

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**PETRA VIDIC (ZUPANČIČ)**

**DIPLOMSKA NALOGA  
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE  
BIOMEDICINE**

Ljubljana, 2010

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
**FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**PETRA VIDIC (ZUPANČIČ)**

**LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA GNOJNEGA MENINGITISA**  
**LABORATORY DIAGNOSTICS OF BACTERIAL MENINGITIS**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljana na Kliničnem inštitutu za klinično biokemijo v Laboratoriju za analitiko specialnih telesnih tekočin pod mentorstvom Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokemije in somentorstvom Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biol., spec. med. biokemije.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokemije in pod vodstvom somentorice Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biol., spec. med. biokemije.

Petra Vidic (Zupančič)

Predsednica komisije: Janja Marc, mag. farm.

Član komisije: Aleš Jerin, univ. dipl. kem.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	ŽIVČEVJE.....	1
1.2	MOŽGANI.....	2
1.3	MENINGITISI.....	4
1.3.1	GNOJNI ALI BAKTERIJSKI MENINGITIS.....	4
1.3.1.1	MENINGOKOKNI MENINGITIS IN DRUGE OKUŽBE Z MENINGOKOKI.....	11
1.3.1.2	PNEVMOKOKNI MENINGITIS.....	12
1.3.1.3	MENINGITIS POVZROČEN S HAEMOPHILUSOM INFLUENZAE.....	13
1.3.2	SEROZNI ALI VIRUSNI MENINGITIS.....	14
1.3.3	REFERENČNE VREDNOSTI.....	16
2	NAMEN DELA.....	18
3	EKSPERIMENTALNI DEL.....	19
3.1	OPIS PREISKOVANE SKUPINE.....	19
3.2	BIOLOŠKI VZORCI.....	19
3.3	PRINCIP METOD DOLOČANJA.....	21
3.3.1	KRVNA SLIKA Z DKS NA HEMATOLOŠKEM ANALIZATORJU COULTER HmX.....	21
3.3.2	DOLOČANJE KONCENTRACIJE C-REAKTIVNEGA PROTEINA V KRVI.....	24
3.3.3	OSNOVNE PREISKAVE LIKVORJA.....	25
3.4	STATISTIČNE METODE ZA OBDELAVO PODATKOV.....	30
4	REZULTATI.....	31
5	RAZPRAVA.....	35
6	SKLEP.....	38
7	LITERATURA.....	39

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Krvna slika .....	17
Tabela 2: Prikaz obravnavanih preiskovancev v naši skupini .....	19
Tabela 3: Prikaz rezultatov analiz.....	31
Tabela 4: Prikaz srednjih vrednosti in standardnih deviacij (SD) .....	32
Tabela 5: Primerjava naših rezultatov z referenčnimi vrednostmi .....	32
Tabela 6: Rezultat analiz pri virusnem meningitisu .....	33

## KAZALO SLIK

Slika 1: Možganske ovojnice (prirejena slika).....	3
Slika 2: Potek vdora mikroorganizma v telo in povzročitev okužbe možganskih ovojnic....	5
Slika 3: Izpuščaji pri meningokoknem meningitisu (pogostejši so pri otrocih in epidemijah) (Šumak Irena, knjiga z naslovom: Zdravstvena nega infekcijskega bolnika, slika je uporabljena z avtorjevim dovoljenjem) .....	12
Slika 4: Lumbalna punkcija (prirejena slika).....	20
Slika 5: Princip določanja hemoglobina .....	22
Slika 6: Formule za izračun eritrocitnih konstant .....	23
Slika 7: Komplet QuikRead (prirejena slika).....	24
Slika 8: Princip določanja glukoze z glukozna – oksidazno metodo.....	27
Slika 9: Turbidimetrija - princip merjenja (prirejena slika .....	29
Slika 10: Prikaz razlik za posamezne parametre med bakterijskim in virusnim meningitisom (enote za posamezne parametre so: k-Lkci – $\times 10^9/L$ ; CRP – mg/L; lc-B – g/L; lc-Glu – mmol/L; lc-Mo - $\times 10^6/L$ ) .....	33
Slika 11: Prikaz razlik za posamezne parametre med bakterijskim in virusnim meningitisom (enote za posamezne parametre so: lc-Lkci - $\times 10^6/L$ ; lc-Seg - $\times 10^6/L$ ; lc- Ly - $\times 10^6/L$ ).....	34



## POVZETEK

V diplomski nalogi smo obravnavali laboratorijsko diagnostiko bakterijskega meningitisa. Namen naloge je bil predstaviti bakterijski meningitis, laboratorijske preiskave značilne za diagnostiko meningitisov, njihove vrednosti, ter primerjava vrednosti bakterijskega meningitisa z virusnim. Gnojni ali bakterijski meningitis je vnetje možganskih ovojnic, ki ga povzročajo različne vrste bakterij in lahko prizadene tako moške kot ženske različnih starosti. Zanj je značilen hiter potek bolezni, zato je potrebna hitra diagnostika in zdravljenje. V klinično biokemičnih laboratorijih se z osnovnimi citološkimi, biokemičnimi in presejalnimi mikrobiološkimi preiskavami lahko potrdi sum na bakterijski meningitis.

Obravnavali smo skupino 20 preiskovancev s sumom na bakterijski meningitis. Preiskovancem sta bila odvzeta vzorec venske krvi in likvor. V vzorcu venske krvi smo določili krvno sliko z diferencialno krvno sliko po Coulterjevem principu merjenja ali ročno z mikroskopom. V vzorcu krvi smo določili še C-reaktivni protein z imunoturbidimetrično metodo, ki temelji na lateks delcih.

Vzorcu likvorja smo najprej organoleptično pregledali, nato smo v njih določili številčno koncentracijo levkocitov z mikroskopom in jih diferencirali. Določili smo še celokupno koncentracijo beljakovin z turbidimetrično metodo z benzetonijevim kloridom. Koncentracijo glukoze pa smo določili spektrofotometrično z glukoza-oksidadno metodo. Naredili smo še bakteriološke sedimente likvorja in jih obarvali po Gramu.

Rezultati analiz so značilno spremenjeni in odstopajo od referenčnih vrednosti. Različne vrste meningitisov imajo značilno spremenjene vrednosti parametrov in na podlagi tega lahko zdravnik sklepa za katero vrsto meningitisa gre in lahko začne z zdravljenjem.

Povečani parametri pri bakterijskem meningitisu so številčna koncentracija levkocitov v krvi in likvorju, C-reaktivni protein in celokupna koncentracija beljakovin v likvorju. Izjema je koncentracija glukoze v likvorju, ki je znižana. Pri virusnem meningitisu je drugače, in sicer so številčna koncentracija levkocitov v krvi, koncentracija glukoze v likvorju in celokupna koncentracija beljakovin v likvorju normalni ali povečani, medtem ko sta C-reaktivni protein in številčna koncentracija levkocitov v likvorju povečani.

Ugotovili smo da vrednosti posameznih parametrov pri bakterijskih meningitisih bolj odstopajo od referenčnih vrednosti, kot vrednosti pri virusnih meningitisih.



## SUMMARY

I will describe laboratory diagnostics of bacterial meningitis. I wanted to present bacterial meningitis, his laboratory analysis, there results and to compare them with the viral meningitis. The bacterial meningitis is inflammation of the brain meninges, which is caused by infection of different types of bacteria and it can affect on both male and female at different ages. The disease progress very quickly and therefore is very important to determine the diagnosis and to start with appropriate treatment. In clinical biochemical laboratories we can confirm the suspicion of bacterial meningitis with the basic cytological, biochemical and microbiological analysis.

We were reading the group of 20 subjects where there were suspected to have bacterial meningitis. From each person we took the samples of venous blood and cerebrospinal fluid. In venous blood we determine the blood count with differential blood count on the principle of Coulter or manually under the microscope. In venous blood we also determine C-reactive protein with latex agglutination.

Samples of cerebrospinal fluid are first organoleptically screened, then we determine the concentration of leukocytes under the microscope and we differentiate them. Also we determine the concentration of protein with turbidimetric method with benzethonium chloride. The concentration of glucose is determined spectrophotometrical with glucose oxidase method. We stained the bacteriological sediment of cerebrospinal fluid after Gram.

Results of analysis are significantly changed and therefore the results depart from reference values. In different types of meningitis each parameter is significantly changed and on those parameters the doctor can conclude the type of meningitis and can begin with the treatment.

Increased parameters in bacterial meningitis are the concentration of leukocytes in blood and cerebrospinal fluid, C-reactive protein and concentration of proteins in cerebrospinal fluid. The only exception is the concentration of glucose in cerebrospinal fluid, which is reduced in bacterial meningitis. In the viral meningitis is a little different, therefore the concentration of leukocytes in blood, concentration of glucose in cerebrospinal fluid and concentration of protein in cerebrospinal fluid are normal or increased, while the C-reactive protein and concentration of leukocytes in cerebrospinal fluid are increased.

We find out that parameters in bacterial meningitis depart more from reference value than the parameters in viral meningitis.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>IL</b>	interlevkin
<b>CRP</b>	C-reaktivni protein
<b>OŽS</b>	osrednji živčni sistem
<b>DKS</b>	diferencialna krvna slika
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>ELISA</b>	encimsko imunska metoda
<b>Hib</b>	<i>Haemophilus influenzae tip B</i>
<b>EDTA</b>	etilen-diamin-tetraocetna kislina
<b>Erci</b>	eritrociti
<b>Lkci</b>	levkociti
<b>Trci</b>	trombociti
<b>Hb</b>	hemoglobin
<b>Ht</b>	hematokrit – volumen stisnjenih eritrocitov
<b>MCV</b>	srednji volumen eritrocitov
<b>RDW</b>	širina razporeditve eritrocitov
<b>MPV</b>	srednji volumen trombocitov
<b>MCH</b>	srednja količina hemoglobina v eritrocitu
<b>MCHC</b>	srednja koncentracija hemoglobina v eritrocitu
<b>Lc-Lkci</b>	številčna koncentracija levkocitov v likvorju
<b>Lc-Seg</b>	številčna koncentracija segmentiranih nevtrofilnih granulocitov v likvorju
<b>Lc-Ly</b>	številčna koncentracija limfocitov v likvorju
<b>Lc-Mo</b>	številčna koncentracija monocitov v likvorju
<b>Lc-B</b>	koncentracija beljakovin v likvorju
<b>Lc-Glu</b>	koncentracija glukoze v likvorju
<b>G-</b>	po Gramu negativne bakterije
<b>G+</b>	po Gramu pozitivne bakterije

# 1 UVOD

## 1.1 ŽIVČEVJE

Zaradi kompleksne zgradbe naš organizem potrebuje nadzorni sistem, ki ga imenujemo živčevje, ki usklajuje delovanje organov in organskih sistemov in hkrati omogoča organizmu povezavo z okoljem. Živčevje sestavljajo živčne celice – nevroni in živčno oporno tkivo imenovano nevroglia, ter prekrvavljeno vezivo. Nevroni so med seboj povezani z izrastki, dendriti in aksoni. Povezave med nevroni lahko opišemo kot kompleksno mrežo, ki omogoča prenos sporočil iz osrednjega živčnega sistema (OŽS) preko živcev do skeletnih in gladkih mišic, ter čutil (1).

**Osrednje ali centralno živčevje** sestavljajo možgani in hrbtni mozeg ali hrbtenjača. Hrbtni mozeg predstavlja živčno zvezo med možgani in telesom (2). Motorične poti prenašajo informacije iz možganov navzdol po hrbtnem mozgu v organe. Čutilne poti pa potekajo iz kože in drugih organov navzgor po hrbtnem mozgu do možganov (3). Hrbtenjača je dobro zavarovana v hrbteničnem kanalu in sega od velike odprtine v zatilnici navzdol do drugega ledvenega vretenca (4). Njen podaljšek sega še do trtice, vendar v njem ni živčnih celic (3).

**Periferno živčevje** sestavljajo aksoni živčnih celic možganskih in hrbtenjačnih živcev. Senzorične živčne celice prenašajo vzburjenje v osrednje živčevje, medtem ko motorične živčne celice prenašajo vzburjenje iz OŽS v mišice. Del perifernega živčevja je hrbtenjača, ki se nahaja v hrbtenici, iz nje izhajajo hrbtenjačni živci (1). Po delovanju delimo periferno živčevje na somatsko in vegetativno živčevje, ki sta med seboj povezana po zgradbi in delovanju (3).

