, jen výjimečně ostatní Ig)
- **IEF/afinitní imunoblotting**: membrána potažena relevantním **antigenem** (např. firma ProSpec, Izrael, <https://www.prospecbio.com/company>)
- Je vhodné aplikovat větší množství IgG než při detekci „celkového“ oligoklonálního IgG – u neuroinfekcí představují antigen-specifické IgG 10 – 20 % z celkového IgG, u polyspecifické „doprovodné“ odpovědi (např. MS) 0,1 – 0,5 %

Specifita oligoklonálních protilátek – I.

Infekční agens

Antigen	Metoda*	Výsledky**	Reference
Virus spalniček	PVDF, ALP CL	RS: 14/18; AMON: 12/27 ; VZV meningitis: 1/3; neurolupus: 1/2; kontroly: 0/12 RS: 3/3; CIS: 1/3 IgG-OCB-neg.RS: 4/17; kontroly: 0/11	Sindic <i>et al.</i> 1994, Frederiksen a Sindic1998; Skorstad <i>et al.</i> 2009 Stich <i>et al.</i> 2015
Virus zarděnek	PVDF, ALP CL	RS: 12/18; AMON: 6/27; neurolupus: 1/2; kontroly: 0/12 IgG-OCB-neg.RS: 2/17; kontroly: 0/11	Sindic <i>et al.</i> 1994, Frederiksen a Sindic 1998 Stich <i>et al.</i> 2015
Virus příušnic	PVDF, ALP	RS: 6/18; AMON: 6/27; kontroly: 0/12	Sindic <i>et al.</i> 1994; Frederiksen a Sindic 1998

*vždy IEF/AIB, není-li uvedeno jinak; **podíl pacientů s ith. syntézou z celkového počtu pacientů dané dg. skupiny

IF = imunofixace; membrána: PVDF = polyvinyliden-difluoridová; NC = nitrocellulosová

Značení detekční protilátky: HRP = křenová peroxidasa; ALP = alkalická fosfatasa

Chromogen: 4-CN = 4-chloro-1-naftol; AEC = 3-amino-9-ethylkarbazol; BCIP/NBT = 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitroblue tetrazolium

CL = chemiluminiscence

Specifita oligoklonálních protilátek – I.

Infekční agens (pokr.)

Antigen	Metoda	Výsledky	Reference
VZV	PVDF, ALP; CL	RS: 8/18; AMON: 9/27; VZV-meningitis: 3/4; HE: 3/3; neurolupus: 2/2; kontroly: 1/12 VZV-meningoradikulitis: 10/27 RS: 2/3; CIS: 2/3 IgG-OCB-neg.RS: 5/17; kontroly: 1/11	Sindic et al. 1994, Frederiksen a Sindic 1998; Gregoire et al. 2006; Skorstad et al. 2009; Stich et al. 2015
HSV	PVDF, ALP; CL	RS: 4/20; HE: 14/15; OIND: 3/10; NIND: 1/10 RS: 1/3; CIS: 0/3	Monteyne et al. 1997; Skorstad et al. 2009
CMV	PVDF, ALP NC, HRP, 4-CN	RS: 1/20	Sindic et al. 1994
EBV	NC	RS: 2/43; OIND: 1/13; NIND: 0/10	Franciotta et al. 2011
Enteroviry	HRP, 4-CN	Enterovirová infekce CNS: 2/2; RS: 1	Kaiser et al. 1989
JCV	PVDF, ALP	PML: 10/18; RS: 1/16; meningitis: 1/15 (borr.)	Sindic et al. 1997

Specifita oligoklonálních protilátek – I.

Infekční agens (pokr.)

Antigen	Metoda	Výsledky	Reference
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Vectastain ABC, HRP, AEC NC, HRP, CL	Borrel. meningoradikulitis: 35/45 NB s pozit. AI: 4/4	Hansen et al. 1989 Derfuss et al. 2001
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Imprint IF/autoradiografie biotin/streptavidin, HRP, 4-CN	Tbc meningitis: 1/1 (2 vzorky); kontroly (3×RS, 4×chron.zánět CNS n.s. Tbc meningitis: 8/8	Kinnman et al. 1981 Sindic et al. 1990
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	NC, biotin/streptavidin, HRP, CL HRP, 4-CN	Pozit. AI: 0/15 (!) RS, 2/4 kontrol; Negat. AI: 2/3 séropozit. RS, 0/8 pacientů (7×RS, 1×OIND) s neg. ELISA-CSF RS: 4/56; OIND: 2/18 (2×HIV-1-dementia); NIND: 0/15; kontroly: 0/10	Derfuss et al. 2001 Franciotta et al. 2005
<i>Toxoplasma gondii</i>	NC, HRP, 4-CN	Toxopl. encefalitis u AIDS: 5/5 Toxopl. encefalitis u AIDS: 7/9	Franciotta et al. 1996; Contini et al. 2000

Specifita oligoklonálních protilátek – I.

Infekční agens (pokr.)

Antigen	Metoda	Výsledky	Reference
HTLV-1	NC, HRP, AEC	Tropická spastická paraparesa: 7/7 (5 IgG a 2 IgM)	McLean et al. 1989
HIV	NC, biotin/streptavidin, HRP, 4-CN	8/10 asymptomatických HIV pozitivních; 3/4 AIDS-related complex; 9/13 AIDS	Kaiser et al. 1989
	NC, ALP, BCIP/NBT	Jen sérum: 10 z 10 dětí séropozitivních matek – shoda spektrotypů (4 pozit., 6 negat.)	Slade et al. 1989

Specifita oligoklonálních protilátek – II.

antigeny neinfekční povahy

Antigen	Metoda	Výsledky	Reference
Hu	NC, HRP IEF/IB, NC, inkubace s Ag značeným ³⁵ S	Anti-Hu-syndrom: 5/5 PEM/SN, poz. anti-Hu v séru: 4/4 RS: 0/5; kontroly: 0/5	Rauer a Kaiser 2000 Storstein et al. 2004
Yo	NC, HRP IEF/IB, NC, inkubace s Ag značeným ³⁵ S	Anti-Yo syndrom: 9/9 (ale jen 5/9 pozit. „celkové“ o-IgG) PCD, poz. Anti-Yo v séru: 6/6; RS: 0/5; kontroly: 0/5	Stich et al. 2003 Storstein et al. 2004
Ri	NC, HRP	Anti-Ri syndrom: 1/1; non-Ri PNS (anti-CV2, anti-Hu, anti-Yo): 0/6	Stich a Rauer 2006
CV2/CRMP5	NC, HRP	PNS a pozitivitou anti-CV2/CRMP5 Ab v séru: 2/3 (+ 1× S > L) Kontroly (1×RS, 1×NB): 0/2	Stich a Rauer 2007
amphiphysin		PNS s pozitivitou anti- amphiphysinových Ab v séru: 1/1 Kontroly (1×RS, 1×NB): 0/2	
GAD65	NC, CL	Stiff person syndrom: 5/5	Skorstad et al. 2008
GFAP	NC, HRP, 4-CN	Akutní myelitis: 1/1	Kaiser et al. 1993

Metoda: izoelektrická fokusace s následným afinitním imunoblottingem (IEF/AIB)

- 1. Potah membrány roztokem relevantního antigenu (6-24 hod)
- 2. Blokování volných vazebných míst (např. 3% BSA, 45-120 min – v průběhu IEF)
- 3. Blotting (40-60 min)
- (4. fixace 0,1% - 0,25% glutardialdehydem – 15-20 min, 2-8°C)
- (5. reblokování membrány – např. 0,3% BSA, 10-20 min)
- 6. Inkubace membrány se značenou protilátkou (≥ 60 min)
- 7. Detekce

