

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA I INTERPRETACIJA NALAZA SPECIFIČNIH PROTUTIJELA

mr.sc. Oktavija Đaković Rode
Klinika za infektivne bolesti
"Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

ETIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA INFektivNIH BOLESTI

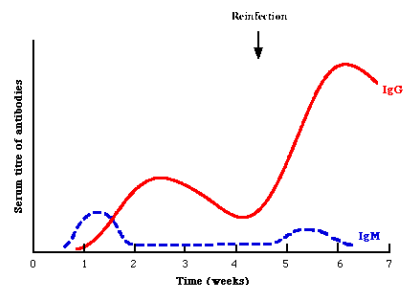
- **Izravna detekcija** uzročnika ili njegovih dijelova (antigena, nukleinskih kiselina)
 - Elektronski mikroskop; svjetlosni mikroskop (inkluzijska tjelešca); detekcija antigena imunofluorescentnim ili imunoenzimskim testom; metode molekularne biologije za detekciju genoma
- **Izolacija uzročnika (kultivacija)**
 - stanične kulture (CPE, hemadsorpcija, potvrda testom neutralizacije, interferencije, imunofluorescencije); oplođena jaja; pokusne životinje; bakteriološke podloge
- **Dokaz specifičnog imunog odgovora - serologija**

KATEGORIJE IMUNOG ODGOVORA

- STANIČNA IMUNOST (limfociti T)
- HUMORALNA IMUNOST (limfociti B)

IMUNOGLOBULINI = PROTUTIJELA
IgM, IgG, IgA, (IgE, IgD)

IMUNI ODGOVOR



ZNAČAJKE HUMORALNOG IMUNOG ODGOVORA KOJE SE KORISTE U SEROLOGIJI

- Vrijeme pojave protutijela
- Primarni odgovor
- Anamnestički sekundarni odgovor
 - Specifičan (monoklonski)
 - Nespecifičan (poliklonski)

SEROLOGIJA

=

DIJAGNOSTICIRANJE BOLESTI
ODREĐIVANJEM REAKCIJE
PROTUTIJELA I ANTIGENA

UZORCI ZA SEROLOŠKU OBRADU

PARNI SERUMI

- **prvi ili akutni serum**
 - uzeti što ranije u početku bolesti
- **drugi ili parni (rekonvalescentni serum)**
 - uzeti oko 2-3 tjedna kasnije

POSTUPAK S UZORKOM

- u **sterilnu epruvetu** (bez dodataka) u aseptičkim uvjetima uzeti **5-10 mL pune krvi**
 - ostaviti na sobnoj temperaturi da se odvoji koagulum
 - centrifugirati (na 3000 rpm / 5-10 minuta)
 - oprezno odvojiti supernatant - **SERUM**
- **ČUVANJE** seruma na +2-8° C do 7 dana
 - za dulje čuvanje uzorke alikvotirati i čuvati na -20° C
- **TRANSPORT UZORAKA** u adekvatno zaštićenim posudama u hladnim uvjetima

**KVALITETA UZORKA ZNAČAJNO UTJEČE NA
REZULTATE TESTIRANJA !**

ODREĐIVANJE PROTUTIJELA U DRUGIM TJELESNIM TEKUĆINAMA

LIKVOR, OČNA VODICA

PROBLEM PORIJEKLA PROTUTIJELA !

