

# Antigen-specifické oligoklonální IgG

**David Zeman<sup>1,2,3</sup>, Pavlína Kušnierová<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Ústav laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava

<sup>2</sup> Katedra biomedicínských oborů, LF, Ostravská univerzita

<sup>3</sup> Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Ostrava



# Způsoby detekce intrathekální protilátkové odpovědi

- **CELKOVÉ PROTILÁTKY** (IgG, IgM, IgA, volné lehké řetězce)
- **SPECIFICKÉ PROTILÁTKY** (proti konkrétnímu antigenu – mikroorganismu, autoantigenu)
- **KVANTITATIVNÍ:** výpočet podle Reiberových rovnic nebo překročení cut-off pro některý z empirických vztahů (pro celkové Ig); výpočet protilátkového indexu (pro specifické protilátky)
- **KVALITATIVNÍ:** oligoklonální Ig (celkové/specifické) – pro celkové Ig senzitivnější, pro specifické Ig se rutinně nepoužívá

# 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. 2009*)

# 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	Sindic <i>et al.</i> 1994, Frederiksen a Sindic 1998; Skorstad <i>et al.</i> 2009
Virus zarděnek	PVDF, ALP	RS: 12/18; AMON: 6/27; neurolupus: 1/2; kontroly: 0/12	Sindic <i>et al.</i> 1994, Frederiksen a Sindic 1998
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 = křenuv 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	Sindic <i>et al.</i> 1994, Frederiksen a Sindic 1998;  Gregoire <i>et al.</i> 2006;  Skorstad <i>et al.</i> 2009
HSV	PVDF, ALP;  CL	RS: 4/20; HE: 14/15; OIND: 3/10; NIND: 1/10  RS: 1/3; CIS: 0/3	Monteyne <i>et al.</i> 1997;  Skorstad <i>et al.</i> 2009
CMV	PVDF, ALP NC, HRP, 4-CN	RS: 1/20	Sindic <i>et al.</i> 1994
EBV	NC	RS: 2/43; OIND: 1/13; NIND: 0/10	Franciotta <i>et al.</i> 2011
Enteroviry	HRP, 4-CN	Enterovirová infekce CNS: 2/2; RS: 1	Kaiser <i>et al.</i> 1989
JCV	PVDF, ALP	PML: 10/18; RS: 1/16; meningitis: 1/15 (borr.)	Sindic <i>et al.</i> 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 <i>et al.</i> 1989 Derfuss <i>et al.</i> 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 <i>et al.</i> 1981  Sindic <i>et al.</i> 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-demence); NIND: 0/15; kontroly: 0/10	Derfuss <i>et al.</i> 2001  Franciotta <i>et al.</i> 2005
<i>Toxoplasma gondii</i>	NC, HRP, 4-CN	Toxopl. encefalitis u AIDS: 5/5 Toxopl. encefalitis u AIDS: 7/9	Franciotta <i>et al.</i> 1996;  Contini <i>et al.</i> 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 <i>et al.</i> 1989
HIV	NC, biotin/streptavidin, HRP, 4-CN  NC, ALP, BCIP/NBT	8/10 asymptomatických HIV pozitivních; 3/4 AIDS-related complex; 9/13 AIDS  Jen sérum: 10 z 10 dětí séropozitivních matek – shoda spektrotypů (4 pozit., 6 negat.)	Kaiser <i>et al.</i> 1989  Slade <i>et al.</i> 1989

## Specifita oligoklonálních protilátek – II. *antigeny neinfekční povahy*

Antigen	Metoda	Výsledky	Reference
Hu	NC, HRP IEF/IB, NC, inkubace s Ag značeným <sup>35</sup> 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 <i>et al.</i> 2004
Yo	NC, HRP IEF/IB, NC, inkubace s Ag značeným <sup>35</sup> 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 <i>et al.</i> 2003 Storstein <i>et al.</i> 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 <i>et al.</i> 2008
GFAP	NC, HRP, 4-CN	Akutní myelitis: 1/1	Kaiser <i>et al.</i> 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 ( $\geq 60$  min)
- 7. Detekce

# Antigen-specifické oligoklonální IgG

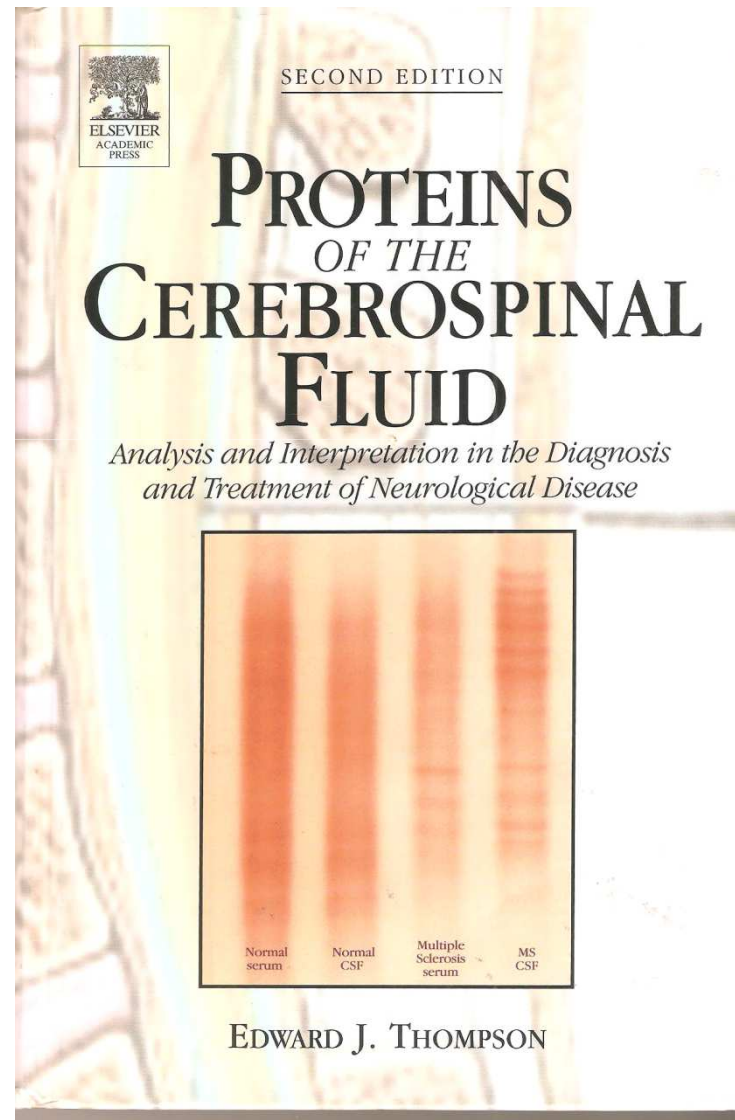
- Je vhodné aplikovat větší množství IgG než při detekci „celkového“ oligoklonálního IgG – u neuroinfekcí představují antigen-specifické IgG 10 – 20 % z celkového IgG, u polyspecifické „doprovodné“ odpovědi (např. MS) 0,1 – 0,5 % (Conrad *et al.* 1994, Jacobi *et al.* 2007)
- Ředění vzorků na 20 – 50 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':  
$$Q_{\text{lim}}\text{IgG} = \frac{\text{CSF} - \text{IgG}'}{S - \text{IgG}}$$
$$\text{CSF} - \text{IgG}' = Q_{\text{lim}}\text{IgG} \times S - \text{IgG}$$
- 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 denzit CSF a séra ředěných na stejnou koncentraci IgG
- Western blot a příbuzné techniky