**Somatsko živčevje** deluje pod vplivom naše volje, ki s pomočjo čutil sprejema dražljaje iz okolice in se nanje odzove, tako da spodbuja mišične gibe pri delu, hoji, dihanju in govoru (3).

**Vegetativno ali avtonomno živčevje** nadzira delovanje notranjih organov, ki deluje neodvisno od naše volje. Deluje preko dveh sistemov, ki med seboj usklajujeta delovanje organov: simpatično delovanje, ta spodbuja telo in mobilizira energijo, in parasimpatično delovanje, ta pa umirja telo in varčuje z energijo (1). Simpatični živci izvirajo iz prsnega in

ledvenega dela hrbtenjače in izžarevajo svoje nitje v vse notranje organe. Parasimpatične živce delimo v dve skupini, in sicer en del živcev izvira iz spodnjega konca hrbtenjače in so namenjeni medeničnim organom. Drugi najpomembnejši živci pa izvirajo iz možganskega debla in oskrbujejo organe v prsni in trebušni votlini (3).

## 1.2 MOŽGANI

Možgani so del OŽS, ki se nahajajo v lobanji. Vse življenjske procese nadzorujejo in vodijo možgani, okvare le teh privedejo do hudih obolenj, pogosto tudi do smrti. Sestavljeni so iz zelo občutljivih živčnih celic. Ločimo jih na velike in male možgane ter možgansko deblo (1).

**Veliki možgani** so najboljšežnejši del OŽS saj predstavljajo kar 80 odstotkov možganske mase. Pri njih ločimo dve možganski polobli, levo in desno, ki ju ločuje vzdolžna špranja. V globini sega špranja do prečnika, ki povezuje obe polobli z živčnim nitjem (5). Leva polobla nadzoruje desno stran telesa in obratno. Navpično in poševno potekajoči brazdi razdelita zunanjo stran polobel na režnje. Režnji se imenujejo po kosteh možganske lobanje v neposredni bližini: čelni, temenski, senčni in zatilni reženj. Možganski polobli sta sestavljeni iz sivine in beline. Sredica je iz bele možganovine in se nahaja v globini polobel, poleg tega se v njej nahajajo tudi možganski prekati (1). Sivina je nagubana in se nahaja na površini možganov kot možganska skorja (4).

**Mali možgani** so prav tako razdeljeni na dve polobli (3). Pomembni so za usklajevanje naših gibov, vzdržujejo mišični tonus in ravnotežje telesa. Ležijo v zadnji lobanjski kotanji in so z živčnimi progami povezani s hrbtenjačo in možganskim deblom. Skorja malih možganov je nagubana in iz sive možganovine. Sredica pa je iz bele možganovine. V male možgane prihajajo sporočila iz skeleta in ravnotežnega organa, odziv na ta sporočila pa se prenese preko možganskega debla in hrbtenjače v skeletne mišice (4).

Most **možganskega debla** se nahaja pred malimi možgani. Podaljšana hrbtenjača pa se nadaljuje navzgor v most, navzdol pa v hrbtenjačo. V podaljšani hrbtenjači se nahajajo različni centri vegetativnega živčevja (1). Sivina v možganskem deblu se nahaja v notranjosti iz katere izvirajo možganski živci, belina pa je na površini (3).

Možgane prekrivajo **tri možganske ovojnice** imenovane meninge. Notranja mehka možganska ovojnica (pia mater encephali) je žilnica, nad njo se nahaja srednja možganska

ovojnica pajčevnica (arachnoidea), ki je iz rahlega veziva, sledi ji čvrsta zunanja možganska ovojnica (dura mater encephali). Prostor med žilnico in pajčevnico napolnjuje hrbtenjačno-možganska tekočina imenovana likvor (3).



Slika 1: Možganske ovojnice (prirejena slika)

**Likvor** nastaja v notranjosti velikih možganov in možganskega debla (6). Njegova naloga je, da varuje OŽS pred udarci, poleg tega je še pomemben za zbiranje odpadnih snovi, ki nastajajo pri presnovi v živčnih celicah, ter sodeluje v cirkulaciji in hidrataciji celic OŽS (3). Likvor se izliva na površino možganov in hrbtnege mozga skozi odprtino pod malimi možgani. Normalno je brezbarvna, bistra tekočina, po sestavi zelo podobna krvni plazmi, vendar z zelo nizko koncentracijo beljakovin. V likvorju se nahajajo voda, anorganske in organske snovi, ki pa imajo drugačno sestavo kot v krvni plazmi. Levkocitov (Lkci) je malo, normalno do  $5 \times 10^6/L$ , prevladujejo mononuklearne celice, predvsem limfociti. Pri obolenjih OŽS in možganskih ovojnic sta videz in sestava likvorja spremenjena (6).

### 1.3 MENINGITISI

Meningitis ali vnetje možganskih ovojnic in hrbtenjače je ena od okužb OŽS. Med možganskimi ovojnicami kroži likvor, po katerem se lahko morebitni povzročitelji vnetja hitro razširijo in tako napadejo celotno površino možganov (7). Povzročitelji te nevarne bolezni so lahko bakterije, virusi, zajedalci in glivice, ki v likvor pridejo preko krvnih žil ali z razširjenim lokalnim vnetjem. Glede na vrsto povzročitelja, meningitise razdelimo v več skupin (8).

#### 1.3.1 GNOJNI ALI BAKTERIJSKI MENINGITIS

Gnojni ali bakterijski meningitis je akutna, smrtno nevarna bolezen, povzročajo ga piogene bakterije, ki vdrejo v možganske ovojnice in tam izzovejo nevtrofilni celični odgovor (9). Večinoma nastane zaradi razsoja bakterij po krvi iz primarnega mesta okužbe izven možganov (10). Po svetu se bakterijski meningitis pojavlja sporadično, epidemično pa se pojavlja le meningokokni meningitis. Smrtnost je velika, zato je zgodnja ugotovitev bolezni, določitev povzročitelja in čimprejšnje zdravljenje z antibiotiki zelo pomembno. Kljub ozdravitvi pa bolezen po končanem zdravljenju pogosto pusti hude nevrološke posledice (9).

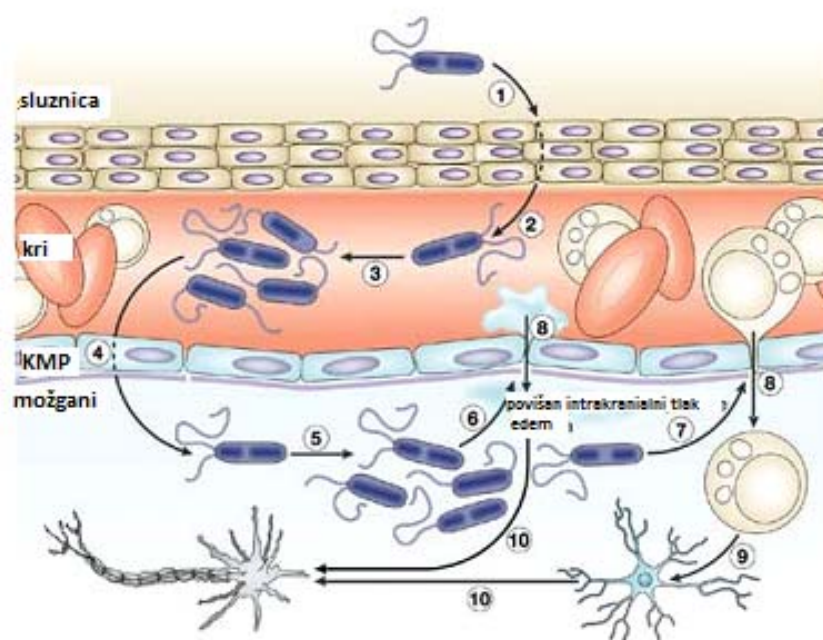
##### **Dejavniki tveganja za nastanek bakterijskega meningitisa so:**

- starost do 4. leta,
- asplenija,
- anemija srpastih celic in hemoglobinopatije,
- maligne bolezni,
- stanje po poškodbah glave,
- sladkorna bolezen,
- genetski dejavniki,
- motnje imunskega sistema,
- nedohranjenost,
- prepozno in nepravilno zdravljenje bakterijskega meningitisa (9).

Najpogostejši povzročitelji bakterijskih meningitisov v Sloveniji so pnevmokoki (*Streptococcus pneumoniae*), meningokoki (*Neisseria meningitidis*) in *Haemophilus influenzae* tipa B (11). Povzročajo kar 95 odstotkov vseh bakterijskih meningitisov. Pogosti povzročitelji bakterijskega meningitisa pri novorojenčkih in dojenčkih do 2. meseca starosti so streptokoki skupine B, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, enterokoki in gramnegativni entero bacili. Drugi povzročitelji bakterijskih meningitisov so še *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* in drugi. Pri bolnikih z imunsko okvaro lahko bakterijski meningitis povzročijo tudi druge bakterije (10).

Bakterijski meningitis je bolezen, ki se pojavlja v vseh starostnih skupinah, pogosteje pri otrocih od 1. do 4. leta starosti in pri starostnikih. Moški obolevajo pogosteje kot ženske. Bolezen se prenaša preko bolnikov in prenašalcev, ki so navadno zdrave osebe. Kapljično ali aerogeno se bakterije sproščajo v zrak pri govorjenju, kašljanju in kihanju, okužimo se lahko tudi neposredno ali preko kontaminiranih predmetov in površin (9).

Nastanek in razvoj bolezni sestoji iz več stopenj: naselitev bakterij na koži, sluznicah ali v drugih organih, vdor v krvni obtok, naselitev v OŽS in nato sledi razmnoževanje bakterij v likvorju (9).



Slika 2: Potek vdora mikroorganizma v telo in povzročitev okužbe možganskih ovojnic

(1. naselitev v nosno žrelnem predelu, 2. vdor v krvni obtok, 3. preživetje in razmnoževanje bakterij, 4. prehod skozi krvno-možgansko pregrado, 5. invazija v možganske ovojnice in OŽS, 6. povečanje prepustnosti krvno-možganske pregrade in ožilja, 7. pleocitoza – povečano število Lkci v likvorju, 8. sledi povečan intrakranialni pritisk in edem možganov, 9. sproščanje proti vnetnih delcev iz infiltrata Lkci in drugih celic gostitelja, 10. nevrološka okvara) ; KMP – krvno-možganska pregrada, (prirejena slika)

**Naselitev v nosno žrelnem predelu in invazija – vdor:** Meningokok, pnevmokok ali *Haemophilus influenzae tipa B* se pritrjuje na epiteljske celice sluznice nosno-žrelnega predela. Za pritrjitev mikroorganizma na epitelij so pomembni specifični virulenčni dejavniki, ki omogočajo lažjo pritrjitev na celico. Virulenčni dejavniki so polisaharidna kapsula s specifičnimi epitopi in fimbrijami ali pili, ter izločanje proteaz imunoglobulinov A. Pomanjkanje sekretornih IgA protiteles poveča tveganje za nastanek invazivne bolezni. Meningokoki se pritrjujejo na receptor na površini epiteljske celice in se z endocitozo prenesejo v celico (9).

**Razsoj bakterij po krvi:** Obdobje v katerem so bakterije prisotne v krvi pravimo bakteriemija, ta je pogosto prehodna. Njena stopnja, ki se razvije v prvih 24 urah po okužbi, je najpomembnejši dejavnik pri nastanku in razvoju bakterijskega meningitisa. Antifagocitna kapsula meningokokov in pnevmokokov prepreči nevtrofilnim granulocitom in drugim celicam makrofagnega fagocitnega sistema, da bi fagocitirale bakterije. Gostitelj se na to odzove z aktivacijo komplementa po alternativni poti, pri tem nastanejo aktivirane komponente komplementa C3. Te delujejo kot opsonini, ki z vezavo na bakterije omogočijo fagocitozo. Pri osebah, ki imajo okvare tega sistema se poveča tveganje za nastanek pnevmokoknega meningitisa, pri bolnikih, ki pa imajo okvaro v končni fazi aktivacije komplementa grozi okužba z meningokoki (9).

**Meningealna invazija:** Bakterije nato prodrejo v likvor skozi horoidni pletež ali skozi steno kapilar, tam se razmnožujejo in izzovejo nevtrofilni celični odgovor, vnetje možganskih ovojnic in vnetje možganske skorje. Zaradi poškodbe povezav v krvno-možganski pregradi bakterije prodrejo v subarahnoidalni prostor, kjer nato povzročijo vnetje (9).



