

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA STANIČ

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA STANIČ

**LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA KLOPNEGA
MENINGOENCEFALITISA**

**LABORATORY DIAGNOSTIC OF TICK-BORNE
ENCEPHALITIS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem oddelku za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, in sicer v Laboratoriju za analitiko specialnih telesnih tekočin, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokemije in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biol., spec. med. biokemije.

Svojo zahvalo namenjam ljudem, ki so s svojim sodelovanjem neposredno ali posredno pripomogli k nastanku pričujočega dela.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokemije in somentorici mag. Elizabeti Božnar Alič, univ. dipl. biol., spec. med. biokemije za kritično presojo in pregled dela. S svojim znanjem, izkušnjami in svetovanjem sta me usmerjala pri izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala pa velja še domačim, ki so mi omogočili študij in me potrpežljivo podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo opravila samostojno, in sicer pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokemije in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biol., spec. med. biokemije.

Tina Stanič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Albin Kristl

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar

Somentorica: mag. Elizabeta Božnar Alič

Član: asist. Nejc Horvat, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	MOŽGANI	1
1.1.1	Veliki možgani	1
1.1.2	Mali možgani	2
1.1.3	Možgansko deblo	2
1.1.4	Likvor	2
1.2	MENINGITIS	3
1.2.1	Vrste meningitisa	3
1.3	KLOPNI MENINGOENCEFALITIS	3
1.3.1	Prenašalec	4
1.3.2	Povzročitelj klopnega meningoencefalitisa	6
1.3.3	Klinični znaki	11
1.3.4	Epidemiologija	13
1.3.5	Zaščita proti klopnemu meningoencefalitisu	15
1.3.6	Osnovna laboratorijska diagnostika klopnega meningoencefalitisa	17
2	NAMEN	19
3	MATERIALI IN METODE	20
3.1	PREISKOVANCI	20
3.2	VZORCI	20
3.3	ANALIZNE METODE	22
3.3.1	Organoleptični pregled likvorja	22
3.3.2	Določanje koncentracije levkocitov in eritrocitov v likvorju	23
3.3.3	Določanje koncentracije levkocitov in diferencialna krvna slika v krvi na hematološkem analizatorju Coulter Hmx	24
3.3.4	Določanje koncentracije glukoze v likvorju z glukoza-oksidadno metodo	26
3.3.5	Določanje koncentracije beljakovin v likvorju z benzentonijevim kloridom	27
3.3.6	Določanje koncentracije C-reaktivnega proteina s QuikRead aparatom	29
3.4	REFERENČNE VREDNOSTI	30
3.5	STATISTIČNE METODE ZA OBDELAVO PODATKOV	31
4	REZULTATI	32

5	RAZPRAVA	38
6	SKLEP	43
7	LITERATURA	44

KAZALO TABEL

Tabela I: Znanstvena klasifikacija	4
Tabela II: Potek bolezni.....	12
Tabela III: Prijavljeni primeri KME v Sloveniji	14
Tabela IV: Odmerki cepiva	16
Tabela V: Prikaz obravnavanih preiskovancev v naši skupini glede na spol in starost	20
Tabela VI: Prikaz odmerjanja vzorcev pri določanju koncentracije glukoze.....	27
Tabela VII: Prikaz odmerjanja vzorcev pri določanju koncentracije beljakovin	28
Tabela VIII: Referenčne vrednosti v krvi.....	30
Tabela IX: Referenčne vrednosti v likvorju	30
Tabela X: Prikaz rezultatov analiz KME.....	32
Tabela XI: Primer rezultatov analiz vzorca pri bakterijskem meningitisu	34
Tabela XII: Prikaz aritmetičnih sredin, standardnih deviacij (SD) ter najnižjih in najvišjih vrednosti KME	34
Tabela XIII: Primerjava naših rezultatov KME z referenčnimi vrednostmi	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Klopov razvojni cikel	5
Slika 2: Zgradba virusa KME.....	7
Slika 3: Genom virusa KME	7
Slika 4: Razmnoževalni cikel virusa KME (prirejena slika)	8
Slika 5: Prenos virusa KME	9
Slika 6: Potek bolezni KME	10
Slika 7: Najpogostejša endemična območja v Sloveniji.....	13
Slika 8: Prijavljeni primeri KME v letih 2007, 2008, 2009 v Sloveniji.....	14
Slika 9: Primer primernege mesta za lumbalno punkcijo.....	21
Slika 10: Fuchs-Rosenthalova komora	23
Slika 11: Hematološki analizator Coulter Hmx	25
Slika 12: Princip določanja glukoze z glukoza-oksidadno metodo	26
Slika 13: Komplet QuikRead za določanje koncentracije CRP	29
Slika 14: Prikaz razlik v koncentraciji K-Lkci med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom	35
Slika 15: Prikaz razlik v koncentraciji Lc-B med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom	35
Slika 16: Prikaz razlik v koncentraciji Lc-GLU med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom	36
Slika 17: Prikaz razlik v koncentraciji CRP med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom	36
Slika 18: Prikaz razlik za posamezne vrste levkocitov v likvorju med klopnim meningoencefalitisom in bakterijskim meningitisom (enota za vse parametre je: $\times 10^6/L$)	37

POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil predstaviti klopni meningoencefalitis, klinične, epidemiološke in laboratorijske značilnosti ter le te primerjati z rezultati laboratorijskih analiz pri klopnem meningoencefalitisu in bakterijskem meningitisu, ki so podani v literaturi. Klopni meningoencefalitis je vnetje možganskih ovojnic, ki ga povzroča virus klopnega meningoencefalitisa, prenaša pa ga klop *Ixodes ricinus*. Prizadene lahko moške in ženske različnih starosti, kar smo ugotovili tudi v naši raziskavi. Trenutno specifičnega zdravila za zdravljenje klopnega meningoencefalitisa ni, zato se pripisuje večji pomen preventivnim ukrepom preprečevanja okužbe. V raziskavo smo vključili 35 preiskovancev, ki so bili obravnavani v ambulanti Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja in pri katerih je bila serološko potrjena diagnoza okužbe z virusom klopnega meningoencefalitisa in en vzorec bakterijskega meningitisa, katere vrednosti so bile že podane. Preiskovancem sta bila odvzeta vzorca likvorja in venske krvi. Vzorec likvorja smo najprej organoleptično pregledali, nato smo določali številčno koncentracijo in diferenciacijo levkocitov ter številčno koncentracijo eritrocitov v likvorju. Koncentracijo glukoze v likvorju smo določali spektrofotometrično z glukoza-oksidazno metodo. Koncentracijo beljakovin smo z benzentonijevim kloridom določali s turbodimetrično metodo. V vzorcu venske krvi smo določili C-reaktivni protein in koncentracijo levkocitov z diferencialno krvno sliko na hematološkem analizatorju Coulter HMX. Ugotovili smo, da se rezultati analiz razlikujejo glede na vrsto meningitisa. Razlika je bila že v izgledu likvorja; pri klopnem meningoencefalitisu je bister, le redko moten, medtem ko je pri bakterijskem meningitisu moten ali celo gnojen. Povprečna koncentracija levkocitov v likvorju je bila pri klopnem meningoencefalitisu $101,2 \times 10^6/L$ (povečana) s prevladovanjem limfocitov, veliko bolj je bila koncentracija povečana pri bakterijskem meningitisu ($19733 \times 10^6/L$). Povprečna številčna koncentracija levkocitov v krvi je pri klopnem meningoencefalitisu nižja ($9,0 \times 10^9/L$) kot pri bakterijskem meningitisu ($23,4 \times 10^9/L$). Ugotovili smo, da je pri bolnikih s klopnim meningoencefalitisom povprečna koncentracija glukoze v likvorju normalna (2,93 mmol/L), medtem ko je za bakterijski meningitis značilna znižana koncentracija (pod 2,2 mmol/L). Vrednost povprečne koncentracije beljakovin v likvorju je bila pri klopnem meningoencefalitisu povečana (0,79 g/L), kar navajajo tudi v literaturi (nad 0,45 g/L), medtem ko zaznamo pri vzorcu bakterijskega meningitisa še večje povečanje koncentracije (3,68 g/L). Pri naši skupini bolnikov s klopnim meningoencefalitisom je bila povprečna

koncentracija CRP povečana (20,0 mg/L), medtem ko se je pri bakterijskem meningitisu koncentracija CRP močno povečala (268 mg/L).

SUMMARY

The purpose of this diploma work was to present the tick-borne encephalitis and its clinical, epidemiological and laboratorial characteristics. Another purpose was to compare them with the laboratorial analyses results of the tick-borne encephalitis and bacterial meningitis, as mentioned in the literature. The tick-borne encephalitis is the inflammation of the brain membranes, caused by the virus of the tick-borne encephalitis which is transferred by a tick *Ixodes ricinus*. As we have found out in our survey, it can affect men and women of a different age. Preventive measures against the infection are very significant, since there is no specific medication for it. Our survey included thirty-five people under investigation, who were treated in the Clinic for the Infectious diseases and fever conditions. All thirty-five had serologically confirmed diagnosis of infection with the tick-borne encephalitis virus. We also included one sample of bacterial meningitis whose values were already given. People under investigation had their cerebrospinal fluid and venous blood samples collected. Firstly the cerebrospinal fluid sample was examined organoleptically, secondly we have determined numerical concentration and differentiation of the leukocytes and numerical concentration of erythrocytes in the cerebrospinal fluid. The concentration of glucose in the cerebrospinal fluid was spectra-photo-metrically determined by glucose-oxidizing method. Protein concentration was determined by a Benzethonium Chloride and turbo-diametrical method. In the venous blood sample we have determined C-reactive protein and the concentration of the leukocytes by a differential blood image provided by the haematological analyzer Coulter HMX. We concluded that the analyses results differentiate regarding the species of meningitis. The difference was already in the appearance of the cerebrospinal fluid itself; clear, rarely blurry with the tick-borne encephalitis, while blurry and even inflamed with the bacterial meningitis. The average concentration of the leukocytes in the cerebrospinal fluid with the tick-borne encephalitis was $101,2 \times 10^6/L$ (increased) with the lymphocytes domination. The concentration was even more increased with bacterial meningitis ($19733 \times 10^6/L$). The average concentration of the leukocytes in the blood with the tick-borne encephalitis is lower ($9,0 \times 10^9/L$) than with the bacterial meningitis ($23,4 \times 10^9/L$). We have established that patients with the tick-borne encephalitis have a normal (2,93 mmol/L) average concentration of glucose in the cerebrospinal fluid, while a lower concentration is typical of bacterial meningitis (below 2,2 mmol/L). The level of the average protein in the cerebrospinal fluid of tick-borne encephalitis was increased (0,79 g/L), which is indicated

also by literature (above 0,45 g/L), while we detected in the sample of bacterial meningitis even bigger concentration increase (3,68 g/L). Our group of patients infected by the tick-borne encephalitis had an average CRP concentration increased (20,0 mg/L), while the average CRP concentration with bacterial meningitis was highly increased (268 mg/L).

SEZNAM OKRAJŠAV

CEE	Centralno evropski encefalitis (angl. Central European encephalitis)
CRP	C-reaktivni protein
DKS	diferencialna krvna slika
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deokxyribonucleic acid)
Erci	eritrociti
Lc-B	koncentracija beljakovin v likvorju
Lc-Glu	številčna koncentracija glukoze v likvorju
Lc-Lkci	številčna koncentracija levkocitov v likvorju
Lc-Ly	številčna koncentracija limfocitov v likvorju
Lc-Mo	številčna koncentracija monocitov v likvorju
Lc-Seg	številčna koncentracija segmentiranih nevtrofilnih granulocitov v likvorju
Lkci	levkociti
Hb	hemoglobin
IgG	imunoglobulin razreda G
IgM	imunoglobulin razreda M
KME	klopni meningoencefalitis
OŽ	osrednje živčevje
RNK	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic acid)
RSSE	rusko pomladno poletni encefalitis (angl. Russian spring summer encephalitis)
VCS	V-volumen, C-prevodnost, S-odboj laserske svetlobe (angl. Volume, Conductivity, Scatter)
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

1 UVOD

1.1 Možgani

Možgani (latinsko *encephalon*) izpolnjujejo lobanjsko votlino in so najboljšežnejši, pa tudi najpopolneje razviti del osrednjega živčevja (OŽ). Pri človeku je večina življenjskih funkcij vezana na možgane, tako da ima hrbtenjača le podrejeno vlogo (1).

Možgani nadzirajo in usklajujejo večino gibanja, vedenja in homeostatskih funkcij, kot so krvni tlak, telesna temperatura, srčni ritem, ravnovesje telesnih tekočin. Možgani so glede na funkcijo odgovorni za čustvene in kognitivne procese, motorično učenje in pomnjenje (2).

Sestavljeni so iz dveh vrst celic:

- nevronov ali živčnih celic (glavni gradniki živčevja, prenašalci informacij),
- glialnih celic (so pomožne celice, ki služijo pretežno varovanju, hranjenju in podpori nevronom) (2).

Pri možganih ločimo velike možgane, male možgane ter možgansko deblo (3).

1.1.1 Veliki možgani

So del osrednjega živčevja, so najboljšežnejši, saj zapolnjujejo skoraj celotno lobanjo. Velike možgane sestavljata dve polobli, leva in desna, ki ju ločuje vzdolžna špranja. Polobli sta med seboj povezani z živčnim nitjem. Zunanjo stran polobel navpično ter poševno potekajoči brazdi razdelita na režnje, ki se imenujejo po kosteh možganske lobanje v bližini. Ti režnji so čelni, temenski, senčni in zatilni (1, 3).

Na površini polobel je možganska skorja, ki je nagubana v številne vijuge in ima zato veliko površino. Preostalo maso polobel pa zavzema bela substanca, ki jo sestavljajo različne živčne proge (1).

Pomen velikih možganov je, da urejajo našo zavest, razumsko reakcijo, voljo, spomin, asociacijo, abstrakcijo, so pa tudi čutilno središče za sluh, vid, trup in gibalno središče za jezik, grlo, zgornje ter spodnje ude. Delujejo po principu prejemanja poročil s površine in odgovarjanja nanje (1).

1.1.2 Mali možgani

Nahajajo se v zadnji lobanjski kotanji in so z živčnimi programi povezani s hrbtenjačo in možganskim deblom. Skorja malih možganov je močno nagubana, ker je iz celic sive barve, notranjost, ki jo sestavljajo živčne proge, pa je bele barve (1).

Naloga malih možganov je, da urejajo skladnost naših gibov, ravnotežje telesa in mišični tonus. Pri okvari malih možganov postanejo mišični gibi neokretni in nenatančni, mišični tonus popusti, hoja pa postane opotekajoča in negotova (1).

