

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**Elizabeta Božnar Alič**

**POMEN DOLOČANJA S100B PROTEINA V DIFERENCIALNI  
DIAGNOSTIKI BAKTERIJSKEGA IN VIRUSNEGA MENINGITISA**

**SIGNIFICANCE OF S100B PROTEIN DETERMINATION IN DIFFERENTIAL  
DIAGNOSTICS OF BACTERIAL AND VIRAL MENINGITIS**

**MAGISTRSKO DELO**

**Ljubljana, 2010**

**Mentor:**

**Prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., višji svetnik**

**Somentor:**

**Doc. dr. Matjaž Jereb, dr. med.**

**Komisija za oceno in zagovor:**

**Prof. dr. Jana Lukač Bajalo, predsednica**

**Prof. dr. Joško Osredkar, mentor**

**Doc. dr. Matjaž Jereb, somentor**

**Prof. dr. Janja Marc, članica**

Laboratorijski del magistrskega dela je potekal na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Klinični del magistrskega dela je potekal na Kliniki za infektivne bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

## **IZJAVA**

*Izjavljam, da sem magistrsko delo z naslovom **Pomen določanja S100B proteina v diferencialni diagnostiki bakterijskega in virusnega meningitisa** opravila samostojno pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja in somentorstvom doc. dr. Matjaža Jereba.*

*Elizabeta Božnar Alič, univ. dipl. biolog*

## ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju se zahvaljujem za vso pomoč in spodbudo v ključnih trenutkih in za vse nasvete in usmeritve, da je to delo sploh lahko nastalo.

Somentorju doc. dr. Matjažu Jerebu se zahvaljujem za pomoč in nasvete s kliničnega stališča, ki so mi pomagali pravilno umestiti laboratorijske rezultate raziskave.

Doc. dr. Milanu Skitku se zahvaljujem za pomoč pri materialni izvedbi naloge.

Doc. dr. Iztoku Grabnarju se zahvaljujem za pomoč pri statistični obdelavi in interpretaciji rezultatov statistične obdelave.

Zahvaljujem se medicinski sestri Jadranki Stojnič za pomoč pri zbiranju vzorcev.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, ki so pripomogli k nastanku tega dela, še posebno asist. dr. Alešu Jerinu, Janezu Pavliču in sodelavkam Laboratorija za analitiko specialnih telesnih tekočin.

Hvala tudi moji družini, ki mi je tudi tokrat potrpežljivo in razumevajoče stala ob strani.

## KAZALO

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1.	S100B PROTEIN	1
1.1.1.	Koncentracija S100B proteina pri preiskovancih brez bolezni osrednjega živčevja	4
1.1.2.	Koncentracija S100B proteina pri bolnikih z meningitisom	5
1.2.	OKUŽBE OSREDNJEGA ŽIVČEVJA	7
1.3.	LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB OSREDNJEGA ŽIVČEVJA	8
<b>2.</b>	<b>NAMEN DELA IN PREDSTAVITEV HIPOTEZ</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE</b>	<b>12</b>
3.1.	PREISKOVANCI	12
3.2.	VZORCI	13
3.2.1.	Likvor	13
3.2.2.	Kri	14
3.2.	ANALIZNE METODE	14
3.3.1.	Določanje koncentracije S100B proteina v serumu in likvorju	14
3.3.2.	Določanje koncentracije levkocitov v krvi	17
3.3.3.	Določanje koncentracije beljakovin v likvorju	18
3.3.4.	Določanje koncentracije glukoze v likvorju	19
3.3.5.	Določanje koncentracije levkocitov v krvi	20
3.3.6.	Določanje koncentracije CRP v serumu	22
3.3.6.	Statistične metode	22
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>24</b>
4.1.	KONCENTRACIJA S100B PROTEINA V LIKVORJU IN SERUMU	25
4.2.	KONCENTRACIJE S100B PROTEINA V POVEZAVI S STAROSTJO IN LABORATORIJSKIMI PREISKAVAMI	30
4.3.	BOLNIKI Z BAKTERIJSKIM MENINGITISOM	31
4.4.	BOLNIKI Z OSAMITVIJO BAKTERIJ IZ LIKVORJA	33
4.5.	DIAGNOSTIČNA ZANESLJIVOST POSAMEZNIH LABORATORIJSKIH PREISKAV	35
<b>5.</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>54</b>

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>CRP</b>	C-reaktivni protein
<b>BM</b>	bakterijski meningitis
<b>HSV</b>	herpes simplex virus
<b>IgG</b>	imunoglobulini razreda G
<b>IgM</b>	imunoglobulini razreda M
<b>K</b>	kri
<b>KME</b>	klopni meningoencefalitis
<b>KMP</b>	krvno možganska pregrada
<b>Lc</b>	likvor
<b>KO</b>	kontrolna skupina
<b>NNV</b>	negativna napovedna vrednost
<b>OŽ</b>	osrednje živčevje
<b>PNV</b>	pozitivna napovedna vrednost
<b>RIA</b>	radioimunska metoda
<b>RLU</b>	jakost svetlobe v relativnih enotah (relative light units)
<b>ROC</b>	ROC krivulja (Receiver Operator Characteristic)
<b>S</b>	serum
<b>S100B</b>	S100B protein
<b>SD</b>	standardni odklon
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	faktor tumorske nekroze $\alpha$
<b>UKC</b>	Univerzitetni klinični center
<b><math>\bar{x}</math></b>	aritmetična sredina

## POVZETEK

V zadnjem času je bilo opravljenih več raziskav, kjer so ugotavljali in spremljali obsežnost okvare osrednjega živčevja (OŽ) z določanjem koncentracije biokemičnega označevalca S100B proteina v likvorju in serumu. Večina S100B proteina se nahaja v astrocitih OŽ in se po njihovi poškodbi ali propadu sprošča v likvor in preko poškodovane krvno-možganske pregrade (KMP) prehaja v kri. Večje koncentracije nakazujejo obsežnejšo okvaro ter so v povezavi s slabšim izidom po možganski okvari zaradi različnih vzrokov.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali obstaja razlika v koncentraciji S100B proteina v serumu in likvorju bolnikov z bakterijskim meningitisom (BM) in virusnim meningitisom ter ali ima določanje koncentracije S100B proteina dodaten diferencialno diagnostični pomen.

V prospektivno raziskavo smo vključili 30 preiskovancev z izključeno okužbo OŽ (kontrolna skupina, KO), 35 bolnikov s klopnim meningoencefalitisom (KME) in 25 bolnikov z bakterijskim meningitisom.

Največjo koncentracijo S100B proteina smo izmerili v likvorju bolnikov z BM (srednja koncentracija 4,21 µg/L), nižjo pri bolnikih s KME (srednja koncentracija 1,35 µg/L) in najnižjo pri kontrolni skupini (srednja koncentracija 0,85 µg/L). Pri vseh bolnikih z BM je bila likvorska koncentracija S100B proteina večja od mejne vrednosti 1,50 µg/L. Ta vrednost je bila presežena tudi pri 37 % bolnikov s KME in 10 % preiskovancev v kontrolni skupini. Največjo koncentracijo S100B proteina v likvorju smo našli pri bolnikih z BM, ki so imeli težji potek bolezni z motnjo zavesti in pri bolnikih s KME, ki so imeli težji potek bolezni s sliko meningoencefalitisa. Pri bolnikih z okužbo OŽ koncentracije S100B proteina v likvorju, ki so nižje od 1,60 µg/L s 100 % zanesljivostjo izključujejo bakterijsko okužbo OŽ.

Koncentracije S100B proteina v likvorju so se statistično pomembno razlikovale med vsemi tremi skupinami (KME/KO  $p < 0,001$ ; BM/KO  $p < 0,001$ ; BM/KME  $p < 0,001$ ). Pri bolnikih s KME smo dokazali, da se koncentracija S100B proteina v likvorju povečuje s starostjo bolnikov ( $p = 0,01$ ). Pri bolnikih z BM smo ugotovili, da je bila povečana koncentracija S100B proteina v likvorju v sorazmerju s povečano koncentracijo beljakovin v likvorju ( $p = 0,025$ ). Pri kontrolni skupini povečana

koncentracija S100B proteina v likvorju ni bila v sorazmerju z višjo starostjo, ne z laboratorijskimi parametri, ki smo jih v raziskavi določali.

Srednja koncentracija S100B proteina v serumu bolnikov z BM je bila 0,15 µg/L. Bolniki s KME in preiskovanci v kontrolni skupini so imeli enako srednjo koncentracijo S100B proteina v serumu (0,07 µg/L). Mejna koncentracija v serumu (0,15 µg/L) je bila presežena pri 48 % bolnikov z BM, pri 20 % bolnikov s KME in pri 10 % preiskovancev v kontrolni skupini. Med kontrolno skupino in KME ni bilo statistično pomembne razlike v koncentraciji S100B proteina v serumu ( $p = 0,572$ ), medtem ko smo dokazali statistično pomembno razliko med kontrolno skupino in BM skupino ( $p = 0,001$ ) ter KME in BM skupino ( $p = 0,003$ ).

Povečana koncentracija S100B proteina v likvorju ni bila v sorazmerju s povečano koncentracijo S100B proteina v serumu pri nobeni skupini (KO:  $p = 0,756$ ; KME:  $p = 0,309$ ; BM:  $p = 0,309$ ).

Koncentracije S100B proteina v likvorju nam lahko služi kot napovedni dejavnik težjega poteka bakterijskega in virusnega meningitisa ter v nejasnih primerih tudi kot dodatni laboratorijski kriterij za razlikovanje bakterijskega meningitisa od virusnega meningitisa.



## ABSTRACT

In recent years, there have been numerous studies establishing and monitoring the existence of brain damage based on determining the S100B protein biochemical marker in cerebrospinal fluid (CSF) and serum. In the central nervous system the S100B protein is most abundant in astrocytes and after brain damage it is released in CSF and then it passes into systemic circulation in the areas of blood-brain barrier impairment. High levels of S100B have been considered as a biomarker that could indicate damage or dysfunction of the central nervous system.

The purpose of our research was to determine a difference in the S100B protein level in serum and CSF of patients with bacterial and viral meningitis and to establish whether S100B protein concentration is of additional importance for differential diagnosis.

In the prospective study 3 study groups were included: a control group (CG) of 30 patients with no central nervous system infection, a group of 35 patients with tick-borne encephalitis (TBE) and a group of 25 patients with bacterial meningitis (BM). Median values of the S100B protein in CSF were 4.21 µg/L for the bacterial meningitis group, 1.35 µg/L for tick-borne encephalitis group and 0.85 µg/L for control group. With all patients with BM the CSF S100B concentration was above cut off value of 1.50 µg/L. 37 % patients with TBE and 10 % patients in the control group had CSF S100B concentration above the cut off value, too. The highest CSF S100B concentration was found in patients with BM and neurological complications and in patients with TBE and meningoencephalitis. With patients having the infection of central nervous system and the S100B protein in cerebrospinal fluid lower than 1.60 µg/L s, bacterial infection can be excluded with 100% certainty.

Statistically significant differences in CSF S100B concentration were found between all three groups (TBE/CG  $p < 0.001$ ; BM/CG  $p < 0.001$ ; BM/TBE  $p < 0.001$ ). Concentration of the S100B protein in CSF increased with age in patients with TBE ( $p = 0.01$ ). Increased concentration of S100B protein was in correlation with the increased CSF protein concentration in patients with BM. In the control

group increased, CSF S100B concentration was not in correlation with age and routine laboratory parameters.

Median concentration of the S100B protein in the serum of patients with BM was 0.15 µg/L. Patients in the control group had the same median concentration of serum S100B protein than the patients in the TBE group (0.07 µg/L). 48 % patients in the BM group, 20 % patients in the TBE group and 10 % patients in the control group had the serum S100B concentration above the cut off value 0.15 µg/L. There were significant differences between the CG and BM group ( $p = 0.001$ ) and TBE and BM group ( $p = 0.003$ ) in serum S100B concentration, but there was no significant difference between the CG and TBE group in S100B concentration in serum ( $p = 0.527$ ).

Increased S100B concentration was not in correlation with increased serum S100B concentration in none of our research groups (CG:  $p = 0.756$ ; TBE:  $p = 0.309$ ; BM:  $p = 0.309$ ).

The CSF S100B concentration can be used as a biochemical marker to predict more severe form of bacterial and viral meningitis and also as an additional laboratory criterion to distinguish bacterial meningitis from viral meningitis when other results are indecisive.

## **1. UVOD**

Diagnostika okužb osrednjega živčevja (OŽ) je lahko dolgotrajen postopek, saj je za zanesljivo diagnozo potrebna osamitev bakterij iz likvorja ali krvi, ob značilnih biokemičnih in citoloških spremembah likvorja. Kljub številnim preiskavam, ki so na voljo, je etiologija pogosto nepojasnjena in diagnoza kakor tudi prognoza bolezni vprašljiva.

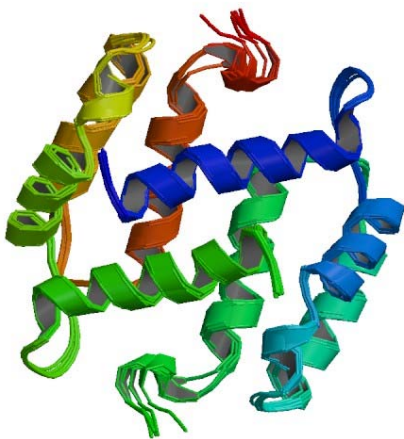
V zadnjem času je vse več raziskav, ki ugotavljajo in spremljajo obsežnost okvare OŽ z določanjem koncentracije biokemičnega označevalca S100B proteina v likvorju in serumu. Večina S100B proteina je v astrocitih OŽ in se po njihovi poškodbi ali propadu sprošča v likvor in preko poškodovane krvno-možganske pregrade (KMP) prehaja v kri. Večje koncentracije nakazujejo hujšo stopnjo in večji obseg okvare ter so v povezavi s slabšim izidom po možganski okvari zaradi različnih vzrokov.

V največ opravljenih raziskavah so ugotavljali spremembe koncentracije S100B proteina pri ishemični okvari možganov zaradi srčnega zastoja in po poškodbah glave. Raziskav, v katerih bi ugotavljali vlogo, dinamiko in diferencialno diagnostično vrednost S100B proteina pri okužbah OŽ pa je malo.