ANTIBODY INDEX (AI)

- Uz **TEKUĆINU** iz koje se žele odrediti protutijela obavezno je **ISTOVREMENO UZETI SERUM!**
- Iz istovremeno oduzetih uzoraka, npr. **likvora i seruma**, uz određivanje specifičnih protutijela treba odrediti i **ukupne imunoglobuline i/ili albumin** i/ili **“surogat” protutijela**

PROCJENA KRVNO-MOŽDANE MEMBRANE

1. “normalan” kvocijent IgG

$$Q_{\text{ukupni}} < Q_{\text{lim}}$$

$$AI = Q_{\text{spec}} : Q_{\text{ukupni}}$$

Q_{spec} = specifični IgG u likvoru : specifični IgG u serumu

Q_{ukupni} = ukupni IgG u likvoru : ukupni IgG u serum

Reiberova formula za procjenu krvno-moždane membrane

2. povećani kvocijent IgG

npr. u multiplom mijelomu ili nekim kroničnim bolestima

$$Q_{\text{ukupni}} > Q_{\text{lim}}$$

$$AI = Q_{\text{spec}} : Q_{\text{lim}}$$

$$Q_{\text{lim (IgG)}} = 0.93 \times \sqrt{Q_{\text{alb}}^2 + (6 \times 10^{-6})} - 1.7 \times 10^{-3}$$

$$Q_{\text{lim (IgM)}} = 0.67 \times \sqrt{Q_{\text{alb}}^2 + (120 \times 10^{-6})} - 7.1 \times 10^{-3}$$

Interpretacija nalaza likvorskih protutijela (AI)

- AI 0.5-1.5
 - Referentne vrijednosti za zdrave osobe
 - Nema intratekalne sinteze
- AI 1.5-2.0 (4.0)
 - Granični nalaz
- AI > 2.0 (4.0)
 - Značajan nalaz likvorskih protutijela

METODE U SEROLOGIJI

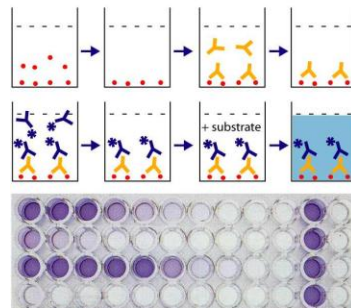
- REAKCIJA VEZANJA KOMPLEMENTA (RVK)
- REAKCIJA AGLUTINACIJE
 - Bakterijska
 - Latex
 - Hemaglutinacija
 - Inhibicija hemaglutinacije
- REAKCIJA PRECIPITACIJE
 - Precipitacija u epruveti
 - Gel imunodifuzija
 - Protusmjerna imunoelktroforeza
- NEUTRALIZACIJA
 - Virusna
 - Toksina

NOVIJE METODE

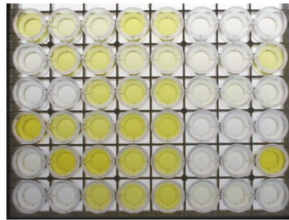
- RADIOIMUNOTEST (RIA)
- IMUNOFLUORESCENTNI TEST (IFA)
- IMUNOENZIMSKI TEST (EIA, ELISA)
- IMUNOBLOT / WESTERN BLOT (WB)
- REKOMBINANTNI IMUNOBLOT TEST (RIBA)

- TESTOVI AVIDNOSTI

ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*



ELISA



ELISA assay
(b)

IZRAŽAVANJE REZULTATA

- Reaktivno
- Nereaktivno
- Granično ("siva zona")
- Točka "cut off"
- **KVALITATIVNO**: pozitivno / negativno
- **KVANTITATIVNO**: jedinice prema naputku proizvođača:
 - OD (ekstinkcija)
 - Index (ratio)
 - VE (value ELISA)
 - IU/mL
 - U/mL
 - AU/mL
 - titar

ODREĐIVANJE STAROSTI INFEKCIJE

- praćenje titra protutijela u parnim serumima
- testovi avidnosti IgG
 - **AVIDNOST** = čvrstoća veze antigena i protutijela
 - protutijela **veće** avidnosti javljaju se **kasnije** tijekom infekcije
 - promjena niske avidnosti u visoku unutar 6 mjeseci!