1.1.3 Možgansko deblo

Nahaja se pred malimi možgani v zadnji lobanjski kotanji. Po zgradbi in pomenu je možgansko deblo močno podobno podaljšani hrbtenjači. Iz možganskega debela izhajajo možganski živci. Izjema sta le vohalni in vidni živec, ki izhajata iz velikih možganov (1, 3).

Pomen možganskega debela: skozi možgansko deblo potekajo enostavni refleksi (refleks kihanja, požiranja, kašlja, sesanja, bruhanja,...). Seveda pa možgansko deblo ni samo preprost refleksni center, ampak je prav tako kot hrbtenjača s senzibilnimi in motoričnimi živčnimi progami povezano z velikimi možgani (1).

1.1.4 Likvor

Likvor je možganska tekočina, ki se nahaja v subarahnoidalnem prostoru med možganskima ovojnica in kroži skozi možganske prekate v hrbtenjačo. Normalno je likvor brezbarvna, bistra tekočina. Funkcija likvorja je mehanska zaščita možganov pred udarci in sodelovanje v metabolizmu OŽ. Sestavljen je iz vode (več kot 90 %), elektrolitov (natrij, kalij, klor), glukoze in beljakovin, ki pa imajo drugačno sestavo kot v krvni plazmi. Vzorec likvorja odvzame zdravnik, običajno z lumbalno punkcijo (4). V normalnih razmerah poteka med krvjo in možgansko tekočino le omejena izmenjava snovi. Tej pregradi (barieri) pravimo krvno-likvorska pregrada. Če pride v tej pregradi zaradi bolezni do motenj, lahko iz krvi v možgansko tekočino preidejo tudi druge snovi in tako spremenijo sestavo (5).

1.2 Meningitis

Je infekcijska bolezen, pri kateri so vnete možganske ovojnice (meninge). Povzročitelji bolezni so lahko bakterije, virusi, glive in zajedavci (6).

Bolezen se začne akutno z glavobolom, slabostjo, bolečinami v vratu in vzdolž hrbtenice, bruhanjem, fotofobijo, prisotna je visoka vročina, tudi do 40 °C. Lahko se pojavi meningitični izpuščaj, ki je značilen za meningokokni meningitis. Pri bakterijskem meningitisu se lahko razvijejo še konvulzivni napadi, omotica ali koma, možganski absces (oblikovanje z gnojem napolnjene votline v možganih) (7). Na splošno so simptomi pri virusnem meningitisu lažji kot pri bakterijskem meningitisu in večina bolnikov (odvisno od povzročitelja) ozdravi brez zdravljenja, čeprav lahko težave trajajo nekaj tednov (6).

1.2.1 Vrste meningitisa

Gnojni ali bakterijski meningitis je vnetje možganskih ovojnic, povzročajo ga piogene bakterije, je akutna smrtno nevarna bolezen. Likvor je gnojen. Najpogostejši povzročitelji gnojnih meningitisov so meningokoki, pnevmokoki in *Haemophilus influenzae* tipa B (6).

Serozni meningitis je vnetje možganskih ovojnic, povzročajo ga virusi, glive, zajedavci, nekatere bakterije, rikecije in mikoplazme. Likvor je bister ali rahlo moten. Najpogostejši povzročitelji seroznega meningitisa so *Borrelia burgdorferi* ter virus klopnega meningoencefalitisa, enterovirusi in virus herpes simpleksa (6).

Encefalitis je akutno ali kronično vnetje možganov, povzročajo ga virusi, nekatere bakterije in glive, praživali ter paraziti. Večina bolnikov ima hkrati prizadete tudi možganske ovojnice, zaradi tega ga označujemo kot meningoencefalitis. Likvor ima enake spremembe kot pri seroznemu meningitisu. Potek je različen, odvisen od povzročitelja (6).

1.3 Klopni meningoencefalitis

Klopni meningitis je virusna bolezen, pri kateri pride do vnetja možganskih ovojnic. Pri pregledu živčnih celic se je pokazalo, da so pri vsakem vnetju možganskih ovojnic prizadeti tudi možgani in hrbtni mozeg, zato se vsak meningitis šteje za kombinacijo z encefalitisom in mielitisom. Ker meje med prizadetostjo možganskih ovojnic in živčnega tkiva ni mogoče natančno ugotoviti, se v medicini uporablja za to obolenje izraz **klopni meningoencefalitis (KME)** (8).

Prenašalci (vektor) virusa na človeka so klopi iz rodu *Ixodes ricinus*. KME ogroža predvsem tiste ljudi, ki se v obdobju aktivnosti klopov zadržujejo v naravnih žariščih bolezni. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO, angl. World Health Organization) pa opredeljuje KME kot resno akutno bolezen osrednjega živčevja, ki lahko povzroči tudi smrt ali pa ima dolgotrajne nevrološke posledice (35–58 % bolnikov). Smrtnost pri KME je 0,5–20 %. KME se pojavlja endemično v večini evropskih držav, Ruski federaciji in na Kitajskem (6, 9).

Okužba lahko poteka brez simptomov kot lahka vročinska bolezen ali z znaki vnetja možganov in možganskih ovojnic. Tipična bolezen poteka v dveh fazah: kratki, neznačilni vročinski bolezen sledi prosto obdobje in nato nastopi druga faza bolezni, ki jo pri odraslih razdelimo v naslednje oblike: meningitis, meningoencefalitis, meningoencefalomielitis ali meningoencefaloradikulitis (6, 10).

Bolezen lahko pusti na bolniku trajne posledice, kot so glavobol, zmanjšana sposobnost koncentracije, zmanjšana delovna sposobnost, pareze in tudi ohromelost (9).

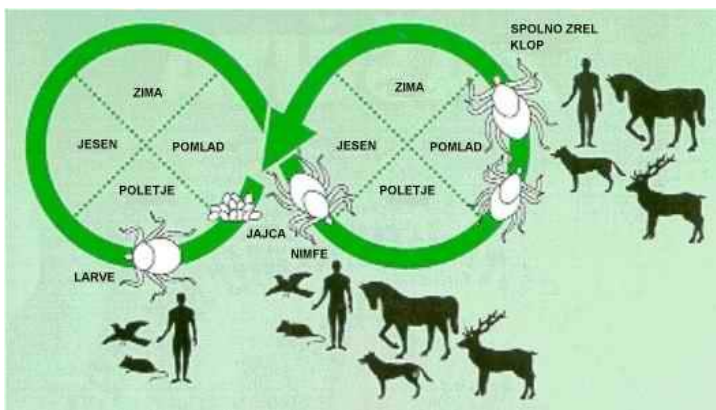
1.3.1 Prenašalec

Najbolj razširjena vrsta klopa pri nas je klop *Ixodes ricinus* ali navadni klop, ki ga štejemo v skupino ščitastih klopov. V tabeli I je prikazana znanstvena klasifikacija klopa. Poznane so še druge vrste, vendar so njihovi predstavniki tako redki, da nimajo večjega epidemiološkega pomena (11).

Tabela I: Znanstvena klasifikacija

Kraljestvo:	Animalia (živali)
Deblo:	Arthropoda (členonožci)
Poddeblo:	Chelicerata (pipalkarji)
Razred:	Arachnida (pajkovci)
Podrazred:	Acarina (pršice)
Nadred:	Parasitiformes (zajedavske pršice)
Red:	Ixodida
Naddružina:	Ixodoidea

Klopi živijo na vlažnih krajih v mešanih gozdovih in na njihovih obronkih z gosto plastjo nizkega rastlinstva. Na življenjski prostor klopov vpliva tudi nadmorska višina. Najpogosteje se nahajajo do 800 metrov nadmorske višine, v posameznih primerih, pa se pojavijo tudi do nadmorske višine 1500 metrov. Aktivnost klopa je odvisna od zunanje temperature. Kadar je temperatura nižja kot 5–7 °C, klopi mirujejo. Pri naših zemljepisnih in podnebnih razmerah so klopi aktivni od pomladi do pozne jeseni (8, 11).



Slika 1: Klopov razvojni cikel

Običajno čaka klop na gostitelja v podrasti pri tleh. S čutnimi laski in kemičnim čutilom na prednjem paru nog zazna najšibkejše toplotne tokove, premike in rahel vonj. Tako odkrije primerno žrtev, na katero se prisesa. Gostitelji so najpogosteje sesalci, ptiči, plazilci in priložnostno tudi človek. Okužene so lahko tudi nekatere domače živali, katerih mleko je lahko vir okužbe za človeka (6, 8).

Življenjski cikel klopa (slika 1) ima 4 faze razvoja (jajčece-ličinka-nimfa-odrasel klop). Življenjski cikel klopa lahko traja do osem let, povprečno pa traja dve do štiri leta. Odrasla samička je velika 3–4 mm, medtem ko so samci nekoliko manjši (2,5 mm). Vsak razvojni stadij mora zajediti gostitelja, da se lahko razvije naprej (6).

Pri prehodu na človeka pride klop najpogosteje v stik z okončinami in išče pot do kože. Išče tiste predele kože, ki so nežnejši in kjer je predor lažji. Ti predeli so zlasti na zadnji strani kolenskega sklepa, na vratu, v dimljah ali pod pazduho. Preden najde ustrezno mesto za pritrditev, lahko traja več ur. Šele ko je klop trdno pritrjen, začne sesati kri ali medcelično tekočino. Klopov ugriz je neboleč, saj pred sesanjem izloči tudi slino, ki vsebuje snov (anestetik), ki povzroči lokalno omrtničenje, in snov, ki prepreči strjevanje krvi (8).

Vsak klop ni okužen (stopnja okuženih klopov je bila leta 2002 od 0,1- do 5-odstotna in je nihala glede na endemsko območje), okužen je le, če je med svojim razvojem naletel na okuženega gostitelja. Ko se klop okuži, ostane kužen ves čas svojega življenja, povzročitelje pa prenašajo samice celo na svoje potomce. Klop torej le prenese povzročitelja bolezni z enega na drugega gostitelja. Zato medicina bolezni, ki jih povzroča klop, uvršča med prenosljive. Klop prenaša tudi povzročitelje drugih bolezni, kot sta lymfska borelijoza in erlichioza (6, 8).

1.3.2 Povzročitelj klopnega meningoencefalitisa

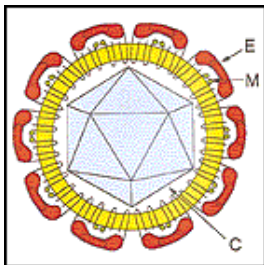
Povzročitelj obolenja je virus klopnega meningoencefalitisa, ki ga klop kot glavni prenašalec prenese z enega na drugega gostitelja med sesanjem krvi. Antigensko razvrščamo virus KME v družino *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*, ki pri človeku povzroča obolenje osrednjega živčevja in poteka v dveh fazah (6, 8). *Flaviviridae* je družina strukturno enotnih virusov polarno enoverižne RNK (ribonukleinska kislina), ki se v prvi vrsti širi preko členonožcev (predvsem klopov in komarjev). Družina je dobila ime po bolezni, imenovani rumena mrzlica (latinsko *flavi* pomeni rumeno). Delimo jo na rodove *Flavivirus*, *Pestivirus* in *Hepacivirus* (12). Pri nas je virus KME znan že od začetka 1950. leta kot povzročitelj meningitisa, ki se pri človeku pojavlja sezonsko, največkrat od meseca maja do septembra (13).

Poznamo dva podtipa virusa KME:

- **virus centralnoevropskega encefalitisa oz. zahodni virus (CEE):** prenašalec je klop *Ixodes ricinus*; pojavlja se večinoma na zahodu centralnoevropskih držav, še posebno v gozdnih in hribovitih območjih,
- **virus ruskega pomladno-poletnega encefalitisa oz. vzhodni virus (RSSE):** prenašalec je klop *Ixodes persulcatus*; pojavlja se v vzhodni Rusiji in nekaterih državah v vzhodni Aziji, večinoma v gozdnih območjih Kitajske in Japonske (6).

Med seboj se podtipi razlikujejo v vrsti klopov, ki jih prenašajo, po območju, kjer se nahajajo, po poteku ter teži bolezni, ki jo povzročajo pri ljudeh in po rahli razliki v strukturi virusnih beljakovin.

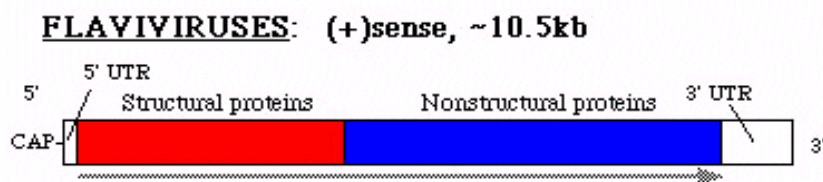
Virus KME je po zgradbi enak ostalim virusom družine *Flaviviridae*. Virus (slika 2) je ikozaedrične oblike, z ovojnico (iz lipidov, beljakovin in ogljikovih hidratov) in meri v premeru od 45 do 60 nm (14).



Legenda: E-beljakovina E, M-beljakovina M, C-beljakovina C

Slika 2: Zgradba virusa KME

Genom virusa predstavlja linearna molekula pozitivno polarne enovijačne RNK (ribonukleinska kislina), ki deluje v celici kot sporočilna RNK (mRNK). Celoten genom je dolg približno 11 kb (14, 15). RNK ima na koncu 5' kapo, na 3' pa nima poliA repa. Virusne beljakovine so kodirane v en sam dolg bralni okvir (slika 3).