### **1.1. S100B PROTEIN**

S100B protein pripada veliki skupini S100 proteinov, ki ima najmanj 25 predstavnikov in je največja skupina "EF-hand" (vijačnica-zanka-vijačnica) signalnih proteinov pri človeku (1, 2, 3, 4). Prvi protein iz te skupine je izoliral B. W. Moore leta 1965 iz citoplazme glia celic govejih možganov (5) in ga zaradi 100-odstotne topnosti v raztopini amonijevega sulfata pri nevtralnem pH, poimenoval S100 protein (100 % soluble) (5).

S100 proteini z visoko afiniteto vežejo kalcij in so različno izraženi v različnih vrstah celic in tkiv, kjer opravljajo specifične naloge (4, 6, 7, 8, 9,10). S100 proteini so majhni kisli vodotopni proteini z molsko maso od 10 do 12 kDa. Obstajajo v treh različnih dimernih izoformah: S100A<sub>0</sub> ( $\alpha\alpha$ , homodimer iz dveh  $\alpha$  podenot), S100A ( $\alpha\beta$ , heterodimer iz  $\alpha$  in  $\beta$  podenote) in S100B ( $\beta\beta$ , homodimer iz dveh  $\beta$  podenot). S100 proteini imajo homologno strukturo kot kalmodulin in troponin C in so udeleženi v uravnavanje številnih od kalcija odvisnih znotrajceličnih aktivnosti, kot so: fosforilacija beljakovin, aktivacija encimov, rast in diferenciacija tkiv, dinamika sestave celičnega skeleta, organizacije strukture celične membrane, znotraj celična homeostaza kalcija, vnetje in zaščita pred oksidativno poškodbo celic. Nekateri od S100 proteinov se sproščajo in izločajo tudi v zunajcelični prostor in kažejo trofične ali škodljive učinke, odvisno od koncentracije (1, 4, 11, 12, 13).



**Slika 1:** Kristalna struktura S100B proteina

S100B protein je  $\beta\beta$ -homodimer z molsko maso 21 kDa, njegov gen se nahaja na daljši ročici 21 kromosoma (21q22.3). Veže  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$  in je strukturno podoben kalmodulinu, troponinu C in parvalbuminu, ki prav tako vežejo  $\text{Ca}^{2+}$  ione (4, 14).

V visokih koncentracijah se nahaja predvsem v tkivih živčnega sistema, kjer predstavlja največji, 90 % delež vseh S100 proteinov v OŽ in je desetletja veljal za protein, specifičen le za živčni sistem (13). V živčnem sistemu je S100B

proteina največ v celicah glie: astrocitih, endotelialnih celicah, oligodendrocitih, mikro celicah glie in Schwannovih celicah (4, 15, 16, 17), prisoten pa je tudi v ostalih vrstah živčnih celic. Kasnejše raziskave so pokazale, da S100B protein ni omejen le na živčni sistem (3). V tkivih, ki niso živčnega izvora, je v nižjih koncentracijah in le v določenih vrstah celic: melanocitih, Langerhansovih celicah, hondrocitih, zvezdastih folikularnih celicah adenohipofize, satelitskih celicah adrenalne žleze, Leydigovih celicah, interdigitalnih retikulumskih celicah in celicah založnega tkiva (3, 4, 9, 15). S100B protein se presnavlja in izloča preko ledvic in ima razpolovno dobo do 60 minut (3, 7).

S100B protein, ki je znotraj celic v citoplazmi, je v povezavi s številnimi znotrajceličnimi tarčnimi beljakovinami in sodeluje pri izgradnji komponent celičnega skeleta (mikrotubulov, glialnega fibrilarnega kislega proteina in vimentina) (16). Z vplivom na naštete beljakovine sodeluje pri inhibiciji fosforilacije beljakovin, inhibiciji izgradnje celičnega skeleta, stimulaciji encimske aktivnosti ter interakciji z različnimi transkripcijskimi faktorji (3, 6, 17, 18).

Poleg znotrajcelične regulacije opravlja svojo nalogo tudi kot sekretorna beljakovina v zunajceličnem prostoru, kjer deluje kot citokin in posreduje medsebojne vplive med celicami glie ter celicami glie in nevroni (3, 10). Učinki S100B proteina v zunajceličnem prostoru so odvisni od njegove koncentracije. V fizioloških nanomolarnih koncentracijah pospešuje rast nevrinov in preživetje nevronov. V večjih mikromolarnih koncentracijah ima nasproten, nevrotoksičen učinek (4, 15, 17, 18). Povzroča apoptozo nevronov, spodbuja nastanek vnetnih citokinov, interlevkina 1 $\beta$ , interlevkina 6 in faktorja tumorske nekroze (TNF- $\alpha$ ) ter z vnetnim stresom povezanih encimov, kot je sintaza dušikovega oksida. Ta katalizira nastanek dušikovega oksida (NO), ki prav tako povzroča celično smrt – apoptozo (3, 4, 8, 10, 16, 18, 19).

### 1.1.1. Koncentracija S100B proteina pri preiskovancih brez bolezni osrednjega živčevja

Zaradi zgoraj naštetih lastnosti se S100B protein vse bolj uveljavlja kot pokazatelj poškodbe možganov in veliko je raziskav, v katerih so na podlagi določanja koncentracije S100B proteina v serumu in likvorju ugotavljali in spremljali obsežnost okvare OŽ pri različnih bolezenskih stanjih: možganski kapi, multipli sklerozi (20), srčnem zastoju (21, 22), akutni poškodbi možganov (18, 23, 24), subarahnoidalni krvavitvi (25), melanomu (24), Creutzfeldt-Jakobovi bolezni (27) in okužbah OŽ (7, 20, 28, 29, 30, 31).

Koncentracije S100B proteina so v likvorju precej večje kot v serumu. Večina (99 %) proteina v likvorju je intratekalnega izvora, vir so celice glie, predvsem astrociti. Dinamika S100B proteina v likvorju se zato razlikuje od dinamike beljakovin krvnega izvora. Večje koncentracije v likvorju povzročajo tok v smeri krvi, pri beljakovinah krvnega izvora pa je pot nasprotna, iz krvi v likvor. Povprečna koncentracija S100B proteina v likvorju znaša 1,5 µg/L, normalno razmerje med likvorjem in serumom znaša 18 : 1. Koncentracije S100B proteina v ventrikularnem likvorju (5,3 µg/L) v primerjavi z lumbalnim likvorjem so večje (razmerje 3,5:1). Vzrok je v različnih lokalnih gradientih in različni zgradbi tkiv, ki so v stiku s temi prostori (33).

V večini opravljenih raziskav so bile izmerjene koncentracije S100B proteina v likvorju pri odraslih preiskovancih brez bolezni OŽ nad 0,55 µg/L in so se gibale do 6,5 µg/L (20, 31, 34, 35). Koncentracije s starostjo naraščajo pri obeh spolih, vendar pri ženskah manj izrazito kot pri moških (36, 37). Podatki o razlikah v koncentraciji S100B proteina v likvorju med moškimi in ženskami so si nasprotni. V eni od raziskav so ugotovili, da so koncentracije S100B proteina pri moških večje kot pri ženskah (36), medtem ko v drugi raziskavi niso ugotovili razlik v koncentraciji S100B proteina v likvorju med spoloma (37).

Koncentracije S100B proteina v serumu so nižje kot v likvorju. Posamezni proizvajalci reagentnih kompletov podajajo mejno vrednost 0,15 µg/L. V podatkih

iz literature so navedene podobne ali nižje vrednosti (13, 22, 24, 35, 38). Z 10- do 100-krat večjimi koncentracijami izstopa le raziskava, kjer so koncentracijo S100B proteina določali z radioimunsko metodo (RIA) (34).

Razlike v koncentraciji serumskega S100B proteina med spoloma niso bile dokazane (39, 40). Ugotovili pa so, da se koncentracija S100B proteina v serumu s starostjo zmanjšuje (40). Za razliko od likvorja, kjer se koncentracije večajo s starostjo, so bile največje serumske koncentracije ugotovljene pri novorojencih, otrocih in odraslih do 20. leta. Po 20. letu starost ne vpliva več na koncentracije S100B proteina v serumu (40).

Koncentracije S100B proteina v serumu se razlikujejo pri različnih rasah. Kavkazijska rasa ima nižje vrednosti, kot so bile določene pri Azijcih in črncih. Vzrok za razliko je različna barva kože, ki je povezana s številom melanocitov v koži (41).

### **1.1.2. Koncentracije S100B proteina pri bolnikih z meningitisom**

Pri bakterijskih in virusnih okužbah OŽ pride do različnih patofizioloških sprememb, ki so vzrok povečane koncentracije S100B proteina v likvorju in serumu. Predvsem pri bakterijskih meningitisih so lokalni vnetni procesi, sistemska vnetna reakcija ter nastanek oksidativnega stresa vzrok za sproščanje S100B proteina iz poškodovanih astrocitov (30, 31). Pri nizkih nanomolarnih koncentracijah je učinek S100B proteina koristen, na drugi strani pa večje mikromolarne koncentracije, ki so posledica poškodbe celic glie ter reakcije astrocitov na poškodbo (reaktivna astroglia), še dodatno poškodujejo živčevje (4, 15, 17, 18, 30).

Pri preiskovancih z bakterijskim in virusnim meningitisom so bile v več raziskavah tako pri odraslih kot otrocih določene povečane koncentracije S100B proteina v likvorju (20, 28, 29, 30, 31, 32). Največje koncentracije so bile izmerjene pri tistih, ki so imeli hujši potek bolezni (32), pridružen meningoencefalitis (28, 29) ali so imeli nevrološke zaplete (28, 30).

Bolniki z bakterijskim meningitisom, ki so imeli večjo koncentracijo S100B proteina v likvorju, so imeli tudi večjo koncentracijo levkocitov in beljakovin v likvorju, večjo koncentracije CRP v krvi (31) ter hkrati nižjo koncentracijo glukoze v likvorju (7, 28, 29, 31, 32). Povezava med večjo koncentracijo Lc-levkocitov in Lc-S100B proteina je kazalec izrazitejšega vnetja in lahko hujšega poteka bolezni, težja oblika okužbe pa je v povezavi z večjim tveganjem za nastanek nevroloških posledic (29).

Pri spremljanju dinamike koncentracij S100B proteina v likvorju in serumu, pri bolnikih z bakterijskim meningitisom, so ugotovili povečane koncentracije v likvorju na začetku bolezni pri vseh bolnikih in pri tretjini v serumu. Do zmanjšanja likvorskih in serumskih koncentracij S100B proteina je prišlo že pri drugem vzorčenju (mediani dan drugega vzorčenja je bil 2. dan), ko je že bilo uvedeno ustrezno antibiotično zdravljenje, hkrati se je izboljšalo tudi klinično stanje bolnikov. Klinično stanje bolnikov so ocenjevali z Glasgowsko koma lestvico (ob sprejemu, 1. In 4. bolnišnični dan ter ob odpustu) in Glasgowsko lestvico izhoda bolezni (ob odpustu in tri mesece po odpustu). Pri nadaljnjih vzorčenjih so se koncentracije tako v likvorju kot v serumu še zmanjševale. Spremljanje koncentracije pri posameznih bolnikih lahko prispeva k oceni resnosti stanja bolezni in spremljanju uspešnosti zdravljenja (31).

Poleg povečanih koncentracij S100B proteina v likvorju so pri bakterijskem meningitisu povečane koncentracije tudi v serumu. Med poškodbo možganskih celic del sproščenega S100B proteina lahko prehaja tudi v sistemski krvni obtok, tudi zaradi okvare KMP (3).

Večina preiskovancev z bakterijskim meningitisom ima povečano koncentracijo Lc-S100B proteina, medtem ko se delež tistih s povečanimi koncentracijami v serumu giblje od 36 do 73 % (7, 31). Večje koncentracije S100B proteina v serumu so bile izmerjene pri bolnikih z osamitvijo bakterij iz likvorja in pri bolnikih z nevrološki zapleti (30).

Pri virusnih meningitisih je vnetje manj izrazito in sprošča se manj vnetnih označevalcev in poškodba možganskih celic je običajno manjša. Zato je tudi koncentracija S100B proteina tako v likvorju kot serumu običajno manjša. Izjema



so le virusni meningitisi s težjim potekom, kot je encefalitis. Pri bolnikih z HSV (herpes simplex virus) encefalitisom so koncentracije S100B proteina lahko zelo visoke in lahko presežejo vrednosti, ki jih dobimo pri bolnikih pri bakterijskim meningitisom (28, 31).

## 1.2. VNETJE OSREDNJEGA ŽIVČEVJA

Meningitis je vnetje možganskih ovojnic, ki ga lahko povzročajo virusi, bakterije, glive in različni zajedavci. Vnetje v subarahnoidalnem prostoru in draženje možganskih ovojnic se kaže s značilnimi kliničnimi simptomi in znaki. Gnojni meningitis je bakterijski meningitis, ki ga povzročajo piogene bakterije, medtem ko so lahko povzročitelji seroznega meningitisa bakterije, virusi, glive in praživali. Pri bakterijskih meningitisih je potek bolezni običajno težji in so redkejši, medtem ko so serozni meningitisi pogostejši in potekajo v blažji obliki (42).

Vnetje možganskih ovojnic pri bakterijskem meningitisu lahko povzročajo tudi piogene bakterije, ki vdrejo v možganske ovojnice in izzovejo nevtrofilni celični odgovor. Bolezen je akutna in smrtno nevarna. Kaže se z vročino, glavobolom in bruhanjem. Zgodaj se lahko pojavi motnja zavesti in zmedenost. Potek bolezni je hiter in bolniki so hudo prizadeti. Smrtnost je še vedno dokaj visoka (5–10 % pri otrocih in 3 do 40 % pri odraslih), pri ozdravelih pa lahko pusti hude nevrološke okvare (30, 42, 43, 44).

Bakterijski meningitisi se pojavljajo v vseh starostnih skupinah. Pogostejši so pri otrocih od 1. do 4. leta starosti in pri starejših osebah. Bolezen je pogostejša pri moških (42, 45).

Najpogostejši povzročitelji so *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* in *Streptococcus pneumoniae*, vendar se pogostost razlikuje glede na starostno obdobje in okolje (42, 45, 46, 47, 48, 49).

V razvitih državah, kjer so uvedli obvezno cepljenje otrok proti *H. influenzae*, sta najpogostejša povzročitelja v tem obdobju *Neisseria meningitidis* in *Streptococcus*

*pneumoniae*. Prav tako sta ti dve bakteriji najpogostejša povzročitelja bakterijskega meningitisa tudi med 18. in 50. letom. Po 50. letu starosti je pnevmokok pogostejši od meningokoka, povzročitelji so lahko tudi *Listeria monocytogenes* in drugi aerobni po Gramu negativni bacili. Po nevrokirurških operacijah je najpogostejši povzročitelj meningitisa *Staphylococcus aureus* (42, 45, 46, 47).