**Vnetje v subarahnoidalnem prostoru:** Tukaj se bakterije hitro razmnožujejo, saj je znižana koncentracija Lkci in primanjkljaj imunoglobulinov in komplementa. Celična stena začne razpadati zaradi vpliva vnetnega odgovora organizma in baktericidnega delovanja antibiotika, ob tem se sproščajo biološko zelo aktivne snovi bakterij, kot so delci celične stene in beljakovine zunanje ovojnice. Ti delci izzovejo gostitelja, da začne tvoriti vnetne citokine (interlevkine IL-1 beta, IL-6, IL-8 in IL-12, interferon gama in druge). Vnetje povzroči, da se začne tvorba arahidonske kisline in njenih presnovkov. Vsi ti citokini aktivirajo receptorje na endotelijskih celicah žil OŽS, ki s tem privabljajo in vežejo Lkci. Nastanejo tromboze v ožilju zaradi delovanja citokinov na koagulacijski sistem, ki sproži koagulacijo. V krvno-možganski pregradi se poveča prepustnost pregrade in ožilja. Povečan intrakranialni tlak povzroči edem možganov. Edem je lahko vazogeni (posledica povečane prepustnosti), citotoksični (posledica izgube celične homeostaze in spremembe v celični membrani) ali intersticijski (nastane zaradi povečane tvorbe likvorja in motenega odtoka likvorja) (9).

Organizem se pred okužbo zaščiti s specifičnimi protitelesi, komplementnim sistemom in Lkci, ki omogočajo fagocitozo. Imunski odziv delimo na specifični, ki temelji na tvorbi specifičnih protiteles, komplementnem sistemu in fagocitozi, ki jo opravljajo nevtrofilni granulociti in nespecifični, ki se kaže s tvorbo nespecifičnih protiteles. Kakšen bo potek bakterijskega meningitisa je odvisno od vrste bakterije, njene virulence (stopnja patogenosti mikroorganizma), števila bakterij in interakcije med mikroorganizmom in gostiteljem. Virulenco določa kemična sestava bakterijske kapsule (9).

V začetnem obdobju meningitisa so klinični znaki lahko zelo različni in neznačilni, odvisno je od starosti bolnika. Pri novorojenčku so znaki neznačilni, ti so: vročina, zaspanost, zlatenica, težko dihanje, bruhanje, driska in odklanjanje hrane. Pri otrocih in odraslih so klinični znaki podobni, ti so: vročina, mrzlica, glavobol, fotofobija, slabost, bruhanje, nemirnost, razdražljivost, zmedenost in solmolentnost. Pri starejših osebah je začetek bakterijskega meningitisa zelo neznačilen, pojavi se lahko le rahlo povišana telesna temperatura in psihična prizadetost (9).

Zdravnik pri pregledu bolnika opazi naslednje splošne znake, ki kažejo na meningitis:

- vročina in huda prizadetost,

- meningealni simptomi in znaki: glavobol, bruhanje, otrplost tilnika, Kernigov znak, hrbtencični znak, zgornji in spodnji znak, Brudzinskijev znak, Amossov znak trinožnika in opistotonus,
- encefalitični simptomi nastanejo zaradi patoloških sprememb v možganih: motnje zavesti, motnje osebnosti, koma, zmedenost, zaspanost, tremor, krči, motnje sluha, motena usklajenost mišičnih gibov, povišana telesna temperatura,
- razne spremembe na koži: rdečkasto obarvane drobne lise in pikice na koži,
- prizadetost možganskih živcev,
- lokalni nevrološki znaki: motnje vida, delna paraliza polovice telesa, omrtvelost obraznega živca,
- vročina lahko traja različno dolgo: pri bolnikih, ki jih zdravimo traja od 5 do 7 dni, lahko traja 10 ali več dni kar nakazuje na različne zaplete,
- pojavijo se lahko še druga infekcijska žarišča med samim potekom bakterijskega meningitisa kot so: celulitis, septični artritis, vnetje srednjega ušesa, pljučnica, osteomielitis, perikarditis in flebitis (9).

### **Laboratorijska diagnostika bakterijskega meningitisa**

Bakterijski meningitis moramo hitro diagnosticirati, prepoznati povzročitelja in hitro pričeti z ustreznim zdravljenjem. Kako to dosežemo? Zdravnik že pri pregledu pacienta, glede na njegove klinične znake posumi na bakterijski meningitis (9). Na podlagi tega se odloči za odvzem likvorja z lumbalno punkcijo in odvzem venske krvi (12). V likvorju se nato opravijo osnovne citološke in biokemične preiskave: organoleptični pregled likvorja, določanje številčne koncentracije Lkci z diferenciacijo, določanje številčne koncentracije eritrocitov (Erci), določanje koncentracije laktata, določanje koncentracije glukoze in beljakovin ter bakteriološki sediment likvorja in hitri aglutinacijski test na antigene najpogostejših povzročiteljev. Vedno se vzorec likvorja odvzame tudi za mikrobiološke preiskave – kulturo, s katero točno določimo povzročitelja bolezni. V venski krvi se opravijo osnovne hematološke in biokemične preiskave (9).

Likvor najprej organoleptično pregledamo, normalno je pri zdravih osebah brezbarven in bister. Pri bakterijskih meningitisih pa je likvor po izgledu moten ali celo gnojen, v njem določimo povečano številčno koncentracijo Lkci, Lkci tudi diferenciramo po posameznih skupinah kjer opazimo, da med njimi prevladujejo nevtrofilni granulociti, kar 60 odstotkov.

Določimo še znižano koncentracijo glukoze in povečano koncentracijo celokupnih beljakovin (9).

Bakterijo, ki povzroča meningitis želimo izolirati in identificirati. Iščemo jo v krvi in likvorju ali v drugih telesnih tekočinah. V bakteriološkem sedimenta likvorja, ki ga obarvamo po Gramu lahko dokažemo bakterije, ki se glede na zgradbo celične stene različno obarvajo. Ločimo jih na Grampozitivne (G+), ki se obarvajo modrovijolično in Gramnegativne (G-) bakterije, ki se obarvajo rdeče. Za bolj natančno prepoznavo bakterije je potrebno kulturo zasejati na gojišče. Poleg tega lahko opravimo še hitri lateks aglutinacijski test na najpogostejše povzročitelje meningitisov. S hitrim lateks aglutinacijskim testom direktno in kvalitativno določimo najpogostejše antigene povzročiteljev bakterijskega meningitisa. Antigeni, ki so zajeti v testu so za *Hib*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus skupine B*, *Neisseria meningitidis* skupine A, B, C, Y ali W135 in *Escherichia coli K1* (9). Test je zelo specifičen in malo občutljiv. Če je test negativen še ne pomeni, da ne gre za bakterijsko okužbo (12).

V krvnem vzorcu določimo povečano številčno koncentracijo Lkci in koncentracijo C-reaktivnega proteina (CRP), ki je protein akutne faze vnetja. Služi nam kot pokazatelj vnetnega dogajanja v telesu in z njim lahko spremljamo potek zdravljenja. Pri zdravih osebah je prisoten v zelo majhnih koncentracijah, medtem ko je pri bakterijskih infekcijah močno povečan, pri virusnih okužbah pa navadno ni povečan ali je le rahlo. Tako lahko hitro in zanesljivo razlikujemo med bakterijskimi in virusnimi infekcijami. Povišane vrednosti zasledimo že v 6 do 12 urah po začetku vnetnega procesa (13).

Redki laboratoriji za določitev povzročitelja uporabijo PCR metodo (metoda pomnoževanja nukleinskih kislin). Metoda je zelo občutljiva in pomembna predvsem v diagnostiki virusnih meningitisov. Z metodami kot so lateksna aglutinacija, protitočna elektroforeza, koaglutinacija, ELISA (encimsko imunska metoda) ali radioimunskim testom prav tako lahko dokažemo bakterijske antigene v likvorju (9).

Obstajajo biokemični kriteriji na podlagi katerih meningitis opredelimo kot bakterijski. Določeni parametri so značilno povečani ali znižani.

Ti kriteriji so:

- številčna koncentracija Lkci v likvorju nad  $2000 \times 10^6/L$ ,
- številčna koncentracija nevtrofilnih granulocitov v likvorju nad  $1180 \times 10^6/L$ ,

- koncentracija glukoze v likvorju pod 1,9 mmol/L,
- razmerje koncentracije glukoze med likvorjem in serumom pod 0,23,
- koncentracija beljakovin v likvorju nad 2,2 g/L.

Če pri nekem primeru določimo te značilne pokazatelje, lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da gre za bakterijski meningitis, čeprav mogoče povzročitelja ne moremo dokazati iz izolacije iz likvorja ali hemokulture (14).

### **Zdravljenje in cepljenje**

Poleg antibiotičnega zdravljenja bakterijskih meningitisov, zdravimo še zaplete v OŽS, ter vzdržujemo življenjske funkcije bolnika. Baktericidni antibiotiki, ki jih uporabljamo pri zdravljenju dobro prehajajo krvno-možgansko pregrado. Pred dajanjem antibiotika moramo odvzeti vzorec likvorja in krvi za hemokulturo. Najpogostejši antibiotiki, ki jih uporabljamo pri zdravljenju so penicilin G, cefalosporin tretje generacije, vankomicin, ampicilin in gentamicin. Ugotovili so, da zdravljenje z deksametazonom dobro vpliva na sam potek bakterijskega meningitisa, saj zmanjša možganski edem, intrakranialni tlak in vnetje možganov, prepreči okvaro notranjega ušesa in skrajša trajanje vročine (9).

Po končanem zdravljenju veliko bolnikov ozdravi, vendar bolezen za sabo pusti različno hude posledice. Najbolj pogoste posledice so okvare sluha, motnje govora, cerebralne ohromitve, težave pri učenju, cerebralna herniacija, manj pogoste pa so motorične okvare, epilepsija, kortikalna slepota in hidrocefalus (9).

Najvarnejše in najučinkovitejše preprečevanje bakterijskih meningitisov je s cepljenjem. Za preprečitev okužbe z meningokoki uporabimo polisaharidna meningokokna cepiva, zaščitijo kar 85 do 95 odstotkov cepljenih otrok starejših od dveh let. Pri preprečevanju pnevmokokne okužbe se uporablja 23-valentno polisaharidno pnevmokokno cepivo, ta zaščiti 85 odstotkov prejemnikov, ne zaščiti pa otrok mlajših od dveh let (9). Da bi preprečili okužbo z *Haemophilus influenzae* se je v Sloveniji leta 2000 uvedlo obvezno cepljenje otrok, kjer se cepi s konjugiranim cepivom *Haemophilus influenzae* tipa B. Cepi se otroke stare 3, 6, 9 in 15 mesecev, peti odmerek pa damo v tretjem do petem letu starosti (15).

### 1.3.1.1 MENINGOKOKNI MENINGITIS IN DRUGE OKUŽBE Z MENINGOKOKI

Ta vrsta bakterijskega meningitisa lahko prizadene več organov: srce, koža, OŽS, sluznice, serozne membrane in nadledvični žlezi (16). Meningokoki najpogosteje povzročajo vnetje možganskih ovojnic in sepso. Če se pojavi meningokokna sepsa je umrljivost obolelih 19 odstotna, drugače je umrljivost pri tej bolezni 7 odstotna v razvitem svetu, v nerazvitih deželah so odstotki višji (17).

To vrsto meningitisa povzroča meningokok *Neisseria meningitidis*, ki vdre v možganske ovojnice in izzove nevtrofilni celični odgovor v likvorju. Vnetje se pojavlja sporadično, občasno tudi epidemično. Pomembna je hitra diagnostika in čimprejšnje zdravljenje (17).

*Neisseria meningitidis* je G- diplokok s polisaharidno kapsulo. Glede na polisaharidno kapsulo ločimo meningokoke v 13 seroloških skupin: A, B, C, D, X, Y, Z, E, W-135, H, I, K in L. Glede na beljakovinske antigene v celični steni delimo meningokoke na več serotipov. Povzročijo lahko kolonizacijo brez simptomov, meningokokni konjunktivitis, okužbe spolovil in sečil (*Neisseria meningitidis* lahko povzroči proktitis, vaginitis, uretritis in cervicitis), okužbe dihal, meningitis in fulminantno sepsa (16).

Epidemiološki rezervoar predstavlja človek: bolnik ali klicenosec, meningokokno klicenoštvo je lahko kronično, občasno ali prehodno. Za to vrsto bolezni obolevajo predvsem otroci stari od 1. do 4. leta starosti, pojavlja pa se predvsem v zimskih in spomladanskih mesecih. Prenaša se kapljično, aerogeno, posredno ali neposredno (17).