# Vlastní postup I.

- 1. Potah membrány antigenem ředěným v 0.08 M TBS, pH 7.7 (koncentrace proteinu kolem 20 mg/l) – 4 až 16 hod.
- Promytí membrány v TBS (cca 5 min)
- 2. Blokování NC membrány – 3% BSA v TBS – 75 až 120 min
- 3. IEF na přístroji Multiphor II: 1,2 % agarosový gel, 6,2 % Pharmalyte 3-10 a 1,5 % Pharmalyte 8-10,5; mezielektrodová vzdálenost 8,5 cm; 200 V/cm, 1200 Vh (60-70 min), 10°C

## Vlastní postup II.

- Oplach membrány dH<sub>2</sub>O → promytí v TBS (10 min)
- 4. Afinity imunoblotting (45-50 min)
- Oplach membrány v PBS (2-3 min)
- 5. Inkubace membrány v roztoku 0,25% glutardialdehydu (15-20 min, 4°C)
- Oplach membrány dH<sub>2</sub>O → promytí v TBS (3 × 3-5 min)
- 6. Inkubace membrány v 0,3% BSA (10-20 min)
- Promytí membrány v TBS (3 min)
- 7. Inkubace se sekundární protilátkou (anti-IgG Fc/ALP) ředěnou 1/800 roztokem 0,3% BSA v TBS – 90 min

## Vlastní postup III.

- Promytí membrány v TBS (2 × 3 min), TBS-0,05% Tweenu 20 (2 × 5 min), TBS (2 × 3 min)
- 8. Detekce: BCIP/NBT kit (Vector Laboratories, kat. č. ) v temnotách (do dosažení optimálního zbarvení – cca 30 až 45 min)
- Promytí membrány v TBS (5 min) → oplach dH<sub>2</sub>O
- Osušení membrány → dosušení mezi 2 listy filtračního papíru (několik hodin nebo přes noc)
- Odečet



# 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)

<b>Specif. o-IgG</b>	<b>AMON (n=27)</b>	<b>RS (n=18)</b>
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 průušnic	6 (22 %)	6 (33 %)

# 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.

---

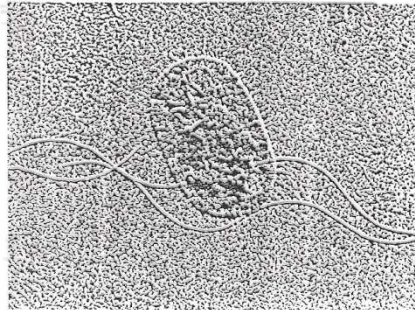
### SOMMARIO

*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).*

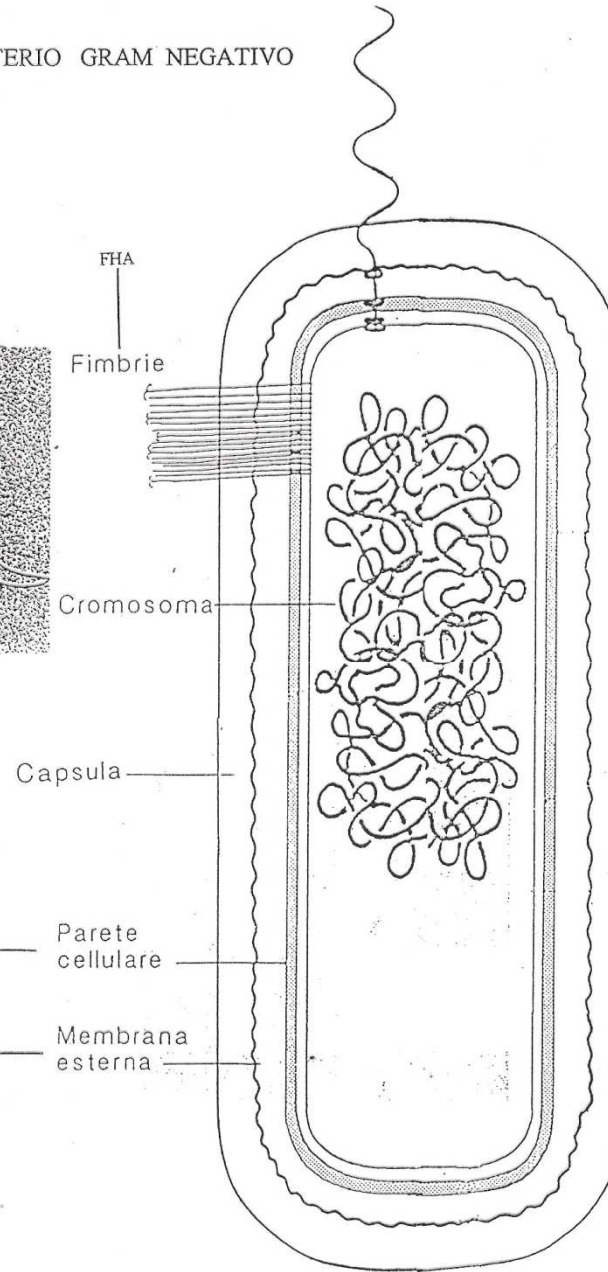
*I risultati ottenuti dimostrano che, nella SM:*

- 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 ...



BATTERIO GRAM NEGATIVO



(LPE)  
PT  
(tossina pertussica)  
LPP  
Lipopolisaccaride  
(LPS)

Lymphoecton  
Pseudog  
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:

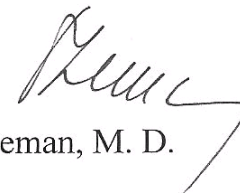
- a) 100 ml of CSF diluted 1:1 in 6.5 mM PBS, pH 7.3
- b) 300 ml of native CSF
- c) 500 ml of native CSF

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  $\mu$ kat/l; AST: 0,39  $\mu$ kat/l; KTD 10)
- CYTOLOGIE: Lymfocytární pleocytóza s aktivací v lymfocytární, méně i v monocytární řadě, se zřetelnou plazmocytární reakcí – cytol. nálezný 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 náleží
- 12/2007 ambulantně doplněno MRI a MRAG mozku: normální náleží

# 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 frustrní 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 intrathék. 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 (antiborrel. 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.

	<b>9/2007</b>	<b>8/2008</b>
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	<b>-20</b>	<b>+28</b>

# Kazuistika 1

## Dynamika likvorového nálezu II.

	9/2007	8/2008
Q-Alb*10 <sup>3</sup>	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)**  
*nahore: 1. vzorek (9/2007); dole: 2. vzorek (8/2008)*



# Kazuistika 2

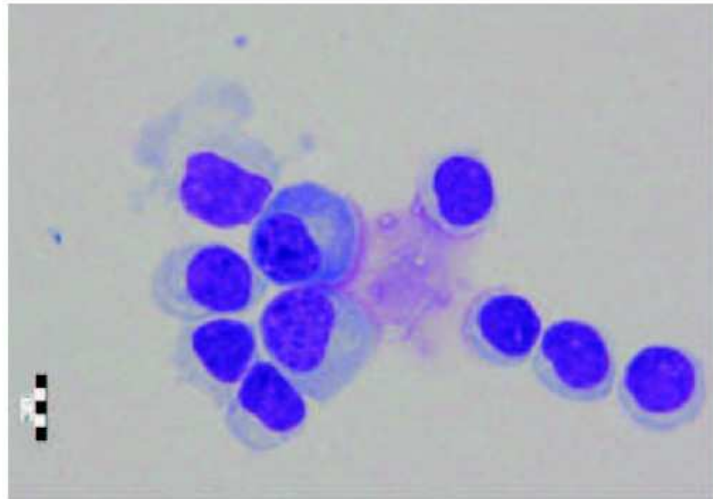
## Neuroborrelióza + MGUS

- Muž, 69 let
- Přijat pro polyradikulo-neuritický 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 $\kappa$
- Kontrolní elfo po 6 a 12 měsících: přetrvávající M-gradient (6,5 ... 7,7 g/l)