Klopni meningoencefalitis je virusna okužba OŽ in je v Sloveniji endemična. Povzročitelj je virus klopnega meningoencefalitisa. To je arbovirus, ki pripada družini *Flaviviridae*. Virus prenaša klop *Ixodes ricinus*, okužbo širijo vse razvojne stopnje: larve, nimfe in odrasle živali. Bolezen se pojavlja sezonsko, od maja do oktobra in je vezana na biološko aktivnost klopov. Največ obolelih je starih od 20 do 39 let. Moški obolevajo pogosteje kot ženske. Okužba lahko poteka brez značilnih kliničnih znakov, kot lahka vročinska bolezen ali pa z znaki vnetja možganskih ovojnic, možganov in hrbtenjače. Značilna bolezen poteka v dveh fazah. Po prvi fazi, ki se kaže kot neznačilna vročinska bolezen, sledi prosto obdobje in nato druga faza bolezni, ki poteka kot meningitis, meningoencefalitis in meningoencefalomielitis (42, 48, 50). 1–2 % odraslih bolnikov, okuženih z virusom KME, umre. 4–46 % bolnikov ima po bolezni posledice v obliki pogostih glavobolov, psihičnih motenj, prizadetosti možganskih živcev ter parez in atrofij prizadetih mišičnih skupin (51).

### **1.3. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB OSREDNJEGA ŽIVČEVJA**

Pri vseh bolnikih s sumom na okužbo OŽ je trebno opraviti lumbalno punkcijo. Rezultati analiz likvorja imajo ključen pomen za biokemično potrditev vnetja ter so lahko odločilni za razlikovanje med bakterijskim in virusnim meningitisom ter uvedbo začetnega protimikrobnega zdravljenja (52). Učinkovitost zdravljenja okužb OŽ je odvisna od izbire antibiotika ter od časa, ki je pretekel od začetka bolezni do začetka zdravljenja.

Ključni segmenti laboratorijske diagnostike so: ustrezen čas vzorčenja likvorja; hiter transport v laboratorij pod optimalnimi pogoji; ustrezen izbor laboratorijskih preiskav in analiza vzorca v najkrajšem možnem času (46, 53).

Osnovna laboratorijska diagnostika okužbe OŽ obsega osnovne citološke, biokemične in bakteriološke preiskave. Za hitro opredelitev bolezni in odločitev o antibiotičnem zdravljenju v večini primerov zadostuje število in diferenciacija likvorskih levkocitov, koncentracija beljakovin in glukoze v likvorju, bakteriološki sediment likvorja in hitri aglutinacijski test na najpogostejše bakterijske povzročitelje. V nekaterih raziskavah so ugotovili, da se s kombinacijo več običajnih laboratorijskih preiskav povečujeta diagnostična specifičnost in občutljivost (54).

Dokončna diagnoza temelji na osamitvi bakterij iz likvorja, na seroloških preiskavah in/ali na molekularno genetskih preiskavah. Za vse pa je postopek preiskave precej daljši.

Laboratorijski kriteriji, ki kažejo na bakterijsko okužbo možganskih ovojnic, so: povečana koncentracija levkocitov v likvorju (nad  $1000 \times 10^6/L$ ) s prevladovanjem nevtrofilnih granulocitov (nad 60 %); povečana koncentracija likvorskih beljakovin; zmanjšana koncentracija likvorske glukoze; zmanjšano razmerje koncentracije glukoze med likvorjem in serumom; povečana koncentracija CRP in povečano število levkocitov v periferni krvi (42, 55, 56, 57).

Za razliko od bakterijskega meningitisa pri virusnem meningitisu koncentracija levkocitov običajno ne preseže  $1000 \times 10^6/L$ . Koncentracija glukoze je normalna; koncentracija beljakovin je normalna ali zmerno povečana, vendar so koncentracije praviloma nižje kot pri bakterijskem meningitisu. V prvem obdobju imamo lahko v krvni sliki levkopenijo, v drugem obdobju pa tudi nevtrofilno levkocitozo (42, 50, 58).

## **2. NAMEN DELA IN PREDSTAVITEV HIPOTEZ**

S100B protein se v visokih koncentracijah nahaja v celicah OŽ. Zaradi specifične lokalizacije in zaradi nizke molekulske mase lahko prehaja krvno-možgansko pregrado in je pri različnih okužbah OŽ biokemični označevalec poškodb možganskih celic. Večje koncentracije nakazujejo hujšo stopnjo in večji obseg okvare. Povezane so tudi s slabšim izhodom možganske okvare. V mejnih primerih, kjer na osnovi biokemičnih preiskav ne moremo jasno ločiti bakterijskega in virusnega meningitisa, bi lahko koncentracijo S100B proteina uporabili kot dodatni diferencialno diagnostični parameter pri razlikovanju bakterijskega od virusnega meningitisa. S pomočjo koncentracije S100B proteina bi lahko napovedali tudi potek in izid bolezni.

Namen naše raziskave je bil, da z določitvijo koncentracije S100B proteina v serumu in likvorju pri preiskovancih z izključeno okužbo OŽ, pri bolnikih z virusnim meningitisom in pri bolnikih z bakterijskim meningitisom ugotovimo, ali obstajajo razlike v koncentracijah S100B proteina med skupinami.

Naše domneve so:

1. da se koncentracije S100B proteina v likvorju zaradi različne stopnje poškodbe možganskih celic med skupinami razlikujejo.
2. da bodo koncentracije zelo majhne pri preiskovancih z izključeno okužbo OŽ, večje bodo pri bolnikih z virusnim meningitisom in največje pri bolnikih z bakterijskim meningitisom. Pričakujemo, da bodo koncentracije S100B proteina pri obeh skupinah z okužbo OŽ statistično značilno večje od skupine z izključeno okužbo OŽ. Domnevamo tudi, da bodo koncentracije S100B proteina statistično značilno večje pri bolnikih z bakterijskim meningitisom v primerjavi z bolniki z virusnim meningitisom.

3. da bodo imeli bolniki s povečano koncentracijo S100B proteina v likvorju tudi sorazmerno povečane koncentracije S100B proteina v serumu, saj mu nizka molekulska masa omogoča enostavno prehajanje krvno-možganske pregrade in prehajanje iz likvorja v kri.

4. da bodo imeli bolniki s povečano koncentracijo S100B proteina v likvorju sorazmerno povečano koncentracijo levkocitov v likvorju in krvi, beljakovin v likvorju, CRP v serumu in sorazmerno zmanjšano koncentracijo glukoze v likvorju. Za diagnostiko okužb OŽ se običajno izvaja nabor osnovnih laboratorijskih preiskav v likvorju in krvi (Likvor (Lc)-koncentracija levkocitov, Lc-koncentracija beljakovin, Lc-koncentracija glukoze, Kri (K)-levkociti, serum (S)-CRP), ki kažejo na vnetno dogajanje v OŽ in rezultati teh preiskav so v povezavi z vrsto povzročitelja okužbe.

### 3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE

#### 3.1. PREISKOVANCI

Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje je 12. 2. 2008 izdala soglasje za opravljanje raziskave.

V prospektivno raziskavo so bili vključeni bolniki, ki so bili sprejeti v bolnišnico zaradi suma na okužbo OŽ in bolniki, pri katerih je do okužbe prišlo sekundarno ob neki drugi primarni bolezni. Glede na to, ali je bila okužba kasneje dokazana in glede na vrsto povzročitelja okužbe, smo bolnike razdelili v tri skupine.

Pri vseh bolnikih smo opravili laboratorijske preiskave, ki se običajno določajo pri bolnikih s sumom na okužbo OŽ: koncentracijo levkocitov v likvorju, koncentracijo beljakovin v likvorju, koncentracijo glukoze v likvorju in serumu ter koncentracijo levkocitov in koncentracijo CRP v krvi.

- **Kontrolna skupina:**

V prvo skupino smo vključili preiskovance, ki so bili zaradi suma na okužbo OŽ obravnavani v enodnevni bolnišnici Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja. Rezultati osnovnih likvorskih preiskav so bili v okviru orientacijskih referenčnih vrednosti za odrasle (negativna likvorska punkcija): Lc-levkociti  $< 5 \times 10^6/L$ , koncentracija beljakovin od 0,15 do 0,45 g/L in koncentracija glukoze od 2,5 do 3,9 mmol/L. Tudi delovanje krvno-likvorske bariere je bilo glede na starost posameznika normalno (količnik albumina ( $Q_{alb}$ ) v območju orientacijskih referenčnih vrednosti).

- **Bolniki s klopnim meningoencefalitisom:**

V drugo skupino smo vključili bolnike, ki so bili obravnavani v urgentni ambulanti, enodnevni bolnišnici ali bolnišničnih oddelkih Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja. Bolniki so imeli serološko potrjeno diagnozo okužbe z virusom KME.

- **Bolniki z bakterijskim meningitisom:**

V tretjo skupino smo vključili bolnike, ki so imeli bakterijsko okužbo OŽ. Diagnoza je temeljila na osamitvi bakterij iz vzorca likvorja ali pa so bili vključeni na podlagi citoloških in biokemičnih značilnosti likvorja, ki z 99 % verjetnostjo potrjujejo bakterijsko okužbo OŽ. Ti kriteriji so: številčna koncentracija levkocitov 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 in koncentracija beljakovin v likvorju, večja od 2,2 g/L (56). Na podlagi osamitve bakterij iz vzorca likvorja smo vključili 18 bolnikov. Sedem bolnikov smo vključili na podlagi izpolnjevanja zgoraj naštetih citoloških in biokemičnih kriterijev.

## **3.2. VZORCI**

Vzorci likvorjev in krvi niso bili odvzeti v raziskovalne namene, saj smo koncentracijo S100B proteina določali poleg ostalih zahtevanih laboratorijskih preiskav, ki se izvajajo pri obravnavi preiskovancev s sumom na okužbo OŽ.

### **3.2.1. Likvor**

Vzorci likvorja so bili zaradi suma na okužbo OŽ bolnikom odvzeti ob sprejemu v bolnišnico bodisi v urgentni ambulanti, enodnevni bolnišnici ali na bolnišničnem oddelku. Vzorci so bili odvzeti pri sterilnih pogojih, po predpisanem postopku lumbalne punkcije. Vzorci likvorja so bili odvzeti v predpisane prozorne, plastične, konične epruvete z navojem, namenjene za vzorčenje likvorja (proizvajalec Greiner). Po odvzemu so se vzorci čim prej prenesli v laboratorij, kjer smo opravili osnovne citološke in biokemične preiskave likvorja. Nato smo vzorec likvorja centrifugirali 5 minut pri 2500 vrtljajih/minuto. 0,5 mL centrifugata smo odpipetirali v plastično alikvotirno epruveto, označili s podatki o preiskovancu in datumom odvzema. Vzorce likvorja smo nato zamrznili in do analize hranili pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2. Kri

Vzorci krvi za hematološke in biokemične preiskave so odvzeli isti dan, kot je bila opravljena lumbalna punkcija. Vzorce za hematološke preiskave so odvzeli v epruvete za vakuumski odvzem krvi z dodanim antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA (proizvajalec Laboratorijska tehnika Burnik, Slovenija). Vzorce za biokemične preiskave so odvzeli v vakuumske epruvete brez antikoagulantov z dodatkom aktivatorja koagulacije (proizvajalec Laboratorijska tehnika Burnik, Slovenija).

Kri z dodatkom antikoagulantov smo brez predhodne priprave uporabili za določanje osnovnih hematoloških preiskav (hemogram in diferencialna krvna slika), analize so bile opravljene v času dveh ur po odvzemu.

Vzorci krvi za biokemične preiskave so najprej centrifugirali 10 minut pri 3000 vrtljajih/minuto in v serumu opravili biokemične preiskave, nato smo 0,5 mL seruma odpipetirali v alikvotirno epruveto, zamašili, označili in do analize hranili pri – 20 °C.

## 3.2. ANALIZNE METODE

### 3.3.1. Določanje koncentracije S100B proteina v serumu in likvorju

Določanje koncentracije S100B proteina smo opravili v štirih serijah v štirih različnih dneh z avtomatizirano kemiluminiscenčno metodo. Uporabili smo kvantitativni luminometrični imunski test za in vitro določanje koncentracije S100B proteina na avtomatiziran način na analizatorju Liaison® (DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italy). Pred analizo prve serije vzorcev smo izvedli kalibracijo in pri vsaki seriji analizirali nizek in visok nivo kontrolnega vzorca.

#### **Princip metode:**

Trdno fazo v analizi predstavlja paramagnetni delci, prekriti z dvema vrstama mišjih monoklonskih protiteles, usmerjenim proti beljakovinskemu antigenom na molekuli S100B proteina. Sekundarna monoklonska detekcijska



protitelesa so označena z derivatom izoluminola in so namenjena detekciji in vrednotenju količine S100B proteina v vzorcih. Med prvo inkubacijo pride do vezave S100B proteina v vzorcu s protitelesi, vezanimi na paramagnetne delce. Nevezane snovi odstranimo s spiranjem. V drugi inkubaciji se sekundarna protitelesa vežejo na molekule S100B proteina, ki se je v prvi fazi vezal na paramagnetne delce. Nevezane snovi odstranimo s spiranjem. Z dodatkom alkalne raztopine vodikovega peroksida in katalizatorja oksidiramo izoluminol vezan na sekundarna protitelesa, ki pri tem emitira svetlobo valovne dolžine 425 nm. V luminometru izmerimo intenziteto emitirane svetlobe v RLU (relative light units), ki je direktno sorazmerna s koncentracijo S100B proteina v vzorcu.

#### **Reagenti, kalibratorji, kontrole:**

Vsi reagenti so iz kompletov LIAISON Starter-Kit (kat. št. 319.102), LIAISON S100 (kat. št. 314.701) in (low/high; kat.št. 319.117) proizvajalca BYK-SANGTEC Diagnostica:

- suspenzija primarnih anti-S100B protiteles, vezanih na magnetne delce
- označevalec: raztopina sekundarnih protiteles (anti-S100B monoklonalna protitelesa, označena z izoluminolom)
- pufer
- kalibrator 1 – low
- kalibrator 2 – high
- raztopina za redčenje
- alkalna raztopina vodikovega peroksida
- katalizatorska raztopina

#### **Kalibracija:**

Osnovna kalibracijska krivulja je predhodno nameščena v analizatorju in jo poda proizvajalec reagentov. S ponovno kalibracijo smo prilagodili kalibracijsko krivuljo našim pogojem dela. Ponovno kalibracijo smo izvedli z dvema kalibratorjema, ki ju dobimo v posebnem kompletu (LIAISON Sangtec 100 Cal).