Slika 3: Genom virusa KME

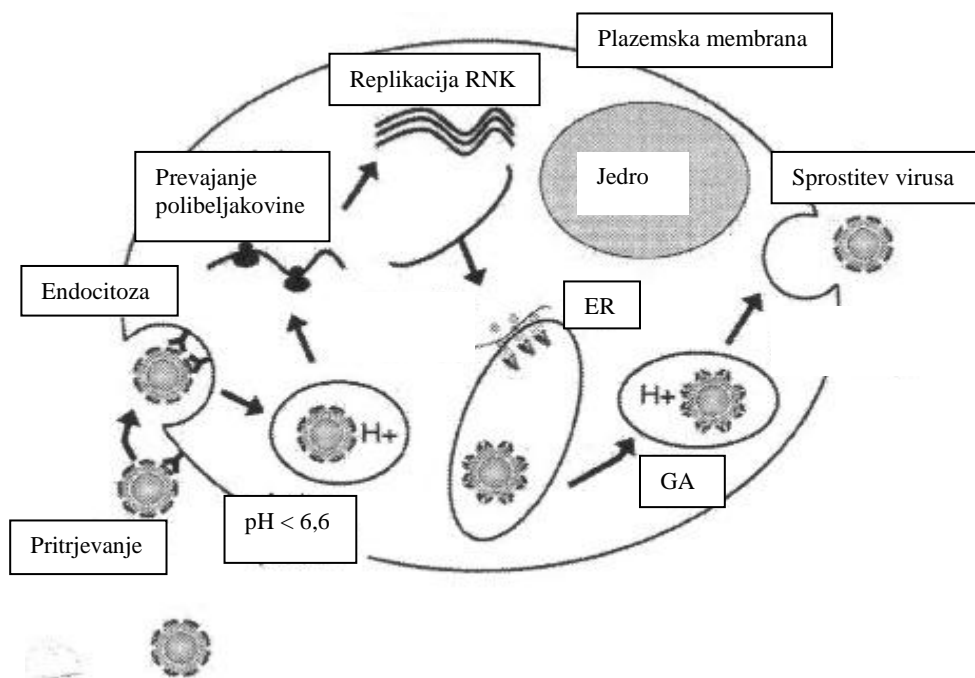
Genom kodira 7 nestrukturnih (v večini so to encimi, ki sodelujejo pri pomnoževanju virusne RNK): NS1, NS2, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 in 3 strukturne beljakovine: V1 neglikozirana membranska beljakovina **M** (M-membrane like protein), V2 kapsidna beljakovina **C** (C-core) in V3 glikozirana ovojnična beljakovina **E** (E-envelope), ki sodelujejo pri razmnoževanju virusa (6).

Geni za strukturne beljakovine predstavljajo približno 25 % bralnega okvirja na 5' koncu. Preostali del bralnega okvirja (približno 75 %) pa zavzemajo geni za nestrukturne beljakovine (16).

Protein C je edina komponenta kapsidne beljakovine, ki vključuje pozitivno polarno RNK, dolgo približno 11.000 nukleotidov. Beljakovini M in E sta vključeni v virusni membrani. Glikoprotein E, ki je glavni sestavni del virusne površine, odgovarja za tvorbo

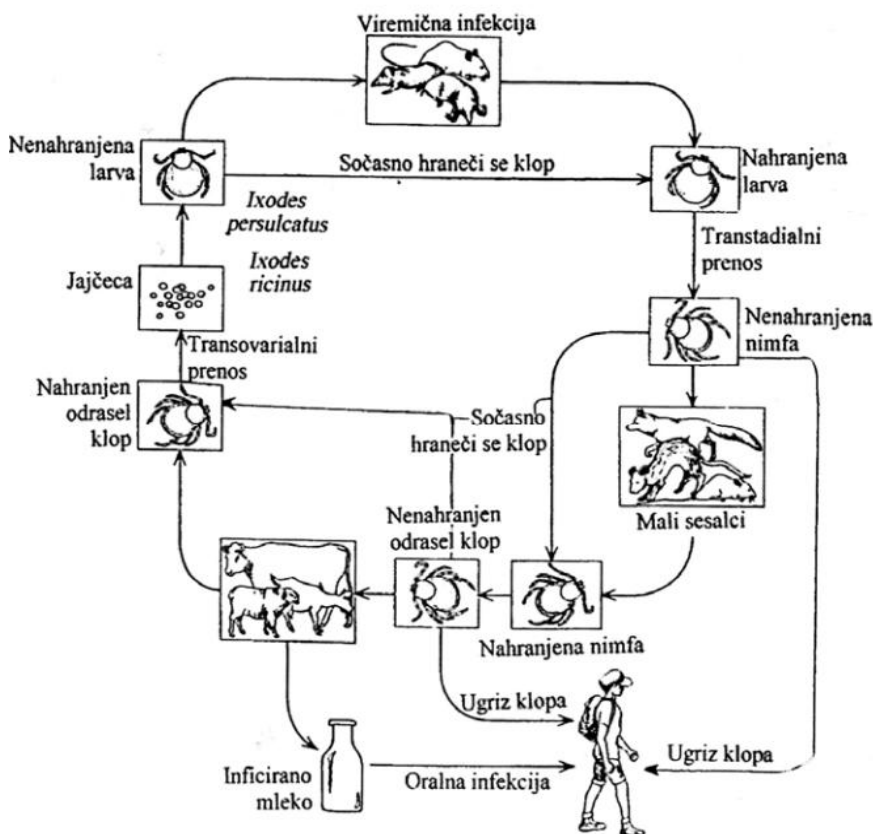
nevtralizirajočih protiteles in zaščitnih protiteles. Strukturna analiza je pokazala, da je beljakovina E (V3) vzporedno poravnana s površino virusa (17).

Virus KME se razmnožuje v citoplazmi gostiteljske celice (slika 4). V celico vstopi z receptorsko posredovano endocitozo. Po vstopu pride zaradi nizkega pH do zlitja virusne membrane z membrano endocitotskega mešička, nukleokapsida pa se sprosti v citoplazmo. Pozitivno polarna RNK služi kot mRNK in celotna beljakovina se prevede v eno polibeljakovino s strukturnimi in nestrukturnimi beljakovinami. Posamezne beljakovine nastanejo s cepljenjem s celičnimi in virusnimi proteazami. Zorenje poteka na membranah endoplazemskega retikuluma (ER), nato virusi potujejo do Golgijevega aparata (GA) in se z eksocitozo sprostitjo iz celice (18, 19, 15).



Slika 4: Razmnoževalni cikel virusa KME (prirejena slika)

Virusi se v klopu razmnožujejo v različnih organih, tudi v žlezah slinavkah, in se prenašajo s slino ob vbodu klopa. Med klopi se virus lahko prenaša (slika 5) vertikalno: spolno, transovarialno (samica-jajčeca), transtadialno (z ličinke na nimfo in nato na odraslo žival) ali horizontalno: stik z okuženim klopom med sočasnim hranjenjem ali stik med klopi in malimi sesalci. Odrasli klopi napadajo tudi večje sesalce, s katerimi se širijo na večje razdalje. Človek je le naključni gostitelj ali pa se okuži z okuženim mlekom (6).



Slika 5: Prenos virusa KME

Dogajanje v organizmu po vbodu klopa (slika 6): virus se začne razmnoževati že na mestu okužbe, to je v podkožnem tkivu, če pa je bil vnesen s hrano (okuženo neprekuhano mleko krav, ovc, koz), se razmnožuje v sluznici prebavil. Najprej se virus razširi po limfni in krvni poti. To je prva stopnja, kjer okuženi še ne čuti nikakršnih težav. V organizmu se virus množi in nato spet preide v kri. To je druga stopnja. Prva in druga stopnja skupaj tvorita inkubacijsko dobo. Ko se virus v večjem številu vrne v kri, začuti bolnik prve znake obolenja. Nastopijo znaki, podobni gripi. Virus nato prodira naprej v OŽ, kjer se pospešeno množi. To je tretja stopnja okužbe, s katero nastopi hujši del obolenja. Čim bolj se virus namnoži, več živčnih celic prizadene in težje obolenje povzroča (6, 8).

Možganske ovojnice so vnetno spremenjene, hiperemične, pojavi se edem in petehialne krvavitve. V možganih je prizadeta predvsem siva možganovina, nastanejo degeneracije, spongiformne nekroze, infiltracija okoli žilja z vnetnimi celicami in nevronfagija. Sposobnost virusa, da povzroči citopatsko okužbo OŽ in razvoj encefalitisa, imenujemo nevrovilurencija (6, 18).

Sam potek bolezni je odvisen od dolžine časa klopovega sesanja in s tem količine virusa, ki prodre v kri, njegove virulence in obrambnih sposobnosti organizma (6).



Slika 6: Potek bolezni KME

1.3.3 Klinični znaki

Vbodu klopa sledi 7–14 dni inkubacije, nato nastopi prva faza bolezni. Sledi prosti interval, ki traja 1–20 dni, temu pa druga faza bolezni.

Bolezen poteka v dveh fazah:

- **prva faza** je posledica viremije (virus preide v kri) in traja 1–8 dni; bolniki se slabo počutijo, imajo glavobol, povišano telesno temperaturo, bolečine v mišicah, možni so lahni prehladni znaki, bolečine v trebuhu, bruhanje in driska;
- prvemu obdobju sledi **prost interval**, ki traja 1–20 dni, v tem času so bolniki običajno brez težav, možen je blag glavobol;
- zatem nastopi **druga faza** bolezni; tu pride virus skozi krvno-možgansko pregrado v možgane; znaki, ki se pokažejo v tej fazi, so visoka temperatura (po navadi nad 39 °C), močan glavobol, slabost, bruhanje, tresenje jezika in rok, težave pri mišljenju in koncentraciji ter otrdelost vratu, možna je tudi ohromitev dihalnih mišic in pri nekaterih celo nezavest; druga faza lahko pri odraslih poteka kot (tabela II) akutni meningitis, meningoencefalitis, meningoencefalomielitis ali meningoencefaloradikulitis.

Klinične oblike so odvisne od stopnje in lokalizacije prizadetosti osrednjega živčevja. Bolniki se zdravijo v bolnišnici 3–40 tednov (6, 13).

Poznamo več kliničnih oblik KME:

Meningitična oblika: začne se z vročino, ki je lahko višja od 39 °C, glavobolom, slabostjo, bruhanjem, trdim vratom, občutljivostjo na svetlobo. Bolnik ima izrazite meningealne znake. Navadno akutni znaki v nekaj dnevih povsem izzvenijo, lahko pa glavobol, utrujenost in motnje koncentracije trajajo še več mesecev (6).

Meningoencefalitična oblika: najpogostejši znaki encefalitisa, ki se pridruži meningitisu, so zaspanost, tresenje rok in/ali jezika, epileptični napad in oteženo dihanje (če je prizadeto možgansko deblo). Lahko se pojavijo tudi hujše motnje zavesti, govora, vedenjske motnje in motnje ravnotežja ter motnje v delovanju vegetativnega živčevja. V večini primerov bolniki po daljšem času popolnoma ozdravijo, posledice bolezni pa lahko ostanejo prisotne še več let (6).

Meningoencefalomielitična oblika: znakom in simptomom klopnega meningoencefalitisa se navadno nekoliko pozneje pridružijo še znaki, ki so odraz vnetja hrbtenjače, kar se največkrat pokaže kot ohromitev udov in/ali dihalnih mišic. Motenj v občutljivosti ni. Del bolnikov po tem obolenju popolnoma ozdravi (6).

Meningoencefaloradikulitična oblika: kaže se s simptomi in znaki meningoencefalitisa, z znaki prizadetosti in vnetja hrbtenjače ter živčnih korenin, kar povzroči paralizo z amiotropijo (upadanje mišic), bolečimi živci in/ali paraplegijo, z motnjami peristaltike in uriniranja. Virus lahko sočasno prizadene še miokard, jetra in druge organe. Na srcu povzroča miokarditis, ki se klinično kaže z motnjami srčnega ritma (6).

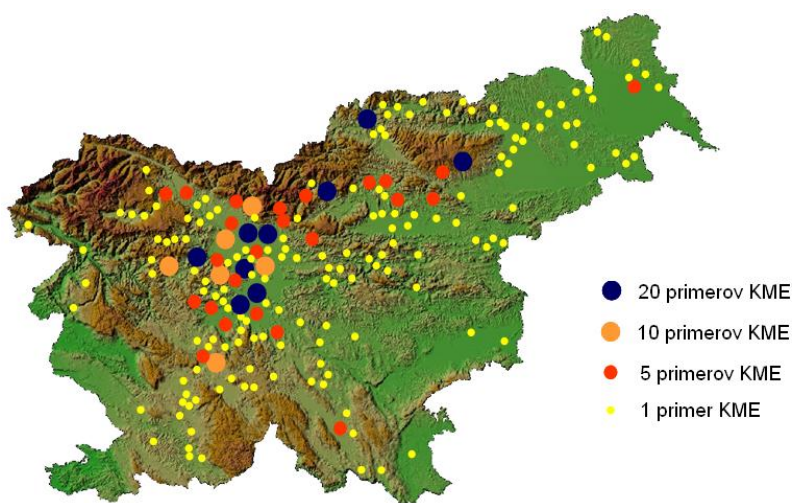
Možno je tudi, da osebe, okužene z virusom KME, ne zbolijo in ostane okužba neopazna, imajo pa le znake prve stopnje bolezni (lahka vročinska bolezen z neznačilnimi kliničnimi znaki). Okoli 20 % bolnikov zazna le drugo fazo bolezni, zelo redko pa se pokaže s prvo fazo bolezni, ki ji druga, meningoencefalitična oblika ne sledi (9).

Tabela II: Potek bolezni

	Meningitična oblika	Meningoencefalitična oblika	Meningomielitis / meningoencefalomielitična oblika
Delež obolelih	35,0 %	59,8 %	3,0 %
Simptomi	- glavobol - slabost - vročina - bruhanje - občutljivost na svetlobo	- večja nagnjenost k zaspanosti - epileptični napadi - tresenje rok in/ali jezika - oteženo dihanje - motnje govora - motnje motoričnih in senzoričnih funkcij glede na prizadeti centralni živčni sistem	- ohromitve udov in/ali mišic - druga življenje ogrožajoča stanja
Proгноza	Možno popolno okrevanje, vendar nekatere motnje ostanejo več mesecev.	Zdravljenje brez večjih komplikacij, motnje pa lahko ostanejo še več let.	Navadno popolno okrevanje z nekaterimi motnjami. V nekaterih primerih (približno 2 %) pa je bolezen smrtna.

1.3.4 Epidemiologija

V Sloveniji je pojavljanje te bolezni vezano na naravna žarišča. Njihova intenziteta je različna (slika 7): od izredno aktivnih, kjer je možnost okužbe večja kot v manj aktivnih območjih, in celo latentnih žarišč, kjer okužba in obolenje nista verjetni. V Sloveniji lahko endemično območje omejimo s črto, ki poteka od Jesenic čez Škofjo Loko, Postojno do Kočevja, nato proti Litiji, preko Zidanega Mosta, mimo Celja in Šentjurja proti meji s Hrvaško (6).

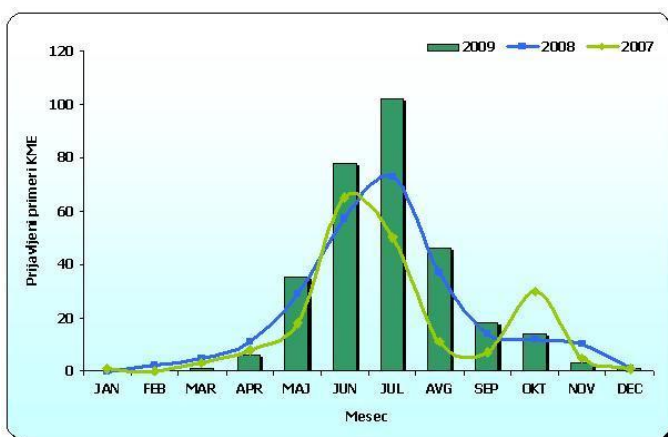


Slika 7: Najpogostejša endemična območja v Sloveniji

Stopnja obolevnosti in stopnja prekuženosti sta v posameznih žariščih Evrope zelo različni. Velika je bila v Avstriji, kjer se je po uvedbi cepljenja proti KME število obolelih znatno zmanjšalo, sledile so ji Češka, osrednja Nemčija, Slovaška in Skandinavija (6).