Antigen-specifické oligoklonální IgG

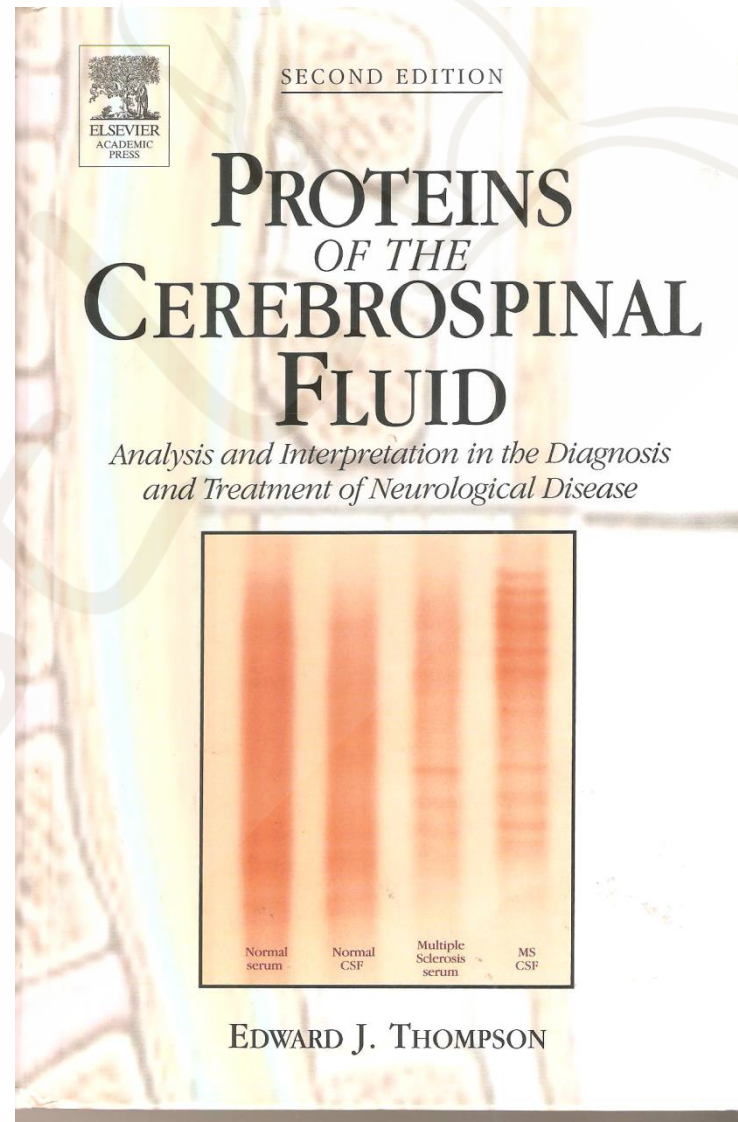
- Je vhodné aplikovat větší množství IgG než při detekci „celkového“ oligoklonálního IgG – u neuroinfekcí představují antigen-specifické IgG 10 – 20 % z celkového IgG, u polyspecifické „doprovodné“ odpovědi (např. MS) 0,1 – 0,5 % (Conrad *et al.* 1994, Jacobi *et al.* 2007)
- Ředění vzorků na 10 – 50 mg/l IgG (NEBO: neředěný CSF a sérum ředěné na likvorovou koncentraci IgG)

Kdo „vynalezl“ detekci antigen-specifických oligoklonálních IgG pásů imunoblottingem?!

- Dörries R, Ter Meulen V (Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg): Detection and identification of virus-specific, oligoclonal IgG in unconcentrated cerebrospinal fluid by immunoblot technique. *J Neuroimmunol* 1984; 7: 77-89.
- Moyle S, Keir G, Thompson EJ (Institute of Neurology, Queen Square, London): Viral immunoblotting: A sensitive method for detection of viral-specific oligoclonal bands in unconcentrated cerebrospinal fluid. *Biosci Rep* 1984; 4: 505-510.

„Eastern blotting“

- Thompson EJ. *Proteins of the cerebrospinal fluid*. 2nd Edition. Elsevier, London 2005. (str. 146-160)



Poznámka k ředění vzorků pro detekci specifických oligoklonálních IgG pásů – *platí pouze pro specifické IgG!*

- Pro $Q\text{-IgG} \leq Q_{\text{lim}}\text{-IgG}$ ředíme likvor i sérum na stejnou koncentraci IgG
- Pro $Q\text{-IgG} > Q_{\text{lim}}\text{-IgG}$ lze nejprve vypočítat (maximálně možné) množství CSF-IgG krevního původu, tj. CSF-IgG':

$$Q_{\text{lim}} \text{ IgG} = \frac{\text{CSF} - \text{IgG}'}{S - \text{IgG}}$$

$$\text{CSF} - \text{IgG}' = Q_{\text{lim}} \text{ IgG} \cdot S - \text{IgG}$$

- Pokud $Q\text{-IgG} > Q_{\text{lim}}\text{-IgG}$, pak vždy platí, že $\text{CSF-IgG}' < \text{CSF-IgG}$
- Při $Q\text{-IgG} > Q_{\text{lim}}\text{-IgG}$ lze při ředění uvažovat likvorovou koncentraci IgG CSF-IgG' namísto CSF-IgG
- Postup teoreticky použitelný i pro
 - alternativní výpočet AI (protilátkového indexu) jako poměru optických densit CSF a séra ředěných na stejnou koncentraci IgG
 - Western blot a příbuzné techniky

Ith. syntéza specifických protilátek – „Quantity versus quality“

- **PML:** 14/18 pacientů AI >1,5; ale jen 10/18 pacientů pozitivní specifické o-IgG (Sindic *et al.* 1997)
- **HSV:** Monteyne *et al.* 1997 – dobrá shoda AI vs. spec. o-IgG u herpet. encefalitidy (diskrepantní nálezy 2/27), horší u RS (diskrepantní nálezy 3/20)
- **Neuroborrelióza:**
 - Pícha *et al.*, Čes. a slov. neurol. neurochir. 2000, 63/96, 5: 279-82: 39/72 pacientů pozitivní AI, 31/72 pozitivní specif.o-IgG, 33/72 pozitivní celkové o-IgG. 1 pacient s negat. AI a pozit. specif. o-IgG.
 - Racek 2001: specif. o-IgG u 30/30 pacientů s pozit. AI a 0/54 séropozitivních pacientů s negat. AI

Specifické o-IgG u AMON a RS

(Sindic CJM et al., *J Neuroimmunol* 1994; 54: 75-80;
Frederiksen JL, Sindic CJM, *Mult Scler* 1998; 4: 22-26)

Specif. o-IgG	AMON (n=27)	RS (n=18)
negativní	11 (41 %)	0 (0 %)
pozitivní	16 (59 %)	18 (100 %)
- virus spalniček	12 (44 %)	14 (78 %)
- virus zarděnek	6 (22 %)	12 (67 %)
- VZV	9 (33 %)	8 (44 %)
- virus příušnic	6 (22 %)	6 (33 %)

MRZ-specifické o-IgG u o-IgG negativních pacientů s RS

- Stich O. et al. *Acta Neurol Scand* 2015; 131(6): 381-8
- Chemiluminiscenční detekce (rtg film)
- 8/17 o-IgG negativních (a 13/18 o-IgG pozitivních) pacientů s RS mělo pozitivní specifické o-IgG alespoň 1 z MRZ specifit
- 7/17 o-IgG negativních pacientů s RS mělo zvýšený aspoň 1 AI
- 4/11 „MRZ pozitivních“ pacientů: AI + spec. o-IgG
- 4/11 „MRZ pozitivních“ pacientů: jen spec. o-IgG
- 3/11 „MRZ pozitivních“ pacientů: jen AI
- tj. nepříliš dobrá shoda obou metod (10/17, tj. 59 %)

První impuls k vlastnímu pátrání po specifitě oligoklonálních IgG pásů u RS

abstrakt posteru dr. Fioreho ze Světového neurologického kongresu v Buenos Aires r. 1997 **Multiple sclerosis:**

Microbiology, serology, treatment

(J Neurol Sci 1997; Suppl.150: S248-S249)

na vyžádání pak autorem poskytnuta podrobnější verze práce

UNA MALATTIA TOSSI-INFETTIVA DA DIFETTO DI BARRIERA: LA SCLEROSI MULTIPLA.