# Koincidence neuroborreliózy a MGUS

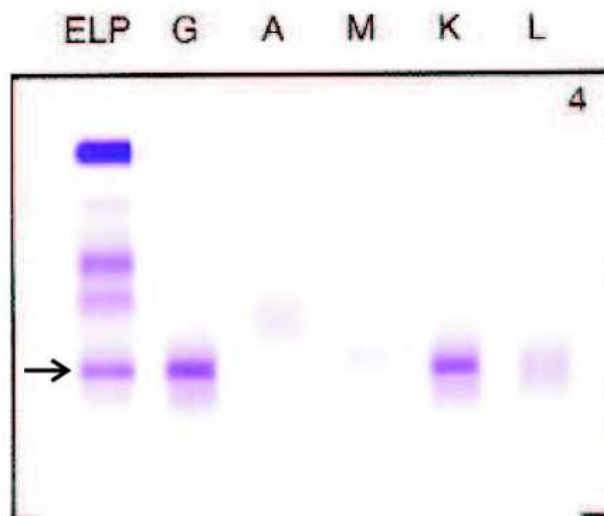
Zeman et al. *Fluids and Barriers of the CNS* 2012, 9:5



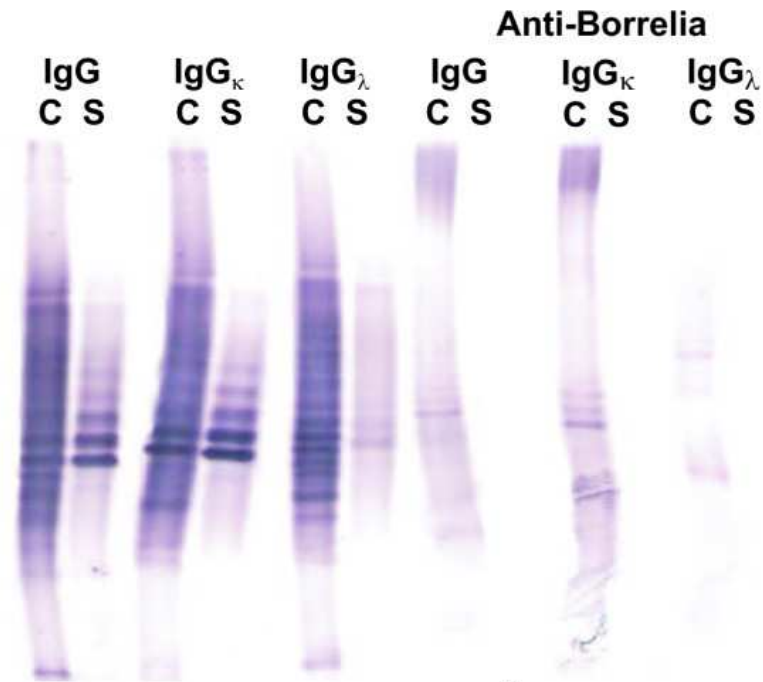
a



b



c

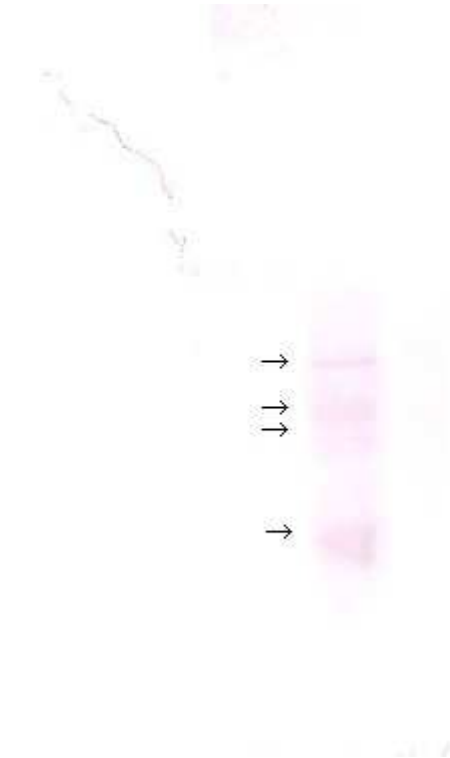
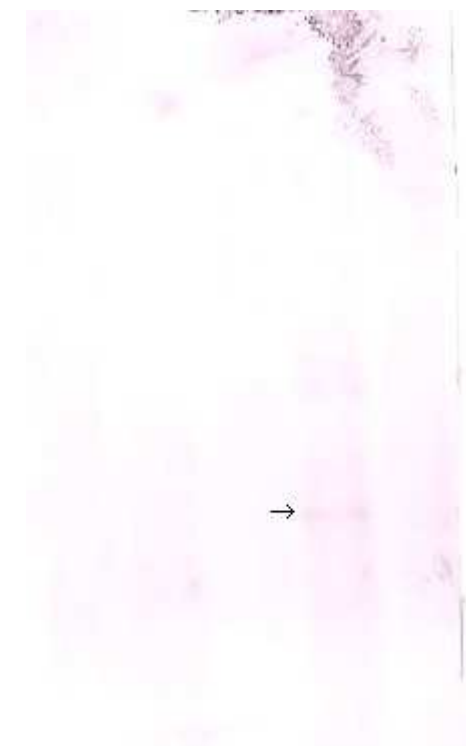


d

# Antiborreliové oligoklonální IgG , IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ :

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 (neprůkazný), C2 pozitivní !*

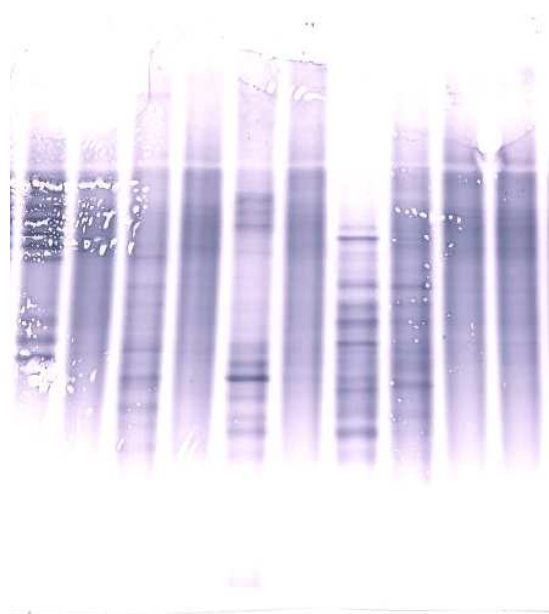
IgG					IgG $\kappa$					IgG $\lambda$				
IVIG	C1	S1	C2	S2	IVIG	C1	S1	C2	S2	IVIG	C1	S1	C2	S2