#### **Klinično lahko meningokoki povzročijo:**

- brez simptomatsko kolonizacijo,
- lokalne okužbe: okužbe dihal (pljučnica, faringitis), konjunktivitis, okužbe spolovil in sečil (proktitis, uretritis, vaginitis, cervicitis) se kažejo predvsem pri homoseksualcih,
- invazivne okužbe lahko potekajo s prehodno bakteriemijo brez simptomov ali se kot fulminantna bolezen konča s smrtjo: bakteriemija brez simptomov je prehodna, bakteriemija (bolniki kažejo znake okužbe zgornjih dihal ali kožne spremembe, podobne virusnim izpuščajnim boleznim), meningokokcemija brez meningitisa (bolniki imajo znake sepse, levkocitozo, kožne spremembe, utrujenost, slabost, glavobol, hipotenzija, šok in znaki odpovedi številnih

Zapleti, ki se lahko pojavijo po meningokoknih meningitisih so meningokokni artritis, kjer so najpogosteje prizadeti koleno, zapestje in komolec (pri zgodnji in pozni obliki je prizadet vedno en sklep), poleg artritisa so pogoste kožne spremembe, ki se razvijejo v mehurčke in razjede (17).



Slika 3: Izpuščaji pri meningokoknem meningitisu (pogostejši so pri otrocih in epidemijah) (Šumak Irena, knjiga z naslovom: Zdravstvena nega infekcijskega bolnika, slika je uporabljena z avtorjevim dovoljenjem)

#### 1.3.1.2 PNEVMOKOKNI MENINGITIS

Ta vrsta meningitisa prav tako spada v skupino bakterijskih meningitisov, pojavlja se sporadično. Pnevmonoki so najpogostejši povzročitelji bakterijskih meningitisov pri odraslih osebah. Pnevmonokni meningitis je huda bolezen, smrtnost je kar 9 do 40 odstotna (18). Povzročajo različna obolenja dihal predvsem pljučnico, akutno vnetje srednjega ušesa, pnevmokokni endokarditis se pojavi predvsem pri alkoholikih, septični artritis, peritonitis in druge bolezni (19).

Povzročitelj te vrste meningitisa je *Streptococcus pneumoniae*. Pnevmonok se po Gramu obarva modrovijolično, je G<sup>+</sup> kok s kapsulo – polisaharidno ovojnico, ki se pojavlja v parih ali krajših verižicah. Zanj je značilno, da pogojno raste brez prisotnosti kisika, fermentira glukozo in na gojiščih s krvjo tvori značilne kolonije in povzroča alfa hemolizo (nepopolna hemoliza) (19). Poznamo 83 različnih serotipov pnevmokokov. Bakterijski meningitis in sepso povzročajo predvsem serotipi 1, 3, 6, 7, 14, 18, 19, 21 in 22. Nekateri serotipi so bolj invazivni kot drugi. Rezervoar predstavlja človek: bolnik ali klicenosec. Pnevmonoki se prenašajo preko kužnih kapljic s kihanjem in kašljanjem, aerogeno, posredno ali neposredno (18).

Klinični znaki so podobni znakom drugih bakterijskih meningitisov. Oseba zboli zelo nenadno, pojavijo se mrzlica, vročina, glavobol, bruhanje, kmalu se pojavi tudi motnja zavesti, pogosto se pojavijo tudi področni nevrološki znaki (18).

### 1.3.1.3 MENINGITIS POVZROČEN S HAEMOPHILUSOM INFLUENZAE

*Haemophilus influenzae* povzroča meningitis in druga obolenja kot so: vnetje srednjega ušesa, vnetje obnosnih votlin, bronhitis, pljučnico, torakalni empiem in invazivne okužbe. Pred uvedbo cepljenja je bil najpogostejši povzročitelj bakterijskega meningitisa pri nas in v drugih razvitih državah Evrope in ZDA. Po uvedbi cepljenja se je v nekaterih državah pojavnost invazivnih bolezni izredno zmanjšala, ponekod tudi za 90 do 100 odstotkov. Za to boleznijo najpogosteje obolevajo otroci stari od dveh mesecev do dveh let, pri vseh rasah in obeh spolih. Največ jih zboli v jesenskem in zimskem času (15).

*Haemophilus influenzae* je G<sup>-</sup> kokobacil s kapsulo, ki je sestavljena iz visokomolekularnih polisaharidov. Delimo ga na dva načina, glede na biokemične lastnosti v 8 različnih biotipov od I. - VIII. in glede na kapsularne polisaharide v skupino 6 serotipov od A - F. Virulenco določa kemična sestava kapsule. Virulentni sevi *Haemophilus influenzae* tipa B (Hib) imajo v kapsuli poliribozaribitol-fosfat. Meningitis povzroča predvsem biotip I. Hib je respiratorni patogen, ki povzroča okužbe samo pri človeku, bolnik ali klicenosec pa predstavljata epidemiološki rezervoar. Prenaša se enako kot drugi bakterijski meningitisi kapljično ali aerogeno in posredno ali neposredno (15).

Bolezen, ki jo povzroča *Haemophilus influenzae* je posledica naselitve bakterij v zgornjih dihalih. Kolonizacijo, širjenje in povzročanje bolezni mu omogočajo številni

virulentni dejavniki. Najpomembnejša sta peptidoglikan in lipooligosaharid, ki zavirata delovanje proteaze IgA1 in razkrajata IgA1 v sluznici nosno-žrelnega predela. Ostali dejavniki, ki spodbudijo razširitev kolonizacije bakterij so razni tujki, padec odpornosti organizma, refluks v Evstahijevi cevi, okvare epitela v dihalih zaradi kajenja ali virusne okužbe, imunske pomanjkljivosti in pomanjkanje komponent C2 in C3 komplementnega sistema (15).

Klinični znaki Hib meningitisa so podobni kot pri ostalih bakterijskih meningitisih. Bolniki kažejo simptome okužbe zgornjih dihal, bolezen se začne z mrzlico, vročino, glavobolom, bruhanjem in motnjami zavesti. Pri bolnikih, ki so pravilno zdravljeni je smrtnost manjša kot pet odstotna v nerazvitih državah pa kar 40 odstotna. Pri tistih, ki preživijo so opazili trajne posledice kar pri 20 do 30 odstotkih vseh preživelih, pogoste okvare so okvare sluha in pojav epilepsije pri otrocih (15).

### 1.3.2 SEROZNI ALI VIRUSNI MENINGITIS

Povzročitelji seroznega ali virusnega meningitisa so virusi, nekatere bakterije, rikecije, mikoplazme, glive in zajedalci. Bolezen se pojavlja razmeroma pogosto, kaže se z vročino, glavobolom in bruhanjem. Poteka lahko akutno ali kronično. Kronični virusni meningitis se kaže s simptomi in znaki vnetja možganskih ovojnic ter pleocitozo, znaki lahko trajajo več kot 4 tedne. V likvorju, ki je bister, redko prašnat najdemo poleg povečanega števila Lkci še povečano koncentracijo beljakovin, koncentracija glukoze je lahko normalna ali zmanjšana (20).

Večino virusnih meningitisov povzročajo virusi, med njimi so najpogostejši enterovirusi, ki povzročajo kar 85 odstotkov virusnih meningitisov. Ti virusi so coxsackievirusi B5 ter echovirusi 4, 6, 9 in 11. Med bakterijami, ki povzročajo to vrsto meningitisov pri nas je najpogostejša *Borrelia burgdorferi sensu lato*, druge pa so *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, leptospire in brucele. Glive in zajedalci povzročajo virusni meningitis pri sicer zdravem človeku, nekatere pa le pri bolnikih z motnjami v imunskem odzivu (20).

V Sloveniji sta med virusnimi meningitisi pogosta endemični klopni meningoencefalitis, ki ga povzroča virus klopnega meningoencefalitisa, in lymška borelijoza, ki jo povzroča *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Za obe boleznii je značilno, da ju



prenašajo klopi in se zato pojavljata predvsem poleti. Oseba se okuži z vbodom okuženega klopa. Otroci in mladostniki se pogosto okužijo z enterovirusi (20).

Nastanek in razvoj virusnih okužb OŽS je odvisen od virusnega nevrotropizma – privlačnost do živčevja in nevrovirulence. Razširjenost in lokalizacijo virusnih okužb OŽS določajo virusni dejavniki in dejavniki gostitelja, kot so: starost, spol, genetične spremembe in drugi (20).

Za tuberkulozni meningitis, ki ga povzroča *Mycobacterium tuberculosis*, je značilno da se pojavlja pri zelo mladih ali zelo starih osebah. *Mycobacterium tuberculosis* je negibljiv bacil brez kapsule in je acidorezistenten. Raste samo na posebnih gojiščih, zelo počasi, za rast pa obvezno potrebuje kisik. Tuberkulozni meningitis je pogostejši v nerazvitih državah in pri osebah z slabšim socialno-ekonomskim statusom ter pri okuženih s HIV (21).

Z enterovirusi se človek okuži skozi usta. Z virusi ošpic, rdečk, mumpsa, influence in parainfluence se človek okuži preko kužnih kapljic. Herpesvirusi vstopijo v telo skozi kožo ali sluznice, na vstopnem mestu se začnejo razmnoževati in povzročajo bolezenske spremembe. Virus stekline se v OŽS širi hematogeno, to pomeni, da vstopi skozi žrelo, dihala, kožo ali prebavila ali pa se širi po živcih proti OŽS ali proti periferiji iz senzornih ganglijev (20).

Spremembe, ki se pojavijo pri virusnih meningitisih so predvsem opazne na možganskih ovojnicah. Najpogostejši so obsežni infiltrati, pretežno z mononuklearnimi celicami in tudi z nevtrofilnimi granulociti (20).

Klinični znaki, ki se pojavijo pri bolnikih z akutnim virusnim meningitisom so vročina, glavobol, slabost in bruhanje, ki pa so dokaj neznačilni. Bolezen lahko spremljajo tudi prehladni znaki, različni izpuščaji, driska, medtem so lahko prisotni tudi meningealni znaki. Običajno so simptomi blažji kot pri bakterijskih meningitisih. Večina bolnikov ozdravi brez zdravljenja, vendar lahko bolezen traja tudi nekaj tednov. Klinična slika kroničnega virusnega meningitisa je drugačna. Začne se z glavobolom, izgubo apetita in vročino. Prisotna je lahko tudi otrplost tilnika. Veliko oblik kroničnega virusnega meningitisa prizadene bazalne dele možganov in povzroča pareze možganskih živcev. Če bolezen napreduje se opazijo krči, osebne motnje, zmedenost, halucinacije, žariščni nevrološki znaki, kar kaže na okvaro možganov. Lahko se razvije tudi hidrocefalus in zvišan intrakranialni tlak (20).

Zdravljenje kroničnega virusnega meningitisa je odvisno od povzročitelja in traja mesece ali celo življenje. Zdravila, ki jih uporabljamo pri zdravljenju se razlikujejo glede na povzročitelja okužbe. Po zdravljenju bolniki ponavadi ozdravijo brez posledic. Borelijski in tuberkulozni meningitis imata dober izid bolezni, če se ju začne dovolj zgodaj pravilno zdraviti. Za preprečevanje okužb učinkovito in varno uporabljamo cepiva proti tuberkulozi, mumpsu, poliomielitisu in klopnemu meningoencefalitisu (20).

### **Laboratorijska diagnostika virusnih meningitisov**

Diagnostika je podobna kot pri bakterijskih meningitisih. Analize, ki jih opravimo v krvi in likvorju so enake, vendar se rezultati zelo razlikujejo. V likvorju, ki je bister redko prašnat določimo povečano številčno koncentracijo Lkci, normalno ali zvečano koncentracijo glukoze in koncentracijo beljakovin, vendar povečanja niso tako visoka kot pri bakterijskem meningitisu. Razlika je le v koncentraciji glukoze, ki je pri bakterijskem meningitisu zmanjšana. V krvni sliki je število nevtrofilnih Lkci normalno ali povečano. Hitrost sedimentacije Erci in CRP sta lahko povečana. Intrakranialni tlak je včasih zvečan (20).

Poleg teh analiz virusne povzročitelje dokažemo še z drugimi testi, kot so tuberkulinski test za ugotovitev tuberkuloznega meningitisa, PCR metoda, osamitev virusa iz likvorja ali možganov, z dokazom visokega titra protiteles razreda IgM in IgG v serumu ali likvorju, protitelesa dokažemo z različnimi metodami, serološki ELISA test ali z določitvijo intratekalno nastalih specifičnih protiteles, ki nam pokaže razmerje med protitelesi v serumu in likvorju, to pa je zanesljiv dokaz virusne okužbe OŽS (20).