Dr. Domenico Fiore

Ambulatorio: Via Gauslino 15 - Abitazione: Viale Madonna delle Grazie 17/19

Tel. e Fax: 049-9704306 - 35028 Piove di Sacco (PD). Italia.

SOMMARIO

Rivalutando il ruolo delle tossine delle Bordetelle nell'induzione dell'encefalite allergica sperimentale, rivisitata la fisiopatologia della pertosse del neonato da madre iperimmune e la patologia da immunocomplessi, ho ricercato anticorpi anti-Bordetella e complessi immuni circolanti in diversi gruppi di pazienti con Sclerosi Multipla (SM).

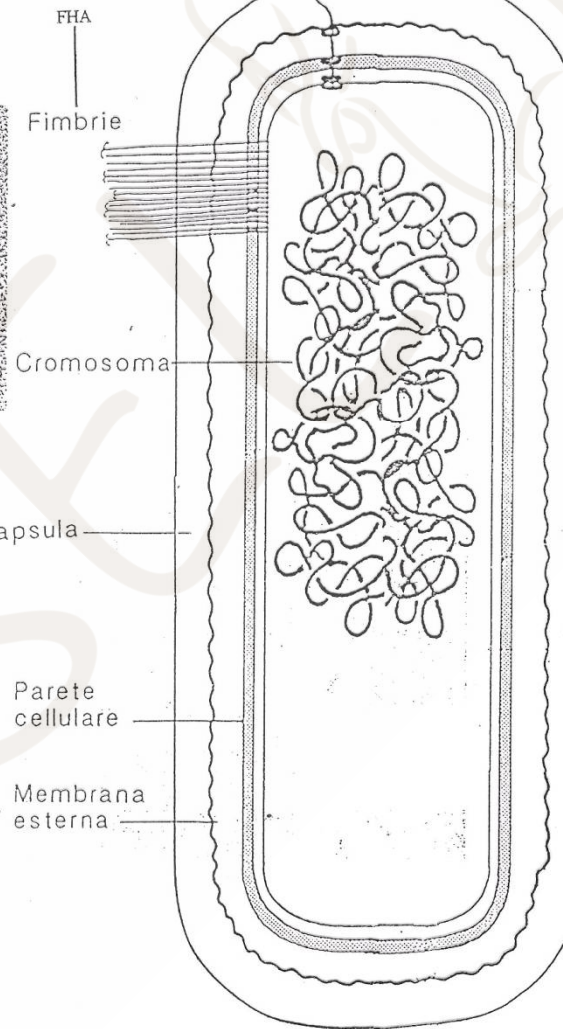
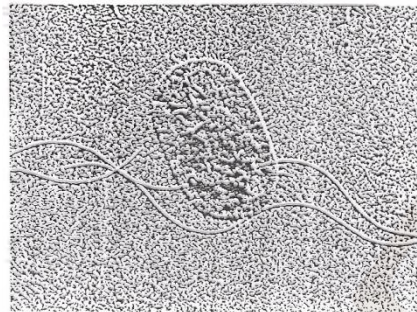
I risultati ottenuti dimostrano che, nella SM:

- il fattore ambientale è costituito dalle Bordetelle;*
 - il fattore individuale è un difetto della barriera muco-ciliare;*
 - si possono avere 3 tipi sierologici (SM a IgG = remittente; SM a IgM = cronica-evolutiva con intervalli liberi; SM-sieronegativa = cronica-evolutiva senza intervalli liberi);*
 - è obbligatorio il trattamento antibiotico specifico.*
-

18. listopadu 1998 dr.

Fiore vystoupil na
semináři Hennerovy
neurologické kliniky se
smíšenými ohlasy ...

BACTERIO GRAM NEGATIVO



(LPE)
LPS
Lipopolisaccaride (LPS)
Lymphoetox
Rausing
Factor

Prague, December 19, 1998

Dear dr. Fiore,

Thank You very much for Your kind letter. We're sorry to answer so late.

Preliminary investigations with adsorption of immunoglobulins in cerebrospinal fluid (CSF) to bordetella antigen are unfortunately negative. Allow us to give You some details of our methodology, in order to exclude methodological fault:

200 ml of formaline-immortalised Bordetella pertussis (strain 1.2) concentrate was centrifuged, 100 ml of supernatant removed, and CSF (from different MS patients) added in the following amounts:

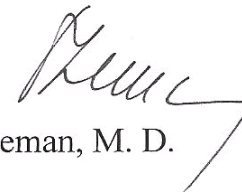
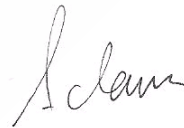
- a) 100 ml of CSF diluted 1:1 in 6.5 mM PBS, pH 7.3
- b) 300 ml of native CSF
- c) 500 ml of native CSF

The mixture was incubated for 2-3 hrs, with gentle agitation each 15-30 min. No oligoclonal bands present in native CSF have disappeared after the incubation.

We will continue our experiments and inform You soon about the results. Please take this preliminary information as confidential (Bordetella pertussis concentrate was not obtained in official way, but as a kind gift).

Merry Christmas and a Happy New Year
To You and to Your family,

Yours sincerely



Assoc. Prof. Pavel Adam, M. D. David Zeman, M. D.

Kazuistika 1

Anamnéza

- Žena nar. 1977
- **RA:** sestra + ve 22 letech hemoragická CMP v graviditě
- **OA:** s ničím se neléčí
- **EA:** 2006 klíště snad s následným erytémem, od 10/2006 opakovaně cefalea, 11/2006 pozitivita antiborreliových protilátek IgM – přeléčena p.o. ATB – Azitrox 500 mg 1xdenně 1 týden, dále přerušovaně ob 3 dny (?), cefalea ustoupila po několika dnech užívání ATB, 12/2006 ambulantní neurologické vyš. s normálním nálezem
- **NO:** 20. 9. 2007 dopoledne náhle parestézie PHK a pravé poloviny obličeje, přechodná expresivní afázie, porucha hybnosti PHK akrálně asi 20 min, pak difúzní cefalea

Kazuistika 1 - pokračování

- **Vstupní objektivní nález:** Zcela diskrétní dysarthrie, HK: méně obratná špetka vpravo, Hanzal vpravo, fen. retardace vlevo, DK: v Ming. lehká deprese vlevo asi o 5 cm, stoj III s oscilacemi - tj. velmi diskrétní nález bez hrubší patologie
- **Vstupní laboratoř:** v normě (FW 10/18, CRP negat.)
- **CT mozku** nativně i postkontrastně s norm. nálezem
- **USG karotid a vertebrálních tepen:** nevelké AS změny hemodynamicky nevýznamné, užší AV vlevo
- **ECHOkdg:** norm. nález
- **EEG:** nález odpovídá ložisku F-T vlevo

Kazuistika 1: CSF 29. 9. 2007

- čb, 394/3 elem, 10/3 ery, Pandy ++++, CB 1,5 g/l
- **Glukosa: 0,9 mmol/l; Laktát: 2,9 mmol/l**
- **KEB: -20 !!**
- (LDH: 0,77 μ kat/l; AST: 0,39 μ kat/l; KTD 10)
- CYTOLOGIE: Lymfocytární pleocytóza s aktivací v lymfocytární, méně i v monocytární řadě, se zřetelnou plazmocytární reakcí – cytol. nález odpovídá floridnímu nehnisavému zánětu.
- **Imunochemické vyšetření:** Těžká porucha funkce hemato-likvorové bariéry (3,0-násobek horní hranice věkové normy). Extrémně výrazná intrathék. syntéza IgM a IgG, výrazná intrathék. syntéza volných lehkých řet. kappa, prokázána též intrathék. syntéza IgA. Oligoklonální IgG – IEF: typ 3 (18/2)
- **Vyšetření k potvrzení dg. neuroborreliózy:**
 - *Antiborreliové protilátky:* IgM a IgG pozitivní v séru i v moku (ELISA, WB; AI nestanoven)
 - *PCR:* negativní v krvi i moku
 - *Oligoklonální IgG – afinitní imunoblotting* (membrána preinkubována s roztokem sonikovaných borrelií /fy. Serotec/): typ 3 – pásy jen v moku i společné pásy v moku a séru