TUMAČENJE SEROLOŠKOG NALAZA

KLINIČAR ↔ MIKROBIOLOG

VAŽNI ČIMBENICI ZA INTERPRETACIJU SEROLOŠKIH NALAZA

- vrijeme oduzimanja uzorka
- nespecifični poticaji imunog odgovora
- ukrižene reakcije
- anamnestički odgovor

Vrijeme oduzimanja uzorka

- Parni uzorci
 - akutni serum
 - rekonvalescentni serum
- SEROKONVERZIJA
- PORAST TITRA PROTUTIJELA
- POJAVA SPECIFIČNIH IgM PROTUTIJELA

Nespecifični poticaj

- POLIKLONSKA AKTIVACIJA LIMFOCITA B
 - daje stvarne pozitivne rezultate

Ukrižene reakcije

- ZAJEDNIČKE ANTIGENE DETERMINANTE
 - npr. HSV-1 i HSV-2;
 - mumps i parainfluenca;
 - HHV-6 i CMV

Anamnestički odgovor

- POTICANJE REAKTIVACIJE IMUNOG ODGOVORA

- proizvodnja protutijela za ranije upoznat antigen

“original antigenic sin”

RAZLOZI LAŽNO NEGATIVNIH SEROLOŠKIH REZULTATA

- VRIJEME UZIMANJA UZORAKA
 - prije stvaranja specifičnih protutijela
- KOMPETICIJA IgM i IgG za vezna mjesta na nosaču
 - IgM lažno negativan u suvišku IgG
- LOKALNE INFEKCIJE (npr. genitalni HSV, *C.trachomatis*)
- REKURENTNA INFEKCIJA HSV
 - nema porasta titra protutijela
- IMUNONEKOMPETENTNI
 - imunokompromitirani koji ne razvijaju porast protutijela ili do porasta dolazi sporo - djeca

RAZLOZI LAŽNO POZITIVNIH SEROLOŠKIH REZULTATA

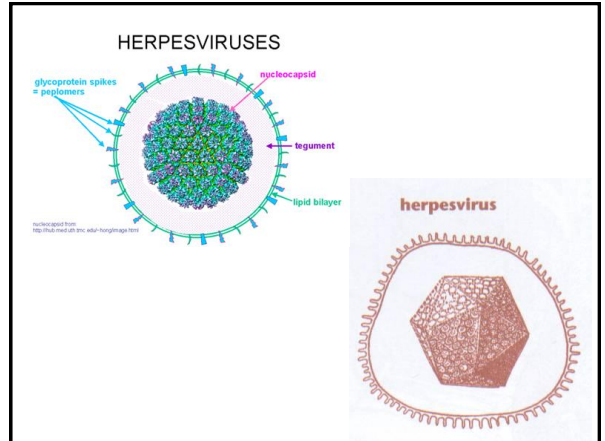
- ANTIGLOBULINI (reumatoidni faktor IgM)
- UKRIŽENA REAKTIVNOST
- POLIKLONSKA AKTIVACIJA LIMFOCITA B
- NEKVALITETAN UZORAK
 - ikteričan, hemoliziran, lipemičan, kontaminiran
- *Anamnestički odgovor*
- *Transplacentarni prijenos*
- *Transfuzije*

EVALUACIJA TESTOVA

- OSJETLJIVOST (%)
 - $\frac{\text{Stvarno pozitivni}}{(\text{stvarno pozitivni} + \text{lažno negativni})} \times 100$
- SPECIFIČNOST (%)
 - $\frac{\text{Stvarno negativni}}{(\text{stvarno negativni} + \text{lažno pozitivni})} \times 100$
- POZITIVNA PREDIKTIVNA VRIJEDNOST (%)
 - $\frac{\text{Stvarno pozitivni}}{(\text{stvarno pozitivni} + \text{lažno pozitivni})} \times 100$
- NEGATIVNA PREDIKTIVNA VRIJEDNOST (%)
 - $\frac{\text{Stvarno negativni}}{(\text{stvarno negativni} + \text{lažno negativni})} \times 100$