### **Postopek:**

*Priprava reagentov:* integral z reagenti smo pazljivo premešali in postavili v pokončen položaj. Odstranili smo zaščitno folijo in se prepričali, da v raztopinah ni zračnih mehurčkov in ga vložili v analizator. Ob tem se je začelo mešanje suspenzije v prvi posodici. Suspenzija se mora pred pričetkom dela mešati vsaj 30 minut.

*Priprava vzorcev:* Najmanjša količina vzorca, potrebna za preiskavo je 400  $\mu\text{L}$ , mrtvi volumen vzorca je 300  $\mu\text{L}$ . Vzorce pacientov in kontrolne vzorce smo postavili v stojala in vstavili v analizator. Linearnost metode je do 30  $\mu\text{g/L}$ , zato smo vzorce z večjo koncentracijo redčili 10-krat, 100-krat ali 1000-krat. Redčenje je bilo avtomatizirano, raztopina za redčenje je bila v integralu, v rezultatu je bil faktor redčenja že upoštevan.

Postopek pipetiranja vzorcev, reagentov in kontrolnih vzorcev je avtomatiziran in predhodno programiran na analitatorju (preglednica 1).

**Preglednica 1:** Shema izvedbe postopka analize na analizatorju Liasion.

vzorec, kalibrator, kontrola	100 $\mu\text{L}$
susp .magnetnih delcev	20 $\mu\text{L}$
pufer	100 $\mu\text{L}$
inkubacija, nato spiranje	10 minut
označevalec	200 $\mu\text{L}$
inkubacija, nato spiranje	10 minut
merjenje	3 s

Merilno območje metode je med 0,02  $\mu\text{g/L}$  in 30,0  $\mu\text{g/L}$ , meja detekcije je 0,02  $\mu\text{g/L}$ . Koeficient variacije rezultatov v seriji je manjši od 6,4 % in med serijami manjši od 10,7 %.

### 3.3.2. Določanje koncentracije levkocitov v likvorju

#### Princip:

Levkocite v likvorju vitalno obarvamo s kislom raztopino fenolnega fuksina v razmerju 10 + 1 (kar pomeni redčenje 10/11) ter jih preštejemo in diferenciramo v Fuchs-Rosenthalovi komori ob uporabi svetlobnega mikroskopa.

#### Reagenti:

- Raztopina fenolnega fuksina: lekarna UKC po recepturi.
- Fiziološka raztopina (9 g/L NaCl): lekarna UKC po recepturi.

#### Postopek:

V plastično epruveto smo pipetirali 20  $\mu$ L raztopine fenolnega fuksina in 200  $\mu$ L dobro premešanega vzorca likvorja. Epruveto smo mešali 5 do 10 minut na valjčnem mešalcu, da so se levkociti obarvali, nato smo napolnili Fuchs-Rosenthalovo komoro. Počakali smo, da so se celice sesedle na dno komore, nato smo levkocite prešteli na celotni površini komore in hkrati diferencirali na nevtrofilne granulocite, limfocite in monocite. Če je bila številčna koncentracija levkocitov zelo velika, smo prešteli celice na 1/16 površine komore (16 kvadratkov oz. 1 vrstica) ali na 1/256 površine komore (1 kvadratok.) Prešteli smo najmanj tri vrstice oz. kvadratke, izračunali srednjo vrednost ter dobljeno število pomnožili s 16 oz. z 256. Ob zelo veliki številčni koncentraciji levkocitov smo likvor redčili s fiziološko raztopino v razmerju 1 : 10 (100  $\mu$ L likvorja in 900  $\mu$ L fiziološke raztopine) ali 1 : 100 (10  $\mu$ L likvorja in 990  $\mu$ L fiziološke raztopine) in v izračunu upoštevali razredčitev.

### 3.3.3. Določanje koncentracije beljakovin v likvorju

#### Princip:

Beljakovine (albumini in globulini) reagirajo v alkalnem mediju NaOH/Na<sub>2</sub>EDTA z benzetonijskim kloridom. V reakciji nastalo motnost, ki je sorazmerna koncentraciji beljakovin v vzorcu, merimo spektrofotometrično.

#### Reagenti:

- Raztopina NaOH/Na<sub>2</sub>EDTA: 0,5 mol/L NaOH v 33 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA; 20 g NaOH in 12,3 g Na<sub>2</sub>EDTA raztopi v 1000 mL destilirane vode.
- Raztopina benzetonijskega klorida: 2,0 g benzetonijskega klorida raztopimo v 1000 mL destilirane vode.
- Kontrolna raztopina: RANDOX CSF KONTROL, kataloška številka: CF1501.

Reagente in standarde hranimo v hladilniku pri 2–8 °C.

#### Postopek:

Priprava vzorca: če je bil vzorec krvav, moten ali so bili v njem eritrociti, smo ga predhodno centrifugirali 10 minut pri 1500 g (2000 obratov na minuto).

Postopek pipetiranja vzorcev, standardne raztopine in reagentov je opisan v preglednici 2.

**Preglednica 2:** Shema pipetiranja pri postopku določanja koncentracije beljakovin v likvorju.

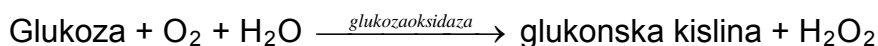
	STANDARD	VZOREC
Standardna raztopina	0,1 mL	-
Vzorec	-	0,1 mL
NaOH/Na <sub>2</sub> EDTA	4,0 mL	4,0 mL
Benzetonijev klorid	1,0 mL	1,0 mL

Vsebinsko epruvet smo dobro premešali, inkubirali na sobni temperaturi in izmerili absorbanco po 10 minutah pri valovni dolžini 450 nm na spektrofotometru UV-mini (Shimadzu). Za slepo smo uporabili destilirano vodo.

### 3.3.4. Določanje koncentracije glukoze v likvorju

#### Princip:

Encim glukoza-oksidadaza oksidira glukozo v glukonsko kislino, pri čemer nastaja vodikov peroksid. Ta ob prisotnosti peroksidaze oksidira brezbarven kromogen v rdeče-vijolični kinonimin, katerega absorbanco merimo spektrofotometrično.



#### Reagenti:

Reagentni komplet GLUCOSE (GLUC-PAP) (Randox), kataloška številka GL 2614:

- R1: fosfatni pufer 50 mmol/L, pH 7,0
  - MOPS pufer 50 mmol/L, pH 7,0
  - fenol 11 mmol/L
  - 4-aminofenazon 0,77 mmol/L
  - Glukoza oksidaza  $\geq 1,5$  kU/L
  - peroksidaza  $\geq 1,5$  kU/L
- CAL. Standard : glucose 5,5 mmol/L

Reagente in standarde hranimo v hladilniku pri 2–8 °C.

#### Postopek:

Priprava vzorca: vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 1500 g (3000 obratov na minuto), za nadaljnjo analizo smo uporabili supernatant.

Reagent za določanje koncentracije glukoze smo predhodno inkubirali 10 minut pri 37 °C.

Postopek pipetiranja vzorcev, slepe raztopine, standardne raztopine in reagentov je opisan v preglednici 3.

**Preglednica 3:** Shema postopka pipetiranja pri določanju koncentracije glukoze v likvorju.

	SLEPA	STANDARD	VZOREC
Standardna raztopina	-	20 µL	-
Vzorec	-	-	20 µL
Glukozni reagent	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

Epruvete smo dobro premešali in inkubirali 10 minut pri 37 °C. Absorbanco smo izmerili pri valovni dolžini 500 nm na spektrofotometru UV-mini (Shimadzu).

### 3.3.5. Določanje koncentracije levkocitov v krvi

#### Princip:

Na hematološkem analizatorju COULTER HmX poteka štetje krvnih celic avtomatično z električnim načinom detekcije, uporabljata se t. i. Coulterjev princip. To je elektronska metoda za štetje in merjenje delcev, ki poteka na principu zaznavanja in merjenja sprememb električnega toka, ko delci (celice, ki so slabi prevodniki) v prevodni tekočini potujejo skozi majhno odprtino v številni kapilari. Koncentracija in volumen levkocitov se določi z merjenjem električnega upora, ki ga tvorijo posamezne celice v prevodni raztopini. Število sprememb upora v enoti časa je sorazmerno številu celic. Velikost spremembe upora je sorazmerna velikosti oziroma posredno volumnu celic.

#### Reagenti:

- Isoton III, 20 L (Beckman Coulter): izotonična raztopina elektrolita je namenjena razredčevanju vzorcev, stabilizaciji celičnih membran, prenosu vzorcev preko pretočne celice in spiranju sistema med posameznimi vzorci.

- Lyse s III diff, 1L (Beckman Coulter): je reagent namenjen za liziranje eritrocitov, odstranjevanje celičnega debrija in pretvorbo hemoglobina v stabilno obliko, primerno za merjenje absorbance.
- HmX pak (Beckman Coulter):
  - PAK LYSE je namenjen liziranju eritrocitov.
  - PAK PRESAERVATIVE je namenjen ohranitvi levkocitov v stanju, ki je najbolj podobno nativnemu.
- Coulter latron control (Beckman Coulter) je namenjena kontroliranju izvedbe merjenja volumna, konduktivnosti in odboja laserske svetlobe.
- Coulter latron primer (Beckman Coulter) pripravi sistem za merjenje latron kontrole.
- Coulter 5C cell control (Beckman Coulter): normal, abnormal I, abnormal II
- Clenz, 5 L (Beckman Coulter): namenjen je čiščenju in spiranju notranjih površin (cevi, števnih komor) analizatorja.
- Natrijev hipoklorit, 13 % aktivnega klora (Kemika Zagreb). Priprava 3 % raztopine natrijevega hipoklorita: 115 mL 13 % raztopine natrijevega hipoklorita dopolnimo do 500 mL z redestilirano vodo.

### **Postopek:**

Vsako jutro smo po zagona analizatorja (start up) izvedli analizo celotnega panela kontrolnih vzorcev: Coulter latron primer, Coulter latron control in Coulter 5C cell control (normal, abnormal I in abnormal II).

Analizirali smo vzorce venske krvi, odvzete po priporočenem postopku v epruveto za zaprti odvzem krvi z dodatkom antikoagulanta kalijeve soli EDTA (vijolični zamašek).

Pred analizo smo s prostim očesom preverili, ali vzorci vsebujejo makroskopsko vidne strdke. Vzorcev s strdki nismo analizirali, ampak smo se dogovorili za ponoven odvzem vzorca. Vzorce, odvzete v epruvete za zaprt odvzem krvi, smo predhodno mešali na valjčnem mešalcu 5 minut. Analizo smo izvedli v času pet minut po odvzemu. Če analiza v tem času ni bila možna, smo počakali najmanj pol

ure, da je prišlo do vzpostavitve ravnotežja koncentracije  $K^+$  ionov znotraj in izven celic.

Analizo smo opravili na primarni način z avtomatskim podajalnikom vzorcev (zamašene premešane vzorce smo vložili v kasete in nato kasete vložili v za to namenjeno mesto v analizatorju, sledi avtomatsko mešanje, aspiracija in analiza vzorcev).

### 3.3.6. Določanje koncentracije CRP v serumu

#### Princip:

Anti-CRP protitelesa, vezana na lateksne delce, reagirajo s CRP iz vzorca in tvorijo antigen-protitelo kompleks. Po aglutinaciji merimo svetlobo, prepuščeno skozi motno raztopino, turbidimetrično.

#### Reagenti:

- Tina-quant CRPLx (kat. št. 03.002.039.122), Roche
- C.f.a.s. Protein (kat. št. 11.355.279.216), Roche
- PreciNorm Protein QCS (kat. št. 11.553.577.922), Roche
- PreciPath Protein QCS (kat. št. 11.553.585.922), Roche

#### Postopek:

Koncentracijo CRP v serumu smo določili z avtomatiziranim postopkom na biokemičnem analizatorju Modular (Roche) po ustaljenem protokolu.

### 3.3.7. Statistične metode

Pri statistični obdelavi rezultatov naše raziskave smo uporabili statistični program SPSS Statistica 17.0.

Za vsak posamezen parameter pri vseh skupinah smo izračunali aritmetično sredino ( $\bar{x}$ ), standardni odklon (SD), mediano ter razpon.



Z multiplo linearno regresijo smo najprej ugotavljali povezanost koncentracije proteina S100B v likvorju s koncentracijami S-S100, Lc-levkociti, Lc-beljakovine, Lc-glukoza, S-CRP in K-levkociti).

Pri vseh treh skupinah smo za starost in laboratorijske preiskave preverili normalnost porazdelitve s Kolmogorov-Smirnovim testom in ugotovili, da porazdelitev za večino parametrov v vseh treh skupinah ni normalna.

V nadaljnji obravnavi smo uporabili metode neparametrijske statistike, kjer smo z Kruskal-Wallisovim testom primerjali skupine med seboj in ugotavljali, v katerih parametrih se razlikujejo. Za primerjavo dveh neodvisnih skupin (kontrolna /KME, kontrolna/BM, KME/BM, BM-izolacija bakterije iz likvorja/BM-citološki in biokemični kriteriji, po Gramu pozitiven povzročitelj/po Gramu negativen povzročitelj okužbe) za vsako posamezno spremenljivko smo nato uporabili Mann-Whitneyev test (primerjava parov). Pri obeh testih je bila meja statistične značilnosti postavljena pri vrednosti  $p < 0,05$ .

V zadnjem koraku smo z analizo ROC krivulje ugotavljali, kolikšno diagnostično zanesljivost (specifičnost in občutljivost) imajo posamezne spremenljivke za razlikovanje bakterijskega meningitisa od KME in izračunali tudi pozitivno in negativno napovedno vrednost za likvorsko in serumsko koncentracijo S100B proteina.

## 4. REZULTATI

V raziskavo smo vključili dve skupini bolnikov in kontrolno skupino. V kontrolno skupino je bilo vključeno 30 preiskovancev, 22 žensk in 8 moških, starih od 15 do 77 let. Povprečna starost preiskovancev v skupini je bila 50 let. Pri vseh so bile osnovne laboratorijske preiskave likvorja znotraj referenčnih mej za odrasle. Trije preiskovanci so imeli likvorsko koncentracijo S100B proteina večjo od 1,50 µg/L in dva koncentracijo S100B proteina v serumu večjo od 0,15 µg/L.

