

Intratekální syntéza specifických antivirových protilátek u atakovitého a primárně chronicko-progresivního průběhu roztroušené sklerózy

MUDr. Jana Bednářová, Ph.D.¹, doc. MUDr. Pavel Štourač, Ph.D.²

¹Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno

²Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Brno

U roztroušené sklerózy mozkomíšní rozlišujeme atakovitý nebo primárně chronicko-progresivní průběh. Oba typy průběhu se liší patogenezi, imunologií, terapeutickou odpovědí a prognózou. Dosud není k dispozici laboratorní diagnostický marker pro rozlišení obou podjednotek onemocnění. Cílem práce bylo vyšetřit intratekální syntézu specifických IgG protilátek proti neurotropním virům spalniček, zarděnek a planých neštovic (MRZ reakce) u atakovitého a primárně chronicko-progresivního průběhu a stanovit její diferenciálně diagnostický význam. Vyšetřili jsme soubor 35 pacientů (n=35). Intratekální syntéza specifických protilátek byla vyjádřena protilátkovým indexem dle Reiberova vzorce. MRZ reakce byla pozitivní u 14/25 pacientů s atakovitým průběhem a u 2/10 pacientů s primárně chronicko-progresivním průběhem roztroušené sklerózy se senzitivitou 56 %, resp. 20 %. Rozdíl v pozitivitě MRZ reakce u obou průběhů podporuje hypotézu o odlišné patogenезi a MRZ reakci lze použít jako doplňkový diferenciálně diagnostický marker.

Klíčová slova: roztroušená skleróza mozkomíšní, atakovitě-remitentní průběh, primárně chronicko-progresivní průběh, intratekální syntéza, MRZ reakce.

Intrathecal synthesis of specific antiviral antibodies in relapsing-remitting and primary chronic progressive courses of multiple sclerosis

The relapsing-remitting and primary chronic progressive courses are distinguished in cerebrospinal multiple sclerosis. Both these types differ in the pathogenesis, immunology, therapeutic response, and prognosis. No laboratory diagnostic marker to distinguish these two disease subentities has been available to date. Our aim was to assess the intrathecal synthesis of specific IgG antibodies against the neurotropic measles, rubella, and herpes zoster viruses (the MRZ reaction) in the relapsing-remitting course and primary chronic progressive course and to establish its differential diagnostic significance. A cohort of 35 patients (n = 35) was investigated. The intrathecal synthesis of specific antibodies was expressed by the antibody index using Reiber's formula. The MRZ reaction was positive in 14 out of 25 patients with the relapsing-remitting course and in 2 out of 10 patients with the primary chronic progressive course of multiple sclerosis with sensitivities of 56 % and 20 %, respectively. The difference in the positivity of the MRZ reaction in both the courses supports the hypothesis of different pathogeneses, suggesting that the MRZ reaction may be used as a complementary marker in differential diagnosis.

Key words: cerebrospinal multiple sclerosis, relapsing-remitting course, primary chronic progressive course, intrathecal synthesis, MRZ reaction.

Neurol. pro praxi 2009; 10(5): 297–299

Seznam zkratk

SM – sclerosis multiplex
MRI – magnetická rezonance
CNS – centrální nervový systém
M – virus spalniček
R – virus zarděnek
TMB – tetrametylbenzidin
Z – vir planých neštovic
AU – virus arbitrary units
Q alb – albuminový kvocient
HSV – herpes simplex virus

Úvod

Roztroušená skleróza mozkomíšní (sclerosis multiplex, SM) je chronické zánětlivé demyelinizační onemocnění s předpokládaným autoimunitním původem postihující převážně mladé dospělé. U atakovitého průběhu dochází k lézím

funkčních systémů, tzv. atakám, u méně častého primárně chronicko-progresivního průběhu dysfunkce nervového systému narůstá kontinuálně bez projevů remisí. Ženy jsou postiženy častěji než muži, což je jev známý i u jiných autoimunitních onemocnění (autoimunitní tyreopatie, systémový lupus erythematosus). Etiologie roztroušené sklerózy zůstává stále neobjasněna. Za účelem poznání etiologie byly zkoumány faktory genetické, imunologické a vlivy životního prostředí. Značná pozornost byla věnována infekčním agens jako možným spouštěcím faktorům v rozvoji roztroušené sklerózy. Obecně je roztroušená skleróza považována za onemocnění s rozhodující imunitní složkou v patogenезe, kde je autoimunitní reakce vůči myelinovým proteinům spouštěna jedním nebo více exogenními agens u geneticky vnímavého jedince.