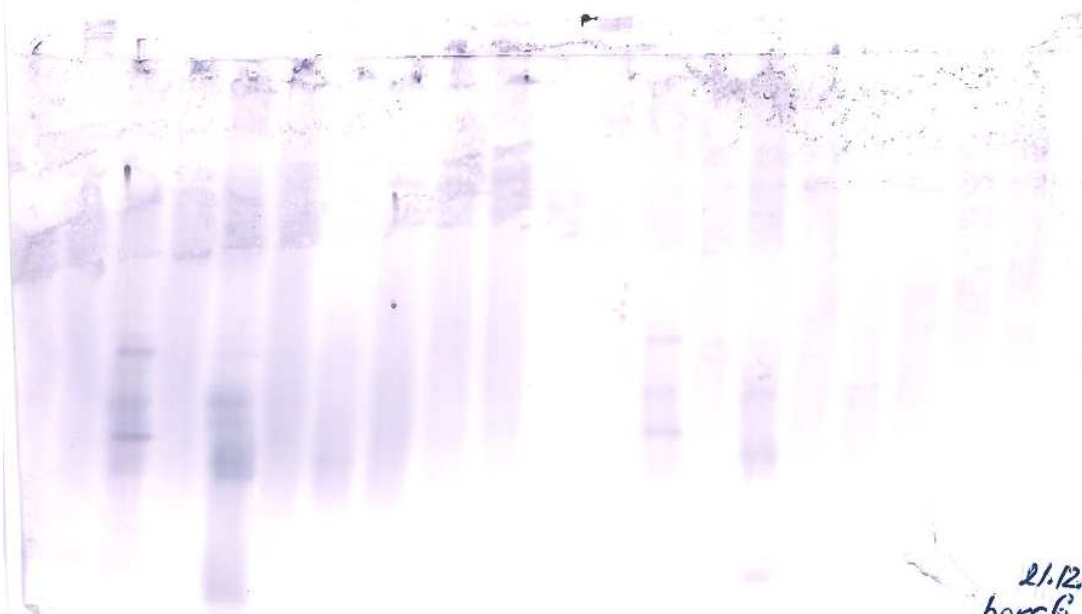
**Vlevo: oligoklonální IgG (IEF/AIB);  
vpravo: antiborrel. oligoklon.IgG (IEF/AIB)**

stejný gel, celkové o-IgG s ředěním vzorků na 2 mg/l IgG (12 ng/pozici) , antiborrel. o-IgG s ředěním vzorků na 20 a 10 mg/l IgG (120 a 60 ng/pozici). L=likvor, S=sérum  
+Co(S): pozit.kontrola (Sebia – směs IgG paraproteinů); F: neg.kontrola (IVIG-Flebogamma)  
L+S1-typická neuroborrelióza ; L+S2-nejasná dg., AI-IgG negativní (1,03); L+S3-roztroušená skleróza; L+S4-v.s. nehnisavá neuroinfekce, blíže neurčená  
Antiborrel.o-IgG pásy ve vzorku L1(očekáváno), ale i L2( interpretace nejasná); negativní ve vzorcích +Co(S), L3 i L4

+Co(S) F L S1 L2 S2 L3 S3 L4 S4  
24.9/10.12. 7.5/7.12. 6.6/13.12. 7.10/7.12.



⊕ 20 mg/l e  
+Co(S) F L1 S1 L2 S2 L3 S3 L4 S4 +Co(S) F 10 mg/l e  
Sebia F L1 S1 L2 S2 L3 S3 L4 S4 F



21.12.13  
borr G

# Klinicko-laboratorní korelace

- **L+S1: typický klinický obraz** (Bannwarthův syndrom)
- **Likvor:**
  - cytologie (preparát) – lymfo 95 %, plazmo 1 %, mono 4 %, neutr.<1 %, eos:1/prep.<<1 %, zcela ojed. ery; závěr: lymfocytární pleocytóza s plazmocytární reakcí – obraz floridního nehnisavého zánětu
  - Q-Alb  $21,7 \times 10^{-3}$  (3,3-násobek horní hranice věkové normy), ith. syntéza IgM (88 %) a IgA (16 %) výpočtem, o-IgG: typ 2 (14/0), o-fKLC +++ (25/0), o-fLLC ++ (11/0)
  - *Borrelia* AI: IgG 15,53  
IgM 21,60
- Protilátky v séru v relativně nízkých koncentracích (IgG 13737 arb. j., IgM 3460 arb.j.)
- **L+S2: atypický klinický obraz** (porucha visu na pravém oku, edém papily zrakového nervu vpravo)
- **Likvor:**
  - cytologie (preparát) – lymfo 91 %, plazmo 3 %, mono 6 %; dosti četné ery, jaderné buňky se však jeví poněkud četnější než by odpovídalo množství ery; preparát z technických důvodů hůře hodnotitelný, pravděpodobně však mírné nehnisavě-zánětl. změny
  - Q-Alb  $3,48 \times 10^{-3}$ , ith. syntéza IgG (51 %), IgM (48 %), IgA (24 %), o-IgG: typ 2 (21/1), o-fKLC +++ (32/0), o-fLLC +++ (15/0)
  - MRZH reakce: hraniční anti-VZV AI (1,40), ostatní negativní
  - *Borrelia* AI: IgG 1,03  
IgM negativní
- Séropozitivita IgG (ZÚ Ostrava; u nás 27261 arb. j. /IgM 4046 arb.j.)
- MR mozku opakovaně negativní, screening autoprotištěk negativní, MRA a DSA negativní

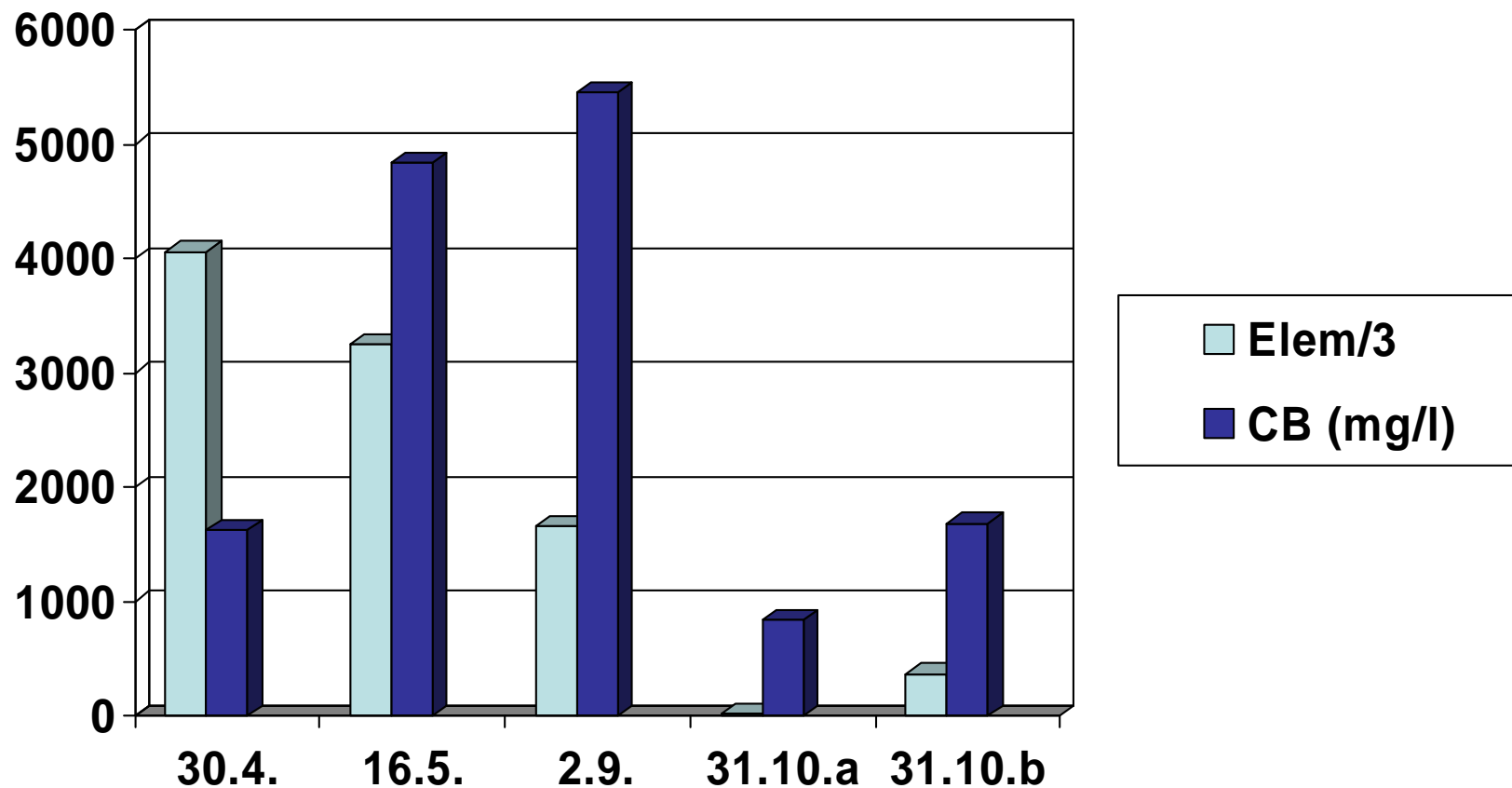
# **Pravděpodobná encefalitis způsobená virem Coxsackie B4**