V skupino s KME je bilo vključenih 35 bolnikov, 14 žensk in 19 moških, starih od 15 do 78 let. Povprečna starost bolnikov v skupini je bila 51 let. Prisotnost specifičnih IgM protiteles je bila dokazana pri vseh bolnikih, medtem ko je bila prisotnost specifičnih IgG protiteles dokazana pri 34 (97,1 %) bolnikih. 37 % (13/35) bolnikov s KME je imelo povečano koncentracijo S100B proteina v likvorju in 20 % (7/35) bolnikov s KME je imelo povečano koncentracijo S100B proteina v serumu. Štirje (11 %) bolniki s KME so imeli hkrati povečano koncentracijo S100B proteina v serumu in likvorju.

V skupino z BM je bilo vključenih 25 bolnikov, 8 žensk in 17 moških, starih od 18 do 81 let. Povprečna starost bolnikov v skupini je bila 50 let. Bakterijsko okužbo potrjeno z osamitvijo bakterij iz likvorja, je imelo 18 bolnikov. V osmih primerih (44,4 %) je bil povzročitelj pnevmokok (*Streptococcus pneumoniae*), v šestih primerih (33,3 %) meningokok (*Neisseria meningitidis*), v dveh primerih (11,1 %) *Listeria monocytogenes* in po enkrat *Staphylococcus aureus* (5,6 %) in *Escherichia coli* (5,6 %). Sedem bolnikov smo v raziskavo vključili na podlagi izpolnjevanja citoloških in biokemičnih kriterijev.

Vsi bolniki z BM so bili hospitalizirani, 18 bolnikov v intenzivni enoti Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja (Respiracijski center), trije na Kliničnem oddelku za nevrokirurgijo in po eden na Kliničnem oddelku za endokrinologijo in presnovne bolezni, Kliničnem oddelku za intenzivno interno medicino, Kliničnem oddelku za anesteziologijo in Kliničnem oddelku za nevrologijo. Bolniki, ki niso bili hospitalizirani na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja, so bili sprejeti v

bolnišnico zaradi osnovne bolezni, ki ni bila okužba OŽ. Pri teh bolnikih je do bakterijske okužbe OŽ prišlo sekundarno. Vsi bolniki z BM so imeli povečano koncentracijo S100B proteina v likvorju in 48 % (12/25) bolnikov je imelo povečano koncentracijo tudi v serumu.

Bolniki z BM so imeli statistično značilno večje koncentracije S100B proteina v likvorju in serumu v primerjavi z bolniki, okuženimi z virusom KME. Bolniki z osamitvijo bakterij iz likvorja niso imeli statistično značilno večjih koncentracij S100B proteina v likvorju in serumu, v primerjavi z bolniki, ki niso imeli osamitve bakterij iz likvorja. Bolniki, pri katerih so bile iz likvorja osamljene po Gramu pozitivne bakterije iz likvorja, so imeli v primerjavi z bolniki z osamitvijo po Gramu negativnih bakterij statistično pomembno večjo koncentracijo serumskega in likvorskega S100B proteina.

Povečana likvorska koncentracija S100B proteina pri nobeni skupini bolnikov ni spremljala sorazmerno povečana serumska koncentracija S100B proteina.

Pri kontrolni skupini koncentracija Lc-S100B ni bila v sorazmerju s starostjo, koncentracijo levkocitov, beljakovin in glukoze v likvorju ter koncentracijo levkocitov in CRP v krvi. Pri bolnikih s KME je bila povečana koncentracija Lc-S100B v povezavi z višjo starostjo, ni pa bila v sorazmerju z večjo koncentracijo Lc-levkocitov, Lc-beljakovin, K-levkociti, S-CRP in nižjo koncentracijo Lc-glukoze. Pri bolnikih z BM je bila povečana koncentracija S100B proteina v likvorju v sorazmerju s povečano koncentracijo beljakovin v likvorju, ni pa bila v sorazmerju z višjo starostjo, višjo koncentracijo Lc-levkocitov, K-levkocitov, S-CRP in nižjo koncentracijo Lc-glukoze.

Največja koncentracija S100B proteina v likvorju je bila izmerjena pri tistih bolnikih z BM in KME, ki so imeli težji potek bolezni.

#### **4.1. KONCENTRACIJA S100B PROTEINA V LIKVORJU IN SERUMU**

S primerjavo vseh treh skupin med seboj smo ugotovili, da so se statistično značilno razlikovale v vseh laboratorijskih preiskavah, ki smo jih opravili pri diagnostiki okužb OŽ. Prav tako so se skupine med seboj razlikovale v likvorski in serumski koncentraciji S100B proteina ter v razmerju koncentracij S100B proteina med likvorjem in serumom. V starosti med skupinami ni bilo razlik.

Pri kontrolni skupini so bili rezultati za Lc-levkocite, Lc-beljakovine, Lc-glukozo, K-levkocite in S-CRP znotraj orientacijskih referenčnih mej za odrasle (preglednica 4, graf 1–8).

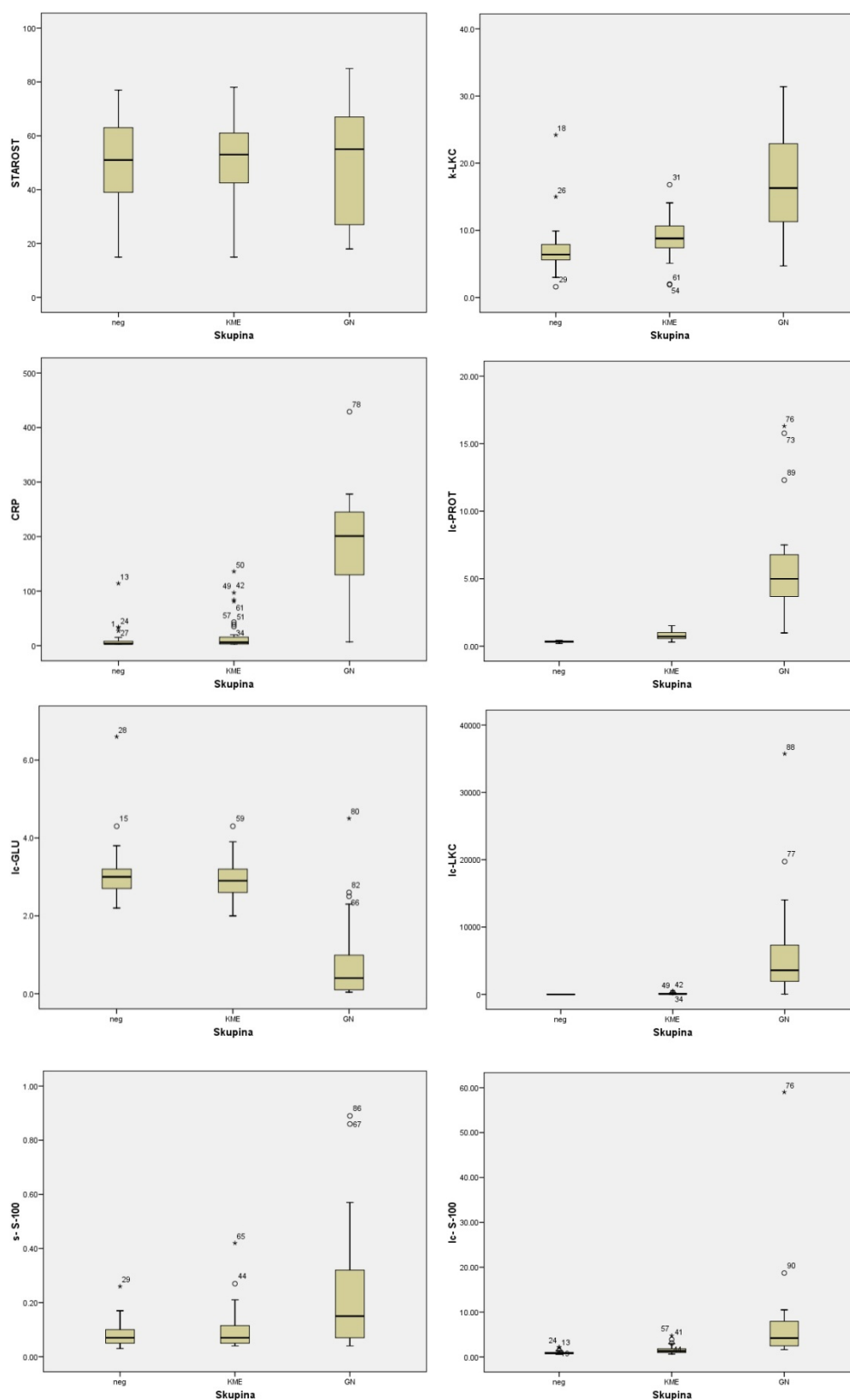
Največje koncentracije krvnih levkocitov so imeli bolniki z BM, medtem ko so bile pri skupini s KME znotraj orientacijskih referenčnih mej. Pri bolnikih z BM smo izmerili tudi največjo koncentracijo CRP, medtem ko je bila pri bolnikih s KME mediana koncentracija le malo nad zgornjo referenčno mejo. Prav tako so imeli bolniki z BM daleč največje koncentracije levkocitov v likvorju, medtem ko so bile koncentracije pri bolnikih s KME znatno nižje. Pri bolnikih s KME in BM je bila povečana koncentracija beljakovin v likvorju, vendar je bila pri bolnikih z BM srednja koncentracija v povprečju 7-krat večja. Pri bolnikih z BM je bila koncentracija glukoze v likvorju znižana, medtem ko je bila pri KME znotraj referenčnega intervala. Serumske koncentracije S100B proteina se med kontrolno skupino in bolniki z okužbo z virusom KME niso razlikovale, medtem ko so bile pri bolnikih z BM dvakrat večje. Likvorske koncentracije S100B proteina so bile pri skupini z BM 3-krat večje kot pri skupini s KME (preglednica 4, graf 1–8).

Razmerje koncentracije S100B proteina v likvorju in serumu je bilo višje pri bolnikih s KME kot pri kontrolni skupini, vendar razlika ni bila statistično pomembna. Bolniki z BM so imeli to razmerje dvakrat višje od drugih dveh skupin, razlika je bila statistično pomembna (preglednica 4, graf 1–8).

**Preglednica 4:** Starost preiskovancev in rezultati laboratorijskih preiskav za vse tri skupine.

PARAMETER	KO	KME	BM	
	mediana (razpon) $\bar{x}$ SD	mediana (razpon) $\bar{x}$ SD	mediana (razpon) $\bar{x}$ SD	<i>p</i>
STAROST (LETA)	<b>51</b> (15 – 77) 49,9 18,1	<b>53</b> (15 – 78) 51,2 16,2	<b>55</b> (18 – 85) 49,8 21,9	0,990
Kri-LEVKOCITI (x10 <sup>9</sup> /L)	<b>6,4</b> (1,6 – 24,2) 7,2 3,8	<b>8,8</b> (1,9 – 16,8) 9,0 3,1	<b>16,3</b> (4,7 – 31,4) 16,7 6,9	<b>&lt; 0,001*</b>
Serum-CRP (mg/L)	<b>3,5</b> (3,0 – 114,0) 11,4 21,2	<b>6,0</b> (3,0 – 136,0) 20,0 31,6	<b>201,0</b> (7 – 429) 180,2 98,7	<b>&lt; 0,001*</b>
Likvor-LEVKOCITI (x10 <sup>6</sup> /L)	<b>1</b> (0 – 4) 1,1 0,96	<b>74</b> (1 – 469) 101,2 96,8	<b>3583</b> (41 – 35733) 6348,7 7863,8	<b>&lt; 0,001*</b>
Likvor-BELJAKOVINE (g/L)	<b>0,33</b> (0,20 – 0,43) 0,33 0,004	<b>0,72</b> (0,30 – 1,52) 0,79 0,32	<b>4,99</b> (0,98 – 16,30) 5,83 3,86	<b>&lt; 0,001*</b>
Likvor-GLUKOZA (mmol/L)	<b>3,0</b> (2,2 – 6,6) 3,1 0,78	<b>2,9</b> (2,0 – 4,3) 2,9 0,50	<b>0,40</b> (0,0 – 4,5) 0,87 1,09	<b>&lt; 0,001*</b>
Serum-S100B (µg/L)	<b>0,07</b> (0,03 – 0,26) 0,08 0,05	<b>0,07</b> (0,04 – 0,42) 0,10 0,80	<b>0,15</b> (0,04 – 0,89) 0,24 0,24	<b>&lt; 0,001*</b>
Likvor-S100B (µg/L)	<b>0,85</b> (0,58 – 2,21) 0,98 0,40	<b>1,35</b> (0,67 – 4,74) 1,60 0,93	<b>4,21</b> (1,66 – 59,00) 7,56 11,4	<b>&lt; 0,001*</b>
Likvor-S100B :Serum- S100B	<b>14,6 : 1</b> (2,8:1 – 5,5:1) 15,4 : 1 8,83	<b>17,0 : 1</b> (3,2: 1 – 59,8:1) 16,8 : 1 1,32	<b>33,6 : 1</b> (2,6:1 – 207,8:1) 47,0 : 1 47,4	<b>0,001*</b>

\*Označene *p* vrednosti so statistično pomembne.



**Grafi 1–8:** Primerjalni grafični prikaz starosti preiskovancev in rezultatov posameznih laboratorijskih preiskav za vse tri skupine.

S primerjavo starosti in posameznih laboratorijskih preiskav med skupinami smo ugotovili, da se kontrolna skupina in skupina s KME med seboj statistično značilno razlikujeta v koncentraciji krvnih in likvorskih levkocitov, koncentraciji likvorskih beljakovin in likvorskega S100B proteina (preglednica 5).

Kontrolna skupina se statistično značilno razlikuje od skupine z bakterijskim meningitisom prav v vseh laboratorijskih preiskavah, razen v starosti. Prav tako se v vseh laboratorijskih preiskavah, razen v starosti, med seboj razlikujejo bolniki s KME in BM (preglednica 5).

**Preglednica 5:** Statistične razlike v starosti in laboratorijskih preiskavah med posameznimi skupinami.

PARAMETER	KO / KME	KO / BM	KME / BM
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
STAROST	0,900	0,912	0,964
Kri-LEVKOCITI	<b>0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>
Serum-CRP	0,202	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>
Likvor-LEVKOCITI	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>
Likvor-BELJAKOVINE	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>
Likvor-GLUKOZA	0,335	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>
Serum-S100B	0,572	<b>0,001*</b>	<b>0,003*</b>
Likvor-S100B	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>&lt; 0,001*</b>
Lc-S100B:S-S100B	0,081	<b>&lt; 0,001*</b>	<b>0,013*</b>

\*Označene *p* vrednosti so statistično pomembne.