Število obolelih v Sloveniji iz leta v leto niha. Zelo veliko je odvisno od vremenskih dejavnikov, ki vplivajo na biološko aktivnost klopa. Okužbi so izpostavljeni ljudje vseh starostnih skupin. Struktura obolelih po spolu ostaja iz leta v leto nespremenjena. Delež obolelih moških je vedno večji kot delež žensk. Največje tveganje za okužbo je pri ljudeh, ki se začasno ali trajno zadržujejo na endemičnih območjih (6).

Letno število prijav se v zadnjih petih letih (od leta 2004 do 2008) giblje od 297 do 304, povprečno je 285 prijav. Iz slike 8 in tabele III opazimo, da število obolelih začne naraščati v mesecu maju, višek doseže v mesecu juliju in se nato znatno zmanjšuje do meseca novembra. Najvišje število prijav v zadnjih petih letih je zabeleženo leta 2006 (373). Povprečna letna incidenca KME v Sloveniji v zadnjih petih letih znaša 14,1/100.000 prebivalcev, kar je 6 % nižje kot leta 2009. V letu 2009 so zabeležili več prijav KME kot v letu 2008 (IVZ–inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije 2010) (20).



Slika 8: Prijavljeni primeri KME v letih 2007, 2008, 2009 v Sloveniji

Tabela III: Prijavljeni primeri KME v Sloveniji

	JAN	FEB	MAR	APR	MAJ	JUN	JUL	AVG	SEP	OKT	NOV	DEC	SKUPAJ:
1999	0	0	1	3	7	23	45	22	11	22	12	4	150
2000	1	0	0	2	14	34	54	34	15	14	24	5	197
2001	0	0	7	13	33	61	66	24	11	25	19	1	260
2002	1	2	5	10	21	65	88	31	22	6	9	2	262
2003	0	0	0	5	39	84	80	26	11	30	6	1	282
2004	0	0	0	15	27	33	66	33	10	10	8	2	204
2005	0	0	2	6	24	51	89	59	41	20	4	1	297
2006	2	0	0	9	36	79	103	51	51	26	10	6	373
2007	1	0	3	8	18	65	50	11	7	30	5	1	199
2008	0	2	5	11	29	57	73	37	14	12	10	1	251
2009	0	0	1	6	35	78	102	46	18	14	3	1	304
SKUPAJ:	5	4	24	88	283	630	816	374	211	209	110	25	

1.3.5 Zaščita proti klopnemu meningoencefalitisu

Okužbo z virusom lahko preprečujemo na več načinov:

- Z zaščito pred vbodom klopa:

- ustrezna oblačila (svetla oblačila, ki pokrivajo večino telesa: dolge hlače, dolgi rokavi),
- uporaba repelentov (kemično sredstvo, ki odganja klope),
- pregled telesa, oblek in drugih predmetov po obisku oz. vračanju iz endemičnega območja (6, 8).

Če klopa zasledimo, ga moramo čim prej previdno odstraniti, saj s tem zmanjšamo možnost okužbe. Odstranimo ga s pinceto, ki ima ostro konico. Klopa primemo čim bližje koži in ga z enakomernimi gibi povlečemo iz kože. V primeru, da deli klopa ostanejo v koži, jih moramo čim prej odstraniti (6, 8).

- Uživanje toplotno pravilno obdelanega mleka in mlečnih izdelkov (6).
- Pasivna imunizacija (ni več v uporabi):

Včasih so KME preprečevali s specifičnimi IgG protitelesi. Odmerki so se dajali pred in po okužbi. Odmerek je bil odvisen od telesne teže bolnika in časa vboda klopa (6).

- Aktivna imunizacija:

Preprečevanje bolezni z uporabo cepiva iz inaktiviranega virusa, pridobljenega na piščančjih plodovih in inaktiviranega s formalinom. Cepivo velja za varno in učinkovito, saj zaščiti skoraj 100 % prejemnikov (6).

Najučinkovitejši ukrep za zaščito pred KME, ki jo prenaša klop *Ixodes ricinus*, je **cepljenje**. V Sloveniji je cepljenje obvezno za vse osebe, ki so pri svojem delu izpostavljene okužbi z virusom KME (gozdni delavci, lovci, dijaki in študentje, ki so okužbi s KME izpostavljeni pri praktičnem pouku ter vojaki na služenju vojaškega roka). Priporočljivo pa je cepljenje tudi za vse osebe, ki živijo ali prihajajo na endemična območja, vendar le to ni obvezno (6).

Osnovno cepljenje sestoji iz treh odmerkov cepiva (po 0,5 mL) (tabela IV) (6).

Tabela IV: Odmerki cepiva

1. odmerek:	priporočen je še v hladnih zimskih mesecih ali zgodaj spomladi
2. odmerek:	1–3 meseca po prvem odmerku
3. odmerek:	9–12 mesecev po drugem odmerku

Ponovno cepljenje pa je potrebno 3–5 let po prvem cepljenju z enim odmerkom cepiva (6).

Ne cepimo bolnikov, ki prebolevajo akutno vročinsko obolenje, nosečnic, bolnikov, ki so preobčutljivi na jajca in/ali piščančje meso in bolnikov, ki so imeli alergično reakcijo na predhodni odmerek cepiva (6).

Neželeni učinki cepiva so redki in blagi. Možen je nastanek otekline ali rdečine na mestu cepljenja, slabo počutje, bolečina in vročina, ki traja običajno 1 dan in ne preseže 38 °C, možna pa je tudi rdečina na mestu injekcije (6).

Trenutno ni specifičnega zdravila za zdravljenje KME, zato je zdravljenje navadno simptomatsko in podporno ter je odvisno od izraženih simptomov pri posamezniku. Zaradi tega dajemo večji pomen preventivnim ukrepom preprečevanja okužbe. Pri pojavu perez ali ohromitve je potrebna zgodnja rehabilitacija s pomočjo ustrezne fizioterapije (6).

Rehabilitacija:

Raziskave, ki so zajele bolnike s posledicami KME, so dale naslednje rezultate:

- v primeru okužbe perifernega živčevja je trajna poškodba pogosta,
- zdravljenje poškodb zaradi KME lahko traja do 3 leta,
- nevrofiziološki testi nam pokažejo, ali je živčevje subklinično obsežno prizadeto,
- čim prej je potrebno začeti z rehabilitacijo KME, saj se s tem omogoči izboljšanje že v prvih letih, nato je potrebno nadaljevati z zdravljenjem. Če pa KME privede do paralize je potrebna redna fizioterapija (izboljša moč in gibljivost), ergoterapija (omogoča bolnikom, da ponovno osvojijo dnevne aktivnosti, kot so: osebna higiena, oblačenje) (21).

1.3.6 Osnovna laboratorijska diagnostika klopnega meningoencefalitisa

Zdravnik se na podlagi pregleda pacienta in opredelitve epidemioloških okoliščin (letni čas, zemljepisno območje, vbod klopa,...), kliničnih znakov in suma na klopni meningoencefalitis odloči za odvzem likvorja z likvorsko punkcijo in odvzem venske krvi (6).

V laboratoriju se opravijo osnovne biokemične, citološke in hematološke preiskave, kot so: organoleptični pregled likvorja, določanje številčne koncentracije Lkci z diferenciacijo, določanje številčne koncentracije eritrocitov v likvorju ter določanje koncentracije glukoze in beljakovin v likvorju. V krvi se opravi določanje koncentracije CRP in določanje koncentracije Lkci z diferenciacijo.

Najprej se opravi organoleptični pregled likvorja. V normalnih fizioloških razmerah je to brezbarvna bistra tekočina. Pri okužbi z virusom KME je likvor na izgled bister, redko moten, v njem določimo povečano koncentracijo Lkci (še zlasti v drugi fazi bolezni do $1000 \times 10^6/L$), prevladujejo mononuklearne celice (6). V likvorju opazimo povečano število limfocitov (limfocitna pleocitoza) kar v 64,5 % primerih (22). Koncentracija glukoze v likvorju je normalna ali zvečana nad 2,5 mmol/L, medtem ko so koncentracije pod 2,22 mmol/L že lahko pokazatelj bakterijskega meningitisa (23, 24). Koncentracija beljakovin v likvorju je povečana. Povečana koncentracija beljakovin je nad 0,45 g/L, kar je dokazano v 97 % primerih (23). Hitrost sedimentacije eritrocitov je lahko pospešena ali normalna (6).

Koncentracija Lkci v krvi je v prvi fazi znižana (levkopenija), medtem ko se v drugi fazi lahko pojavi levkocitoza (povečano število levkocitov), ki je pri okužbah najpogosteje posledica povečanega števila nevtrofilcev, ki se lahko povečajo tudi za 80 % (6, 25). CRP je pokazatelj vnetnega dogajanja v telesu, z njim spremljamo potek zdravljenja. Pri zdravih osebah je prisoten v zelo majhnih koncentracijah (do 5 mg/L), pri KME je koncentracija navadno normalna ali pa zasledimo le rahlo povečanje (6, 19, 26).

V serumu se pojavijo specifična protitelesa IgM in IgG proti virusu KME. IgM protitelesa, ki so pokazatelji zgodnje stopnje bolezni in so zanesljivi znak, da gre za akutno okužbo, so lahko v prvi fazi negativna ali pozitivna, medtem ko so v drugi fazi prisotna že pri vseh preiskovancih (19). V prvi fazi bolezni IgG protitelesa proti virusu KME niso prisotna, v drugi fazi bolezni pa se pojavijo tako v serumu kot tudi v likvorju (25, 26).

Poleg osnovnih citokemičnih, biokemičnih in seroloških metod se za dokaz povzročitelja uporabljata tudi PCR metoda (metoda pomnoževanja nukleinskih kislin) in osamitev virusa iz likvorja ali možganov z dokazom visokega titra specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumu ali likvorju. Protitelesa dokažejo z različnimi metodami: z ELISA (encimsko imunska metoda), IHA (inhibicija hemaglutinacije) in RVK (reakcija vezave komplementa) testom, z aglutinacijskim testom ali z določitvijo intratekalno nastalih specifičnih protiteles, ki nam pokaže razmerje med protitelesi v serumu in likvorju, to pa je zanesljiv dokaz virusne okužbe OŽ (6).

2 NAMEN

Klinično biokemične, citološke in hematološke preiskave v vzorcu likvorja in vzorcu krvi imajo ključni pomen pri dokazovanju okužbe z virusom KME. Laboratorijske značilnosti klopnega meningoencefalitisa se tekom bolezni spreminjajo, saj poteka značilno obolenje KME v dveh fazah. Namen naloge je ugotoviti, kakšna je diagnostična vrednost osnovnih biokemičnih in citoloških preiskav v likvorju in jih primerjati z rezultati KME in bakterijskih meningitisov, ki so podani v literaturi.

Preiskovancem, ki so bili zaradi suma na okužbo z virusom KME obravnavani na Kliniki za infektivne bolezni in vročinska stanja, bodo bili predhodno odvzeti vzorci likvorja in venske krvi v za to namenjene določene epruvete. Odvzeti bodo še dodatni vzorci venske krvi, katere bodo poslali v Mikrobiološki laboratorij na serološke preiskave.

Takoj po odvzemu likvorja in venske krvi bomo opravili osnovne laboratorijske preiskave, kot so: organoleptični pregled likvorja, določanje števila Lkci in Erci v likvorju, določanje koncentracije glukoze in beljakovin v likvorju, določanje koncentracije Lkci v krvi in določanje koncentracije CRP v krvi.

Ko bomo dobili vse rezultate, vključno z rezultati seroloških preiskav, bomo v našo raziskavo vključili le tiste preiskovance, ki bodo imeli serološko potrjeno okužbo z virusom KME. Prav tako, pa bomo v našo raziskavo vključili en vzorec bakterijskega meningitisa, katerega vrednosti bodo že podane. Izbrali bomo takšen vzorec bakterijskega meningitisa, pri katerem bodo rezultati laboratorijskih analiz najboljše izražali vse značilnosti bakterijskega meningitisa.

Rezultate osnovnih laboratorijskih preiskav bomo statistično ovrednotili in med seboj primerjali. Ugotavljali bomo, ali se rezultati analiz klopnega meningoencefalitisa razlikujejo od rezultatov analiz bakterijskega meningitisa, kot je navedeno v literaturi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 35 bolnikov, ki so bili obravnavani v ambulanti Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja in pri katerih je bila serološko potrjena diagnoza okužbe z virusom KME. Prav tako, pa smo v raziskavo vključili še en vzorec bakterijskega meningitisa, katerega vrednosti so bile že podane. Bolnikom sta bila za osnovne biokemične, hematološke, citološke in imunološke preiskave odvzeta vzorca likvorja in venske krvi .

Povprečna starost preiskovancev s KME je bila 51,2 let, z razponom od 15 do 78 let. 21 oseb je bilo moškega spola in 14 ženskega. Povprečna starost moških je bila 50 let, razpon je bil od 15 do 78 let. Povprečna starost žensk je bila 53 let, razpon je bil od 22 do 67 let.

Tabela V: Prikaz obravnavanih preiskovancev v naši skupini glede na spol in starost

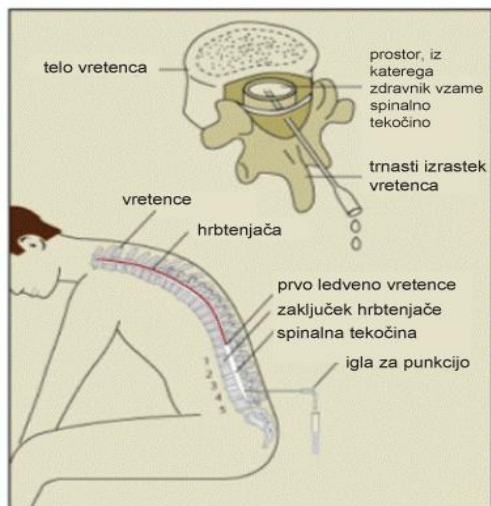
	Število	Delež glede na celoto	Najnižja starost	Najvišja starost
Moški	21	60 %	15	78
Ženske	14	40 %	22	67
Skupaj	35	100 %	/	/

3.2 Vzorci

Za dokazovanje virusa KME je bil potreben odvzem vzorcev likvorja in venske krvi, s katerimi smo opravili naslednje analize: v likvorju smo določali koncentracijo Lkci z diferenciacijo, koncentracijo Erci, koncentracijo glukoze in beljakovin; iz vzorca venske krvi smo določili koncentracijo CRP, koncentracijo Lkci in DKS.