Kazuistika 1 - Průběh hospitalizace

- Přeléčena i.v. Ceftriaxonem 2 g/den po 17 dnů, dále p.o. Zinnat 500 mg 1-0-1 po 3 týdny
- Subj. ústup potíží, vymizely cefalgie. Kompletně regredoval neuropatologický nález
- 12/2007 ambulantně doplněno MRI a MRAG mozku: normální nález

Kazuistika 1

Nečekané pokračování příběhu

- Od 24. 8. 2008 pozvolna vzniklá cefalea frontálně, bez foto- a fonofobie, 29. 8. 2008 febrilie 38°C, klíště neguje, rýmu, kašel neguje
- Vstupní obj. nález 29. 8. 2008: zcela frustní až sporná centr. pravostr. symptomatologie, ameningeální
- Vstupní laboratoř: FW 22/40, CRP 1 mg/l

Kazuistika 1

vyšetření likvoru 29. 8. 2008

- čb, 284/3 elem, 68/3 ery, Hb negat, Pandy ++, CB 0,29 g/l
- Glukosa 2,5 mmol/l; Laktát 1,4 mmol/l
- KEB +28
- **Cytologie:** lymfocytární pleocytóza s plazmocytární a lipofagocytární reakcí – obraz nehnisavého zánětu s v.s. tkáňovou destrukcí
- **Imunochemické vyš.:** Norm. funkce hemato-likvorové bariéry. Výrazná intrathek. syntéza IgG, IgM, IgA i oligoklon. volných lehkých řet. kappa i lambda.
- **Oligoklonální IgG:** typ 3 (12/4)
- **Oligoklonální antiborreliové IgG:** 10 pásů v moku, 2 slaběji i v séru, mnohé pásy přesně kolokalizují s oligoklon. IgG
- **AI (antiborreli. IgG) = Q-spec/Q-lim(IgG):** 66,0

Kazuistika 1

Závěr vyšetření likvoru 29. 8. 2008 a další osud ...

- Prokazujeme přítomnost nehnisavě-zánětlivého procesu v kompartmentu CNS, pravděpodobně borreliové etiologie. Pokud lze srv. s min. vyš., t.č. jde velmi pravděpodobně o chronický aktivní zánět s přetrvávající lokální produkcí IgG (rel. vzestup intrathék. frakce), IgM, IgA i volných lehkých řet. kappa.
- *Zahájena léčba i.v. Ceftriaxonem, pacientka přeložena na spádové infekční oddělení ...*

Kazuistika 1

Dynamika likvorového nálezu I.

	9/2007	8/2008
Elementy/3	394	284
Mononukl./3	375	280
Polymorf./3	19	4
CB (g/l)	1,37	0,29
Glukosa (mmol/l)	0,9	2,5
Laktát (mmol/l)	2,9	1,4
KEB	-20	+28

Kazuistika 1
Dynamika likvorového nálezu II.

	9/2007	8/2008
Q-Alb · 10 ³	18,0	2,8
Index IgG	1,80	4,30
Index IgM	1,98	1,22
Index IgA	1,12	1,33
Index fKLC	25,4	122,5
IgG ith. %	53,0	85,4
IgM ith. %	80,3	86,0
IgA ith. %	44,2	68,4
Oligoklon. IgG (CSF/S)	18/2	12/4

Kazuistika 1

Oligoklonální IgG (vlevo) a oligoklonální antiborreliové IgG (vpravo)

nahoře: 1. vzorek (9/2007); dole: 2. vzorek (8/2008)