## 4.2. KONCENTRACIJA S100B PROTEINA V POVEZAVI S STAROSTJO IN LABORATORIJSKIMI PREISKAVAMI

Z multiplo linearno regresijo smo ugotovili, da v kontrolni skupini velikost koncentracije S100B proteina v likvorju ni bila odvisna od velikosti koncentracije Lc-levkocitov, Lc-beljakovin, Lc-glukoze, K-levkocitov, S-CRP, S-S100B. Velikost koncentracija S100B proteina v likvorju teh bolnikov tudi ni bila odvisna od njihove starosti (preglednica 6).

V skupini bolnikov s KME smo ugotovili, da je bila koncentracija Lc-S100B odvisna od starosti bolnikov, in sicer se za vsako leto starosti koncentracija poveča za 0,032 µg/L. Velikost koncentracije S100B proteina v likvorju teh bolnikov pa ni bila odvisna od velikosti koncentracije Lc-levkocitov, Lc-beljakovin, Lc-glukoze, K-levkocitov, S-CRP in S-S100B (preglednica 6).

V skupini bolnikov z bakterijskim meningitisom smo ugotovili statistično značilno odvisnost med višino koncentracije Lc-S100B in višino koncentracije celokupnih beljakovin v likvorju. Velikost koncentracije S100B proteina v likvorju teh bolnikov pa ni bila odvisna od starosti, velikosti koncentracije Lc-levkocitov, Lc-glukoze, K-levkocitov, S-CRP in S-S100B (preglednica 6).

**Preglednica 6:** Rezultati multiple linearne regresije med koncentracijo S100B proteina v likvorju ter starostjo in ostalimi laboratorijskimi preiskavami.

LIKVOR-S100B	KO	KME	BM
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
STAROST	0,792	<b>0,01*</b>	0,781
Kri-LEVKOCITI	0,864	0,452	0,850
Serum-CRP	0,161	0,772	0,811
Likvor-LEVKOCITI	0,161	0,828	0,759
Likvor-BELJAKOVINE	0,519	0,502	<b>0,025*</b>
Likvor-GLUKOZA	0,999	0,423	0,467
Serum-S100B	0,756	0,309	0,309



\* Označene  $p$  vrednosti so statistično pomembne.

### 4.3. BOLNIKI Z BAKTERIJSKIM MENINGITISOM

V skupino z BM smo vključili bolnike na podlagi dveh različnih kriterijev: osamitve bakterij iz likvorja ali na podlagi izpolnjevanja citoloških in biokemičnih kriterijev.

Bolniki vključeni na podlagi teh dveh različnih kriterijev so se med seboj statistično značilno razlikovali v koncentraciji CRP ter koncentraciji likvorske glukoze in beljakovin. Bolniki z osamitvijo bakterij iz likvorja so imeli večjo koncentracijo CRP, večjo koncentracijo beljakovin v likvorju in nižjo koncentracijo glukoze v likvorju kot bolniki, ki so izpolnjevali biokemične in citološke kriterije. V starosti, koncentraciji levkocitov v krvi in likvorju se bolniki v teh dveh skupinah med seboj niso razlikovali (preglednica 7).

Bolniki z osamitvijo bakterij iz likvorja so imeli srednjo koncentracijo S100B proteina v serumu 0,17  $\mu\text{g/L}$  in je bila višja kot pri bolnikih, ki niso imeli osamitve bakterij iz likvorja (srednja koncentracija 0,10  $\mu\text{g/L}$ ), vendar razlika ni bila statistično pomembna ( $p = 0,326$ ). Tudi v likvorju so bile koncentracije pri bolnikih z osamitvijo bakterij iz likvorja večje kot pri bolnikih, ki niso imeli osamitve bakterij iz likvorja (mediana 4,47  $\mu\text{g/L}$  vs. 3,67  $\mu\text{g/L}$ ). Razlike niso bile statistično pomembne ( $p = 0,836$ ). Razmerje med koncentracijo S100B proteina v likvorju in serumu je bilo večje pri bolnikih, ki so bili vključeni na podlagi citoloških in biokemičnih kriterijev, vendar tudi tu razlika ni bila statistično pomembna ( $p = 0,657$ ) (preglednica 7).

**Preglednica 7:** Starost bolnikov z bakterijskim meningitisom in rezultati laboratorijskih preiskav ločeno glede na različen vključitveni kriterij.

PARAMETER	CITOLOŠKI IN BIOKEMIČNI KRITERIJI	OSAMITEV BAKTERIJ IZ LIKVORJA	
	mediana (razpon) $\bar{x}$ SD	mediana (razpon) $\bar{x}$ SD	$p$
STAROST (leta)	<b>56</b> (27 – 75) 52,6 16,9	<b>54</b> (18 – 85) 48,7 23,9	0,745
Kri-LEVKOCITI (x10 <sup>9</sup> /L)	<b>13,6</b> (5,4 – 24,0) 14,0 6,8	<b>17,3</b> (4,7 – 31,4) 17,8 6,9	0,224
Serum-CRP (mg/L)	<b>61</b> (7 – 251) 101 94	<b>227</b> (22 – 429) 211 84	<b>0,017*</b>
Likvor-LEVKOCITI (x 10 <sup>6</sup> /L)	<b>3574</b> (2719 – 7597) 4267 1653	<b>4096</b> (41 – 35733) 7158 9157	0,976
Likvor-BELJAKOVINE (g/L)	<b>2,18</b> (0,98 – 5,25) 2,93 1,61	<b>5,78</b> (3,26 – 16,30) 6,97 3,91	<b>0,003*</b>
Likvor-GLUKOZA (mmol/L)	<b>1,7</b> (0,4 – 4,5) 1,9 1,4	<b>0,3</b> (0,0 – 2,5) 0,5 0,6	<b>0,001*</b>
Serum-S100B (µg/L)	<b>0,10</b> (0,04 – 0,24) 0,14 0,10	<b>0,17</b> (0,5 – 0,89) 0,28 0,27	0,326
Likvor-S100B (µg/L)	<b>3,67</b> (1,66 – 18,70) 6,15 5,96	<b>4,47</b> (1,68 – 59,00) 8,11 13,05	0,836
Lc-S100B : S-S100B	<b>36,7</b> (14,8 – 207,8) 59,6 68,1	<b>30,6</b> (2,6 – 128,0) 42,2 38,1	0,657

\* Označene  $p$  vrednosti so statistično pomembne.

#### 4.4. BOLNIKI Z OSAMITVIJO BAKTERIJ IZ LIKVORJA

Pri bolnikih, ki so imeli diagnozo BM potrjeno z osamitvijo bakterij iz likvorja, smo opazili, da se koncentracije S100B proteina v likvorju glede na vrsto povzročitelja razlikujejo. Zaradi majhnih vzorcev nismo računali statistično pomembne razlike za posamezno vrsto bakterije, ampak skupaj za po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije.

Skupini s po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim povzročiteljem okužbe sta se med seboj statistično značilno razlikovali v starosti, koncentraciji krvnih levkocitov, koncentraciji S100B proteina v serumu ter koncentraciji levkocitov in S100B proteina v likvorju (preglednica 8).

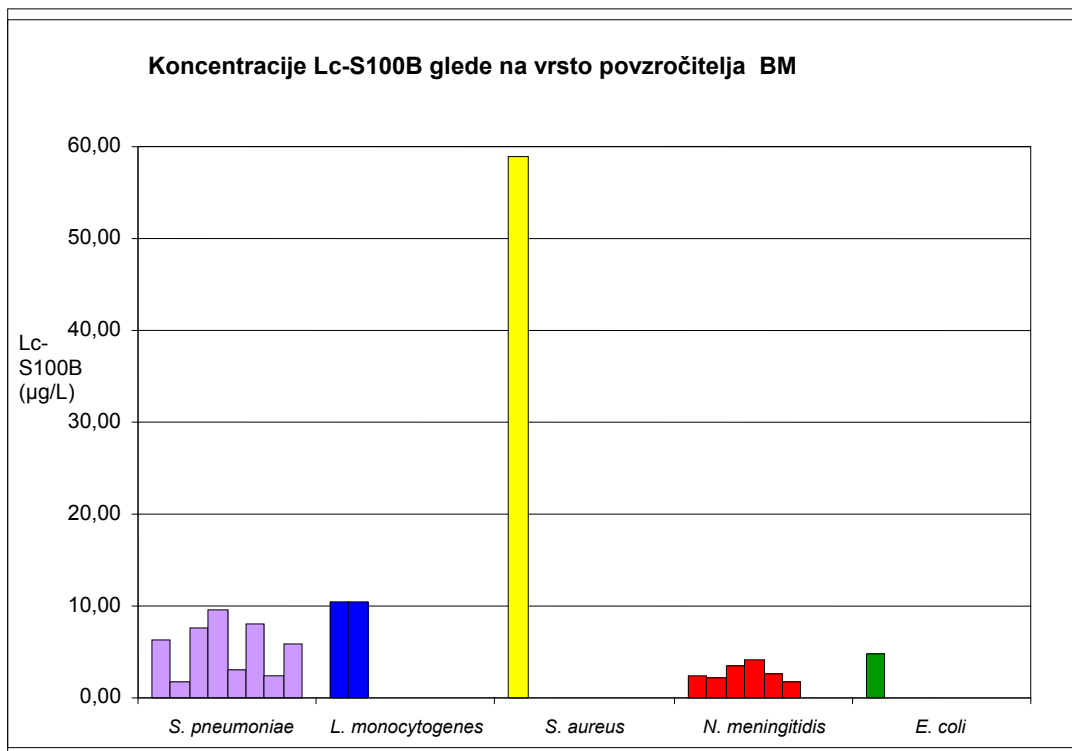
Bolniki z BM zaradi okužbe s po Gramu negativnimi bakterijami so bili mlajši (srednja starost 19 let vs. 67 let), imeli so večjo koncentracijo levkocitov v krvi (mediana  $23,4 \times 10^9/L$  vs.  $15,9 \times 10^9/L$ ) in likvorju (mediana  $13333 \times 10^6/L$  vs.  $1344 \times 10^6/L$ ) v primerjavi z bolniki s po Gramu pozitivnim povzročiteljem okužbe. Bolniki s po Gramu pozitivnim povzročiteljem okužbe pa so imeli večje koncentracije S100B proteina tako v serumu (mediana  $0,35 \mu g/L$  vs.  $0,09 \mu g/L$ ) kot v likvorju (mediana  $7,68 \mu g/L$  vs.  $2,60 \mu g/L$ ) v primerjavi z bolniki s po Gramu negativnim povzročiteljem okužbe (preglednica 8).

Bolniki s po Gramu pozitivnim povzročiteljem so imeli višje razmerje koncentracij S100B proteina med likvorjem in serumom kot bolniki s po Gramu negativnim povzročiteljem, vendar razlika ni bila statistično pomembna (preglednica 8).

**Preglednica 8:** Starost bolnikov s po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim povzročiteljem okužbe in rezultati laboratorijskih preiskav.

PARAMETER	GRAM -	GRAM +	
	mediana (razpon) $\bar{x}$ SD	mediana (razpon) $\bar{x}$ SD	$p$
STAROST (leta)	<b>19</b> (18– 57) 24,1 14,5	<b>67</b> (45 – 85) 64,3 12,6	<b>0,001*</b>
Kri-LEVKOCITI (x 10 <sup>9</sup> /L)	<b>23,4</b> (14,8 – 31,4) 22,2 5,8	<b>15,9</b> (4,7 – 23,3) 14,9 6,2	<b>0,027*</b>
Serum-CRP (mg/L)	<b>245</b> (138 – 278) 236,4 45,9	<b>201</b> (22 – 429) 195,1 99,8	0,056
Likvor-LEVKOCITI (x 10 <sup>6</sup> /L)	<b>13333</b> (3587 – 35733) 14046 11159	<b>1344</b> (41 – 11360) 2775 3674	<b>0,003*</b>
Likvor-BELJAKOVINE (g/L)	<b>6,30</b> (3,68 – 7,50) 5,83 1,45	<b>5,21</b> ( 3,26 – 16,30) 7,69 4,82	0,930
Likvor-GLUKOZA (mmol/L)	<b>0,1</b> (0,0 – 2,5) 0,52 0,89	<b>0,3</b> (0,1 –1,3) 0,44 0,39	0,479
Serum-S100B (µg/L)	<b>0,09</b> (0,05 – 0,21) 0,11 0,06	<b>0,35</b> (0,05 – 0,89) 0,38 0,29	<b>0,044*</b>
Likvor-S100B (µg/L)	<b>2,60</b> (1,68 – 4,73) 3,05 1,11	<b>7,68</b> (1,70 – 59,00) 11,3 16,11	<b>0,027*</b>
Lc-S100B : S-S100B	<b>27,5 : 1</b> (22,5:1 – 49,3:1) 31,3 : 1 9,7	<b>47,4 : 1</b> (2,6: 1 – 128,0:1) 38,4:1 47,7	0,930

\* Označene  $p$  vrednosti so statistično pomembne.