Původní McDonaldova diagnostická kritéria pro roztroušenou sklerózu z roku 2001 byla v roce 2005 doplněna a rozšířena (Polman et al., 2005). Diagnostický algoritmus vycházející z neurologické anamnézy, klinického vyšetření a paraklinických laboratorních vyšetřovacích metod byl doplněn o nálezy na magnetické rezonanci (MRI) se zaměřením na stanovení diseminace lézí v prostoru a čase. Nedílnou součástí laboratorních vyšetřovacích metod je vyšetření mozkomíšního moku (likvor, CSF). Přítomnost oligoklonálních IgG pásů v mozkomíšním moku a zvýšený index IgG podporují diagnózu roztroušené sklerózy. Tyto nálezy však nejsou specifické a mohou být detekovány i u pacientů s jiným postižením nervového systému, např. infekční etiologie (Anderson et al., 1994; Link, Tibblin 1977; Freedman et al., 2005). Intratekální

syntéza specifických IgG protilátek proti viru spalniček (morbilli – M), zarděnek (rubeola – R) a viru planých neštovic (varicella zoster – Z) označovaná jako MRZ reakce má vyšší specifitu a její pozitivita podporuje diagnózu chronického autoimunitního onemocnění s postižením CNS, především sclerosis multiplex (Graef, Henze, Reiber, 1994). Asi 84–94 % pacientů s roztroušenou sklerózou má pozitivní kombinovanou MRZ reakci, tj. protilátkovou syntézu proti jednomu, dvěma nebo třem z uvedených virů. Kombinace positivity těchto protilátek prakticky vylučují jiné, tzn. akutní infekční onemocnění, a jsou důkazem přítomnosti chronického autoimunitního onemocnění nervového systému. U jiných neurologických onemocnění, např. u neuroborreliózy, neurosyfilis nebo neurotuberkulózy, je frekvence výskytu kombinované MRZ reakce nižší než 0,1 % (Tumani, Noelker, Reiber, 1995).

V literatuře bylo popsáno srovnání positivity MRZ reakce u souboru pacientů s roztroušenou sklerózou a jinými neurologickými onemocněními (Bednářová, Štourač, Krbková, 2005). Dosud nebyla sledována pozitivita intratekální syntézy specifických protilátek a její diferenciální diagnostický význam u atakovitého a primárně chronicko-progresivního průběhu roztroušené sklerózy, i přes předpokládané rozdíly v patogenetice obou forem. Předpokládá se, že podstatou atakovitého průběhu je zánětlivá demyelinizace, zatímco chronicko-progresivní průběh má převládající neurodegenerativní složku a menší zánětlivý podíl.

Cílem předložené práce bylo stanovit pozitivitu MRZ reakce u souboru pacientů s atakovitým a primárně chronicko-progresivním průběhem roztroušené sklerózy a vyhodnotit její diferenciálně diagnostický potenciál pro oba průběhy.

Materiál a metodika

V serologické laboratoři Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Brno jsme vyšetřili 35 dvojic sér a likvorů na přítomnost intratekální syntézy specifických IgG protilátek proti virům spalniček, zarděnek a planých neštovic. Z celkového souboru 35 pacientů mělo 25 pacientů atakovitý průběh a 10 pacientů chronicko-progresivní průběh roztroušené sklerózy. Diagnóza roztroušené sklerózy byla stanovena na základě diagnostických kritérií publikovaných v Ann Neurol 2005; 58: 840: 846 (Polman et al., 2005).

Současně odebrané vzorky sér a likvorů byly ihned zpracovány nebo zamrazeny a uchovány při -20 °C.

Specifické IgG protilátky proti viru spalniček, zarděnek a planých neštovic (VZV) byly

stanoveny pomocí komerční soupravy firmy Human, Germany (Measles-Virus Human ELISA IgG Antibody Test, Rubella-Virus Human ELISA IgG Antibody Test, Varicella – Zoster-Virus Human ELISA IgG Antibody Test). Pro detekci protilátek byly použity purifikované antigeny viru spalniček, zarděnek a VZV získané metodou buněčných kultur. Značenou protilátkou byla ve všech případech králičí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgG konjugovaná s peroxidázou. Po napipetování pozitivního, negativního, cut-off kontrolního séra a vyšetřovaných vzorků sér a likvorů se destička inkubuje 30 minut při pokojové teplotě, následuje 4x promytí pufovaným promývacím roztokem, přidání konjugátu a opět inkubace 30 minut při pokojové teplotě. Poté následuje 5x promytí, do jamek se přidá substrát s TMB a vzorky se inkubují 15 minut v temnu. Reakce se zastaví přidáním zastavovacího roztoku. Pozitivita se projevuje žlutým zbarvením, jehož intenzita se měří fotometricky při vlnové délce 450 nm.