CSF

Serum

CSF

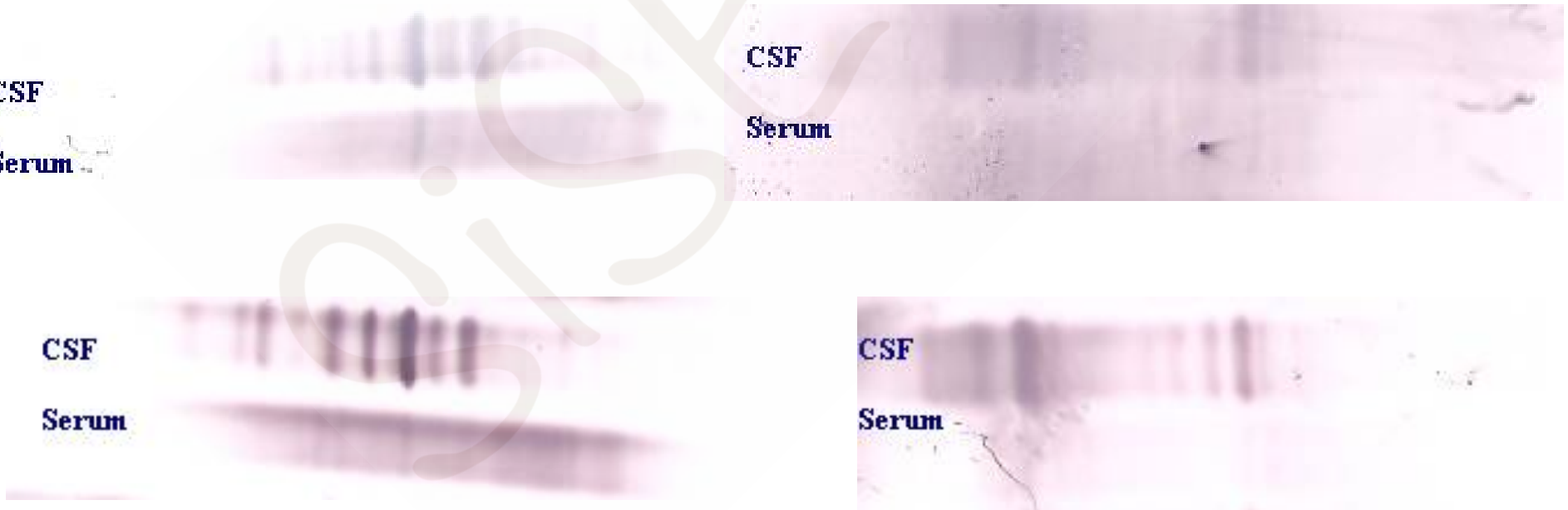
Serum

CSF

Serum

CSF

Serum



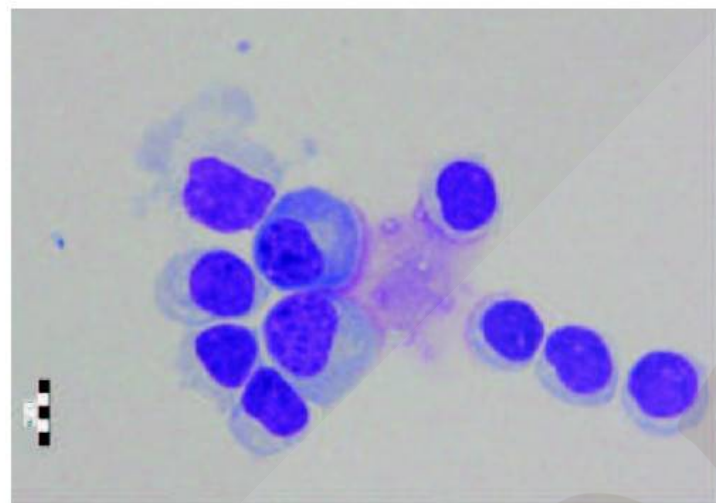
Kazuistika 2

Neuroborrelióza + MGUS

- Muž, 69 let
- Prijat pro polyradikuloneuritický syndrom jako susp. AIDP
- LIKVOR - cytologie: 434/3 elem (lymfocyty 85 %, plazmocyty 2 %, monocyty 11 %, neutrofily 2 %)
- CB 1,911 g/l
- Laktát 3,36 mmol/l, glukosa 3,96 mmol/l, KEB 22,72
- Q-Alb $30,0 \cdot 10^{-3}$ (3,5- násobek horní hranice věkové normy)
- Ith. syntéza IgM (54 %) a IgG (30 %) výpočtem dle Reiberova vztahu
- Oligoklonální IgG: TYP 3 („more than pattern“) + TYP 5 (paraprotein)
- Elfo: M-gradient DM 6,6 g/l, imunofixace: IgG κ
- Kontrolní elfo po 6 a 12 měsících: přetrvávající M-gradient (6,5 ... 7,7 g/l)

Koincidence neuroborreliózy a MGUS

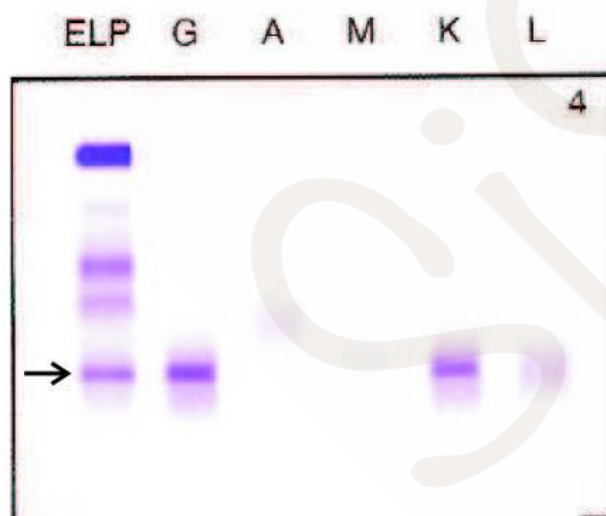
Zeman et al. Fluids and Barriers of the CNS 2012, 9:5



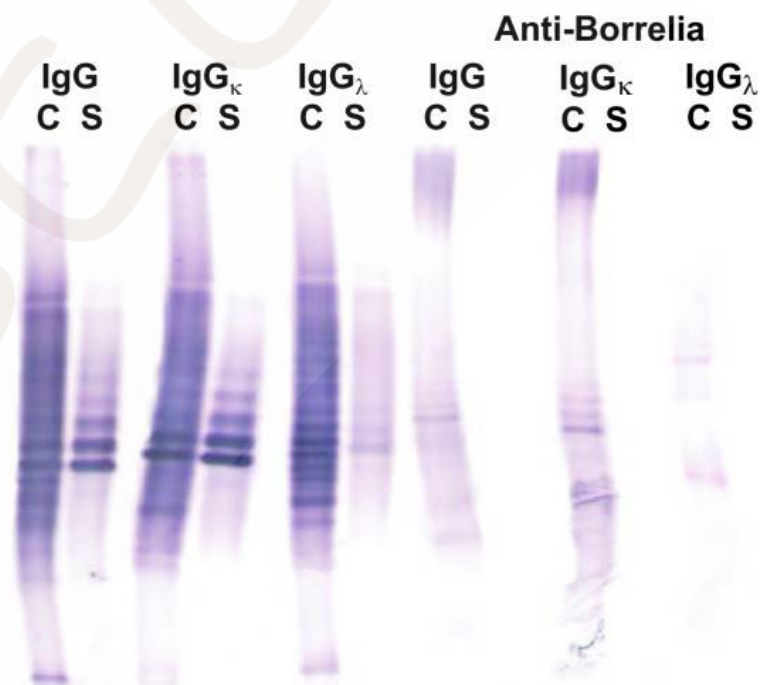
a

S
C

b



c



d

Antiborreliové oligoklonální IgG , IgG κ , IgG λ :

obě pacientky s pozitivitou oligo-IgG a pozitivní MRZ reakcí, ALE u obou negativní antiborreliové IgG protilátky v likvoru i séru v ELISA testu (AI nelze vypočítat)

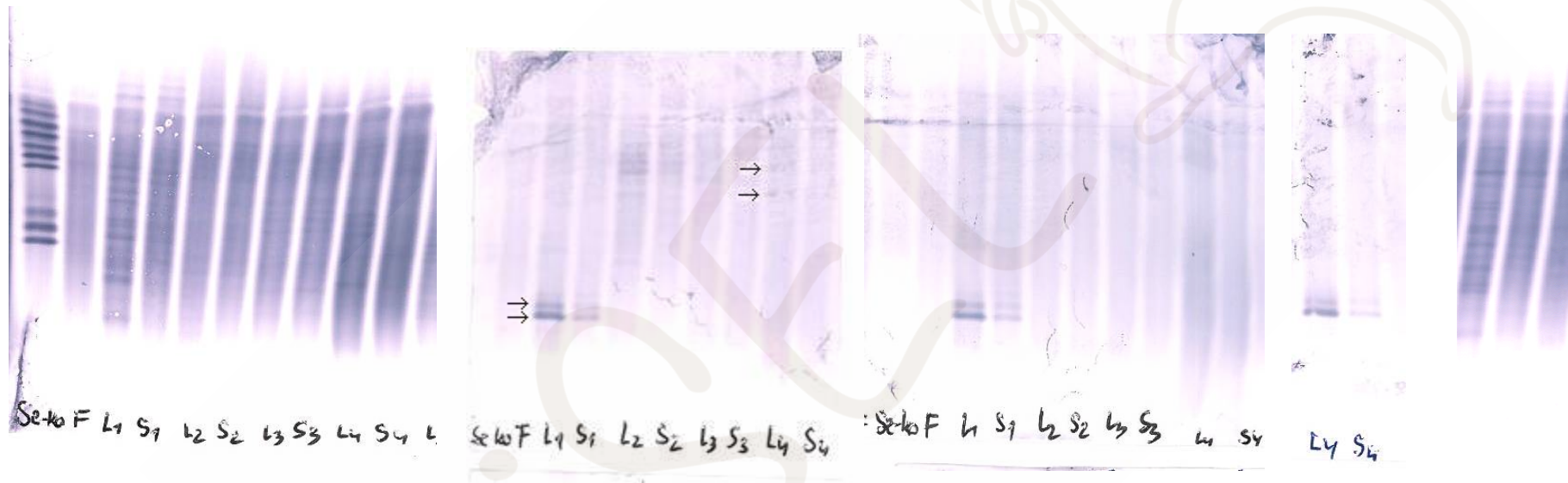
vzorek C1 negativní, C2 pozitivní !

IgG					IgG κ					IgG λ				
IVIG	C1	S1	C2	S2	IVIG	C1	S1	C2	S2	IVIG	C1	S1	C2	S2



Možnost „falešné“ positivity?

2-3 výrazné o-IgG pásy reagující s Ag borrelií, HSV1 i spalniček v L > S (vzorek L1+S1 vlevo, L4+S4 vpravo)



o-IgG: „celkové“

Borrelia burgdorferi

HSV1

measles „celkové“

Pacientka s jistou RS (dle Polmanovy revize McDonaldových kritérií 2010) po první atace

Likvor: čb, 20/3 elem., cytologie: lymfo 97 %, plazmocyt:1/prep.(<1 %), mitotická figura: 1/prep. (<1 %), monocyty 2 %, neutrofil: 1/prep. (<1 %), zcela ojed. velké bazofilní lymfocyty. Zá: Hraniční lymfocytární pleocytóza – pravděpodobně mírné nehnisavě-zánětlivé změny. CB 0,676 g/l, Q-Alb $12,54 \cdot 10^{-3}$ (1,8 – násobek horní hranice věkové normy), ith. syntéza IgG, IgA, IgM výpočtem neprokázána, o-IgG (Sebia): typ 3 (19 pásů v likvoru, 9 v séru-z nich 4 v likvoru výraznější), o-fKLC +++ (15/0), o-fLLC +++ (11/0), MRZ reakce negativní

Avidita IgG protilátek – I.