# Klinicko-laboratorní korelace

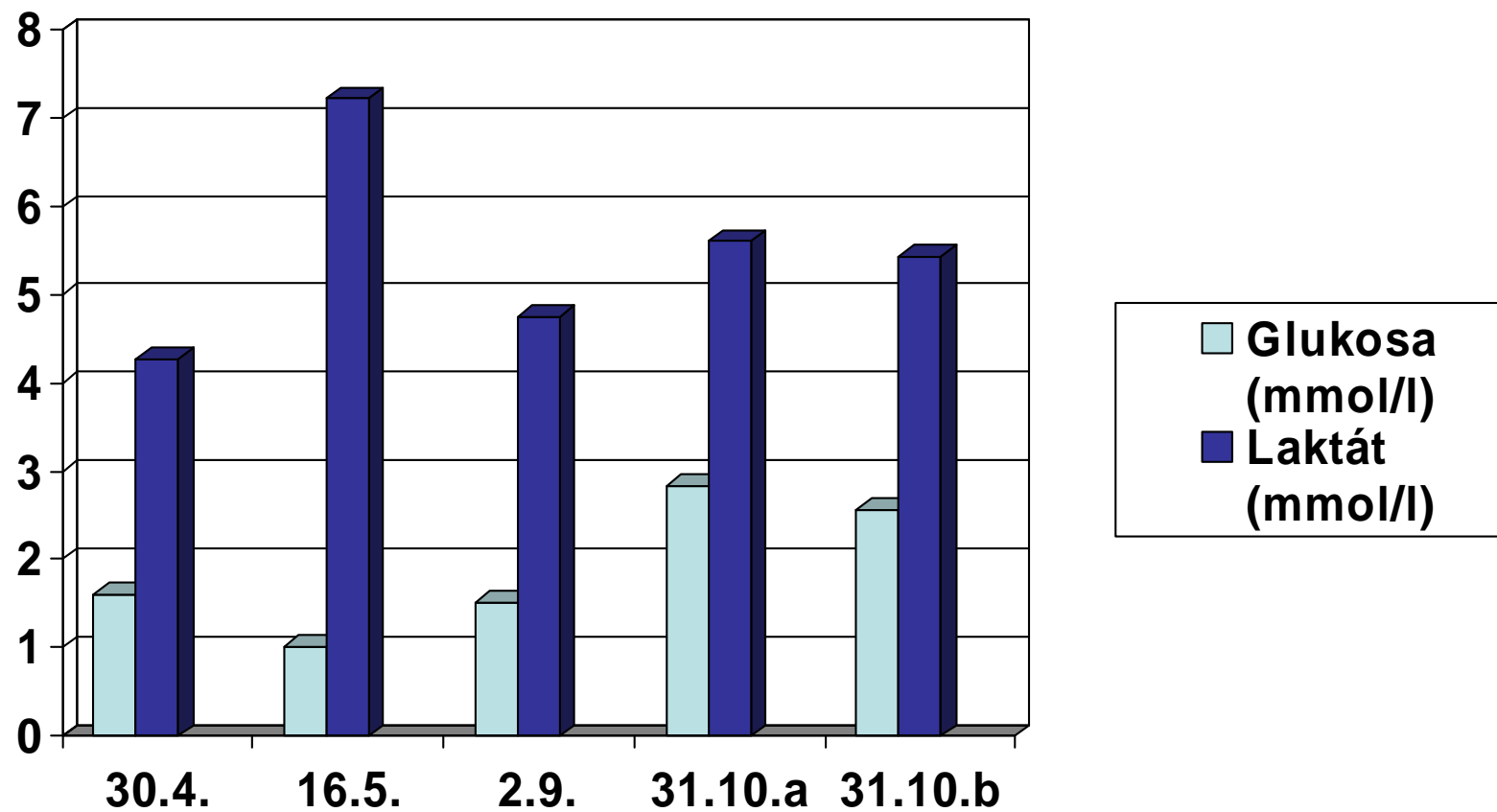
- Mladý muž od 1/2013 zvýšené teploty (38°C), bolesti hlavy
- Po několika měsících přijat na spádové neurologické oddělení pro manželkou pozorované změny osobnosti
- Likvor (1. vyšetření): zkalený, záplava buněk, CB 3,34 g/l, „nízká glukosa“ (ALE: S-CRP „0,1 mg/l“)
- Pro podezření na purulentní meningitidu přeložen na KIL FNO
- Extenzivně vyšetřován, možný odontogenní fokus
- MR mozku: rozsáhlé demyelinizační změny, podezření na RS
- Etiologicky nakonec uzavíráno jako encefalitis způsobená Coxsackie B4 (vzestup titru sérových protilátek ve VNT, ELMI malé kulaté viry v likvoru) s možným spolupodílem neuroborreliózy (fragmenty spirochet v ELMI)
- Klinicky zcela upraven; před plánovanou dimisí rozvoj zmatenosti, agresivity, CT a MR prokázalo čtyřkomorový hydrocefalus – řešeno shuntem, průběh komplikovaný, trvalé následky – organický psychosyndrom