### **1.3.3 REFERENČNE VREDNOSTI**

Izvide, ki jih posamezni laboratoriji izdajajo, zdravnik lahko ovrednoti le, če pozna referenčne vrednosti za posamezne analize. Normalne vrednosti so tiste vrednosti, ki jih z določenimi metodami dokažejo pri zdravih ljudeh. Referenčne vrednosti se med seboj razlikujejo od vrste uporabljenega analizatorja, vrste vzorca, od pogojev dela (način in čas odvzema), od starosti in spola.

CRP v serumu:                   do 5,0 mg/L

CRP v polni krvi: < 8 mg/L

Glukoza v likvorju: 2,5 – 3,9 mmol/L

Glukoza v serumu: 3,6 – 6,1 mmol/L

Beljakovine v likvorju: 0,15 – 0,45 g/L

Beljakovine v serumu: 65 – 80 g/L

Lkci v likvorju: do  $5 \times 10^6$ /L

Tabela 1: Krvna slika

Parameter	Referenčne vrednosti	Enota
Lkci	4,0 – 10,0	$\times 10^9$ /L
Erci	4,2 – 6,3	$\times 10^{12}$ /L
Trci	140 - 340	$\times 10^9$ /L
Hb	120 - 180	g/L
Ht	0,37 – 0,54	
MCV	81,0 – 94,0	fl
MCH	26,0 – 32,0	pg
MCHC	310 - 350	g/L
RDW	11,5 – 14,5	%
MPV	7,4 – 11,0	fl

## 2 NAMEN DELA

Namen naloge je opis laboratorijskega algoritma za obravnavo preiskovancev z bakterijskimi meningitisi in primerjava rezultatov laboratorijskih analiz bakterijskih meningitisov z rezultati virusnih meningitisov.

Od preiskovancev, ki bodo sprejeti v Laboratorij za analitiko specialnih telesnih tekočin bomo odvzeli vzorce venske krvi in vzorce likvorja. Za potrditev suma na bakterijski meningitis bomo v vzorcih venske krvi analizirali krvno sliko z DKS ter CRP. V vzorcih likvorja bomo opravili osnovne preiskave, kot so: organoleptični pregled likvorja, številčno koncentracijo Lkci z diferenciacijo, določili koncentracijo glukoze in celokupno koncentracijo beljakovin. Poleg teh parametrov bomo iz vzorcev likvorja naredili še bakteriološke sedimente, jih obarvali po Gramu in pregledali na prisotnost bakterij.

Iz dobljenih rezultatov bakterijskih meningitisov bomo nato izračunali srednje vrednosti za posamezne parametre in jih z Studentovim t-testom primerjali z vrednostmi virusnih meningitisov. Ugotavljali bomo ali se rezultati analiz bakterijskih meningitisov značilno razlikujejo od rezultatov analiz virusnih meningitisov, kot je navedeno v literaturi.

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1 OPIS PREISKOVANE SKUPINE

Skupina preiskovancev je bila sprejeta na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center v Ljubljani, zaradi suma na bakterijski meningitis. Njihova obravnava je potekala po protokolu, ki se izvaja ob sumu na bakterijski meningitis.

Obravnavali smo skupino 20 oseb, 12 žensk in 8 moških. Njihova povprečna starost je 54 let, najmlajši izmed njih je bil star le 5 let, najstarejši pa je bil star kar 87 let, oba sta bila moška.

Tabela 2: Prikaz obravnavanih preiskovancev v naši skupini

	Število	Delež glede na celoto	Najnižja starost	Najvišja starost
Moški	8	40 %	5	87
Ženske	12	60 %	21	82
Skupaj	20	100 %	5	87

#### 3.2 BIOLOŠKI VZORCI

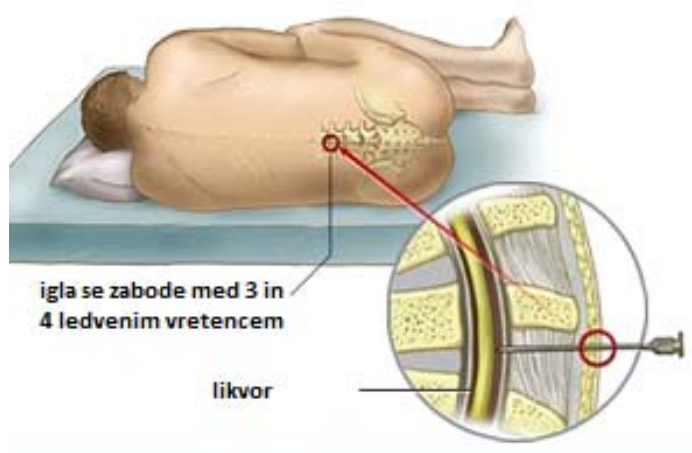
Za ugotavljanje meningitsov je potreben odvzem vzorcev venske krvi iz katerih naredimo krvno sliko z DKS, izmerimo koncentracijo CRP-ja in določimo biokemične analize, ter vzorec likvorja iz katerega naredimo osnovne citološke in biokemične analize, ter druge analize, ki so potrebne, da ugotovimo povzročitelja bolezni.

Venozna kri mora biti odvzeta po standardnem postopku za odvzem venozne krvi. Za biokemične preiskave največ v treh urah od likvorske punkcije, saj je pravilen odvzem pogoj za pravilne rezultate. Najbolje je odvzeti kri 1 do 2 uri pred likvorsko punkcijo, da se v tem času vzpostavi ravnotežje med analiti v krvi in likvorju.

Za hematološke preiskave so bili vzorci venozne krvi odvzeti v vakuumsko epruveto z vijoličnim zamaškom, z dodanim antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA. Hematološke analize smo

opravili čim prej, v skladu s priporočili za analizo vzorcev na hematološkem analizatorju. Pri pediatričnem vzorcu smo naredili krvno sliko iz mikroepruvete z volumnom krvi 250  $\mu$ l. Vzorci krvi so morali biti pred analizo ogreti na sobno temperaturo in dobro premešani na valjčnem mešalcu.

Vzorci likvorja so bili odvzeti z lumbalno punkcijo. Lumbalna punkcija poteka tako, da v sterilnih pogojih zdravnik zabode s tanko iglo v spodnji del hrbtenjačnega kanala pod točko v kateri se konča hrbtenjača, kot je prikazano na sliki spodaj. Preiskovanec ob odvzemu sedi ali leži z usločenim hrbtom.



Slika 4: Lumbalna punkcija (prirejena slika)

Likvor vzorčimo v tri epruvete, ki so plastične, prozorne in koničaste s pokrovom z navojem. Vzorec iz prve epruvete je namenjen za biokemične in imunološke analize, iz druge epruvete za mikrobiološke preiskave in iz tretje epruvete za citološke preiskave. Po punkciji je potrebno likvor čim hitreje dostaviti v laboratorij in ga analizirati, zaradi možnih sprememb v sestavi likvorja. Po določenem času se koncentracija glukoze začne zmanjševati, ker jo celice začnejo porabljati, koncentracija laktata pa se povečuje.

Za mikrobiološke preiskave moramo likvor odvzeti pred začetkom zdravljenja z antibiotiki. Za mikrobiološko osamitev bakterij likvor hranimo v termostatu od 35 do 37  $^{\circ}$ C, za osamitev virusov pa v hladilniku ali na ledu.

V skladu z dobro laboratorijsko prakso smo ves čas ravnali s krvnimi vzorci kot s potencialno kužnim materialom, prav tako smo ravnali tudi z likvorskimi vzorci.

### **3.3 PRINCIP METOD DOLOČANJA**

Vse preiskave, ki smo jih opravili so bile izvedene na Kliniki za infektivne bolezni in vročinska stanja v Laboratoriju za analitiko specialnih telesnih tekočin. Preiskave so bile izvedene po standardiziranih operativnih postopkih.

#### **3.3.1 KRVNA SLIKA Z DKS NA HEMATOLOŠKEM ANALIZATORJU COULTER HmX**

##### **COULTERJEV PRINCIP MERJENJA**

Coulterjev princip se imenuje elektronska metoda za štetje in merjenje delcev, njen princip je zaznavanje in merjenje spremembe električnega upora, ko delci v prevodni tekočini prehajajo skozi majhno odprtino.

Merilna komora je napolnjena z električno prevodno izotonično tekočino, v kateri je nameščena steklena kapilara z okroglo odprtino in dvema elektrodama (notranja je pozitivno nabita, zunanja pa je negativno nabita). Vsaka celica suspendirana v prevodni tekočini predstavlja izolator, saj so celice slabi prevodniki električnega toka, zato motijo konstantni električni tok med elektrodama. Ob prehodu skozi odprtino v kapilari se za trenutek zviša upornost v električni povezavi med obema elektrodama, ki sta nameščeni na obeh straneh odprtine, to povzroči nastanek električnega impulza, ki ga inštrument nato zazna in prešteje kot delec. Število impulzov predstavlja število celic, velikost impulza pa je sorazmerna volumnu celice.

Števec zaznava delce z določeno električno nastavljeno limitno vrednostjo – električnim pragom - threshold, ki izloči neželene delce. Threshold omogoči razlikovanje različnih celic, npr. Erci od Trci. V okviru iste populacije pa razdeli celice v podskupine.

##### **ŠTETJE CELIC**

Poteka v merilnih kapilarah, ki so nameščene v merilnih komorah. Pri analizatorju, ki ima tri števne kapilare, poteka štetje v vseh treh kapilarah istočasno, na koncu pa se izračuna srednja vrednost vseh treh meritev.

Štetje Erci, Lkci in Trci v hematološkem analizatorju poteka vedno pod istimi, optimalnimi pogoji, ki so določeni s premerom odprtine na števeni kapilari, z višino

vakuuma in s časom v katerem štetje poteka. Odprtine imajo določen premer, in sicer čim manjši je, tem natančnejše je štetje, ker vedno obstaja možnost, da gre skozi odprtino več celic hkrati. Vsi Coulterjevi analizatorji to upoštevajo pri rezultatu, ki se korigira. Če želimo, da so naši rezultati pravilni in točni morajo biti kapilare vedno čiste, višina vakuuma pa se med štetjem ne sme spreminjati.

Pri štetju Lkci števec zaznava vse delce, ki imajo volumen večji od 35 fl (femto liter), pred štetjem pa se s hemolizo odstranijo Erci, razen eritroblastov. Za hemolizo se uporabljajo hemolizni reagenti. Trci so normalno manjši od 35 ft in sicer od 2 do 20 ft, Erci pa imajo volumen večji od 36 ft in se merijo skupaj z Lkci.

### DOLOČANJE KONCENTRACIJE HEMOGLOBINA

Vsi hematološki analizatorji določajo tudi koncentracijo hemoglobina (Hb). Meritev je fotometrična. Merjenje Hb lahko poteka v isti merilni komori kot štetje Lkci ali pa lizirana raztopina steče v hemoglobinsko kiveto, kjer je merjenje natančnejše. Najprej se Erci lizirajo z dodatkom hemoliznega reagenta. Nato se fero ioni Hb s kalijevim ferocianidom oksidirajo v feri obliko in nastane hemiglobin. Hemiglobin reagira s cianidnimi ioni kalijevega cianida in nastane hemiglobincianid, kateremu se izmeri absorbanca. Meritev se izvrši pri valovni dolžini 525 nm. Izmerjena absorbanca je sorazmerna koncentraciji Hb v vzorcu krvi.



Slika 5: Princip določanja hemoglobina

**Hematološki analizatorji direktno izmerijo** številčno koncentracijo Lkci, Erci in Trci, ter njihove volumne, in fotometrično izmerijo koncentracijo Hb.

**Iz histogramov** analizatorji določijo srednji volumen Erci (MCV), širino razporeditve Erci (RDW), srednji volumen Trci (MPV).