- Likvor

Vzorci likvorja so bili odvzeti z lumbalno punkcijo. Lumbalna punkcija poteka tako, da zdravnik v sterilnih pogojih zabode s tanko iglo v spodnji del hrbtenjačnega kanala, pod točko, v kateri se konča hrbtenjača (v višini med 3. in 4. ali 4. in 5. ledvenim vretencem). Preiskovanec ob odvzemu vzorca leži ali sedi z usločenim hrbtom, kot je prikazano na sliki 9 (4).



Slika 9: Primer primernega mesta za lumbalno punkcijo

Likvor zberemo v predpisane likvorske epruvete, ki so plastične, prozorne in konične, s pokrovom z navojem. Praviloma mora biti likvor punktiran v tri zaporedne likvorske epruvete, ki so namenjene:

- prva za biokemične in imunološke analize,
- druga za mikrobiološke preiskave,
- tretja za štetje in diferenciranje levkocitov, štetje eritrocitov in citološke preiskave.

Vsako epruveto je potrebno opremiti z imenom in priimkom preiskovanca, datumom in uro likvorske punkcije, vrsto punktata glede na mesto punkcije in zaporedno številko likvorske frakcije. Pomembno je tudi, da mora biti vzorec likvorja zaradi možnih sprememb v sestavi le tega dostavljen v laboratorij najkasneje v eni uri po punkciji. V tem času stoji na sobni temperaturi, izjemoma lahko stoji od dve do tri ure na ledu (4).

- Kri

Za večino likvorskih preiskav je nujno potrebna primerjava s krvnimi analizami, zato potrebujemo tudi krvni vzorec. Venska kri mora biti odvzeta po standardnem postopku za odvzem le te, in sicer po točno določenih zaporednih opravilih v predpisane epruvete. Najbolje je odvzeti vensko kri 1–2 uri pred likvorsko punkcijo. Vsaka epruveta mora biti označena z imenom in priimkom preiskovanca, rojstnimi podatki, identifikacijsko številko ter datumom in časom odvzema krvi (4).

V skladu z dobro laboratorijsko prakso smo z likvorjem in krvnimi vzorci ves čas ravnali kot s potencialno kužnim materialom.

3.3 Analizne metode

Vse preiskave, ki smo jih opravili, so bile izvedene na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, v Laboratoriju za analitiko specialnih telesnih tekočin. Vse preiskave so bile izvedene po standardnih operativnih postopkih.

3.3.1 Organoleptični pregled likvorja

Likvor smo najprej organoleptično pregledali, tako da smo ocenili njegove organoleptične lastnosti: motnost, eritrokromijo in ksantokromijo.

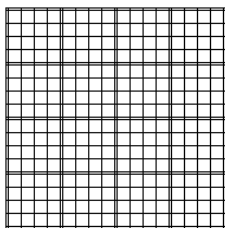
- **Motnost:** normalno je likvor bistra brezbarvna tekočina, le novorojenčki ga imajo obarvanega rahlo rumeno. Motnost likvorja je lahko posledica povečane številčne koncentracije levkocitov (več kot $200 \times 10^6/L$), predvsem nevtrofilnih granulocitov, eritrocitov (več kot $400 \times 10^6/L$), prisotnosti mikroorganizmov (bakterij, gliv), kontrastnih sredstev, povečane koncentracije beljakovin ali maščob. Stopnjo motnosti likvorja smo ocenili od 0 do 4, in sicer glede na možnost branja teksta skozi tekočino. 0 pomeni bister likvor, pri 1 smo v primerjavi z vodo opazili motnost, pri stopnji 2 nam je motnost še dopuščala branje teksta skozi epruveto, stopnja 3 že ovira branje teksta skozi epruveto, medtem ko pri stopnji 4 teksta nismo videli.
- **Eritrokromija:** je rožnato obarvan likvor, ki je lahko posledica bolezenske krvavitve v likvorske prostore (likvor v vseh frakcijah enakomerno rjav) ali posledica poškodbe žile ob punkciji (prve frakcije likvorja so bolj krvave kot naslednje). Ocenili smo jo od 0 do 3, pri čemer pomeni, da je stopnja 3 močno rožnato obarvan likvor. V primeru centrifugiranja je supernatant običajno bister, test prisotnosti hemoglobina pa je negativen. Hemoglobin dokažemo v centrifugiranem likvorju s pomočjo urinskega reagentnega traka (Multistix 10 SG), katerega vrednost ocenimo iz skale za dokaz hemoglobina od 0 do 3.
- **Ksantokromija:** likvor smo centrifugirali in opazovali obarvanost supernatanta. Stopnjo smo ocenjevali v primerjavi z belo podlago od 0 do 3. 0 pomeni brezbarven likvor, pri 1 je likvor blede rumen, pri stopnji 2 je intenzivno rumen, medtem ko je pri stopnji 3 obarvan že oranžno do rjavo. Ksantokromijo lahko povzroči več dejavnikov: visoka koncentracija beljakovin, prisotnost bilirubina

(rumen), prisotnost oksihemoglobina (oranžen), povišana koncentracija karotenov v krvi in melanin v likvorju (rjav).

3.3.2 Določanje koncentracije levkocitov in eritrocitov v likvorju

V likvorju zdravih oseb so prisotni le limfociti (70–100 %) in monociti (0–30 %) ter posamezne epindialne, horodialne ali subarahnoidalne celice. Pri različnih obolenjih OŽ se v likvorju lahko pojavijo tudi druge celice, kot so: granulociti (nevtrofilni, eozinofilni, zelo redko bazofilni), Erci, plazmatke, makrofagi in maligne celice.

Princip: Likvorske Lkci vitalno obarvamo s kislom raztopino fenolnega fuksina v razmerju 10 + 1 (kar pomeni redčitev 10/11) in jih nato preštejemo in diferenciramo v Fuchs-Rosenthalovi komori (slika 10) ob uporabi svetlobnega mikroskopa pri 200- do 400-kratni povečavi.



Slika 10: Fuchs-Rosenthalova komora

Reagenti, pribor in aparature: uporabili smo raztopino fenolnega fuksina in fiziološko raztopino (9 g/L NaCl). Za izvedbo celotnega postopka smo uporabili: epruveto, 50 μ L pipeto, mikropipeto, Fuchs-Rosenthalovo komoro, valjčni mešalec, mikroskop in števec za diferenciranje celic.

Postopek določanja koncentracije Lkci:

- V epruveto smo s pipeto odmerili 20 μ L raztopine fenolnega fuksina in 200 μ L dobro premešanega likvorja,
- na valjčnem mešalcu smo vzorce mešali 5–10 minut, da so se Lkci obarvali,
- s pripravljeno suspenzijo smo napolnili Fuchs-Rosenthalovo komoro,
- počakali smo nekaj minut, da so se celice umirile in sedle na dno komore,

- Lkci smo prešteli na celotni površini komore.

V primeru, da je bila številčna koncentracija Lkci zelo visoka (nad 15 celic v eni vrstici komore), smo prešteli celice na površini 1/16 komore (1 vrsta) in dobljeno število množili s 16.

Pri podajanju številčne koncentracije upoštevamo površino komore, globino komore in redčitev (10/11). Rezultat navedemo tako, da število, ki smo ga prešteli na celotni površini komore (16 x 16), delimo s 3 in dobljeni rezultat izrazimo s celim številom v $10^6/L$.

Določanje eritrocitov

Koncentracijo eritrocitov določamo v nativnem vzorcu likvorja. Erce smo v Fuchs-Rosenthalovi komori prešteli na enak način kot levkocite. Rezultat izrazimo prav tako kot število Erci x $10^6/L$. V primeru, da je likvor zelo krvav, ga razredčimo (10-krat ali 100-krat) s fiziološko raztopino in to redčitev upoštevamo pri izračunu.

3.3.3 Določanje koncentracije levkocitov in diferencialna krvna slika v krvi na hematološkem analizatorju Coulter HMx

Hematološki analizator Coulter HMx (slika 11) je kvantitativen avtomatski hematološki analizator. Uporabljamo ga za štetje celic, merjenje njihovih velikosti in za diferenciacijo Lkci v podskupine.

Princip: Analizator izmeri 4 parametre direktno (številčno koncentracijo Lkci, Erci, Trci in njihove volumne in fotometrično izmeri koncentracijo Hb). Iz histograma dobimo 3 parametre (MCV–srednji volumen eritrocitov, RDW–širina razporeditvene krivulje eritrocitov, MPV–srednji volumen trombocitov). Z izračunom dobimo naslednje parametre: Ht–hematokrit–volumen stisnjenih eritrocitov, MCH–srednja količina hemoglobina v eritrocitu, MCHC–srednja koncentracija hemoglobina v eritrocitu. Poleg tega analizator izvede še diferenciacijo Lkci.

Princip štetja in merjenja celic je zaznavanje in merjenje sprememb električnega upora, ko celice v prevodni tekočini prehajajo skozi majhno odprtino. Vsaka celica, suspendirana v prevodni tekočini, predstavlja izolator. Ob prehodu skozi odprtino v kapilari se za trenutek zviša upornost v električni povezavi med dvema elektrodama, ki sta nameščeni na obeh

straneh odprtine. Število impulzov predstavlja število delcev, velikost impulzov pa je proporcionalna volumnu celic.

Diferencialna analiza Lkci in klasifikacija pa slonita na istočasni meritvi volumna Lkci, visoko frekvenčne prevodnosti in odboja laserske svetlobe (VCS tehnologija). Na ta način se določijo vsebinska, volumenska in strukturna lastnost vsake celice.

Štetje celic poteka v merilni kapilari z odprtino, ki je nameščena v merilni komori. Štetje poteka vedno pod enakimi optimalnimi pogoji, ki so določeni z višino vakuuma, s premerom odprtine na števeni kapilari in časom, v katerem štetje poteka. Odprtine imajo določen premer kapilare, in sicer tem manjši ko je, tem natančneje bo štetje, saj obstaja možnost, da gre skozi odprtino več celic hkrati. Analizator zato vse te pogoje upošteva pri rezultatu, ki se korigira. Pri štetju Lkci števec zaznava vse delce, ki imajo večji volumen od 35 fL (femto liter), pred štetjem pa se s hemolizo odstranijo vsi Erci, razen eritroblastov.



Slika 11: Hematološki analizator Coulter HMx

Ročno diferenciranje Lkci v krvnem razmazu

Mikroskopsko DKS smo pripravili vedno, kadar so bili rezultati analiz na hematološkem analizatorju nezanesljivi oziroma nejasni (opozorila, ki jih izda analizator). Najprej smo pripravili krvni razmaz, ga obarvali po Pappenheimu in posušili na zraku. Nato smo diferencirali pod imerzijsko povečavo (1000x). Pregledali smo 100 Lkci ter jih diferencirali na posamezne vrste Lkci. Mikroskopirali smo po tako imenovanem cik-cak sistemu, pri čemer smo vedno ostali v tankem delu krvnega razmaza.

Barvanje po Pappenheimu:

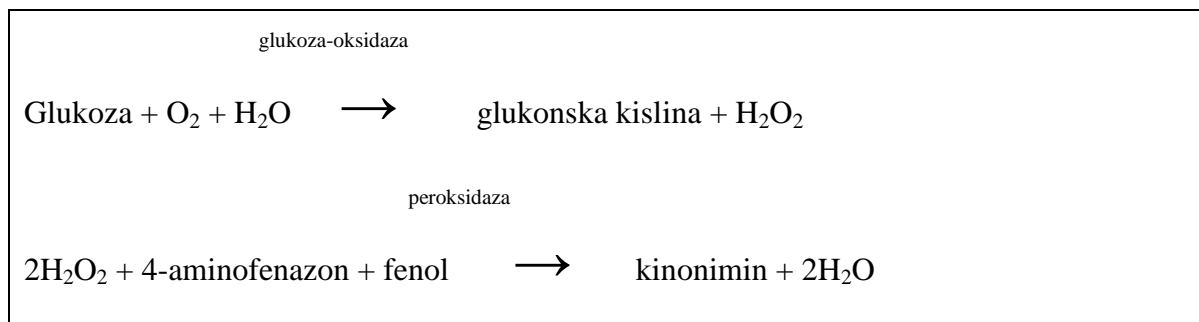
- posušen razmaz potopimo za 5 minut v posodico z nerazredčenim barvilom po May-Grunwaldu,
- nato prenesemo preparat brez spiranja za 15 minut v razredčeno raztopino po Giemsi (4 %),

- obarvan preparat vzamemo iz posodice, speremo s pufrom ter pustimo, da se posuši na zraku.

3.3.4 Določanje koncentracije glukoze v likvorju z glukoza-oksidadno metodo

Glukoza-oksidadno metodo uvrščamo med encimske metode. Koncentracijo glukoze določamo v centrifugatu svežega likvorja, saj se glukoza pod vplivi mikroorganizmov in levkocitnih encimov hitro razgrajuje. Postopek je specifičen za β -D-glukozo. Koncentracija glukoze v likvorju je odvisna od koncentracije glukoze v krvi, normalno pa v njem znaša 60–80 % koncentracije krvne glukoze.

Princip (slika 12): Glukoza-oksidadza oksidira glukozo v glukonsko kislino, kjer nastaja vodikov peroksid. Le ta ob prisotnosti peroksidaze oksidira brezbarvni kromogen v rdečevijolično obarvan kinonimin, katerega absorbanco merimo spektrofotometrično.



Slika 12: Princip določanja glukoze z glukoza-oksidadno metodo

Reagenti, pribor in aparature: Za določanje koncentracije glukoze v likvorju smo z glukoza-oksidadno metodo uporabili glukozni reagent, ki vsebuje: fosfatni pufer 50 mmol/L (pH=7), MOPS pufer 50 mmol/L (pH=7), fenol, 4-aminofenazon, glukoza-oksidadzo, peroksidazo. Pribor in aparature, ki smo jih uporabili, so bile: 2 mL pipeta, 20 μ L pipeta, kivete, spektrofotometer in termostat 37 °C.

Postopek določanja:

Najprej smo pripravili vzorec tako, da:

- smo vzorec 10 minut centrifugirali pri 3000 vrtljajih/minuto,

- v nadaljevanju analize smo uporabili le supernatant.