# Dynamika likvorového nálezu – I.

*ALE pozor – u vzorků z 31. 10. jde o komorový likvor!*

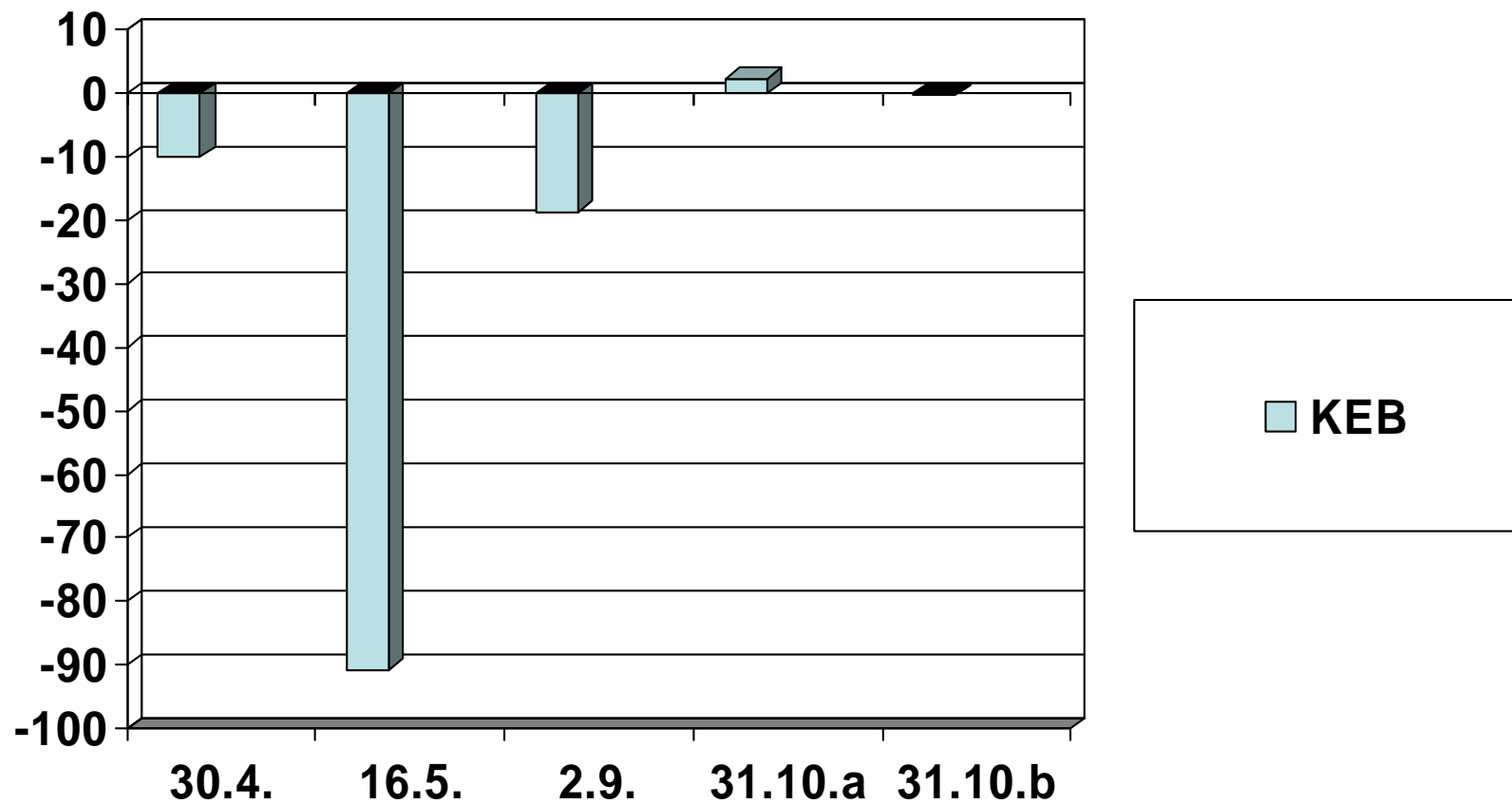


## Dynamika likvorového nálezu – II.





## Dynamika likvorového nálezu – III.

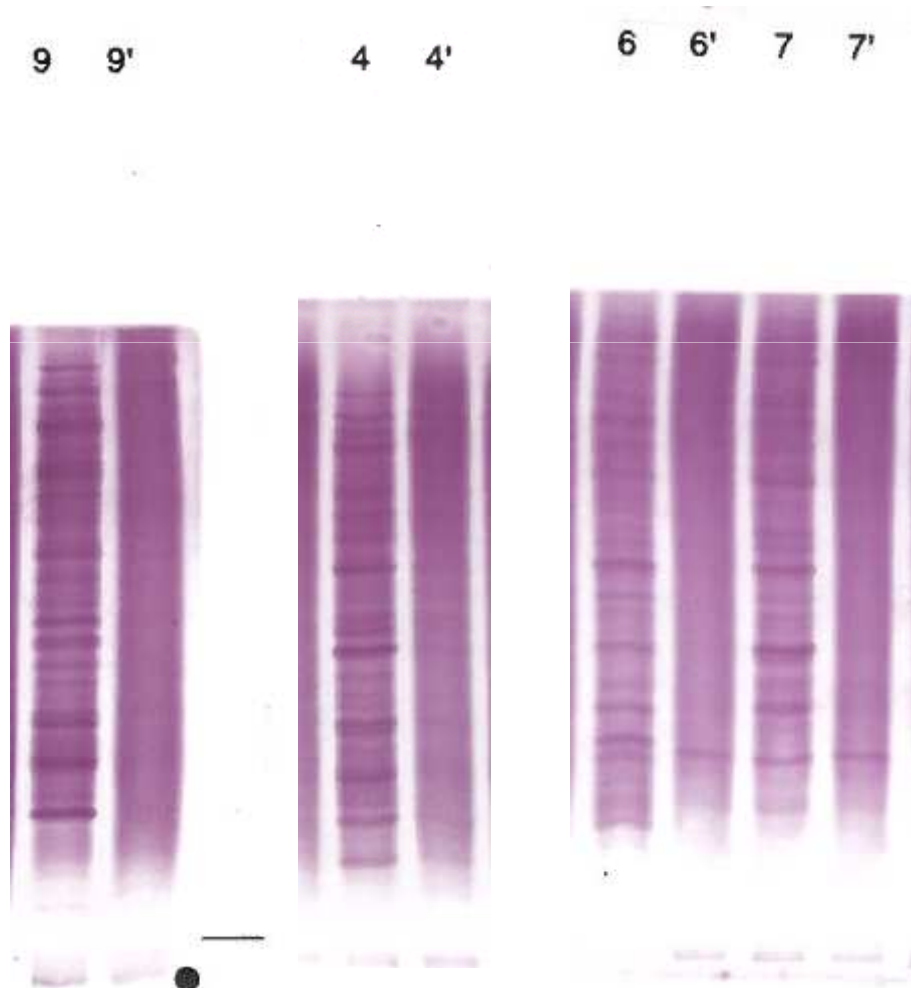


# Dynamika likvorového nálezu

- Imunochemicky likvor vyšetřen třikrát (resp. čtyřikrát – poslední odběr dvou vzorků komorového CSF):
  - **30. 4.:** Q-Alb  $20,69 \times 10^{-3}$  (3,2-násobek horní hranice věkové normy), ith. syntéza IgG (61 %) a IgA (58 %) výpočtem, o-IgG: typ 2 (22/0), MRZ reakce negativní
  - **2. 9.:** Q-Alb  $74,92 \times 10^{-3}$  (11,7-násobek horní hranice věkové normy), ith. syntéza IgG (67 %) a IgA (44 %) výpočtem, o-IgG: typ 3 (22/11; 7 z 11 pásů v séru je v likvoru výraznějších; pozice pásů v likvoru „prakticky shodně“ s min. vyš.)
  - **31. 10.:** Q-Alb 13,68 a  $29,70 \times 10^{-3}$  (5,3-, resp. 11,6-násobek horní hranice věkové normy), ith. syntéza IgG (63 a 60 %) a IgA (42 a 42 %), o-IgG: typ 2 (21/1 a 20/1 – „proti minulým vyšetřením se mění spíše relativní intenzity pásů než jejich polohy“)
  - **7. 11.** dožádáno neurochirurgem stanovení borrel. AI z obou komor (!) s negativními výsledky (IgG-AI 1,02 a 1,08; IgM-AI 0,84 a 1,00; v séru Ab v běžném ředění pod mezí stanovitelnosti  $\Rightarrow$  vyšetřeno v nestandardně nižším ředění /101 $\times$  namísto 404  $\times$ /)

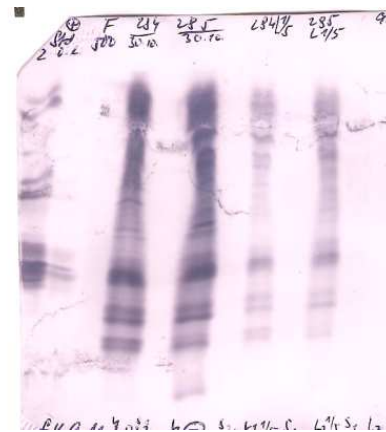
# Pravděpodobná encefalitis způsobená virem Coxsackie B4

dynamika o-IgG: zleva doprava 30. 4., 2. 9. a dva vzorky z 31. 10.