Pro výpočet intratekální syntézy specifických IgG protilátek bylo nutno absolutní hodnoty absorbancí sér a likvorů převést na jednotky AU (arbitrary units) podle logaritmického grafu dle Reibera. K sestrojení grafu slouží hodnoty absorbancí ředěného standardního séra v rozmezí 0,05–2,0, kde nejvyšší hodnota absorbance je definována jako 100 AU. Intratekální syntéza specifických IgG protilátek byla stanovena výpočtem protilátkového indexu (antibody index, AI): $AI = Q_{spec}/Q_{IgG}$, kde Q_{spec} je poměr specifických IgG protilátek v likvoru a séru, Q_{IgG} je poměr celkových IgG protilátek v likvoru a séru. Q_{IgG} je matematicky vyjádřen hyperbolickou závislostí. Limitní hodnota této hyperbolické závislosti Q_{lim} je pro třídu IgG určena rovnicí $Q_{lim} = 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + (6 \times 10^{-9})} - 1,7 \times 10^{-3}$. V případě, že $Q_{IgG} > Q_{lim}$, je nutno upravit výpočet AI následovně: $AI = Q_{spec}/Q_{lim}$. Hodnoty $AI > 1,4$ indikují intratekální syntézu specifických protilátek (Reiber, Lange, 1991). Koncentrace albuminu a celkových IgG protilátek v séru a likvoru nutné pro výpočet intratekální syntézy byly stanoveny nefelometricky analyzátozem Beckman Coulter Immage. Poměr koncentrace

albuminu v likvoru a séru vyjadřuje tzv. albuminový kvocient (Q_{alb}).

Výsledky

MRZ reakce byla pozitivní u 14 z 25 pacientů (56 %) s atakovitým průběhem roztroušené sklerózy. Pozitivní intratekální syntéza protilátek proti viru spalniček byla přítomna u 8 pacientů, proti viru zarděnek u 6 pacientů a proti VZV u 6 pacientů. U 6 pacientů byla přítomna pozitivní intratekální syntéza protilátek proti dvěma agens: M + R u 2 pacientů, M + Z u 2 pacientů a R + Z také u 2 pacientů. Hodnoty AI byly v rozmezí 1,5–11,0.

V souboru pacientů s primárně chronicko-progresivním průběhem roztroušené sklerózy byla MRZ reakce pozitivní pouze u 2 z 10 pacientů (20 %). Oba pacienti měli pozitivní intratekální syntézu protilátek proti viru spalniček s AI = 1,6, resp. 2,1. Výsledky pozitivní intratekální syntézy pro oba průběhy roztroušené sklerózy jsou shrnuty v tabulce 1.

Rozdíl v pozitivitě MRZ reakce mezi soubory pacientů byl statisticky významný. Senzitivita MRZ reakce byla 56 % u atakovitého průběhu a 20 % u primárně chronicko-progresivního průběhu.

Diskuze

Intratekální syntéza specifických protilátek proti jednomu, dvěma nebo třem virům ze skupiny neurotropních virů spalniček (M), zarděnek (R) a VZV (Z) označovaná jako MRZ reakce je přítomna u 84–94 % pacientů s roztroušenou sklerózou (Felgenhauer, Reiber, 1992). Frekvence a hodnota protilátkového indexu koreluje se vzrůstající syntézou celkového IgG (Reiber, Ungefehr, Jacobi, 1998). Kombinace M + R, M + Z nebo R + Z, které se prakticky nevyskytují u jiných zánětlivých onemocnění, jsou známkou přítomnosti chronického, autoimunitního onemocnění na rozdíl od oligoklonálních IgG pásů (IgG-OP), které se vyskytují u zánětlivých procesů nervového systému různé etiologie včetně infekční. Dalším rozdílem mezi uvedenými parametry (MRZ a IgG-OP) je přítomnost MRZ reakce již při první atace autoimunitního

Tabulka 1. Frekvence pozitivní intratekální syntézy u pacientů s atakovitým a chronicko-progresivním průběhem roztroušené sklerózy

	Atakovitý průběh Frekvence (%)	Chronicko-progresivní průběh Frekvence (%)
Morbilli (M)	32	20
Rubeola (R)	24	0
Varicella zoster (Z)	24	0
M, R, Z (a/nebo)	56	20

onemocnění, zatímco pozitivita IgG-OP narůstá s průběhem onemocnění a často citovaná senzitivita 90–95 % je přítomna až při plně rozvinutém zánětlivém procesu, v případě pacientů s roztroušenou sklerózou po dvou a více atakách. V naší vyšetřené souboru (n=35) byly oligoklonální IgG pásy přítomny v likvoru u 91 % pacientů. U jiných neurologických onemocnění se MRZ reakce vyskytuje méně než v 1 % jako přítomnost intratekální syntézy protilátek proti jednotlivým virům a méně než v 0,1 % jako kombinovaná intratekální syntéza M + R + Z s výjimkou velmi vzácných případů chronického průběhu onemocnění (Reiber, Peter 2001; Tumani, Noelker, Reiber, 1995).