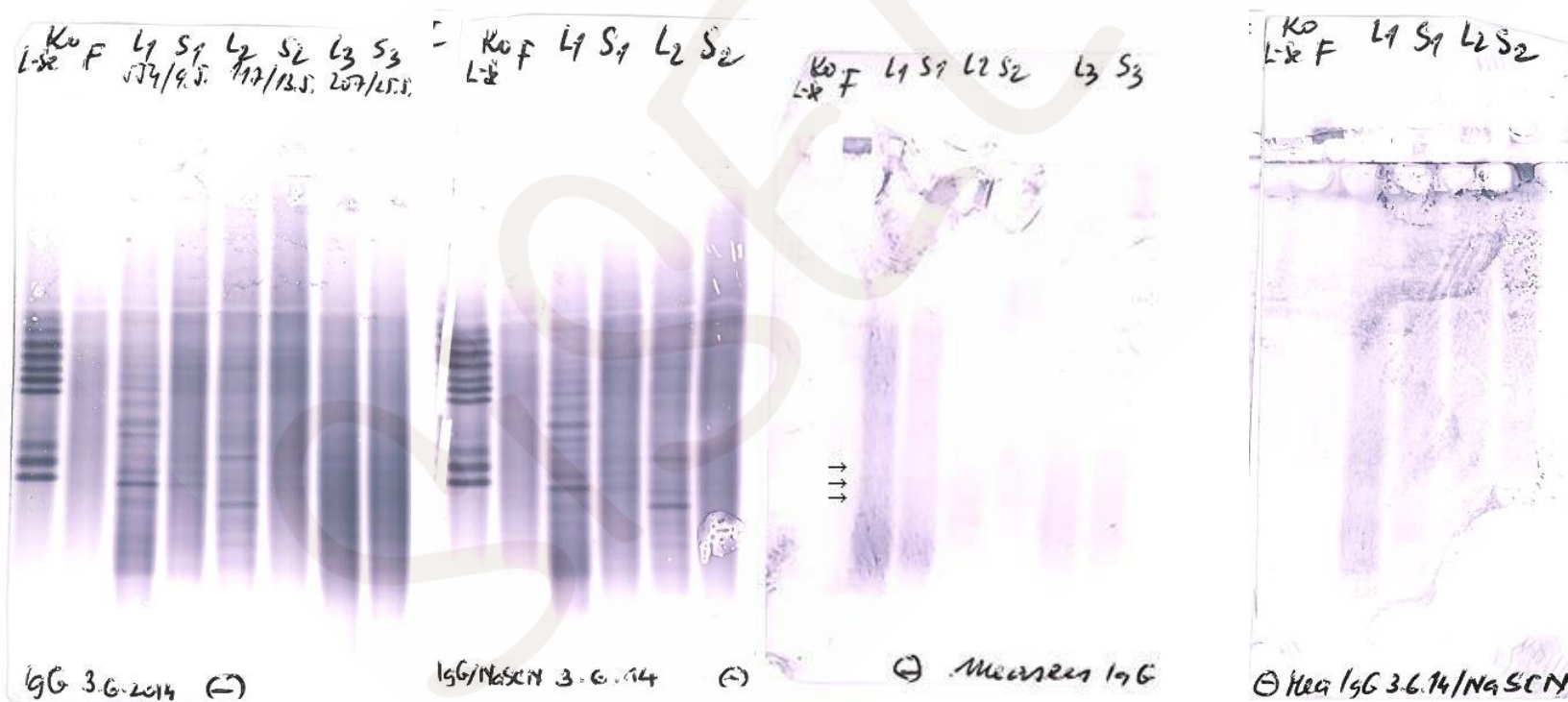
- U imunokompetentních, neléčených jedinců může přítomnost nízké avidních IgG protilátek svědčit pro recentní infekci – během časně imunitní odpovědi jsou IgG protilátky cílené proti mnoha epitopům patogenu a mají nízkou aviditu → klonální selekce → vznik vysoce avidních IgG protilátek proti omezenému počtu imunodominantních epitopů
- **Metody zjišťování avidity:**
 - *chaotropní činidla* (diluční nebo eluční princip)
 - *aviditní kompetice* – přímá detekce nízké avidních IgG protilátek blokováním vysoce avidních IgG protilátek ve vzorku solubilním antigenem a určení koncentrace zbývajících antigen-specifických nízké avidních IgG protilátek

Avidita IgG protilátek – II.

- Chapman MD et al. Measurement of high affinity antibodies on antigen-immunoblots. *J Immunol Methods* 2006; 310: 62-66.
- po blottingu na Ultrabind membránu inkubace membrány s roztokem thiokyanatanu sodného (NaSCN) – 1,25M, 2,5M, 5M
- NaSCN působí jako chaotropní činidlo \Rightarrow eliminace nízkoafinitních protilátek
- Klinické využití: detekce vysokoafinitních oligoklonálních IgG protilátek u herpetické encefalitidy (Chapman MD et al. Quantitative demonstration of intrathecal synthesis of high affinity immunoglobulin G in herpes simplex encephalitis using affinity-mediated immunoblotting. *J Neuroimmunol* 2007; 185: 130-135)

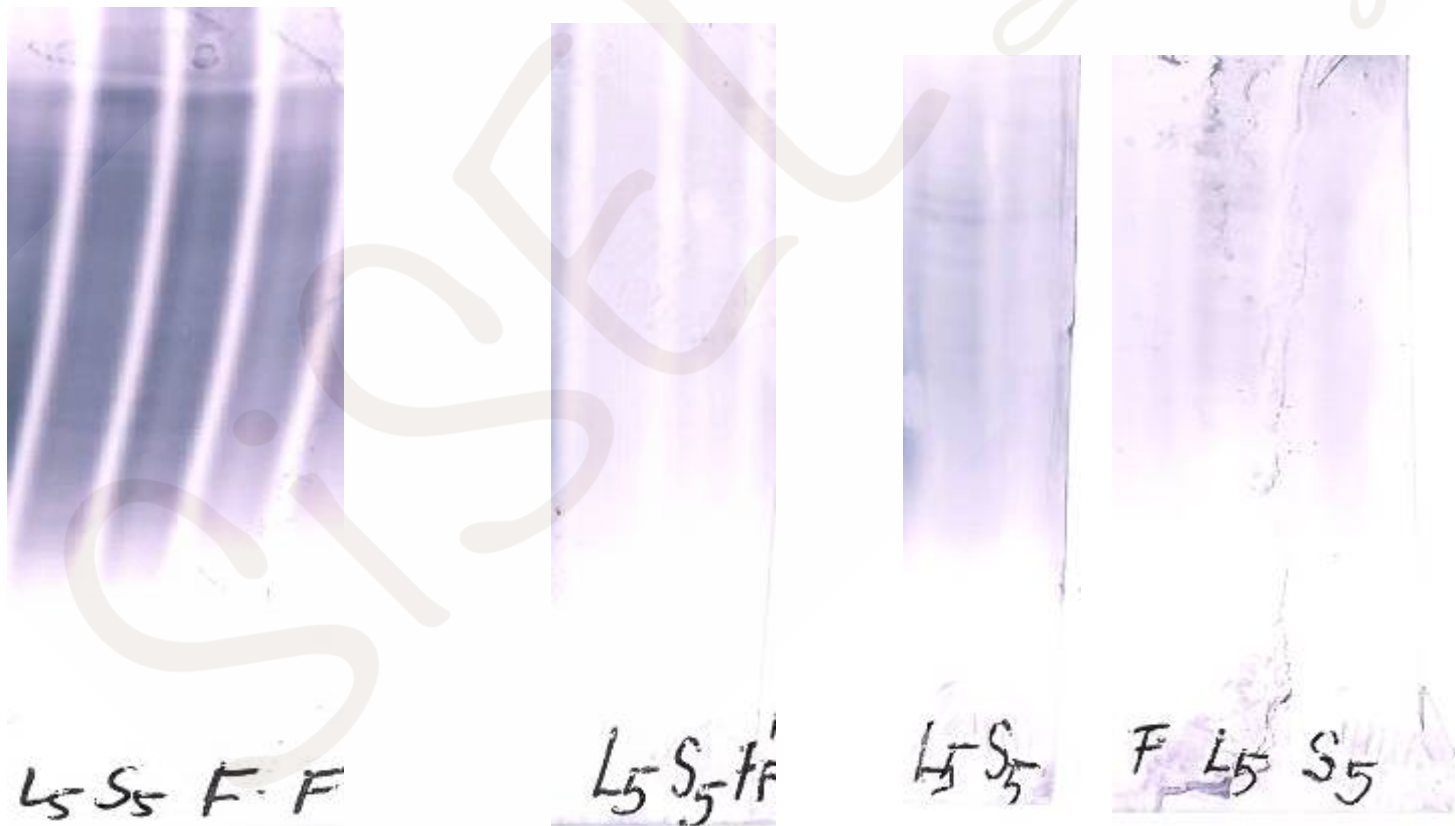
Celkové o-IgG (vlevo) a anti-measles o-IgG (vpravo)