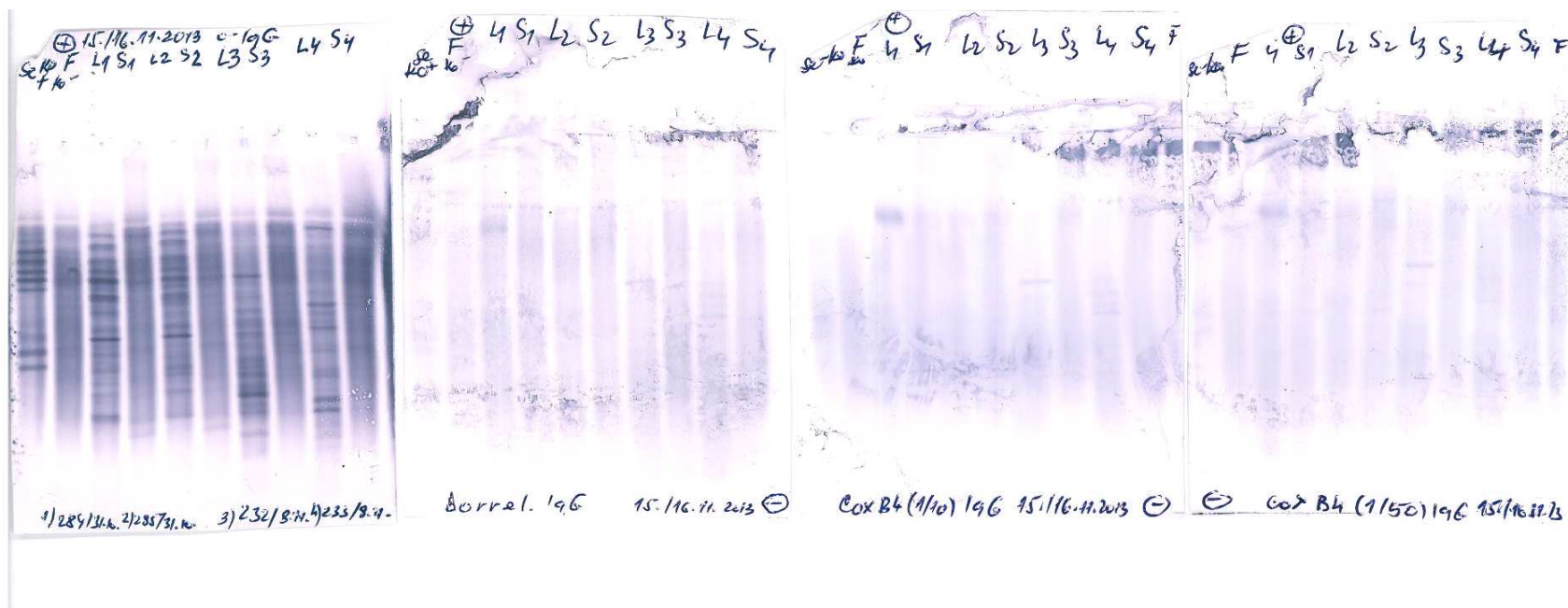
Hodnocení:

1. vzorek: typ 2 (22/0)
2. vzorek: typ 3 (22/11)
3. vzorek: typ 2 (21/1 a 20/1),  
výrazně pozitivní o-fLC  
obou typů (+++)



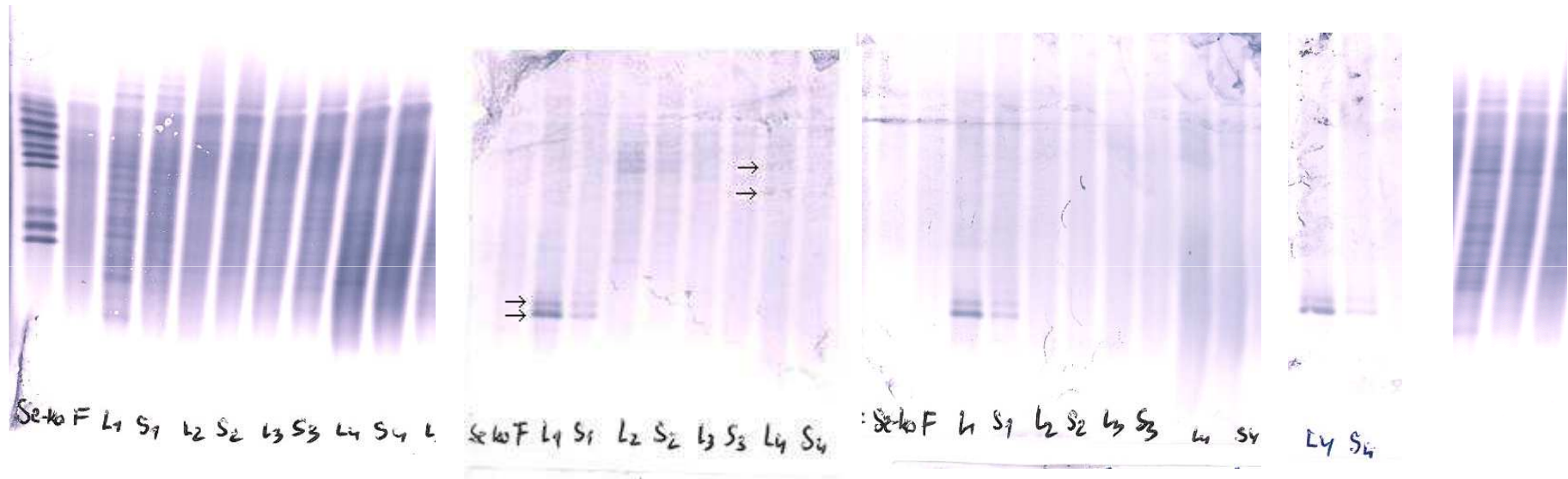
# Pravděpodobná encefalitis způsobená virem Coxsackie B4

Nepodařilo se nám prokázat přesvědčivou reaktivitu o-IgG  
pásů s antigeny borrelií ani viru Coxsackie B4



# 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 nových kritérií) 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  $12,54 \times 10^{-3}$  (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.