Kromě MRZ reakce byla rovněž popsána přítomnost intratekální syntézy protilátek proti viru herpes simplex (HSV), *Toxoplasma gondii* a anti-dsDNA protilátek jako součást oligoklonální, polyspecifické imunitní intratekální reakce u pacientů s roztroušenou sklerózou. Frekvence positivity intratekální syntézy proti těmto agens je nižší než v případě MRZ reakce: intratekální protilátky proti HSV se vyskytují u 28 % pacientů s roztroušenou sklerózou, intratekální protilátky proti *Toxoplasma gondii* u 10 % pacientů a intratekální syntéza auto-protilátek proti dsDNA rovněž u 10 % pacientů s roztroušenou sklerózou (Reiber, Ungefehr, Jacobi, 1998).

V našem souboru pacientů jsme detekovali pozitivní MRZ reakci u 56 % pacientů s atakovitým průběhem a u 20 % pacientů s primárně chronicko-progresivním průběhem roztroušené sklerózy. Signifikantně nižší pozitivita MRZ reakce u pacientů s chronicko-progresivním průběhem onemocnění může podpořit hypotézu o odlišné patogenезi a prognóze obou průběhů roztrou-

šené sklerózy. V literatuře je popsána lepší prognóza u pacientů s negativními oligoklonálními IgG pásy (Zeman, Kidd, McLean, 1996). Práce autorů (Annunziata et al., 2006) zahrnovala 10 % pacientů léčených interferonem – beta s negativními IgG-OP, což výše uvedený závěr poněkud relativizuje. Nižší pozitivita MRZ reakce u primárně chronicko-progresivního průběhu v našem souboru pacientů může být odrazem méně vyjádřené zánětlivé složky onemocnění.

Závěr

Negativní MRZ reakce nevylučuje možnost diagnózy roztroušené sklerózy mozkomíšní. Je častější u primárně chronicko-progresivního průběhu. Signifikantní rozdíl v prevalenci MRZ reakce mezi atakovitým a chronicko-progresivním průběhem roztroušené sklerózy lze využít jako doplňkový diferenciativně diagnostický marker. Uvedené vyšetření nenahrazuje stanovení oligoklonálních IgG pásů.

Literatura

1. Anderson M, Alvarez-Cermenio J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen S, Gallo P, Grimaldi LM, Gronning M. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1994; 57: 897–902.
2. Annunziata P, Giorgio A, De Santi L, Zipoli V, Portaccio E, Amato MP, Clerici R, Scarpini E, Moscato G, Iudice A, Vacca G, Orefice G, Morra VB, Maimone D. Absence of cerebrospinal fluid bands is associated with delayed progression in relapsing-remitting MS patients treated with interferon – beta. *J Neurol Sci* 2006; 244: 97–102.
3. Bednářová J, Štourač P, Krbková L. The diagnostic significance of intrathecal occurrence of selected antiviral antibodies in multiple sclerosis. *Scripta Medica* 2005; 78(4): 249–254.
4. Felgenhauer K, Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Invest* 1992; 70: 28–37.
5. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic

CJ, Sellebjerg F, Tourtellotte WW. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2005; 865–870.

6. Graef IT, Henze T, Reiber H. Polyspezifische Immunreaktion in ZNS bei Autoimmunerkrankung mit ZNS Beteiligung. *Zeitschrift für Arztl Fortbildung* 1994; 88: 587–591.

7. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders III. Validation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scan J Clin Lab Invest* 1977; 37: 397–401.

8. Polman CH, Reingold S, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin F, Metz L, McFarland H, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson A, Weinshenker B, Wolinsky J. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the „McDonald Criteria“. *Ann Neurol* 2005; 58: 840–846.

9. Reiber H, Lange P. Quantification of virus specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clinical Chemistry* 1991; 37: 1153–1160.

10. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease – related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 2: 101–122.

11. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998; 4: 111–117.

12. Tumani H, Noelker G, Reiber H. Relevance of cerebrospinal fluid variables for early diagnosis of neuroborreliosis. *Neurology* 1995; 45: 1663–1670.

13. Zeman AJ, Kidd J, McLean BN. A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1996; 60: 27–30.

MUDr. Jana Bednářová, Ph.D.
Oddělení klinické mikrobiologie,
Fakultní nemocnice Brno
Jihlavská 20, 625 00 Brno
bednarovaj@fnbrno.cz