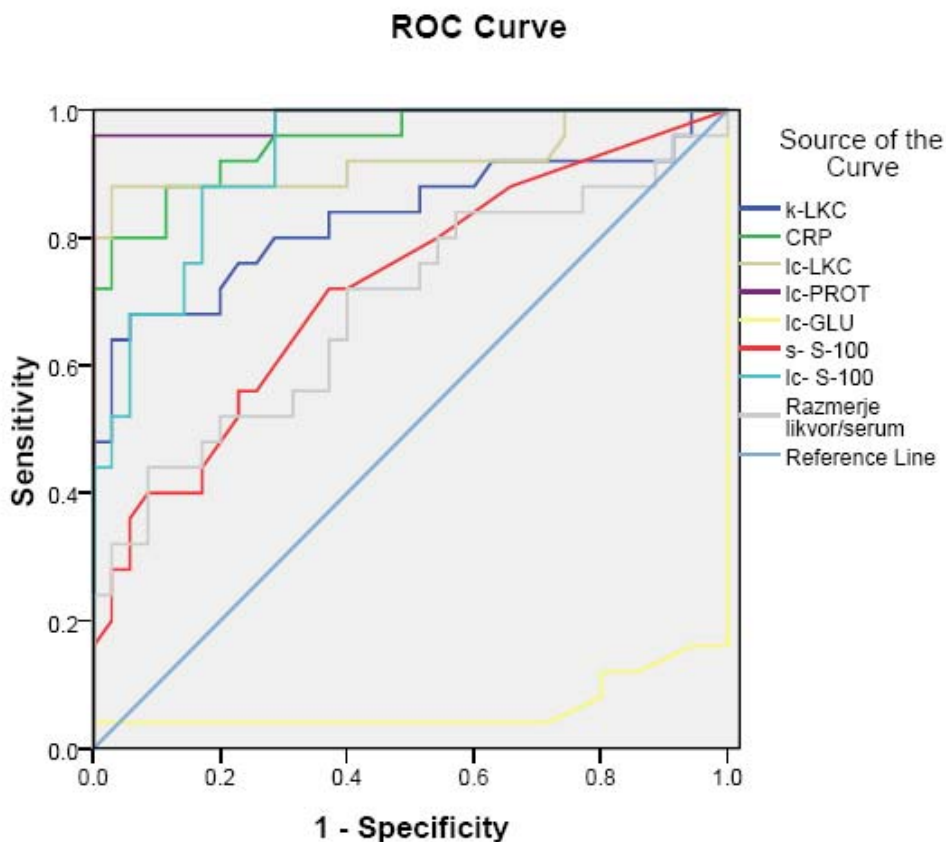


**Graf 9:** Koncentracije Lc-S100B glede na vrsto povzročitelja BM.

Največjo koncentracijo S100B proteina v likvorju je imela bolnica z *S. aureus* okužbo (59,00 µg/L), sledila sta bolnika z osamljeno *L. monocytogenes* iz likvorja (10,40 in 10,50 µg/L). Visoke vrednosti je imelo 5 bolnikov, pri katerih smo iz likvorja osamili *S. pneumoniae* (nad 5,96 µg/L), medtem ko so bile koncentracije nižje pri bolnikih, pri katerih sta bili iz likvorja osamljeni *N. meningitidis* (1,68 – 4,21 µg/L) ali *E. coli* (4,73 µg/L) (graf 10).

#### 4.5. DIAGNOSTIČNA ZANESLJIVOST POSAMEZNIH LABORATORIJSKIH PREISKAV

Z analizo ROC krivulje smo izračunali, kateri od laboratorijskih kazalcev, ki jih določamo pri sumu na okužbo OŽ, vključno z S100B proteinom, je bil najboljši za zanesljivo razlikovanje med bakterijskim meningitisom in KME.



**Graf 10:** ROC krivulja: občutljivost in specifičnost osnovnih laboratorijskih preiskav in koncentracije S100B proteina za razlikovanje BM od KME.

Iz vrednosti površine pod krivuljo smo ugotovili, da je bil najbolj zanesljiv laboratorijski parameter za razlikovanje med BM in KME koncentracija beljakovin v likvorju. Sledi mu koncentracija CRP, koncentracija glukoze v likvorju, število levkocitov v likvorju, koncentracija S100B v likvorju, koncentracija levkocitov v krvi, koncentracija S100B proteina v serumu in na zadnjem mestu je razmerje koncentracij S100B proteina med likvorjem in serumom (graf 10, preglednica 9).

**Preglednica 9:** Prikaz vrednosti površine pod krivuljo, razporejenih po velikosti za posamezne laboratorijske preiskave.

	PARAMETER	POVRŠINA POD KRIVULJO
1.	Likvor-BELJAKOVINE	0,989
2.	Serum-CRP	0,950
3.	Likvor-GLUKOZA	0,938
4.	Likvor-LEVKOCITI	0,923
5.	Likvor-S100B	0,922
6.	Kri-LEVKOCITI	0,831
7.	Serum-S100B	0,722
8.	Lc-S100B/S-S100B	0,690

Koncentracije beljakovin v likvorju večje, od 2,20 g/L, so 100 % specifične za bakterijski meningitis, občutljivost je 86 %. Koncentracija CRP, večja od 50 mg/L, je 88 % specifična za bakterijski meningitis, občutljivost je 89 %. Koncentracije glukoze, nižje od 1,9 mmol/L, so 100 % specifične za bakterijski meningitis, občutljivost je 84 %.

Koncentracije levkocitov v likvorju, večje od  $2000 \times 10^6/L$ , so 100 % specifične za bakterijski meningitis, občutljivost je 72 % (preglednica 10).

Serumska koncentracija S100B proteina, večja od  $0,15 \mu\text{g}/L$ , je 48 % specifična za bakterijski meningitis, občutljivost je 80 %, pozitivna napovedna vrednost (PNV) je 63 %, negativna napovedna vrednost (NNV) je 68 %. Koncentracija S100B proteina v likvorju, večja od  $1,60 \mu\text{g}/L$ , je 71 % specifična za bakterijski meningitis, občutljivost je 100 %, PNV je 71 %, NNV je 100%. Koncentracija levkocitov v krvi, večja od  $10,0 \times 10^9/L$ , je 63 % specifična za bakterijski meningitis, občutljivost je 80 %. Razmerje koncentracije S100B proteina med likvorjem in serumom, ki je večje od 18 : 1 je 46 % specifično za bakterijski meningitis, občutljivost je 72 % (preglednica 10).

**Preglednica 10:** Diagnostična specifičnost in občutljivost laboratorijskih preiskav pri veljavnih mejnih vrednostih.

PARAMETER	VELJAVNA MEJNA KONCENTRACIJA	DIAGNOSTIČNA SPECIFIČNOST (%)	DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST (%)
Likvor-BELJAKOVINE	2,20 g/L	100	86
Serum-CRP	50 mg/L	88	89
Likvor-GLUKOZA	1,9 mmol/L	100	84
Likvor-LEVKOCITI	2000 x 10 <sup>6</sup> /L	100	72
Kri-LEVKOCITI	10,0 x 10 <sup>9</sup> /L	63	80
Serum-S100B	0,15 µg/L	48	80
Likvor-S100B	1,60 µg/L	71	100
Lc-S100B/S-S100B	18 : 1	64	72



## **5. RAZPRAVA**

Bakterijski meningitis je akutna, lahko tudi smrtno nevarna bolezen. Nujna je zgodnja ugotovitev bolezni in čimprejšnje zdravljenje z antibiotiki. Smrtnost je še vedno velika, številni bolniki ozdravijo, vendar jim bolezen pogosto pusti hude nevrološke posledice. V primerjavi z BM je potek virusnih meningitisov večinoma lažji in delež bolnikov s posledicami po bolezni je nižji (42). Z običajnimi laboratorijskimi preiskavami in bakterijsko kulturo lahko v večini primerov ločimo med bakterijskim in virusnim meningitisom. V nejasnih, mejnih primerih, ko z običajnimi laboratorijskimi preiskavami ne moremo ugotoviti vzroka okužbe, lahko določitev koncentracije proteina S100B pripomore k odločitvi o uvedbi antibiotičnega zdravljenja.

Različni vnetni in citotoksični mediatorji, ki se sproščajo med vnetjem možganskih open in možganov, povzročijo poškodbo nevronov (59). Predvsem pri bakterijskih meningitisih so pglavilni patofiziološki mehanizmi, ki peljejo do sprememb in poškodb: sistemska vnetna reakcija, posledica katere je vdor levkocitov preko KMP v OŽ in lokalni vnetni procesi v možganih, ki jih povzročijo celice glie ter prisotni makrofagi, kar vodi v propad in poškodbo celic (30, 31).

Mehanizem sproščanja S100B proteina ni povsem znan. Vnetne celice, med njimi tudi astrociti, sodelujejo pri pretvorbi molekularnega kisika v reaktivne kisikove spojine (superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikal), ki uničujejo mikroorganizme. Domnevajo, da bi nastalo nesorazmerje med prisotnimi spojinami antioksidantnega sistema in reaktivnimi kisikovimi spojinami, lahko bil vzrok za nastanek oksidativnega stresa in sproščanje S100B proteina (30). Pri nizkih nanomolarnih koncentracijah je učinek S100B proteina pozitiven, saj ščiti nevrone pred škodljivim delovanjem glutamata. Na drugi strani pa večje mikromolarne koncentracije, ki so posledica poškodbe celic glie ter reakcije astrocitov na poškodbo (reaktivna astroglioza), še dodatno poškodujejo živčevje (4, 14, 17, 18, 30). Aktivirane celice glie izločajo številne biološko aktivne molekule, ki škodljivo delujejo na možganske funkcije (spodbudijo nastanek encima sintaze dušikovega

oksida in vnetnih citokinov, interlevkina  $1\beta$  in TNF- $\alpha$ ) (4). Domnevajo, da so povečane koncentracije S100B proteina v likvorju posledica reaktivne astroglioze, kjer pride do povečanega sproščanja S100B proteina iz aktiviranih astrocitov in hkrati prisotnega S100B proteina, ki se sprosti iz poškodovanih oz. odmrlih celic (28).

Disfunkcijo in poškodbo OŽ lahko zaznamo z merjenjem koncentracije proteina S100B. Povečane likvorske in serumske koncentracije so kazalec poškodbe celic glie ter so v sorazmerju z večjim obsegom poškodbe in slabšim nevrološkim izidom po bolezni (32, 60).

Raziskav, pri katerih bi merili koncentracijo S100B proteina pri odraslih bolnikih v likvorju in serumu hkrati, je malo, prav v vseh pa so dokazali statistično pomembne razlike v koncentraciji Lc-S100B pri bolnikih z bakterijskim meningitisom v primerjavi s kontrolno skupino.

Do podobnih rezultatov smo prišli tudi v naši raziskavi. Pri bolnikih z bakterijskim meningitisom in KME smo dokazali povečano koncentracijo likvorskega S100B proteina v primerjavi s kontrolno skupino. Bolniki z bakterijskim meningitisom so imeli statistično pomembno ( $p < 0,001$ ) večje koncentracije S100B proteina v likvorju kot bolniki s klopnim meningoencefalitisom, kar smo pričakovali, saj bakterijski meningitis v veliko večji meri prizadene možgansko tkivo kot virusni meningitis.

V raziskavi Karnerja so imeli bolniki z BM (mediana 7,39  $\mu\text{g/L}$ , razpon 1,15–20  $\mu\text{g/L}$ ) povečane koncentracije S100B proteina v likvorju. Prav tako povečane, vendar manjše koncentracije so imeli bolniki s KME (1,70  $\mu\text{g/L}$ , razpon 0,69–9,7  $\mu\text{g/L}$ ). Razlika med skupinama je bila statistično pomembna ( $p = 0,001$ ) (61). Precej nižje, vendar povečane vrednosti Lc-S100B v primerjavi s kontrolno skupino ( $1,67 \pm 0,23 \mu\text{g/L}$  vs.  $1,00 \pm 0,11 \mu\text{g/L}$ ), so prav tako določili v raziskavi Infanteja pri odraslih bolnikih z bakterijskim meningitisom (20).

V raziskavi Linsa in sodelavcev so spremljali dinamiko koncentracije Lc-S100B in S-S100B pri bolnikih z bakterijskim in virusnim meningitisom z večkratnim vzorčenjem. Mediani dan drugega vzorčenja je bil drugi, tretjega sedmi, četrtega

44. in petega 82. dan. Do padca likvorskih koncentracij S100B proteina je prišlo že pri drugem vzorčenju, ko je že bilo uvedeno ustrezno zdravljenje. Pri nadaljnjih vzorčenjih so se koncentracije v likvorju še zmanjševale, klinično stanje bolnikov pa se je izboljševalo, kar je potrdilo domnevo, da spremljanje koncentracije pri posameznih pacientih lahko prispeva k oceni resnosti stanja bolezni in spremljanju uspešnosti zdravljenja (31). V naši raziskavi smo odvzeli vzorec likvorja le ob sprejemu bolnika v bolnišnico ali pri ambulantnem pregledu, zato dinamike koncentracije S100B proteina v likvorju pri naših bolnikih nismo ocenjevali.

Podobno kot v naši raziskavi so pri vseh bolnikih z bakterijskim meningitisom v prvem vzorcu likvorja določili večje koncentracije S100B proteina v primerjavi s kontrolno skupino ( $p = 0,001$ ). Pri skupini z virusnim meningitisom je imel v prvem vzorcu le bolnik s Herpes-simplex encefalitisom povečane vrednosti v likvorju v primerjavi s kontrolno skupino (31).

V skupini bolnikov z bakterijskim meningitisom je mejno koncentracijo S100B proteina v likvorju  $4,0 \mu\text{g/L}$  preseglo 36 % bolnikov, ob upoštevanju mejne vrednosti  $2,6 \mu\text{g/L}$  pa 55 % bolnikov. Pri bolniku s herpes-simplex encefalitisom sta bili preseženi obe mejni vrednosti (31).

V naši skupini bolnikov z BM je mejno vrednost  $4,0 \mu\text{g/L}$  preseglo 52 % bolnikov, mejno vrednost  $2,6 \mu\text{g/L}$  pa kar 68% bolnikov. Zakaj je mejne vrednosti preseglo več bolnikov v naši raziskavi kot v Linsovi ni povsem jasno. Vzrok je lahko nižja povprečna starost bolnikov z BM v Linsovi, raziskavi (44 let) in manjše število bolnikov v skupini (11 bolnikov). Na drugi strani je v naši raziskavi v skupini bolnikov s KME mejno vrednost  $4,0 \mu\text{g/L}$  presegel le en bolnik, mejno vrednost  $2,6 \mu\text{g/L}$  pa štiri bolniki.

Večina drugih raziskav, v katerih so merili koncentracije Lc-S100B pri bolnikih z meningitisom, je bila opravljena pri preiskovancih, mlajših od 15 let. V raziskavi, pri kateri so proučevali vrednosti S100B proteina pri otrocih in mladostnikih, so prav tako dokazali povečane koncentracije pri bolnikih z okužbo OŽ v primerjavi s kontrolno skupino. Povprečne koncentracije pri skupini z aseptičnim meningitisom so bile  $1,04 \mu\text{g/L}$  in pri skupini z bakterijskim meningitisom  $1,6 \mu\text{g/L}$ , statistično pomembnih razlik med skupinama niso dokazali ( $p = 0,17$ ) (32).