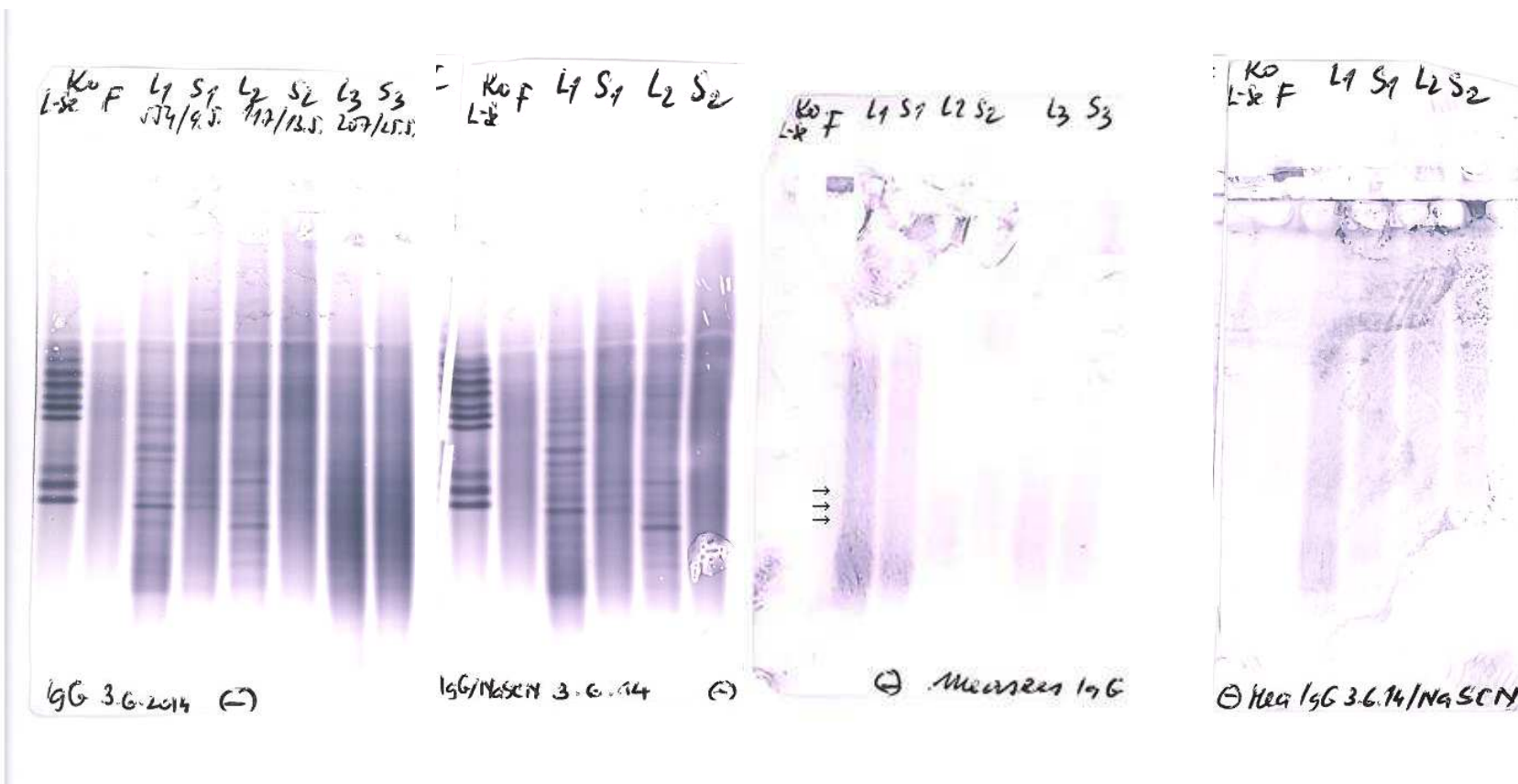
- U imunokompetentních, neléčených jedinců může přítomnost nízké avidních IgG protilátek svědčit pro recentní infekci – během časně imunitní odpovědi jsou IgG protilátky cílené proti mnoha epitopům patogenu a mají nízkou aviditu → klonální selekce → vznik vysoce avidních IgG protilátek proti omezenému 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 ⇒ 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)

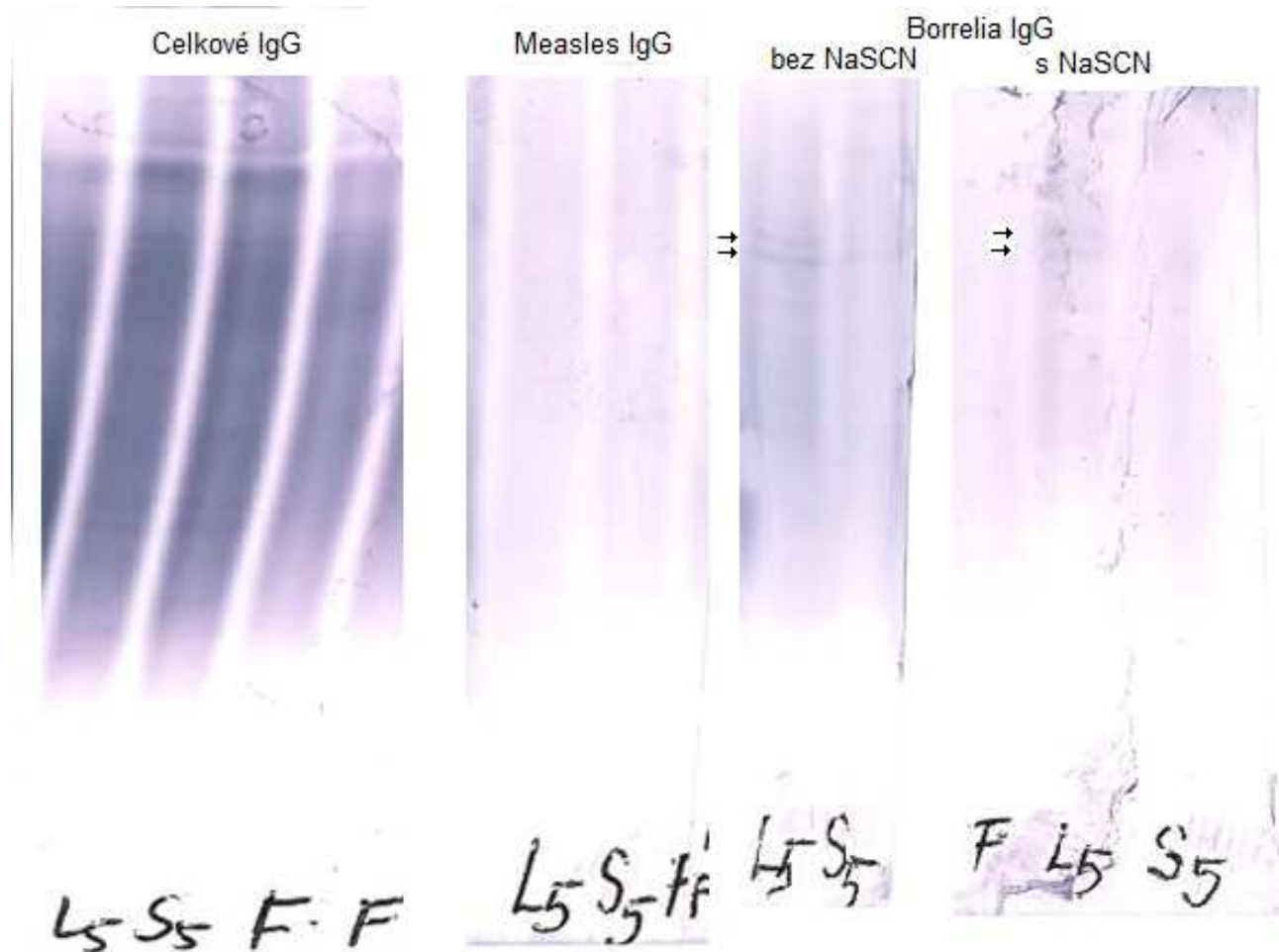
2-3 velmi slabé anti-measles o-IgG pásy v likvorech L1 a L2, nepřítomné na membráně inkubované s 1M NaSCN (v dH<sub>2</sub>O)





# 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 dH<sub>2</sub>O) 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 za předpokladu vzájemné důvěry a dobré spolupráce klinického a laboratorního pracoviště; výsledek je nutno vždy hodnotit velmi opatrně
- 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 100 mg/l*)
- **Luminiscenční detekce** – citlivější než klasická chromogenní (*problém: přístroje a software jsou velmi drahé*)

# 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



# PODĚKOVÁNÍ

**... za pomoc, spolupráci, inspirující diskuse aj.**

- Kolegům z Neurologické kliniky FNO
- Laborantkám Úseku analýzy likvoru ÚLD FNO
- Mgr. M. Pomiklové, Mgr. I. Vidličkové, MUDr. H. Zelené a Mgr. H. Bílkové-Fránkové ze ZÚ v Ostravě
- MUDr. L. Petroušové z Kliniky infekčního lékařství FNO
- MUDr. V. Procházkovi a RNDr. K. Vítkové z útvaru pro vědu a výzkum FNO
- MUDr. J. Volfovi, Ph.D., odd. preventivního a pracovního lékařství FNO
- Doc. RNDr. K. Šafarčíkovi, Ph.D., Katedra biomedicínských oborů LF OSU a ÚLD FNO
- Mgr. R. Šigutové, ÚLD FNO

Děkuji za pozornost