KATEGORIZACIJA RUTINSKIH METODA U VIROLOŠKOJ DIJAGNOSTICI

Virus	Kultura stanica	Izravna dijagnostika (EIA, aglutinacija)	Mikroskop (EM, DFA, imunohistokemija)	DNA/RNA	Imuni odgovor
Arbo (KME)	C	D	C	B	A
CMV	A	D	B	B	A
EBV	D	D	B	B	A
Parvo B19	D	C	C	A	A
Mumps	A	C	B	B	A
Rubela	B	D	C	B	A
Morbili	B	C	B	B	A
HSV	A	B	A	B	B
VZV	A	D	A	C	B
Adeno	A	A	B	C	B
Influenza	A	A	A	C	B
Parainfluenza	A	C	A	C	C
RSV	A	A	A	C	C
Entero	A	D	D	A	C
HHV-6	C	C	C	B	C



HUMANI HERPESVIRUSI

OZNAKA	VIRUS	PODOBITELJ	BOLESTI
HHV-1	Herpes simplex virus - 1 (HSV-1)	α_1	Gingivostomatitis, herpes labialis, keratokorjunktivitis, encefalitis, genitalni herpes
HHV-2	Herpes simplex virus - 2 (HSV-2)	α_1	Genitalni herpes, neonatalne infekcije, meningitis, gingivostomatitis, herpes labialis
HHV-3	Varicella zoster virus (VZV)	α_2	Vođene kozice, zoster
HHV-4	Epstein-Barr virus (EBV)	γ_1	Infektivna mononukleoza (IM); Burkittov limfom; nazofaringealni karcinom; limfoproliferativne bolesti, XLP, T-stanični limfom, Hodgkinov limfom
HHV-5	Cytomegalovirus (CMV)	β_1	Asimptomatska infekcija; IM; retinitis; infekcije u imunokompromitiranih; konatalne infekcije
HHV-6	Human herpesvirus - 6 (HHV-6)	β_2	Mononukleoza; roseola infantum (Exanthema subitum)
HHV-7	Human herpesvirus - 7 (HHV-7)	β_2	Mononukleoza?; roseola infantum; pityriasis rosea?
HHV-8	Human herpesvirus - 8 (HHV-8, KSHV)	γ_2	Kaposiev sarkom; multicentrična Castelmanova bolest; primarni efuzijski (tekući) limfom (PEL)

Herpesvirusi

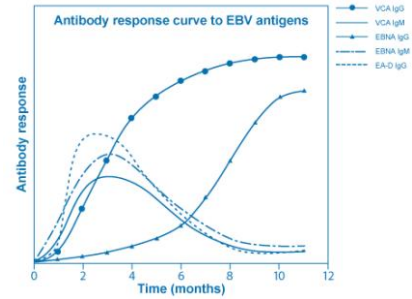
- Ubikvitarni u populaciji
 - osim HSV-2, HHV-8
- Primarne infekcije obično inaparentne u djetinjstvu

✓ **LATENCIJA**
✓ **REAKTIVACIJA**

Epstein-Barrov virus (EBV)

- **VCA (viral capsid antigen)**
 - VCA IgM pojava u 2-3 tjednu infekcije
 - VCA IgG pojava 4-7 tjedana nakon pojave simptoma; perzistira doživotno
- **EA-D (early antigen diffuse)**
 - EA-D IgG vrh u 3. tjednu
 - prisutni tijekom replikacije virusa
- **EBNA (EBV nuclear antigen)**
 - marker prijelaza akutne u rekonvalescentnu fazu (6-12. tjedan); uglavnom perzistiraju doživotno

Epstein-Barrov virus (EBV)



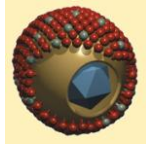
EBV

- **PRIMARNA INFEKCIJA**
 - AKUTNA FAZA
 - “PROLAZNA” SUBAKUTNA FAZA
 - REKONVALESCENTNA FAZA
- **RANIJA (PROŠLA) INFEKCIJA**
- **REAKTIVACIJA**