Glukozni reagent, ki smo ga uporabili, smo predhodno 10 minut inkubirali pri 37 °C.

- Nato smo si pripravili tri vzorce: slepi vzorec, standardni vzorec in vzorec likvorja (tabela VI);

Tabela VI: Prikaz odmerjanja vzorcev pri določanju koncentracije glukoze

	Slepa	Standard	Vzorec
Standard	/	20 µL	/
Vzorec	/	/	20 µL
Glukozni reagent	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

- vse tri epruvete smo takoj dobro premešali in 10 minut inkubirali pri 37 °C,
- na koncu smo pri valovni dolžini 500 nm (nano meter) izmerili absorbanco na UV 1200 SHIMADZU spektrofotometru,
- rezultate smo odčitali iz umeritvene krivulje, ki je shranjena v spektrometru,
- koncentracijo glukoze smo izračunali po naslednji formuli in podali rezultate v mmol/L:

$$\text{mmol/L} = \frac{\text{A vzorca}}{\text{A standardnega dodatka}} \times 5,55.$$

3.3.5 Določanje koncentracije beljakovin v likvorju z benzentonijevim kloridom

Koncentracija beljakovin je nižja od koncentracije serumskih proteinov in fiziološko narašča od ventrikularnega preko cisternalnega do lumbalnega likvorja za približno 15–20 %. Pri sumu na obolenja OŽ lahko zaznamo zvišane vrednosti koncentracij beljakovin v likvorju, zato je določanje koncentracije beljakovin v njem obvezno. Lahko pa je porast koncentracije beljakovin tudi posledica poškodbe žile ob punkciji in prisotnosti plazemskih beljakovin v likvorju.

Princip: Beljakovine reagirajo v alkalnem mediju NaOH/Na₂EDTA z benzentonijevim kloridom. Nastane motnost, ki je sorazmerna koncentraciji beljakovin v vzorcu. Motnost merimo spektrofotometrično. Absorbanco izmerimo pri valovni dolžini 450 nm na spektrofotometru UV 1200 (SHIMADZU).

Reagenti, pribor in aparature: Pri določanju koncentracije beljakovin smo uporabili naslednje reagente: raztopino NaOH/Na₂EDTA (0,5 mol/L NaOH v 33 mmol/L Na₂EDTA; 20 g NaOH in 12,3 g Na₂EDTA raztopimo v 1000 mL destilirane vode), raztopino benzentonijevega klorida (2,0 benzentonijevega klorida raztopimo v 1000 mL destilirane vode) in standardno raztopino. Da smo preiskavo izvedli, smo potrebovali še: UV-1200 spektrofotometer (SHIMADZU), kivete, dispenzerja in 100 µL pipeto.

Postopek določanja:

Najprej smo pripravili vzorec:

- če je bil vzorec na pogled krvav, moten ali če so bili prisotni Erci, smo ga 10 minut centrifugirali pri 2000 vrtljajih/minuto,
- nato smo pripravili standardni vzorec in vzorec likvorja (tabela VII),

Tabela VII: Prikaz odmerjanja vzorcev pri določanju koncentracije beljakovin

	Standard	Vzorec
Standard	0,1 mL	/
Vzorec	/	0,1 mL
NaOH/Na ₂ EDTA	4,0 mL	4,0 mL
Benzentonijev klorid	1,0 mL	1,0 mL

- zatem smo obe pripravljene raztopini takoj dobro premešali (10-krat),
- absorbanco smo izmerili točno po 10 minutah pri valovni dolžini 450 nm.

V analizatorju je bila shranjena umeritvena krivulja, iz katere nam je analizator glede na izmerjeno absorbanco podal koncentracijo beljakovin v vzorcih likvorja v g/L.

3.3.6 Določanje koncentracije C-reaktivnega proteina s QuikRead aparatom

Metodo uporabimo za kvantitativno določanje CRP v polni krvi s pomočjo QuikRead aparata (slika 13). CRP je protein akutne faze okužbe, ki je pri zdravih ljudeh v krvi prisoten v nizkih koncentracijah. QuikRead CRP je imunski turbidimetrični test, ki temelji na lateks delcih, na katera so vezana protitelesa proti človeškemu CRP.

Princip: Na mikrodolge vezana monoklonska protitelesa proti človeškemu CRP reagirajo s CRP v krvnem vzorcu, kar povzroči nastanek motnosti. Intenziteto motnosti izmerimo s QuikRead fotometrom. Test se izvede v kiveti. Reagenti so predhodno kalibrirani, kalibracijska krivulja je za vsako specifično serijo reagentov kodirana na magnetni kartici v vsakem priloženem kompletu. Analizator pri valovni dolžini 340 nm sam odčita rezultat iz kivete. Rezultate podamo v mg/L.



Slika 13: Komplet QuikRead za določanje koncentracije CRP

Reagenti, pribor in aparature: Za določanje koncentracije CRP smo uporabili komplet QuikRead CRP, ki vsebuje: 50 zamaškov s CRP-reagentom, pufer 120 mL, 50 kivet, magnetno kartico in 50 kapilar (20 μ L z iztisnimi vstavki). Da smo preiskavo izvedli, smo potrebovali: analizator QuikRead, dispensor QuikRead, 1 mL in 20 μ L pipeto.

Postopek določanja:

- V kiveto smo najprej odmerili 1 mL pufra,
- nato smo vanjo s pomočjo kapilare dodali 20 μ L polne krvi,
- kiveto smo zaprli s predpisanim zamaškom, jo pretresli, vendar je pri tem nismo obračali,
- slepi vzorec smo izmerili v 40 sekundah.
- Dodali smo suhi reagent in kiveto spet premešali s hitrim obračanjem,
- kiveto smo postavili nazaj na merilno enoto,

- analizator nam je sam izmeril koncentracijo CRP.
- V 2 minutah se nam je na zaslonu analizatorja izpisala vrednost v mg/L.
- Ko smo kiveto po končani analizi odstranili iz merilnega območja, je analizator izvedel samokontrolo.
- V primeru, da samokontrola ni bila uspešna, nismo upoštevali predhodnega rezultata in smo morali analizo še enkrat opraviti.

3.4 Referenčne vrednosti

Referenčne vrednosti so namenjene preverjanju dobljenih rezultatov laboratorijskih preiskav. Z njimi ugotavljamo morebitne odklone od normalnih vrednosti. Kadar rezultat analize prestopi predpisano referenčno vrednost, nam da informacijo o možnih bolezenskih vzrokih. Referenčne vrednosti se med seboj razlikujejo na več načinov: od vrste vzorca (kri, likvor, urin, blato,...), od vrste uporabljenega analizatorja, od pogojev dela (čas in način odvzema), od starosti in spola preiskovanca. V tabeli VIII in tabeli IX so podane predpisane referenčne vrednosti posameznih parametrov v krvi in likvorju.

Tabela VIII: Referenčne vrednosti v krvi

Krvna slika	
Lkci	4,0–10,0 x 10 ⁹ /L
CRP v polni krvi	Do 5,0 mg/L

Tabela IX: Referenčne vrednosti v likvorju

Likvor	
Lc-Glukoza	2,5–3,9 mmol/L
Lc-Beljakovine	0,15–0,45 g/L
Lc-Lkci	do 5,0 x 10 ⁶ /L
Lc-Erci	0 x 10 ⁶ /L
Hb	0 oz. negativno
Organoleptični izgled	bistra brezbarvna tekočina

3.5 Statistične metode za obdelavo podatkov

Dobljene rezultate smo statistično obdelali s programom Microsoft Office Excel. Pri tem smo izračunali aritmetično sredino (povprečje) in standardno deviacijo, določili smo najnižjo in najvišjo vrednost in rezultate primerjali z rezultati v literaturi.

Vzorci KME smo prav tako primerjali z rezultati enega vzorca bakterijskega meningitisa.

4 Rezultati

V raziskavo o laboratorijskih značilnostih KME smo vključili 35 pacientov. V tabeli X so prikazani rezultati analiz, ki smo jih obravnavali, v tabeli XII ter XIII, pa so prikazani rezultati, ki smo jih statistično obdelali. Prav tako, pa smo v našo raziskavo vključili en vzorec bakterijskega meningitisa, katerega nismo sami izmerili, ampak so bile vrednosti že podane (tabela XI).

Tabela X: Prikaz rezultatov analiz KME

ŠT.	Starost	Organoleptični pregled	k-LKC	CRP	Lc-LKCI	Lc-LY	Lc-SEG	Lc-MO	Lc-B	Lc-GLU
1	66	Brezbarven, motnost 0	16,8	17	107	75	27	5	0,46	3,3
2	40	Brezbarven, motnost 0	8,5	6	138	133	5	0	0,99	2,6
3	44	Brezbarven	12,5	3	36	14	20	2	0,81	3,1
4	55	Brezbarven, motnost 0	9,9	35	263	205	53	5	1,14	2,3
5	53	Brezbarven	8,5	3	13	5	7	1	0,77	3,2
6	60	Brezbarven, motnost 0	12,4	13	107	64	27	16	0,67	3,2
7	73	Brezbarven, motnost 0	6,7	10	126	39	79	8	1,23	3,5
8	56	Brezbarven, motnost 0	11,3	9	38	20	13	5	0,64	2,0
9	15	Brezbarven, motnost 0	7,6	3	28	6	22	0	0,41	3,0
10	48	Brezbarven, motnost 0	10,1	3	127	37	69	21	0,58	2,1
11	77	Brezbarven, motnost 0	7,9	3	52	26	23	3	0,42	2,6
12	50	Motnost 1, rahlo rjav	12,4	84	496	325	144	27	1,07	2,4
13	51	Brezbarven, motnost 1	8,2	20	219	144	64	11	1,14	2,7
14	52	Rahlo krvav, motnost 2	5,5	6	91	81	3	7	1,35	2,3
15	18	Brezbarven, motnost 0	10,5	8	107	91	16	0	0,64	3,1

ŠT.	Starost	Organoleptični pregled	k-LKC	CRP	Lc-LKCI	Lc-LY	Lc-SEG	Lc-MO	Lc-B	Lc-GLU
16	32	Brezbarven	8,5	3	59	27	32	0	0,68	2,9
17	47	Rahlo rumen, motnost 1	12,4	8	37	28	8	1	0,56	2,8
18	67	Brezbarven	5,1	3	65	16	48	1	0,55	3,4
19	59	Brezbarven	10,8	97	293	213	48	32	1,52	3,2
20	78	Brezbarven, motnost 0	7,7	136	58	44	1	13	0,45	2,9
21	74	Brezbarven, motnost 0	9,1	39	111	85	16	10	0,90	2,4
22	62	Rahlo rumen, motnost 1	6,6	3	52	38	12	2	0,59	2,3
23	48	Brezbarven, motnost 0	7,9	3	80	48	32	0	0,79	2,6
24	58	Brezbarven, motnost 0	2,0	3	1	1	0	0	0,30	2,8
25	22	Brezbarven	10,3	3	161	32	119	10	0,63	3,8
26	61	Brezbarven, motnost 0	9,5	4	74	29	44	1	0,97	2,9
27	67	Brezbarven, motnost 0	6,4	43	27	20	4	3	1,02	3,0
28	37	Brezbarven, motnost 0	7,2	14	86	75	11	0	1,40	2,7
29	49	Brezbarven, motnost 0	10,2	3	20	15	2	3	1,10	4,3
30	54	Brezbarven, motnost 0	6,6	13	60	56	3	1	0,65	3,1
31	27	Brezbarven, motnost 0	1,9	81	1	1	0	0	0,30	2,9
32	41	Brezbarven, motnost 0	11,8	3	128	11	117	0	0,47	3,0
33	30	Brezbarven	14,1	10	165	37	123	1	0,72	3,0
34	60	Brezbarven, motnost 0	9,1	3	72	48	16	8	0,89	3,2
35	61	Brezbarven, motnost 0	8,8	6	44	30	12	2	0,95	3,9

(enote za posamezne parametre so: K-Lkci = $\times 10^9/L$, Lc-B = g/L, Lc-Glu = mmol/L, CRP = mg/L)

Tabela XI: Primer rezultatov analiz vzorca pri bakterijskem meningitisu

Starost	Organoleptični pregled	k-LKCI	CRP	Lc-LKCI	Lc-Ly	Lc-seg	Lc-Mo	Lc-B	Lc-GLU
20	Rahlo rumen, motnost 4	23,4 x 10 ⁹ /L	268 mg/L	19733 x 10 ⁶ /L	533 x10 ⁶ /L	19200 x10 ⁶ /L	/	3,68 g/L	0,1 mmol/L

Tabela XII: Prikaz aritmetičnih sredin, standardnih deviacij (SD) ter najnižjih in najvišjih vrednosti KME

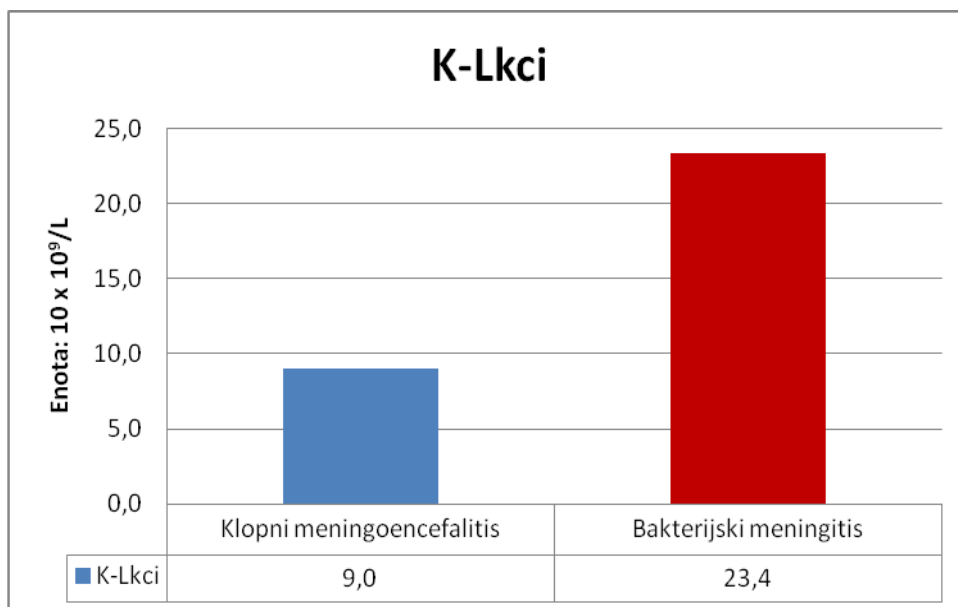
	STAROST	k-LKC	CRP	lc-LKC	lc-LY	lc-SEG	lc-MO	lc-B	lc-GLU
Aritmetična sredina	51,2	9,0	20,0	101, 2	61	35	6	0,79	2,9
SD	16,2	3,1	31,6	96,8	69,1	39,1	7,9	0,3	0,5
Najnižja in najvišja vrednost	15–78	1,9– 16,8	3–136	1–496	1–325	0–144	0–32	0,30– 1,52	2,0–4,3

Aritmetično sredino in standardno deviacijo (SD) smo izračunali samo pri bolnikih klopnega meningoencefalitisa (tabela XII), saj pri vzorcu bakterijskega meningitisa le tega ni možno izračunati, ker imamo podan samo en vzorec. SD nam pove odklon posameznih podatkov (\pm) od aritmetične sredine.