**Računsko iz kombinacije parametrov** se določijo hematokrit (Ht), srednja koncentracija Hb v Erci (MCH) in srednja koncentracija Hb v enem litru Erci (MCHC)



število Erci x MCV	
----- = hematokrit	
1000	
hemoglobin	hemoglobin
----- = MCH	----- = MCHC
število Erci	hematokrit

Slika 6: Formule za izračun eritrocitnih konstant

### **BELA DIFERENCIALNA KRVNA SLIKA**

DKS se določa s pomočjo **VCS tehnologije**. **V** predstavlja volumen Lkci in se določi po Coulterjevem principu. **C** predstavlja prevodnost, kjer skozi celico poteka elektromagnetni tok visoke frekvence, ki da informacijo o razmerju jedra in citoplazme, gostoti jedra in zrcih v citoplazmi. **S** predstavlja odboj laserske svetlobe, kjer se meri odboj svetlobnih žarkov, ki jih daje helij-neonski laser, pri tem dobimo podatke o notranji zgradbi celice. **V**, **C** in **S** se merijo istočasno na vsakem Lkci posebej, medtem ko potuje skozi pretočno celico. Meritve potekajo neodvisno druga od druge. Trije analogni signali potujejo v analizator, kjer se ojačijo, preračunajo in narišejo obrisi za DKS. Direktno se izmerijo nevtrofilni granulociti, limfociti, monociti, eozinofilci in bazofilci v odstotkih, absolutno število dobimo z izračunom.

### **Ročno diferenciranje levkocitov v krvnem razmazu**

Kadar nam hematološki analizator pri DKS poda tudi dodatna opozorila, je DKS potrebno pregledati še pod mikroskopom.

V obarvanem krvnem razmazu določimo s pomočjo mikroskopa DKS, deleže posameznih vrst Lkci in njihove morfološke spremembe, ocenimo tudi morfološke spremembe Erci ter Trci. Krvne razmaze najprej obarvamo po Pappenheimu in jih posušimo na zraku. Diferenciramo 200 Lkci in jih razdelimo na posamezne vrste Lkci. Pri mikroskopskem pregledu najprej s 400 kratno povečavo ocenimo ali je krvni razmaz enakomerno razmazan in pravilno obarvan. Nato diferenciramo s pomočjo imerzijske povečave (1000 kratna) na tankem delu krvnega razmaza, tam kjer so Erci v vidnem polju enakomerno porazdeljeni, ne ležijo v otokih ali drug na drugem. Mikroskopiramo po tako imenovanem cik-cak sistemu, pri čemer ostanemo vedno v tankem delu razmaza. Rezultat DKS izrazimo z deli enote 1 posameznih vrst Lkci.

### 3.3.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE C-REAKTIVNEGA PROTEINA V KRVI

Za določanje koncentracije CRP smo uporabili komplet QuikRead CRP test, ki ima imunoturbidimetričen princip in temelji na lateks delcih, na katere so vezana protitelesa proti humanemu CRP. Namenjen je kvantitativnemu določanju CRP-ja.



Slika 7: Komplet QuikRead (prirejena slika)

CRP predstavlja antigen, ki v vzorcu krvi reagira s protitelesi na lateks delcih. Pri tem nastane kompleks antigen-protitelo, kar spremeni motnost raztopine, ki jo nato izmeri analizator QuikRead. Reagenti so predhodno kalibrirani, kalibracijska krivulja, specifična za serijo pa je zapisana na magnetni kartici v vsakem reagentnem kompletu. Količina imunskih kompleksov je sorazmerna koncentraciji CRP v vzorcu, ki se izmeri turbidimetrično pri valovni dolžini 340 nm. Analizator koncentracijo CRP izmeri v največ 2 minutah, rezultati pa se izrazijo v mg/L.

#### Postopek določanja:

- v kiveto odmerimo 1 ml pufra,
- vanjo dodamo 20  $\mu$ l vzorca polne krvi,
- kiveto zapremo z zamaškom in jo pretresemo, je ne obračamo,
- izmeri se slepi vzorec v 40 sekundah,

- dodamo suhi reagent ter kiveto premešamo s hitrim obračanjem kivete in jo postavimo nazaj na merilno mesto,
- analizator izmeri koncentracijo CRP-ja v 2 minutah in na zaslonu se izpiše vrednost v mg/L,
- ko iz merilnega mesta odstranimo kiveto, aparat izvede samokontrolo, če samokontrola ni uspešna, potem predhodnega rezultata ne upoštevamo, ampak analizo opravimo ponovno.

### 3.3.3 OSNOVNE PREISKAVE LIKVORJA

#### Organoleptični pregled likvorja

Likvor najprej organoleptično pogledamo in ocenimo:

- **bistrost** (normalno je bistra tekočina, novorojenčki pa imajo rahlo rumeno obarvan likvor),
- **motnost** ocenimo od 0 do 4, motnost ocenjujemo glede na možnost branja skozi tekočino, kjer 0 pomeni, da ni motnosti, pri stopnji 2 motnost dopušča branje teksta skozi epruveto, medtem ko pri stopnji 4 ne vidimo več teksta, vzroki zanj so lahko veliko število Lkci, bakterij in visoka koncentracija beljakovin,
- **eritrokromija** se kaže kot rožnata obarvanost, ocenimo jo od 0 do 3, kjer 3 pomeni močna rožnata obarvanost, vzrok zanj je lahko, da je prišlo do poškodbe žile ob punkciji ali pa kaže na bolezensko krvavitev v možganih, opazujemo jo pred belim ozadjem,
- **ksantokromijo** ocenjujemo po centrifugiranju v supernatantu, kjer opazujemo obarvanost, ki je lahko rumena do rožnata, ocenimo jo od 0 do 3, kjer 0 pomeni brezbarven likvor, medtem ko 3 predstavlja oranžen do rjav likvor; ksantokromija je lahko posledica povečane koncentracije beljakovin ali karotenov v krvi ter prisotnosti melanina (rjav), oksihemoglobina (oranžen) ali bilirubina (rumen),
- **pojavnost fibrinske mrežice**: fibrinska mrežica se pojavi po 12 do 24 urah, če likvor stoji pri sobni temperaturi; nastane ob povečani koncentraciji fibrinogena, pogosto se pojavi pri tuberkuloznem meningitisu, zato iz nje pripravimo

### **Določanje številčne koncentracije in diferenciranje levkocitov**

Likvorske celice moramo prešteti in diferencirati najkasneje v eni uri po likvorski punkciji. V likvorju zdravih oseb so prisotni samo limfociti (70 – 100 odstotkov) in monociti (0 – 30 odstotkov). Ob različnih obolenjih OŽS pa lahko najdemo tudi druge celice. Likvorske Lkci vitalno obarvamo s kisló raztopino fenolnega fuksina, kjer v epruveto pipetiramo 20 µl raztopine fenolnega fuksina in 200 µl dobro premešanega likvorja. Lkci nato preštejemo in diferenciramo v Fuchs–Rosenthalovi komori pod svetlobnim mikroskopom pri 200 do 400 kratni povečavi. Rezultat dobimo tako, da število, ki smo ga prešteli na celotni površini komore (1,6 mm<sup>2</sup>) delimo s 3 in ga izrazimo s celim številom v 10<sup>6</sup>/L. Ob visoki številčni koncentraciji Lkci, preštejemo celice v 1/16 ali 1/256 (en manjši kvadrateg) površini komore in na koncu pomnožimo s 16 ali 256. Ob zelo visokem številu Lkci pa likvor 10-krat ali 100-krat razredčimo s fiziološko raztopino in nato pri izračunu upoštevamo razredčitev.

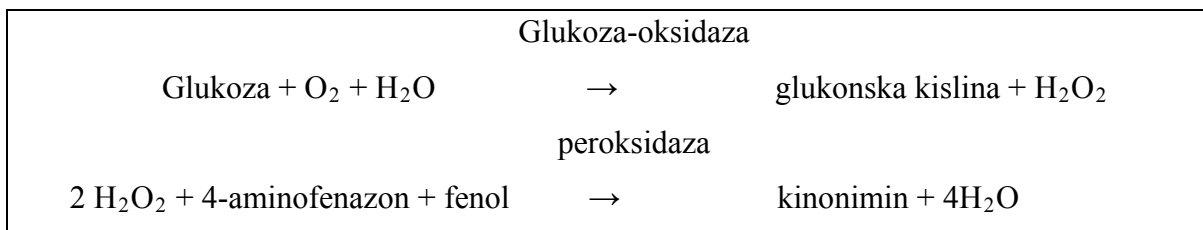
### **Določanje številčne koncentracije eritrocitov**

Na enak način kot Lkci štejemo tudi Erci v Fuchs – Rosenthalovi komori. Edina razlika je v tem, da jih štejemo v nativnem likvorju. Rezultat prav tako izrazimo kot število Erci x 10<sup>6</sup>/L. Če je likvor zelo krvav ga 10-krat ali 100-krat razredčimo s fiziološko raztopino in nato pri izračunu upoštevamo razredčitev. Če je Erci kljub razredčitvi zelo veliko jih opišemo kot zelo številni.

### **Določanje koncentracije glukoze**

Koncentracijo glukoze v likvorju določimo po istem postopku kot v serumu ali plazmi z eno izmed encimskih metod, kjer lahko uporabimo glukozaoksidazno, glukozadehidrogenazno ali heksokinazno metodo. Koncentracija glukoze v likvorju je odvisna od koncentracije glukoze v krvi in znaša v normalnih fizioloških pogojih od 60 do 80 odstotkov koncentracije krvne glukoze in zato poleg likvorske koncentracije glukoze primerjalno določimo še koncentracijo krvne glukoze. Pomembno je, da glukozo določimo v centrifugatu svežega likvorja, ker se pod vplivom mikroorganizmov in levkocitnih encimov hitro razgrajuje. V laboratoriju se uporablja glukoza-oksidazna metoda. Postopek

je specifičen za  $\beta$ -D-glukozo. Glukoza-oksidadza oksidira glukozo v glukonsko kislino, pri tem nastaja vodikov peroksid. Ta ob prisotnosti peroksidaze oksidira brezbarvni kromogen v rdeče-vijolično obarvan kinonimin, katerega absorbanco merimo spektrofotometrično.



Slika 8: Princip določanja glukoze z glukoza – oksidazno metodo

Vsakočas, ko smo odprli nov reagentni komplet (Randox), smo naredili umeritveno krivuljo s pomočjo standarda znane koncentracije 5,55 mmol/L. Absorbanco standardov in vzorcev smo izmerili pri valovni dolžini 500 nm na spektrofotometru UV mini (Shimadzu). Za kontrolo pravilnosti smo pri vsaki seriji izvedli tudi analizo kontrolnega seruma z znano koncentracijo glukoze. Izmerjene koncentracije glukoze so bile pri vseh opravljenih serijah znotraj dovoljenih mej odstopanja.

#### **Postopek določanja:**

- vzorec najprej centrifugiramo 10 minut pri 3000 obratih na minuto, za nadaljnjo uporabo pa uporabimo le supernatant,
- glukozni reagent, ki ga uporabimo moramo inkubirati 10 minut pri 37 °C,
- pripravimo si tri raztopine, in sicer slepi vzorec, standard ter vzorec likvorja,
- za pripravo slepega vzorca pipetiramo 2,0 ml glukoznega reagenta,
- za standard pipetiramo 20  $\mu$ l standarda ter 2,0 ml glukoznega reagenta,
- za vzorec v katerem bomo izmerili koncentracijo glukoze pa pipetiramo 20  $\mu$ l vzorca ter 2,0 ml glukoznega reagenta,
- vse tri raztopine dobro premešamo in inkubiramo 10 minut pri 37 °C,
- na koncu izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 500 nm,
- rezultate pa odčitamo iz umeritvene krivulje v mmol/L.

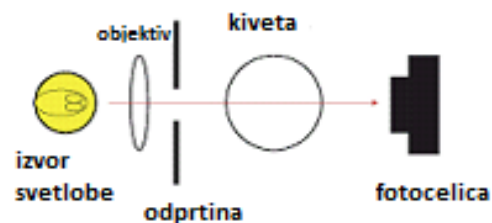
### **Določanje koncentracije beljakovin**

Koncentracijo beljakovin v likvorju smo določali s turbidimetrično metodo z benzetonijskim kloridom. Metoda se uporablja za kvantitativno določanje celokupnih beljakovin v likvorju, kjer beljakovine reagirajo v alkalnem mediju NaOH/Na<sub>2</sub>EDTA z benzetonijskim kloridom. Pri tem nastane motnost, ki je sorazmerna koncentraciji beljakovin v vzorcu, ki jo izmerimo spektrofotometrično. Absorbanco smo izmerili pri valovni dolžini 450 nm na spektrofotometru UV mini (Shimadazu). V aparatu je shranjena umeritvena krivulja, iz katere nam je na podlagi izmerjene absorbance aparat podal koncentracijo beljakovin v vzorcih likvorja v g/L. Za kontrolo pravilnosti smo pri vsaki seriji izvedli tudi analizo kontrolnega seruma z znano koncentracijo beljakovin. Izmerjene koncentracije beljakovin v kontrolnem serumu so bile pri vseh opravljenih serijah znotraj dovoljenih mej odstopanja.