Serološki status u EBV infekciji

VCA IgM	VCA IgG	EA-D IgG	EBNA IgG	EBV infekcija
-	-	-	-	EBV negativan
-	+	-	+	Ranija (prošla) EBV infekcija
+	+	+	-	Primarna EBV infekcija
+	-	+ / -	-	Primarna EBV infekcija (akutna faza)
+	+	+	+	Primarna EBV infekcija (prolazna faza)
-	+	-	-	Primarna EBV infekcija (rekonvalescentna faza)
-	+	-	+	Primarna EBV infekcija (rekonvalescentna faza)
-	+	+	+	Reaktivacija EBV infekcije

Cytomegalovirus (CMV)



- **Anti-CMV IgM**
 - Pojava 3-4 dana nakon infekcije
 - Pad nakon nekoliko tjedana i dalje sporo kroz 4-6 mjeseci
 - Trajanje do 8 mjeseci, a u transplantiranih do 2 godine
- **Anti-CMV IgG**
 - Pojava 1 tjedan nakon pojave IgM

Problemi interpretacije serološkog nalaza u CMV infekciji

- **RAZLIKOVANJE PRIMARNE I SEKUNDARNE INFEKCIJE**
 - Reaktivacija može inducirati IgM
- **HETEROTIPNI IMUNI ODGOVOR**
 - ukrižena reaktivnost
- **INDUKCIJA POLIKLONALNOG IMUNOG ODGOVORA LIMFOCITA B**

Herpes simplex virus HSV-1, HSV-2

- ~45 miliona ljudi starijih od 12 godina u svijetu zaraženo je s HSV-2
- 90% seropozitivnih za HSV-2 ne zna da je imalo genitalni herpes
- >1/3 inficiranih ima ≥ 6 rekurirajućih infekcija u prvoj godini nakon HSV-2 primoinfekcije
- 10-20% genitalnih herpesa su HSV-1

Serološka dijagnostika HSV

- **PRIMARNA INFEKCIJA**
 - **SEROKONVERZIJA** – kasno, nakon 2-3 tjedna
 - Zajednički epitopi između HSV-1 i HSV-2 rezultiraju ukriženom reaktivnosti protutijela
 - Rekombinantni antigeni u testovima
- **REKURIRAJUĆE INFEKCIJE**
 - **NEMA POUZDANE SEROLOŠKE METODE !!**
 - **NAJČEŠĆE NEMA ZNAČAJNE PROMJENE TITRA PROTUTIJELA !!**

Anti-HSV IgM

- **Neonatalna HSV infekcija**
- **Recentna primarna genitalna infekcija trudnice**

– CNS infekcije

- Molekularna dijagnostika !!!
- Određivanje protutijela u likvoru, iako se IgM javljaju kasno

Varicella zoster virus (VZV)

• Anti VZV IgM

- Pojava 2-5 dana nakon simptoma
- Vrh 8-11 dana kasnije
- Pad unutar nekoliko tjedana nakon smirivanja simptoma
- ~Trajanje ~3 mjeseca

Varicella zoster virus (VZV)

• Anti-VZV IgG

- Pojava 4-6 dana nakon simptoma
- Vrh 4-8 tjedana kasnije
- Postepeni pad tijekom nekoliko godina
- Doživotno prisutna u niskom titru

Varicella zoster virus (VZV)

• Anti-VZV IgA

- Pojava 3-5 dana nakon početka osipa
- Trajanje 1-3 tjedna nakon smirivanja osipa; povišen 1-2 mjeseca; postepeni pad
- Obično nedetektabilna 4 mjeseca nakon smirivanja infekcije
- ~ 10% odraslih može imati detektabilnu nisku razinu IgA
- **Značajan pokazatelj reaktivacije VZV !**