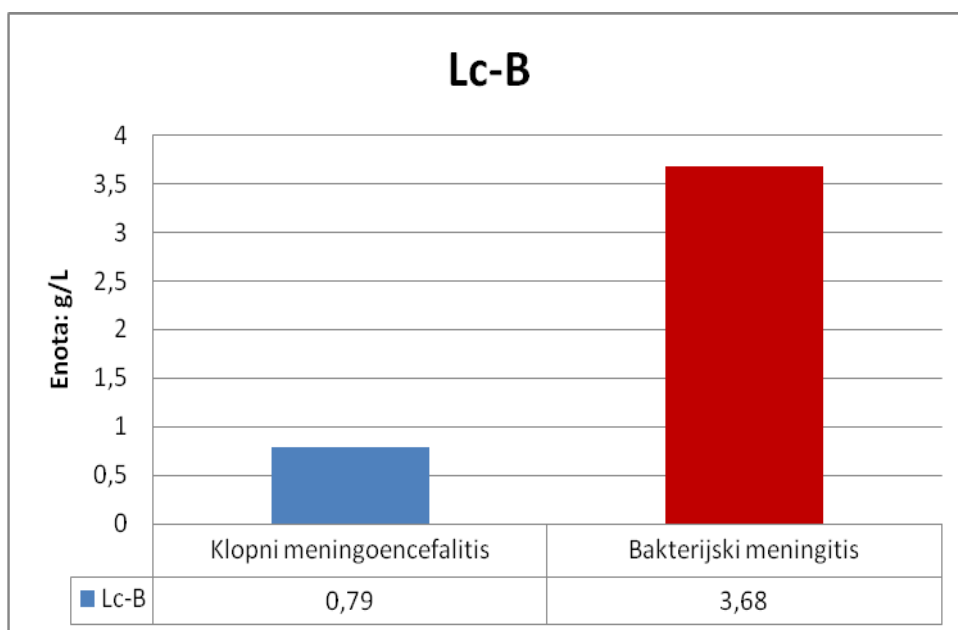
Tabela XIII: Primerjava naših rezultatov KME z referenčnimi vrednostmi

Parameter	Referenčne vrednosti	Vrednosti pri KME (povprečje)	Za koliko % se povečajo/zmanjšajo vrednosti od referenčnih vrednosti
k-Lkci	4,0–10,0 x 10 ⁹ /L	9,0 x 10 ⁹ /L	v okviru osrednjih referenčnih vrednosti
CRP	Do 5 mg/L	20,0 mg/L	povečano za \approx 400 %
Lc-Lkci	Do 5 x 10 ⁶ /L	101,2 x 10 ⁶ /L	povečano za \approx 2000 %
Lc-Glukoza	2,5–3,9 mmol/L	2,9 mmol/L	v okviru osrednjih referenčnih vrednosti
Lc-beljakovine	0,15–0,45 g/L	0,79 g/L	povečano za 170–180 %

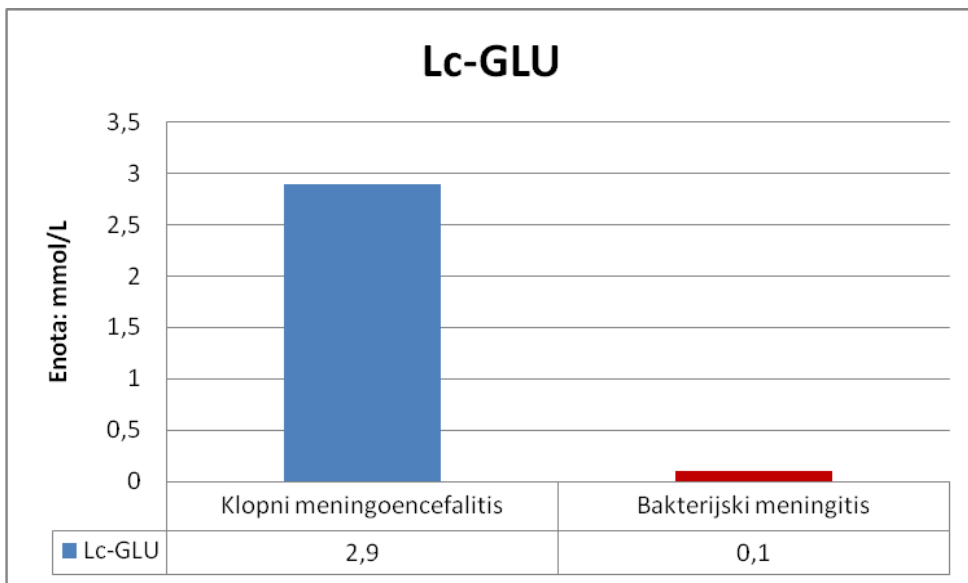
Na sliki 14, 15, 16 in 17 so prikazane razlike v koncentracijah različnih parametrov med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom. Na sliki 18 pa so prikazane razlike za posamezne vrste Lkci v likvorju med klopnim meningoencefalitisom in bakterijskim meningitisom.



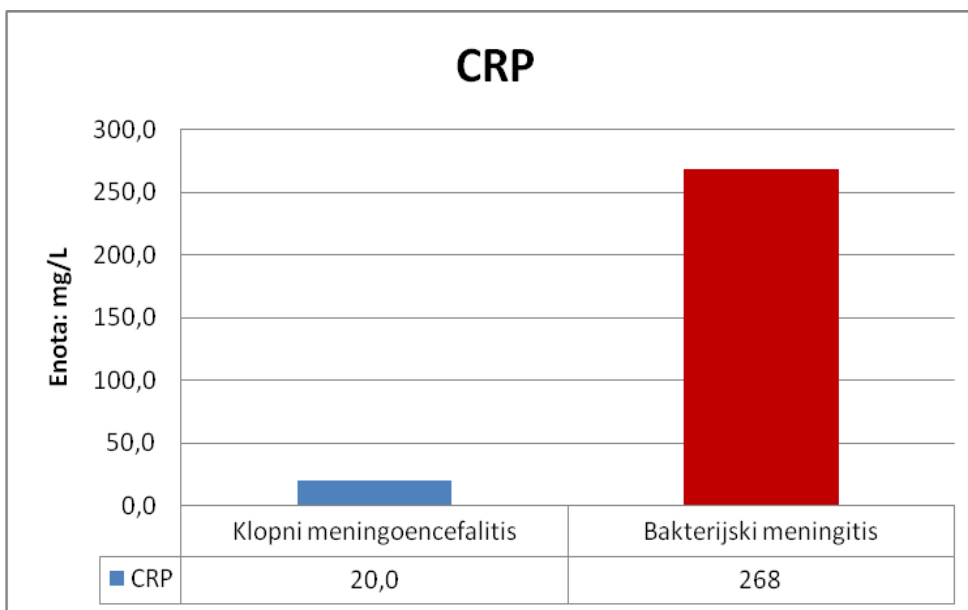
Slika 14: Prikaz razlik v koncentraciji K-Lkci med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom



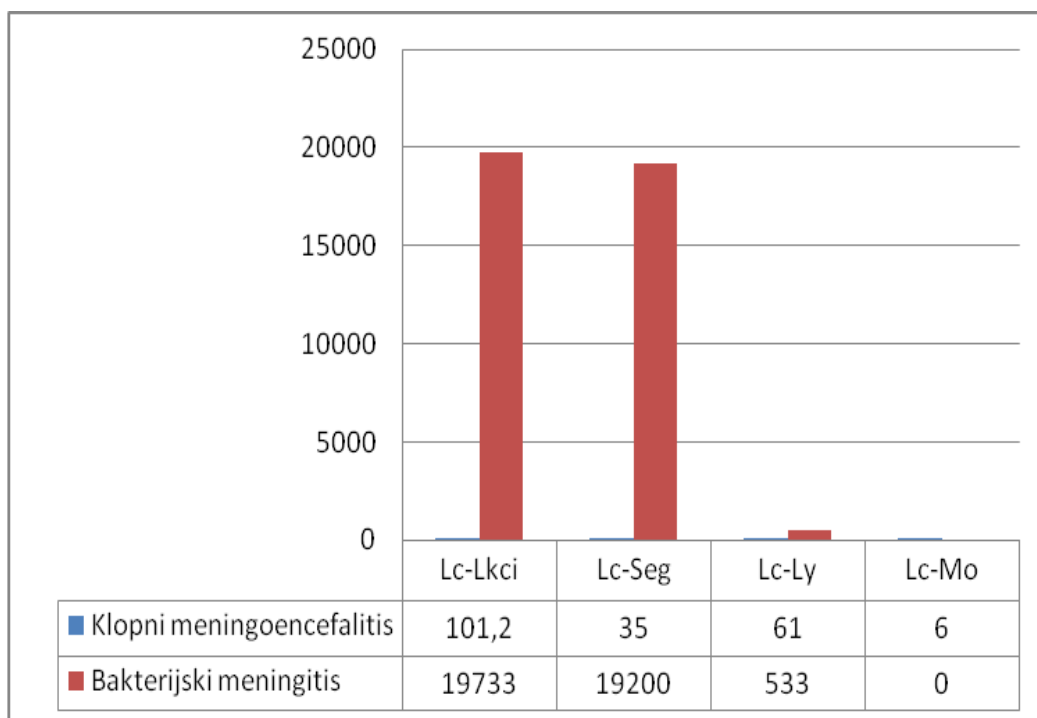
Slika 15: Prikaz razlik v koncentraciji Lc-B med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom



Slika 16: Prikaz razlik v koncentraciji Lc-GLU med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom



Slika 17: Prikaz razlik v koncentraciji CRP med bolniki s klopnim meningoencefalitisom in enim bolnikom z bakterijskim meningitisom



Slika 18: Prikaz razlik za posamezne vrste levkocitov v likvorju med klopnim meningoencefalitisom in bakterijskim meningitisom (enota za vse parametre je: $\times 10^6/L$)

5 Razprava

Kot smo omenili na začetku, poznamo več vrst meningitisov, vendar smo se v diplomski nalogi osredotočili na diagnostiko klopnega meningoencefalitisa. To bolezen OŽ povzroča virus, ki ga prenaša klop vrste *Ixodes ricinus* (6).

Obravnavali smo 35 bolnikov in ugotovili, da lahko klopni meningoencefalitis prizadene tako moške, ki jih je bilo 21 (60 %) kot tudi ženske, ki jih je bilo 14 (40 %). V večini literature se navaja dejstvo, da je pri klopnem meningoencefalitisu med obolelimi več moških kot žensk (6), kar se je pokazalo tudi v naši raziskavi. Povprečna starost bolnikov je bila 51 let, v razponu od 15 do 78 let. Starostni razpon za moške je bil od 15 do 78, medtem ko je bil razpon za ženske od 22 do 67 let. Število obolelih iz leta v leto niha. Pojavljanje obolenja je odvisno od vremenskih dejavnikov, ki vplivajo na biološko aktivnost klopov in na populacijo malih gozdnih sesalcev. Značilni potek klopnega meningoencefalitisa poteka v dveh fazah. Klinične oblike so odvisne od stopnje in lokalizacije prizadetosti osrednjega živčevja. Simptomi klopnega meningoencefalitisa so velikokrat blažji kot pri bakterijskem meningitisu (6).

Pri bolnikih s KME in bakterijskim meningitisom smo s primerjavo vseh preiskav v likvorju in v krvi ugotovili, da je razlika že v samem povzročitelju, saj KME povzroča virus, medtem ko bakterijski meningitis povzročajo bakterije (6). Klopni meningoencefalitis in bakterijski meningitis se med seboj razlikujeta tudi v samem poteku bolezni in načinu zdravljenja. Značilne razlike pa opazimo tudi pri rezultatih laboratorijskih analiz.

Že pri organoleptičnem pregledu likvorja smo ugotovili razliko med KME in bakterijskim meningitisom. Pri klopnem meningoencefalitisu je likvor bister, le redko moten, kar smo dokazali tudi v raziskavi, medtem ko je likvor pri bakterijskem meningitisu moten ali celo gnojen (6). Tudi naš vzorec bakterijskega meningitisa je bil na pogled rahlo rumen, z oceno motnosti 4 (skozi epruveto nismo videli besedila). Pri preiskavi vzorcev klopnega meningoencefalitisa je bilo devetindvajset vzorcev (82,9 %) brezbarvnih oz. bistrnih. Pri dveh (5,7 %) vzorcih je bil likvor na pogled rahlo rumen, z motnostjo 1, en vzorec (2,9 %) je bil rahlo krvav in imel oceno motnosti 1 (tu smo ugotovili, da je bila motnost prisotna

zaradi eritrocitov), drugi (2,9 %) je bil brezbarven, z motnostjo 1, spet tretji (2,9 %) je imel oceno motnosti 2, bil je rahlo krvav, zadnji (2,9 %) pa je dosegel oceno motnosti 0 (likvor je bil bister), vendar je bil obarvan rahlo rumeno.

V primeru suma bakterijskega meningitisa se opravi še bakteriološki sediment likvorja in se pregleda pod mikroskopom. Ker pa analiza bakteriološkega sedimenta v primeru bakterijskega meningitisa ni vedno pozitivna, se za končno potrditev bakterijske okužbe opravi še izolacija bakterije iz likvorja (6). Za bakterijski meningitis je značilno, da je večina parametrov povečanih, izjema je le koncentracija glukoze v likvorju, ki je značilno znižana (6).