2-3 velmi slabé anti-measles o-IgG pásy v likvorech L1 a L2, nepřítomné na membráně inkubované s 1M NaSCN (v dH₂O)



Celkové o-IgG (vlevo), anti-measles (uprostřed) a anti-borrel. o-IgG (vpravo 2 × - bez a s NaSCN)

2 zřetelné (+ několik slabých „neviditelných“) o-IgG pásy v likvoru bez protějšku v séru reagující s Ag borrelií (ale nikoliv s Ag spalniček) - přítomné i na membráně inkubované s 1M NaSCN (v dH₂O) u IgG séropozitivního pacienta s negativními „celkovými“ o-IgG (typ 4 – mirror), ale pozitivním antiborrel. IgG AI (4,65) při jinak nenápadném CSF nálezů



ZÁVĚR – I.

- U **neuroinfekcí (zejm. neuroborreliózy)** specif. o-IgG odpovídají značné části celkových o-IgG, většinou korelují s AI a mohou být užitečným doplňkovým vyšetřením, popř. alternativou stanovení AI
- U **autoimunitních zánětů CNS (RS/CIS)** specif. o-IgG neodpovídají hlavním pásům celkového o-IgG, jsou méně intenzivní než u neuroinfekcí a mají nižší aviditu (např. mizí po proplachu membrány v roztoku chaotropního činidla), o korelaci s AI není dostatek literárních údajů, ale patrně bude horší než u neuroinfekcí. Pro rutinní diagnostiku se jeví jako nepřínosné.

ZÁVĚR - II.

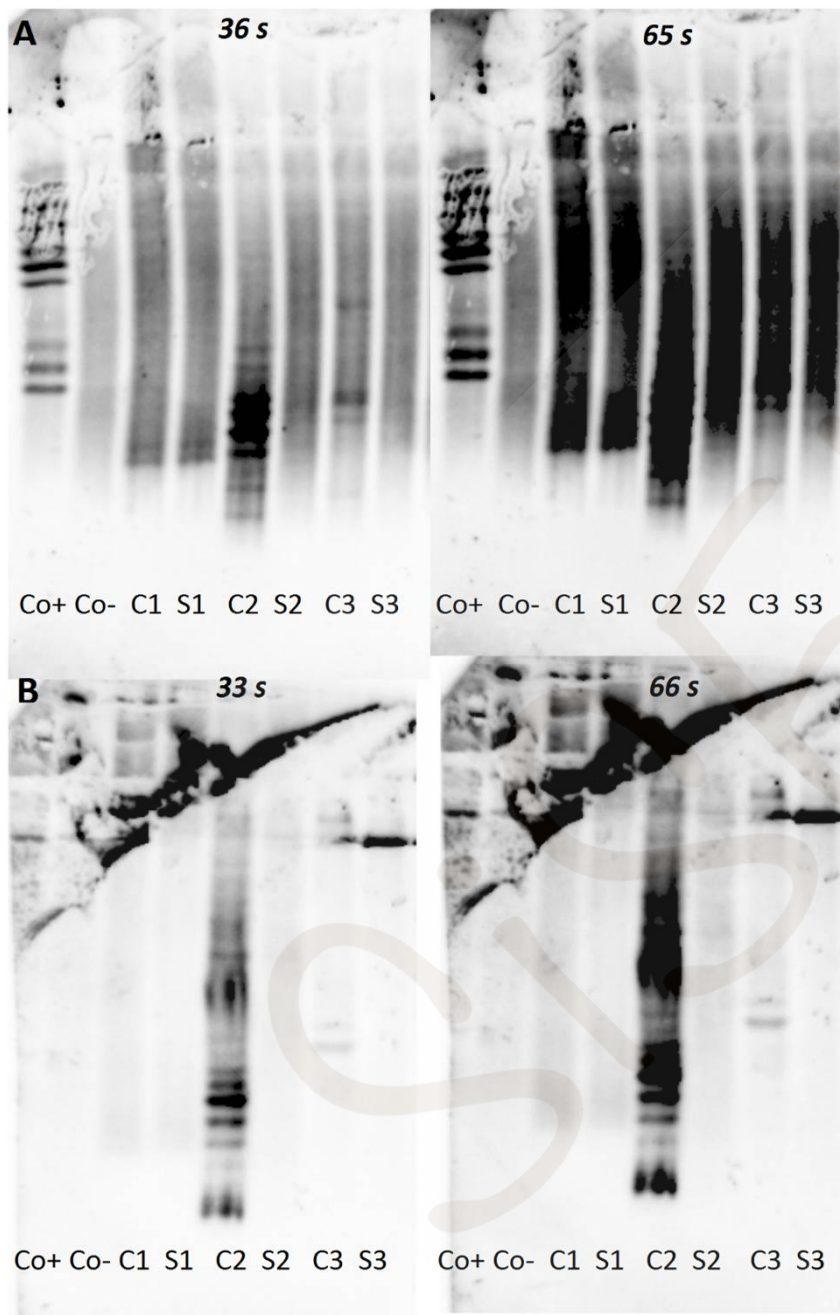
- Domníváme se, že detekce specifických oligoklonálních pásů se NESTANE součástí rutinní likvorové diagnostiky.
- Může však mít význam v ojedinělých klinicky obtížných případech, zejm. není-li komerčně dostupný ELISA test; výsledek je nutno vždy hodnotit velmi opatrně
- Problematika „pozitivní“ (v těchto vzácných případech zpravidla nedostupná) a „negativní“ kontroly (negativní kontrola musí mít pozitivní celkové o-IgG !)
- Na druhé straně se domníváme, že metoda má potenciál pro výzkumné použití – jak u neuroinfekcí, tak zejména u roztroušené sklerózy:
- „Since the major oligoclonal response in infectious diseases of the nervous system is directed against the agent that causes disease, every attempt must be made to determine the specificity of the oligoclonal IgG in MS. Antibodies to various infectious agents and autoantigens that are not part of the oligoclonal IgG repertoire are likely to be irrelevant, although the demonstration of a direct link between such minor antibody responses and the disease process would be significant. Meanwhile the detection of any antibody in MS that is synthesized intrathecally is worthy of further study.“
(Burgoon et al. B cells in multiple sclerosis. *Front Biosci* 2012; 9: 786-796)

IEF/AIB versus protilátkový index (AI)

- **Výhody IEF/AIB:**
 - detekce antigenní specifity přímo v OCB
 - **potřeba mnohem menšího množství vzorku**
 - méně choulostivé na nepřesnosti v kvantitativním stanovením celkového IgG
- **Nevýhody IEF/AIB:**
 - mnohem pracnější
 - prakticky nelze standardizovat (mj. nejsou komerčně dostupné kontroly)

PERSPEKTIVY – I.