#### **Postopek določanja:**

- vzorce likvorja predhodno centrifugiramo 10 minut pri 2000 obratih na minuto,
- nato si pripravimo standardni vzorec in vzorec likvorja,
- za standardni vzorec odpipetiramo 0,1 ml standarda (Randox CSF control), 4,0 ml NaOH/Na<sub>2</sub>EDTA ter 1,0 ml benzetonijskega klorida,
- za vzorec likvorja pa odpipetiramo 0,1 ml vzorca, 4,0 ml NaOH/Na<sub>2</sub>EDTA ter 1,0 ml benzetonijskega klorida,
- nato obe pripravljene raztopine takoj dobro premešamo (10 krat) in izmerimo absorbanco točno po 10 minutah pri valovni dolžini 450 nm.

Pri **turbidimetriji** se meri intenziteta prepuščene svetlobe. Prepustnost svetlobe je odvisna od koncentracije raztopine, čim večja je koncentracija snovi, tem manjša je prepustnost svetlobe. Absorbance pa ne moremo direktno izmeriti ampak se jo izračuna.



Slika 9: Turbidimetrija - princip merjenja (prirejena slika)

### **Bakteriološki sediment likvorja**

Po Gramu obarvan bakteriološki sediment je presejalni test, s katerim hitro ugotovimo morebitno prisotnost bakterij. Za pripravo bakteriološkega sedimenta smo likvor najprej centrifugirali 20 minut pri 5000 obratih na minuto. Supernatant smo odlili in shranili za biokemične preiskave, iz sedimenta pa smo s pomočjo bakteriološke zanke pripravili tri tanke razmaze na objektna stekelca. Dobro osušene razmaze smo najprej fiksirali z dva do trikratnim potegom preko plamena gorilnika in jih nato obarvali z diferencialnim barvanjem po Gramu, kjer se bakterije zaradi razlik v zgradbi celične stene različno obarvajo. Za barvanje po Gramu smo uporabili komplet barvil Color Gram 2 (Biomérieux).

### **Postopek barvanja:**

- Karbol-Gencian violet: 2 minuti,
- nato preparate speremo pod tekočo vodo,
- lugolova raztopina: 1 minuta,
- razbarvanje z raztopino 3 % solno kislega alkohola: 1 minuta,
- karbolfuksin: 1 minuta,
- preparate speremo pod tekočo vodo
- in jih posušimo na zraku.

Nato smo preparate pregledali pod mikroskopom pod imerzijsko povečavo (1000 kratna) in iskali prisotne bakterije. Po G+ bakterije se obarvajo temno modro-vijolično, po G- bakterije se obarvajo rdeče. Kot rezultat smo navedli obarvanost bakterij (G+ ali G-),

obliko bakterij (koki, paličaste) in njihovo organiziranost (v parih, skupinah ali verižicah). Število bakterij smo opisali z izrazi: posamezne, nekaj, številne ali zelo številne. Opisali smo tudi prisotnost kapsule.

### **3.4 STATISTIČNE METODE ZA OBDELAVO PODATKOV**

Dobljene podatke smo statistično obdelali s programom Microsoft Office Excel. Pri tem smo izračunali standardno deviacijo in za srednjo vrednost uporabili aritmetično sredino. Vzorce bakterijskih meningitisov smo opisno primerjali z enim vzorcem virusnega meningitisa, ki smo ga izmerili. Z Studentovim t-testom smo primerjali rezultate bakterijskih meningitisov z rezultati virusnih meningitisov opisanih v literaturi.



## 4 REZULTATI

V tabeli so prikazani rezultati analiz, ki smo jih obravnavali in statistično obdelali. Za lažjo obravnavo rezultatov smo izračunali srednje vrednosti.

Pri bakterioloških sedimentih so nekateri rezultati označeni z 0, kar pomeni, da je sediment bil narejen vendar v njih nismo opazili prisotnih bakterij. Vendar to še ne pomeni, da v kulturi bakterije niso zrasle.

Tabela 3: Prikaz rezultatov analiz

Vzo-rec	Starost	k-Lkci x10 <sup>9</sup> / L	CRP mg/L	Lc-Lkci x10 <sup>6</sup> / L	Lc-Seg x10 <sup>6</sup> /L	Lc-Ly x10 <sup>6</sup> / L	Lc-Mo x10 <sup>6</sup> /L	Lc-B g/L	Lc-Glu mmol/ L	Bakteriološki sediment
1	21	26,3	250	7306	7093	213	0	7,10	0,04	G-diplokok
2	82	16,7	173	731	729	1	1	1,48	0,9	G-paličaste bakterije
3	71	23,3	261	15307	15200	107	0	6,8	1,4	G+ diplokok s kapsulo
4	60	17,2	233	13654	13547	107	0	5,76	0	G-paličaste bakterije
5	66	17,8	192	1920	1867	53	0	4,8	0,6	0
6	73	15,3	185	13494	13435	59	0	5,94	0,6	G+ diplokok s kapsulo
7	75	10,5	12	9226	8960	266	0	3,16	3,0	0
8	56	20,7	160	3146	2933	213	0	1,67	4,4	G+ diplokok in verižice
9	70	41,5	27	5291	5035	85	171	6,22	0,6	G+ diplokok s kapsulo
10	42	39,5	180	14506	12800	1706	0	3,7	0,6	G+ diplokok s kapsulo
11	63	27,0	182	3243	2987	256	0	7,31	0,6	G-diplokok
12	57	10,3	175	2453	2112	341	0	2,0	3,7	0
13	49	25,5	206	8960	8800	160	0	5,7	0,2	0
14	5	19,7	118	6827	5888	853	85	3,58	3,3	G+ diplokok
15	87	22,4	183	18880	18560	320	0	12,28	1,6	0

<b>16</b>	54	24,2	227	2388	2133	170	85	3,16	0,04	G+ diplokok s kapsulo
<b>17</b>	27	10,8	40	11413	11253	160	0	6,47	0,6	0
<b>18</b>	27	4,3	212	2219	1536	512	171	2,73	1,6	G- diplokok
<b>19</b>	45	19,6	217	2304	1963	256	85	0,83	2,0	0
<b>20</b>	44	18,8	240	2133	1931	197	5	4,8	1,2	0

Tabela 4: Prikaz srednjih vrednosti in standardnih deviacij (SD)

	Sta- rost	k- Lkci x10 <sup>9</sup> /L	CRP mg/L	Lc- Lkci x10 <sup>6</sup> /L	Lc-Seg x10 <sup>6</sup> /L	Lc-Ly x10 <sup>6</sup> /L	Lc- Mo x10 <sup>6</sup> /L	Lc-B g/L	Lc-Glu mmol/L
<b>Srednja vrednost</b>	53,7	20,57	173,65	7270,05	6938,1	301,75	30,15	4,77	1,35
<b>SD</b>	21,51	9,04	71,85	5560,22	5505,05	380,15	57,13	2,68	1,3

V tabeli je dobro prikazano za koliko odstotkov se vrednosti bakterijskega meningitisa pri posameznih parametrih razlikujejo od referenčnih vrednosti.

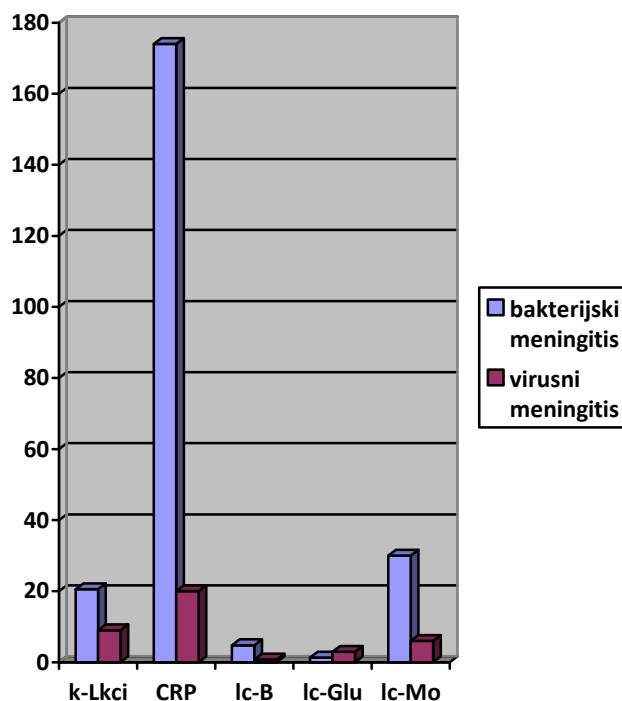
Tabela 5: Primerjava naših rezultatov z referenčnimi vrednostmi

Parameter	Referenčne vrednosti	Vrednosti pri bakterijskem meningitisu (povprečje)	Za koliko % se povečajo/zmanjšajo vrednosti od referenčnih
k-Lkci	4,0 – 10,0 x 10 <sup>9</sup> /L	20,6 x 10 <sup>9</sup> /L	poveča za 106
CRP	do 5,0 mg/L	174 mg/L	poveča za 3380
Lc-Lkci	do 5 x 10 <sup>6</sup> /L	7270 x 10 <sup>6</sup> /L	poveča za 145300
Lc-B	0,15 – 0,45 g/L	4,77 g/L	poveča za 960
Lc-Glu	2,5 – 3,9 mmol/L	1,35 mmol/L	zmanjša za 54,4

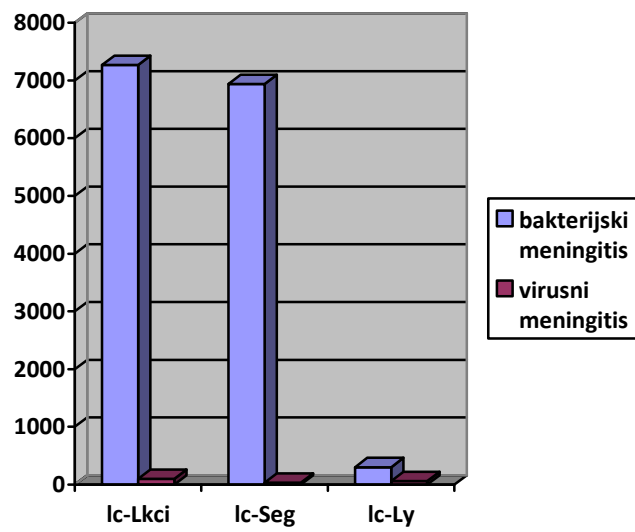
V tabeli 6 je prikazan en vzorec virusnega meningitisa, ki smo ga izmerili. Na sliki 10 in 11 pa so prikazane srednje vrednosti rezultatov bakterijskega meningitisa in rezultati enega vzorca virusnega meningitisa.

Tabela 6: Rezultat analiz pri virusnem meningitisu

Meningitis	k-Lkci $\times 10^9/L$	CRP mg/L	Lc-Lkci $\times 10^6/L$	Lc-Seg $\times 10^6/L$	Lc-Ly $\times 10^6/L$	Lc-Mo $\times 10^6/L$	Lc-B g/L	Lc-Glu mmol/ L
<b>virusni</b>	9	20	101	35	61	6	0,79	2,9



Slika 10: Prikaz razlik za posamezne parametre med bakterijskim in virusnim meningitisom (enote za posamezne parametre so: k-Lkci –  $\times 10^9/L$ ; CRP – mg/L; lc-B – g/L; lc-Glu – mmol/L; lc-Mo -  $\times 10^6/L$ )



Slika 11: Prikaz razlik za posamezne parametre med bakterijskim in virusnim meningitisom (enote za posamezne parametre so: lc-Lkci -  $\times 10^6/L$ ; lc-Seg -  $\times 10^6/L$ ; lc-Ly -  $\times 10^6/L$ )

## 5 RAZPRAVA

Poznamo več vrst meningitisov, v diplomski nalogi smo se osredotočili na diagnostiko bakterijskih meningitisov, ki jih povzročajo bakterije. Bakterijski meningitis je zelo resno obolenje, kjer je potrebno zelo hitro ukrepanje. Pomembna je hitra ugotovitev povzročitelja bolezni, hitro ukrepanje in primerno antibiotično zdravljenje bolnikov, da se čim bolj zmanjšajo neželene posledice, ki jih meningitis pušča za seboj (9).