Pri naši skupini bolnikov s KME je bila izračunana povprečna vrednost številčne koncentracije levkocitov v likvorju $101,2 \times 10^6/L$ (območje od 1 do $496 \times 10^6/L$), medtem ko so v raziskavi Jereba in sodelavcev določili večjo povprečno koncentracijo levkocitov v likvorju— $160 \times 10^6/L$ (23). Vzrok bi lahko bila višja starost bolnikov kot pri naši raziskavi. Pri dvaintridesetih vzorcih (91,4 %) je bila številčna koncentracija levkocitov v likvorju povečana, pri treh (8,6 %) pa je bila koncentracija normalna. Tu bi izpostavila dva primera, in sicer 58- in 27-letna bolnika s številčno koncentracijo levkocitov v likvorju $1 \times 10^6/L$, kar kaže na normalno koncentracijo levkocitov v likvorju. Domnevamo, da sta bila lahko bolnika še v prvi fazi bolezni, ko število levkocitov v likvorju še ni nujno povečano. Haglund in Günther (19) sta navedla podatek, da je imelo sedemindvajset od petinosemdesetih bolnikov (32 %) število levkocitov nad $100 \times 10^6/L$, medtem ko je imelo v naši raziskavi štirinajst od petintridesetih (40 %) bolnikov koncentracijo levkocitov v likvorju nad $100 \times 10^6/L$. Pri bakterijskem meningitisu se številčna koncentracija levkocitov v likvorju močno poveča (koncentracija je nad $1000 \times 10^6/L$, pri tem prevladujejo nevtrofilni granulociti). V našem primeru je bila koncentracija levkocitov v likvorju pri bakterijskem meningitisu $19733 \times 10^6/L$, prevladovali so segmentirani granulociti ($19200 \times 10^6/L$). Pri KME je značilno rahlo povečanje (6), s prevladovanjem limfocitov (22).

Številčna koncentracija levkocitov v krvi je pri KME nižja kot pri bakterijskem meningitisu, kar smo dokazali s primerjanjem vzorcev KME ($9,0 \times 10^9/L$) z vzorcem bakterijskega meningitisa (rezultat vzorca bakterijskega meningitisa je bil $23,4 \times 10^9/L$).

Trinajst bolnikov s KME od petintridesetih (37,1 %) je imelo v periferni krvi levkocitozo (povečano število levkocitov), kar je manj, kot je navedeno v objavljenem članku Jereba in sodelavcev, kjer so obravnavali hujšo obliko poteka KME in kjer so dobili levkocitozo pri enaindvajsetih od triintridesetih bolnikov (64 %) (23). Medtem ko je bila koncentracija levkocitov v krvi pri dvajsetih bolnikih (57,1 %) normalna, je bila pri dveh vzorcih (5,8 %) znižana, kar kaže predvsem na virusno okužbo (5). Vzorec 24 in 31 imata v periferni krvi prisotno levkopenijo ($2,0 \times 10^9/L$ in $1,9 \times 10^9/L$), ki je značilna za prvo fazo bolezni, saj takrat v likvorju še ni povečanega števila levkocitov (oba vzorca imata v likvorju normalno število levkocitov, in sicer $1 \times 10^6/L$). Pri naši skupini bolnikov s KME je povprečna koncentracija levkocitov v krvi $9,0 \times 10^9/L$ (območje od $1,9$ do $16,8 \times 10^9/L$). Ugotovili smo, da je številčna koncentracija levkocitov v krvi glede na povprečno vrednost v mejah normale, medtem ko v članku Jereba in sodelavcev navajajo višje povprečne vrednosti ($12,3 \times 10^9/L$) (23). Razlika je verjetno zato, ker so bili v raziskavo Jereba in sodelavcev vključeni le bolniki s težjim potekom bolezni. V literaturi je zapisano, da se lahko v drugi fazi pojavi tudi levkocitoza, ki je pri okužbah najpogosteje posledica povečanega števila nevtrofilcev, ti pa se lahko povečajo tudi za 80 % (6, 25).

Vrednosti koncentracije glukoze v likvorju pri KME so pri enem bolniku (2,9 %) povečane, pri sedemindvajsetih bolnikih (77,1 %) normalne in pri sedmih bolnikih (20 %) znižane. Vendar pri nobenem bolniku z znižano koncentracijo glukoze razmerje koncentracije glukoze med likvorjem in serumom ni bilo nižje od 0,23, medtem ko je nižja vrednost tega razmerja značilna za bakterijski meningitis. Povprečna koncentracija glukoze v likvorju pri KME je 2,9 mmol/L (območje od 2,0 do 4,3 mmol/L), kar nam kaže, da je povprečje koncentracije glukoze normalno. Za KME je značilno, da je koncentracija glukoze v likvorju normalna ali povečana (6). Nasprotno je za bakterijski meningitis značilno, da je koncentracija glukoze v likvorju znižana pod 2,22 mmol/L (6, 24), kar je razvidno tudi iz našega vzorca bakterijskega meningitisa, kjer je bila izmerjena koncentracija 0,1 mmol/L. Vzrok za zmanjšane vrednosti glukoze je lahko prisotnost bakterij in celic, saj le te za svoje delovanje potrebujejo glukozo.

V naši raziskavi smo določili povprečno koncentracijo beljakovin v likvorju 0,79 g/L (območje od 0,30 do 1,52 g/L), medtem ko so bolniki v raziskavi Jereba in sodelavcev imeli večjo povprečno koncentracijo beljakovin (0,99 g/L) (23). Nižje povprečne

koncentracije beljakovin pri naši skupini bolnikov so bile lahko zaradi nižje starosti bolnikov ali zaradi dejstva, da so bili v skupino Jereba in sodelavcev vključeni le bolniki s težjim potekom bolezni. Pri tridesetih bolnikih (85,7 %) s KME smo določili povečano koncentracijo beljakovin, medtem ko je bila pri petih bolnikih (14,3 %) normalna. Ugotovili smo, da se je koncentracija beljakovin v likvorju pri KME povečala za 170–180 odstotkov od referenčnih vrednosti. Koncentracija beljakovin v likvorju pri KME je povečana, kar navajajo tudi v literaturi, in sicer, da je v 97 % primerov koncentracija beljakovin nad 0,45 g/L (23). V naši raziskavi je imelo trideset bolnikov (85,7 %) s KME koncentracijo beljakovin v likvorju nad 0,45 g/L. Koncentracije pri bakterijskem meningitisu so povečane veliko bolj kot pri KME, kar je razvidno iz rezultata našega vzorca bakterijskega meningitisa (3,68 g/L). Tudi v literaturi navajajo, da se koncentracije beljakovin v likvorju pri bakterijskem meningitisu povečajo nad 2,2 g/L (6, 24). Vzroki za povečano število beljakovin so lahko posledica povečane prepustnosti krvno-možganske pregrade in upočasnjene pretoka likvorja (4). Disfunkcija krvno-možganske pregrade pomeni zmanjšanje pretoka likvorja. Zmanjšanje pretoka likvorja povzroči povečano koncentracijo beljakovin v likvorju. Zmanjšan pretok likvorja pa povzročijo patofiziološki procesi vnetja, ki so prisotni pri bakterijskem vnetju (27).

Pri KME je izračunana povprečna vrednost koncentracije CRP 20,0 mg/L (območje od 3 do 136 mg/L), kar kaže na povečane vrednosti. Povečano koncentracijo CRP smo zaznali pri dvajsetih bolnikih (57,1 %), medtem ko je koncentracija CRP pri petnajstih bolnikih (42,9 %) v mejah normale. Povečana koncentracija CRP nam kaže, da je v telesu prisotno tako imenovano sistemsko vnetje (28). Štirje bolniki od petintridesetih (11,4 %) so imeli koncentracijo CRP nad 50 mg/L, podobne rezultate pa navajajo tudi v raziskavi Jereba in sodelavcev, v kateri je imelo devet od triintridesetih bolnikov (27,3 %) koncentracijo nad 50 mg/L (23). Največje odstopanje v koncentraciji CRP smo zaznali pri 78-letnemu bolniku (136 mg/L); zakaj je koncentracija tako visoka, ni povsem jasno. Možni vzrok je lahko tudi visoka starost bolnika. V istem članku navajajo tudi podobne povprečne koncentracije CRP (18 mg/L), kot smo jih določili v naši raziskavi (20,0 mg/L) (23). Pri akutnih vnetnih boleznih koncentracije CRP v nekaj urah narastejo do zelo visokih vrednosti. Visoke koncentracije zasledimo pri bakterijskem meningitisu, kar je razvidno tudi iz rezultata vzorca bakterijskega meningitisa (268 mg/L), medtem ko se pri bolnikih z virusno okužbo koncentracije CRP le malo povečajo, vrednosti se gibljejo med 20–40

mg/L. Virusi se razmnožujejo znotraj celic, pri tem ostanejo celične membrane ob virusnih okužbah nepoškodovane. Večina bakterijskih okužb pa se dogaja izven celic, pri čemer pride do poškodbe celičnih membran in sproščanje molekule fosfoholina, ki posredno vspodbudi nastajanje CRP v jetrih (29).

6 Sklep

Na podlagi rezultatov naše raziskave smo prišli do naslednjih sklepov:

- Pri KME so povprečne vrednosti izmerjenih parametrov Lc-Lkci, Lc-beljakovin in CRP v krvi povečane, medtem ko so koncentracije K-Lkci in Lc-glukoze v mejah referenčnih vrednosti.
- Pri KME je številčna koncentracija Lkci v likvorju v večini primerov povečana, prevladujejo mononuklearni Lkci (limfociti).
- Pri KME je povprečna številčna koncentracija Lkci v krvi znotraj mej referenčnih vrednosti in je nižja kot pri bakterijskem meningitisu.
- Koncentracija glukoze v likvorju pri KME je v večini primerov znotraj mej referenčnih vrednosti, lahko pa je tudi povečana.
- Koncentracije glukoze v likvorju pri KME so višje kot pri bakterijskem meningitisu.
- Pri KME je koncentracija beljakovin v likvorju normalna ali zmerno povečana, medtem ko je pri bakterijskem meningitisu močno povečana.
- Koncentracije CRP pri KME so v mejah normale ali rahlo povečane, medtem ko zasledimo pri bakterijskem meningitisu izrazito povečanje.

Torej se razlike med KME in bakterijskim meningitisom najbolj opazijo pri naslednjih parametrih: pri koncentraciji CRP, pri številčni koncentraciji levkocitov in koncentraciji segmentiranih levkocitov ter pri koncentraciji glukoze v likvorju.

KME in bakterijski meningitis sta okužbi osrednjega živčevja (OŽ), ki se lahko kažeta s podobnimi kliničnimi znaki, vendar imata značilne razlike v osnovnih laboratorijskih preiskavah, ki se določajo pri sumu na okužbo OŽ, zato imajo te preiskave odločilen pomen pri uvedbi začetnega zdravljenja in nadaljnjih diagnostičnih postopkih.

7 Literatura

1. Pocajt M, Širca A. Anatomija in fiziologija za medicinske šole. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2001; 279–284.
2. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Mo%C5%BEgani>, (4.1.2010)
3. Parramón Editorial Team, (prevod) Hribernik M: Anatomski atlas. Arnau E, (prevod) Cvetko E: Človeško telo. 1. natis, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2004; 158–159.
4. Modrica Kobe J, Flisar Ž. Priporočeni postopki za osnove laboratorijske preiskave likvorja. Ljubljana, Slovensko združenje za klinično kemijo, 2004.
5. Burkhardt D, (prevod). Furlan M. Laboratorijski izvidi: pregled normalnih vrednosti telesa: kako dosežemo trajno ugodne rezultate. Mavrica, d.o.o., Celje, 1998; 18, 30–31.
6. Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A. Infekcijske bolezni. Tangram, Ljubljana, 2002; 26, 387–391, 54–57, 30–41.
7. <http://vizita.si/clanek/leksikon/meningitis.html>, (11.2.2010)
8. Kristan S. Srečanja s klopi. Didakta, Radovljica, 2001; 14–20, 33–34.
9. http://www.konj-zveza.si/dokumenti/UKC_KME_gradivo_za_medije.pdf, (18.1.2010)
10. Kunze U, Asokliene L, Bektimirov T, Busse A, Chmelik V, Heinz F, Hingst V, Kadar F, Kaiser R, Kimming P, Kraigher A, Krech T, Linqvist L, Lucenko I, Rosenfeldt V, Ruscio M, Sandell B, Salzer H, Strle F, Süß J, Zilmer K, Mutz I. Klopni meningoencefalitis v otroštvu–concensus 2004. Zdravniški vestnik, 2004; 73: 611–4.
11. Likar M. Usoda nalezljivih bolezni. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1981; 143.
12. <http://en.wikipedia.org/wiki/Flaviviridae>, (25.3.2010)
13. Likar M. Cepiva danes in jutri. Založba Arkadija d.o.o., Ljubljana, 2004; 142–145.
14. Koren S, Avšič-Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M. Splošna medicinska virologija. Medicinski razgledi, Ljubljana, 1998; 17.
15. Mandl C W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. Virus Research 111, 2005; 161–174.
16. McMinn P C. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. Journal of General Virology, 1997; 78 (Pt 11): 2711–2722.

17. http://www.baxtervaccines.com/?node_id=1454, (4.1.2010)
18. <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=2084>, (19.1.2010)
19. Haglund M, Günther G. Tick borne encephalitis-pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 21, 2003; S1/1–S1/18.
20. http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=165&pi=5&_5_id=1022&_5_PageIndex=0&_5_groupId=298&_5_newsCategory=&_5_action>ShowNewsFull&pl=165-5.0. (12.10.2010)
21. <http://www.tick-victims.info/m-4854.php> (5.1.2010)
22. Jereb M, Muzlovič I, Avšič-Županc T, Karner P. Severe tick-borne encephalitis in Slovenia: Epidemiological, clinical and laboratory findings. *Wien Klim Wochenschr*, 2002; 114/13–14: 623–626.
23. Jereb M, Karner P, Muzlovič I, Jurca T. Severe tick-borne encephalitis in Slovenia in the years 2001–2005: Time for a mass vaccination campaign?. *Wien Klin Wochenschr*, 2006; 118/23–24: 765–768.
24. Tunkel A R, Hartman B J, Kaplan S L, Kaufman B A, Ross K L, Sheld W M, Whitley R J. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clinical infectious diseases*, 2004; 39: 1267–84.
25. Cimperman J, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Ružič-Sabljič E, Avšič-Županc T, Strle F. Double infection with tick borne encephalitis virus and *Borrelia Burgdorferi* sensu lato. *Wien Klin Wochenschr*, 2002; 114/13–14: 620–622.
26. Bender A, Schulte Altedorneburg G, Walther E U, Pfister H W. Severe tick borne encephalitis with simultaneous brain stem, bithalamic, and spinal cord involvement documented by MRI. *J neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005; 76: 135–137.
27. Reiber H. Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Multiple sclerosis*, 1998; 99–107.
28. Ivetič V, Kersnik J. Diagnostične preiskave za vsakdanjo uporabo. *Zavod za razvoj družinske medicine, Ljubljana*, 2007; 358–359.
29. Modrica Kobe J. Določanje C-reaktivnega proteina v plazmi. V: *Zbornik predavanj. Portorož, 19.-20. Oktober 2001*.