- Rozšíření „palety“ vyšetření o další antigeny (*problém*: antigeny /zejm. rekombinantní/ jsou drahé a koncentrace potřebné k potahu membrány poměrně vysoké – 5 až 50 mg/l)
- **Luminiscenční detekce** – citlivější než klasická chromogenní (*problém*: přístroje a software jsou velmi drahé)



CHEMILUMINISCENČNÍ DETEKCE

**Celkové (nahore) a
antiborreliové (dole) o-
IgG**

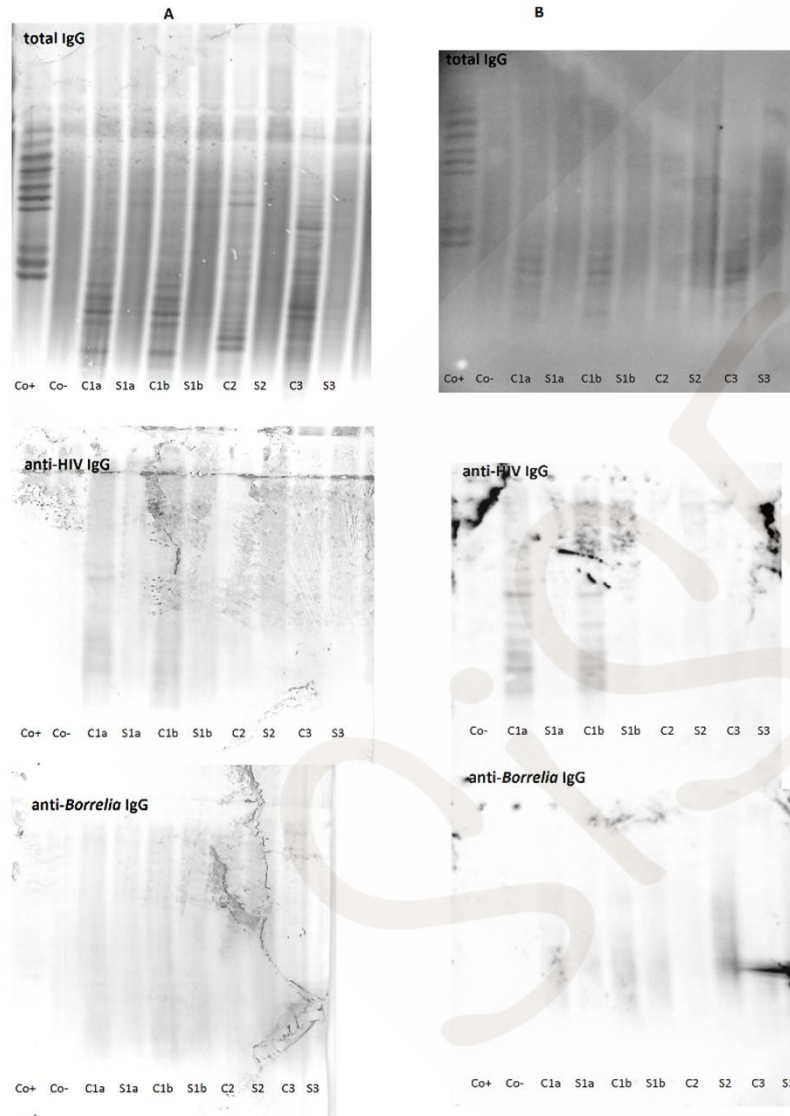
***Pozitivní nález ve
vzorcích C2 a C3***

Co+: CSF control (Sebia) –
směs IgG paraproteinů

Co-: preparát IVIG
(Flebogamma®)

Průkaz reaktivity IgG OCB s HIV antigeny

potah membrány: HIV-110 (rekombinantní HIV-1 p17-p24, gp41-gp120, ProSpec, Izrael)



- **DIF.DG.roztroušená skleróza u HIV-pozitivního pacienta?**
- **Chromogenní detekce (vlevo)**
- **Chemiluminiscenční detekce (vpravo)**
- **Celkové IgG (nahore):** Pásky v likvoru ve vzorcích C1a (zamražený) a C1b (uchovávaný při +4°C), C2 a C3
- **Anti-HIV IgG (uprostřed):** pozitivní jen v C1a a C1b
- **Anti-Borrelia IgG (dole):** jednoznačná pozitivita není v žádném vzorku

Dlouhy O et al. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2018. 162 (2): 107-115

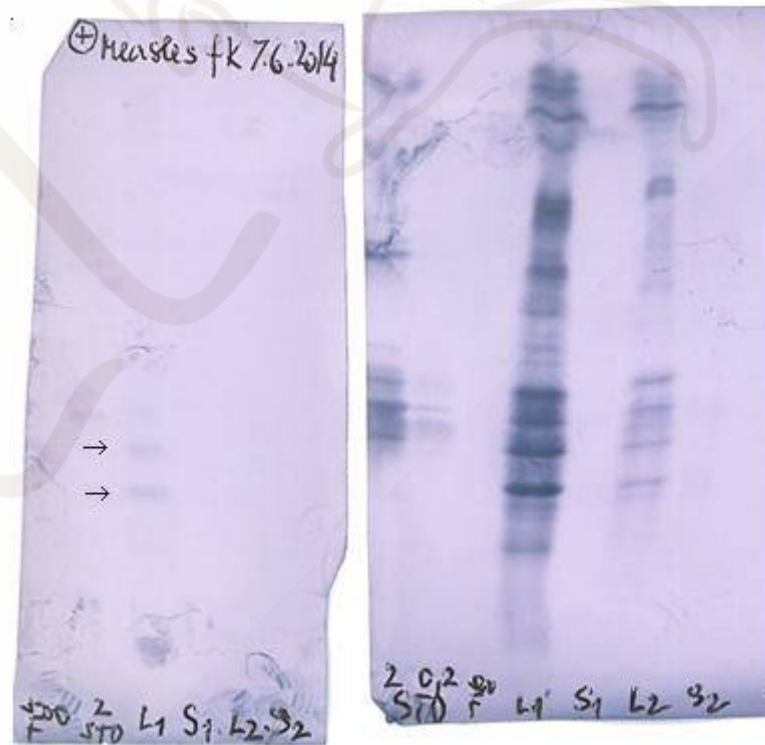
PERSPEKTIVY - II.

- **Antigen-specifické IgA, IgM; fLC ?!!**
- Pacient s klinicky jistou RS
- 15/3 elem, Q-Alb $15,06 \times 10^{-3}$, ith. syntéza IgG výpočtem (34 %), IgG-OCB typ 3 (18/5), ofKLC +++, ofLLC +++, MRZ pozit. (3/3), AI-measles 5,12
- Measles-ofKLC: 2-3 pásy v likvoru bez protějšku v séru (korespondují s dvěma z cca 25 „celkových“ o-fKLC pásů) – první pozitivní záchyt „Ag-specifických“ (?) o-fLC v naší laboratoři vůbec!
- (Measles-ofLLC: negativní, přes výraznou pozitivitu „celkových“ ofLLC)

measles-ofKLC

„celkové“ ofKLC

Oba páry L1+S1, L2+S2 od pacientů s RS



Děkuji za pozornost.