Pri skupini 20 preiskovancev, ki smo jo obravnavali, smo ugotovili, da bakterijski meningitis lahko prizadene tako ženske, ki jih je bilo 12 (60 odstotkov), kot moške, ki jih je bilo 8 (40 odstotkov). Žensk je bilo sicer več, vendar se lahko pojavlja pri obeh spolih, prav tako se pojavlja pri vseh starostnih skupinah, predvsem pa prizadene otroke stare od enega do štirih let ter starostnike (9). Povprečna starost preiskovancev je bila 53,7 starostni razpon za moške je bil od 5 do 87 let, medtem ko je bil razpon za ženske od 21 do 82 let. Določena starostna skupina je bolj dovzetna za določeno vrsto meningitisa, kot na primer meningokokni meningitis pogosto prizadene otroke stare od enega do štirih let (17). Potek bolezni pa se razlikuje od povzročitelja bolezni, starosti osebe in dejavnikov tveganja ter od obrambnega mehanizma vsakega posameznika (9). Pri virusnem meningitisu so simptomi velikokrat blažji kot pri bakterijskem. Oseba z virusnim meningitisom lahko ozdravi tudi brez zdravljenja, vendar to lahko traja tudi nekaj tednov (20).

Rezultate analiz bakterijskih meningitisov smo opisno primerjali z enim vzorcem virusnega meningitisa, ter z rezultati analiz virusnih meningitisov, ki so omenjeni v literaturi. Ugotavljali smo njihova odstopanja od referenčnih vrednosti, ter jih komentirali. Primerjali smo srednje vrednosti osnovnih hematoloških preiskav in preiskav v likvorju bakterijskega meningitisa z vrednostmi virusnih meningitisov. Med tema dvema vrstama meningitisa obstajajo zelo značilne in velike razlike v rezultatih analiz. Razlika je že v samem povzročitelju, kjer virusni meningitis povzročajo predvsem virusi, lahko tudi bakterije ali glivice (20), medtem ko bakterijski meningitis povzročajo le bakterije (9). Razlikujeta se v poteku bolezni, načinu zdravljenja in ugotovitvi samega povzročitelja. Razlika, ki jo opazimo že pri organoleptičnem pregledu je motnost likvorskega vzorca. Pri bakterijskem meningitisu je likvor moten ali celo gnojen (9), pri virusnem meningitisu pa je likvor bister le redko prašnat (20).

Tudi s pomočjo biokemičnih kriterijev lahko ločimo ali gre za bakterijski ali virusni meningitis. Vendar je za končno potrditev bakterijske okužbe najpomembnejša izolacija bakterije iz likvorja. Glede na biokemične kriterije smo v naši preiskovani skupini dokazali trinajst bakterijskih meningitsov, pri ostalih sedem pa ne moremo s pomočjo teh kriterijev trditi, da gre za bakterijski meningitis, zato smo naredili bakteriološke sedimente likvorja in jih pregledali. Izmed teh sedmih vzorcev smo v treh vzorcih dokazali bakterije v bakterioloških sedimentih. Pri štirih vzorcih pa nismo odkrili bakterij v sedimentih, vendar to še ne dokazuje, da pri njih ne gre za bakterijski meningitis.

Značilno za bakterijski meningitis je, da je večina izmerjenih parametrov povečanih, edina izjema je koncentracija glukoze v likvorju, ki je značilno znižana (9). Tako so tudi naše srednje vrednosti izračunanih posameznih parametrov značilne za bakterijski meningitis.

Pri bakterijskem meningitisu, kjer gre za invazivno okužbo je izračunana srednja vrednost CRP 173,65 mg/L (območje od 12 do 261 mg/L). Vrednost povečanega CRP-ja smo izmerili pri vseh dvajsetih preiskovancih. Srednja vrednost se je povečala za 3380 odstotkov. Značilno za bakterijske infekcije je, da se CRP poveča (9). Za virusni meningitis je značilno, da se koncentracija CRP-ja poveča ali pa je normalna (20). Povečan CRP se v krvi pojavi že v 6 do 12 urah po začetku vnetnega procesa, tako da si lahko tudi z njim pomagamo glede opredelitve za katero vrsto meningitisa gre, oziroma ali gre za bakterijsko ali virusno okužbo (13).

Vrednosti za številčno koncentracijo Lkci v krvi in likvorju so mnogo višje pri bakterijskem meningitisu kot pri virusnem. Pri devetnajstih vzorcih bakterijskega meningitisa je številčna koncentracija Lkci v krvi povečana, pri enem vzorcu pa je koncentracija normalna, kar je lahko vzrok, da še ni prišlo do odgovora organizma, oziroma je potek bolezni v zgodnji fazi. Srednja vrednost številčne koncentracije Lkci v krvi pri bakterijskem meningitisu je  $20,57 \times 10^9/L$  (območje od 4,3 do  $41,5 \times 10^9/L$ ). Ugotovili smo, da se je številčna koncentracija Lkci v krvi pri bakterijskem meningitisu, kjer prevladujejo nevtrofilni granulociti (9), povečala za 106 odstotkov. Pri virusnih meningitidih pa je številčna koncentracija Lkci v krvi normalna, lahko pa se tudi poveča, prevladujejo predvsem mononuklearni Lkci (20).

Pri vseh dvajsetih vzorcih bakterijskega meningitisa smo izmerili povečano številčno koncentracijo Lkci v likvorju. Srednja vrednost številčne koncentracije Lkci v likvorju je  $7270,05 \times 10^6/L$  (območje od 731 do  $18880 \times 10^6/L$ ). Pri bakterijskem meningitisu smo

ugotovili, da se je številčna koncentracija Lkci v likvorju povečala kar za 145300 odstotkov od referenčnih vrednosti. Pri bakterijskih meningitisih se številčna koncentracija Lkci v krvi močno poveča, medtem ko za virusne meningitise ni značilno tako močno povečanje, poveča se le rahlo (22).

Vrednost koncentracije beljakovin v likvorju je pri vseh dvajsetih vzorcih bakterijskega meningitisa povečana, njihova srednja vrednost je 4,77 g/L (območje od 0,83 do 12,28 g/L). Ugotovili smo, da se je koncentracija celokupnih beljakovin v likvorju pri bakterijskem meningitisu povečala za 960 odstotkov od referenčnih vrednosti. Koncentracija celokupnih beljakovin pri virusnem meningitisu pa je lahko normalna ali le rahlo zvečana (20). Vzrok za povečano število Lkci in beljakovin v likvorju je povečana prepustnost krvno-možganske pregrade. Prepustnost pa se poveča zaradi vdora in razmnoževanja bakterij v možganskih ovojnicah in OŽS (9).

Vzrok za zmanjšano koncentracijo glukoze v likvorju je prisotnosti velikega števila celic in bakterij, zato ker celice in bakterije za svoje delovanje potrebujejo glukozo. Za bakterijski meningitis je značilno, da se koncentracija glukoze v likvorju zniža (9). Znižala se je pri šestnajstih vzorcih bakterijskega meningitisa, pri treh vzorcih je koncentracija glukoze v likvorju normalna, pri enem vzorcu pa je celo povečana. Vendar je njihova srednja vrednost, ki smo jo izračunali in nato obravnavali znižana. Srednja vrednost koncentracije glukoze bakterijskega meningitisa je 1,35 mmol/L (območje od 0 do 4,4 mmol/L). Znižala se je kar za 54,4 odstotkov od referenčnih vrednosti. Za virusne meningitise je značilno, da je koncentracija glukoze v likvorju normalna, lahko pa se tudi poveča (20).

Iz narejenih bakterioloških sedimentov smo v treh vzorcih dokazali G- diplokoke, pri dveh vzorcih G- paličaste bakterije in pri sedmih vzorcih G+ diplokoke s kapsulo ali pa so bile prisotne tudi verižice poleg diplokokov. Tako da smo dokazali, da gre za bakterijske meningitise. Vendar pa pri ostalih osmih bakterioloških sedimentih nismo odkrili bakterij, vendar to še ne izključuje bakterijskega meningitisa. Za natančnejšo prepoznavanje je potrebno kulturo zasejati na gojiščih (9).

## 6 SKLEP

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo:

- Na podlagi biokemičnih kriterijev lahko sklepamo za katero vrsto meningitisa gre. Vendar smo opazili, da so znotraj preiskovane skupine tudi preiskovanci, ki niso imeli značilno spremenjenih vrednosti posameznih laboratorijskih preiskav.
- Pri bakterijskih meningitisih so srednje vrednosti posameznih izmerjenih parametrov močno povišane, razen koncentracija glukoze v likvorju, ki je bila močno znižana.
- Za bakterijske meningitise je značilno povečanje številčne koncentracije Lkci v krvi in likvorju. Med Lkci prevladujejo nevtrofilni granulociti, za njimi so limfociti in še monociti, ki niso tako značilni. Za virusne meningitise je značilno, da je številčna koncentracija Lkci v likvorju normalna ali povečana, med njimi pa prevladujejo mononuklearni Lkci.
- Pri bakterijskih meningitisih je značilno, da je koncentracija CRP-ja močno povečana, medtem ko pri virusnih meningitisih ni povečana ali je le rahlo.
- Pri bakterijskih meningitisih je koncentracija glukoze v likvorju znižana, medtem ko je pri virusnih meningitisih normalna ali celo povečana.
- Za bakterijske meningitise je značilno, da je koncentracijo celokupnih beljakovin v likvorju povečana. Pri virusnih meningitisih pa je koncentracija beljakovin v likvorju normalna ali povečana.
- V bakterioloških sedimentih likvorja pri bakterijskih meningitisih prevladujejo G+ diplokokki, kjer smo jih našli v 7 vzorcih, G- diplokoke smo dokazali v 3 vzorcih in G-paličaste bakterije smo dokazali v 2 vzorcih.
- Ugotovili smo, da vrednosti posameznih parametrov pri bakterijskih meningitisih bolj odstopajo od referenčnih vrednosti, kot vrednosti parametrov pri virusnih meningitisih.



## 7 LITERATURA

1. Arnau E: Živčevje. V: Arnau E: Človeško telo: Vodnik po človeškem telesu, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2001: 52 - 54
2. Štiblar – Martinčič D, Vraspir – Porenta O, Zorc – Pleskovič R: Centralno živčevje. V: Štiblar – Martinčič D, Vraspir – Porenta O, Zorc – Pleskovič R: Histologija, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete, Ljubljana, 1998: 48
3. Dekleva A, Širca A: Živčevje. V: Dekleva A, Širca A: Naravoslovni atlas: Anatomija človeka, Založba mladinska knjiga, Ljubljana, 1994: 74 - 86
4. Pocajt M, Širca A: Centralno in periferno živčevje. V: Pocajt M, Širca A: Anatomija in fiziologija, DZS, Ljubljana, 1996: 272 - 286
5. Brzin B: Možgani. V: Brzin B: Kako deluje? : človek in njegove bolezni, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1984: 370
6. Pocajt M, Širca A: Vegetativno živčevje. V: Pocajt M, Širca A: Anatomija in fiziologija, DZS, Ljubljana, 1996: 286 - 291
7. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Meningitis>, (4.1.2010)
8. Radšel – Medvešček A: Okužbe osrednjega živčevja. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 26
9. Radšel – Medvešček A: Gnojni meningitis. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 30 - 42
10. Radšel – Medvešček A: Gnojni meningitis. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 1992: 55 - 67
11. Šumak I: Okužbe živčevja. V: Šumak I: Zdravstvena nega infektološkega bolnika, Založba Pivec, Maribor, 2006: 107
12. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ: Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Clinical Infectious Diseases 2004; 39: 1267-84
13. [http://www.dr-gorkic.si/pdf/CRP\\_konc.pdf](http://www.dr-gorkic.si/pdf/CRP_konc.pdf), (4.1.2010)
14. Spanos A, Harrell FE, Durack DT: Differential diagnosis of acute meningitis, An analysis of the Predictive Value of Initial Observations. JAMA 1989-Vol 262, No. 19: 2700-07

15. Radšel – Medvešček A: *Haemophilus influenzae* meningitis. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 49 - 51
16. Radšel – Medvešček A: Meningokokni meningitis. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 1992: 67 - 72
17. Radšel – Medvešček A: Meningokokni meningitis in druge okužbe z meningokoki. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 43 - 48
18. Radšel – Medvešček A: Pnevmonokokni meningitis. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 52, 53
19. Marolt – Gomišček M: Okužbe, ki jih povzroča *S. Pneumoniae*. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 303 - 306
20. Radšel – Medvešček A: Serozni meningitis. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 54 - 58
21. Radšel – Medvešček A: Tuberkulozni meningitis. V: Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 1992: 298 - 301
22. Abro AH, Abdou AS, Ali H, Ustadi AM, Hasab AAH: Cerebrospinal fluid analysis – acute bacterial versus viral meningitis. Pak J Med Sci 2008; 24(5): 645-50.