Mejna vrednost (pod 0,71 µg/L) za otroke do 15 leta starosti je bila presežena tudi v raziskavi, v kateri so imeli otroci z meningitisom povprečne vrednosti Lc-S100B proteina večje (1,51 µg/L) kot tisti z meningoencefalitisom (1,23 µg/L), vendar razlika ni bila statistično pomembna ( $p > 0,05$ ) (28). Hammedova s sodelavci je v podobni raziskavi pri otrocih z meningitisom izmerila precej manjše srednje koncentracije Lc-S100B proteina ( $0,61 \mu\text{g/L} \pm 0,05$ ), koncentracije S100B proteina v likvorju pri kontrolni skupini niso določali (30). Gazzolo s sodelavci je tudi pri nedonošenih otrocih z bakterijskim meningitisom ugotovil večje koncentracije S100B proteina v likvorju v primerjavi s kontrolno skupino (1,34 µg/L vs. 0,16 µg/L,  $p < 0,001$ ) (29).

V skupino bolnikov z bakterijskim meningitisom smo preiskovance vključili na podlagi dveh različnih kriterijev ali osamitve bakterij iz likvorja ali pa izpolnjevanja biokemičnih in citoloških kriterijev. Bolniki z osamitvijo bakterij iz likvorja so imeli večjo koncentracijo S100B proteina v likvorju kot bolniki, pri katerih iz likvorja bakterij ni bilo osamljenih. Razlika v koncentraciji S100B proteina v likvorju med temi bolniki ni bila statistično pomembna ( $p = 0,835$ ). O manjših, prav tako statistično nepomembnih razlikah ( $p > 0,05$ ) med bolniki z osamitvijo bakterij iz likvorja in bolniki brez osamitve bakterij iz likvorja, poroča tudi Hamedova s sodelavci (30).

Kljub temu da v naši raziskavi različna koncentracija S100B proteina med skupinama ni bila statistično pomembna, pa je imela skupina z osamitvijo bakterij iz likvorja statistično pomembno večjo koncentracijo CRP in likvorskih beljakovin ter nižjo koncentracijo glukoze v likvorju kot skupina brez osamitve bakterij iz likvorja. Predhodno antibiotično zdravljenje oz. zelo nizka koncentracija bakterij je lahko vzrok, da iz likvorja ni bilo osamitve bakterij kljub izpolnjevanju ostalih kriterijev za potrditev bakterijskega meningitisa. Večja koncentracija bakterij pri bolnikih z osamitvijo bakterij iz likvorja bi lahko bila vzrok večji koncentraciji CRP zaradi hujšega vnetja, nižji koncentraciji glukoze, zaradi zmanjšanega transporta ter večji porabi prisotnih bakterij in vnetnih celic ter povečani koncentraciji beljakovin zaradi okvarjene KMP.

V skupini bolnikov z opredeljeno etiologijo bakterijskega meningitisa smo iz likvorja osamili po Gramu pozitivne in tudi po Gramu negativne bakterije. Koncentracija Lc-S100B proteina je bila statistično značilno večja pri bolnikih s po Gramu pozitivnim meningitisom kot pri okužbi s po Gramu negativnimi bakterijami ( $p = 0,027$ ). Bolniki s po Gramu pozitivnim povzročiteljem okužbe so bili statistično značilno starejši ( $p = 0,001$ ), imeli so manjšo koncentracijo krvnih ( $p = 0,027$ ) in likvorskih levkocitov ( $p=0,003$ ) ter večjo koncentracijo serumskega S100B proteina ( $p = 0,044$ ).

Razlika v starosti je bila izrazita, saj je bila srednja starost pri bolnikih s po Gramu negativnim povzročiteljem 19 let, pri bolnikih s po Gramu pozitivnim povzročiteljem pa 67 let. Najpogostejši povzročitelj med po Gramu negativnimi bakterijami je bil meningokok (6/7), za katerega podatki iz literature navajajo, da pogosteje povzroča meningitis pri mlajših osebah. Prav tako je bil pnevmokok najpogostejši povzročitelj med po Gramu pozitivnimi bakterijami (8/11), kar je v skladu s podatki iz literature, v kateri je pnevmokok naveden kot pogostejši povzročitelj bakterijskega meningitisa pri starejših (42, 45, 46, 47, 48, 49). Tudi v celotni skupini vseh bolnikov z osamitvijo bakterij iz likvorja sta bila najpogostejša povzročitelja bakterijskega meningitisa meningokok in pnevmokok, kar je v skladu s podatki iz literature (62).

Zelo visoke koncentracije Lc-S100B proteina so bile izmerjene pri 5 bolnikih z bakterijskim meningitisom. Štirje so imeli potrjeno okužbo z osamitvijo bakterij iz likvorja, eden je bil vključen na podlagi citoloških in biokemičnih kriterijev. Največjo koncentracijo S100B proteina v likvorju je imela bolnica z izoliranim *Staphylococcus aureusom* (59,00  $\mu\text{g/L}$ ), sledil je bolnik z negativno bakterijsko kulturo (18,70  $\mu\text{g/L}$ ), nato bolnika z osamljeno *Listerio monocytogenes* (10,40 in 10,50  $\mu\text{g/L}$ ) in bolnica s pnevmokoknim meningitisom (9,61  $\mu\text{g/L}$ ). Pri vseh je bolezen potekala v težji obliki z motnjo zavesti. Tudi drugi avtorji poročajo o večjih koncentracijah Lc-S100B proteina pri bolnikih, pri katerih so se kasneje pojavili nevrolški zapleti (28, 32). V raziskavi El Seifyjeve so imeli bolniki, pri katerih so se pojavili nevrolški zapleti, koncentracijo S100B proteina v likvorju večjo od 2,35  $\mu\text{g/L}$  (28). V naši raziskavi so bile koncentracije pri bolnikih z BM, ki so imeli težji potek bolezni in motnjo zavesti, večje od 9,61  $\mu\text{g/L}$ .

Tudi Spinella je našel povezavo med večjimi koncentracijami S100B proteina v likvorju in težjim potekom ter slabšim izhodom pnevmokoknega meningitisa pri dveh otrocih, ki sta imela koncentracijo S100B proteina v likvorju 10,6 in 3,0 µg/L (32). V naši raziskavi so se koncentracije S100B proteina v likvorju pri bolnikih s pnevmokoknim meningitisom gibale od 1,70 do 9,61 µg/L.

Pri pnevmokoknem meningitisu je znano, da nizka koncentracija levkocitov in številne bakterije v likvorju napovedujejo težji potek bolezni (62). Tudi bolnica s pnevmokoknim meningitisom, ki je imela največjo koncentracijo S100B proteina, je imela nizko število levkocitov v likvorju ( $101 \times 10^6/L$ ), zelo številne bakterije v likvorju, težji potek bolezni in zato lahko visoko koncentracijo S100B proteina v likvorju.

*S. aureus* povzroča meningitis zlasti po nevrokirurških posegih, po poškodbah lobanje in ob stafilokokni sepsi (42). Incidenca je nizka (1 do 9 %), smrtnost pa je izredno visoka (40 do 50 %) in je višja kot pri preostalih povzročiteljih. Tudi starost napoveduje težji potek bolezni (63, 64). Pogostost okužbe z *S. aureus* v naši skupini je bila 5,6 %, bolnica z *S. aureus* okužbo je bila starejša (67 let) in ni imela predhodne poškodbe glave oz. nevrokirurškega posega. Starost in virulenčne lastnosti bakterije so lahko vzrok za izredno visoke koncentracije S100B proteina v likvorju in težji potek bolezni pri tej bolnici.

*L. monocytogenes* ni pogost povzročitelj bakterijskega meningitisa. V naši raziskavi, smo imeli dva bolnika z *L. monocytogenes* meningitisom, oba sta bila starejša (69 in 81 let). Pri obeh je bolezen potekala v težji obliki z motnjo zavesti in pri obeh smo izmerili visoko koncentracijo Lc-S100B proteina. Podatkov v literaturi, ki bi navajali podobne rezultate ni. Verjetno je starost in z njo povezan slabši imunski odziv najpomembnejši dejavnik za težji potek bolezni in s tem tudi večje koncentracije S100B proteina v likvorju.

Zakaj imajo bolniki s po Gramu pozitivnim povzročiteljem bakterijskega meningitisa večje koncentracije S100B proteina v likvorju, ni povsem jasno. Lahko sta odločilna dejavnika starost bolnikov in različen invaziven potencial bakterij. Debela peptidoglikanska plast, lipopolisaharidi, teihočna kislina (pnevmokoki) in različni bakterijski toksini (streptokokni hemolizini in citolizini) ter presnovki omogočajo učinkovitejšo invazijo po Gramu pozitivnim bakterijam (43, 44, 65).

Pri skupni s KME smo določili povečane koncentracije S100B proteina v likvorju v primerjavi s kontrolno skupino ( $p < 0,001$ ). Srednja vrednost pri skupini s KME je primerljiva s tisto, ki jo navaja Reiber za preiskovance brez bolezni OŽ.

Le pri skupini s KME smo dokazali, da se koncentracija Lc-S100B povečuje s starostjo. Za vsako leto starosti se koncentracija poveča za  $0,032 \mu\text{g/L}$ . Še dva avtorja navajata povečanje koncentracij S100B proteina v likvorju s starostjo (36, 37), v eni od teh raziskav so dokazali povečanje za  $0,4\text{--}1,5\%$  na leto (37).

Trinajst bolnikov s KME je imelo povečane likvorske koncentracije S100B proteina nad mejno vrednostjo  $1,5 \mu\text{g/L}$ , šest bolnikov v skupini s KME je imelo vrednosti Lc-S100B nad  $2,40 \mu\text{g/L}$ . Povprečna starost teh bolnikov je bila 70 let in je bila visoko nad povprečno starostjo celotne skupine s KME (51 let). Poleg starosti (77 in 67 let) je za največje izmerjene koncentracije pri dveh bolnikih ( $3,90$  in  $4,47 \mu\text{g/L}$ ) lahko vzrok tudi težji potek bolezni s sliko meningoencefalitisa. Večje koncentracije Lc-S100B pri starejših bolnikih s KME si lahko razlagamo tudi s tem, da pri starejših bolezen pogosto poteka v težji obliki, kar navaja več avtorjev (50, 58, 66). Slabši imunski odziv ter s tem večje virusno breme, ki poškoduje možganske celice, bi tudi lahko prispevalo k večjim koncentracijam S100B proteina v likvorju.

Drugi možen vzrok povečanja koncentracije pri starejših je povečan razpad možganskih celic in mielina ter naraščanje koncentracije S100B proteina v celicah in mielinskih ovojnica. Višji razpolovni čas proteina pa pripisujemo tudi zmanjšanemu pretoku likvorja s starostjo (36, 37).

Tudi v kontrolni skupini so mejno vrednost  $1,5 \mu\text{g/L}$  S100B proteina v likvorju presegli trije preiskovanci ( $1,51 \mu\text{g/L}$ ;  $2,08 \mu\text{g/L}$  in  $2,21 \mu\text{g/L}$ ). V klinični sliki teh preiskovancev ni bilo nobenih posebnosti, okužba OŽ je bila izključena, zato ni jasne razlage za večje koncentracije S100B proteina v likvorju teh preiskovancev.

Referenčne vrednosti za koncentracijo S100B proteina v likvorju podaja le Reiber, ki je proučeval dinamiko proteinov možganskega izvora v likvorju. Povprečna koncentracije v lumbalnem likvorju je  $1,5 \mu\text{g/L}$  in je manjša od koncentracije v ventrikularnem likvorju, ki znaša  $5,3 \mu\text{g/L}$ . Razmerje med koncentracijama je

1 : 3,5. Razlika v koncentraciji je posledica različnih koncentracij S100B proteina v tkivih, ki obdaja možganska prostora in v lokalnih gradientih (33).

Pri naši kontrolni skupini smo določili nižje povprečne vrednosti Lc-S100B ( $0,98 \pm 0,40 \mu\text{g/L}$ ), ki pa so zelo podobne vrednostim pri kontrolni skupini z negativno lumbalno punkcijo v raziskavi Infanteja ( $1,00 \mu\text{g/L}$ ), (20).

V ostalih raziskavah se v kontrolnih skupinah določene srednje vrednosti S100B proteina v likvorju razlikujejo od dobljenih v naši raziskavi: povprečna vrednost  $0,20 \mu\text{g/L}$  je bila določena v raziskavi Greena (13); povprečna vrednost  $1,22 \mu\text{g/L}$  je bila določena v raziskavi Linsa (31); mejna vrednost  $0,55 \mu\text{g/L}$  je bila določena v raziskavi Petzolda (35); in razpon  $1,00\text{--}6,8 \mu\text{g/L}$  je bil določen v raziskavi Perssona (34). V raziskavi, kjer so ugotovili statistično značilne razlike v koncentraciji med moškimi in ženskami, so podali ločene vrednosti:  $1,5 \mu\text{g/L}$  za ženske in  $1,9 \mu\text{g/L}$  za moške (36).

Pri otrocih brez okužbe OŽ so bile v primerjavi z odraslimi izmerjene manjše koncentracije: srednja koncentracija  $0,16 \mu\text{g/L}$  je bila določena v raziskavi Gazzola (29) in srednja koncentracija  $0,71 \mu\text{g/L}$  je bila določena v raziskavi Spinelle (32), kar je v skladu z raziskavami, ki so dokazale, da se s starostjo koncentracije Lc-S100B proteina v likvorju povečujejo (36, 37). V naši raziskavi pri kontrolni skupini nismo dokazali, da bi se koncentracije S100B proteina s starostjo povečevale ( $p=0,792$ ), to smo dokazali le pri skupini s KME ( $p = 0,01$ ).

Velike razlike v koncentracijah med posameznimi raziskavami lahko pripisujemo majhnim vzorcem, predvsem pa različnim metodam, ki so bile uporabljene v raziskavah (31, 32).

Serumske koncentracije S100B proteina so precej nižje od likvorskih, večina v serumu prisotnega S100B proteina izvira iz OŽ. Pri zdravih otrocih in zdravih odraslih, ki niso imeli bolezni OŽ, je bila koncentracija serumskega S100B proteina določena v več raziskavah. V naši raziskavi smo določili mediano koncentracijo za kontrolno skupino v serumu  $0,07 \mu\text{g/L}$  in je precej nižja od mejne vrednosti  $0,15 \mu\text{g/L}$ , ki jo navaja proizvajalec reagentov in smo jo uporabili v raziskavi. Povsem enako vrednost za kavkazijsko populacijo so dobili v raziskavi, kjer so proučevali vpliv rase na koncentracije S-S100B (41). Biberthaker je v svoji raziskavi določil podobno srednjo koncentracijo S100B v serumu ( $0,05 \mu\text{g/L}$ ), kot smo jo določili v



naši raziskavi, kljub temu da je uporabil elektrokemiluminescenčno metodo z nižjo mejo detekcije (0,005 µg/L) v primerjavi z našo metodo (24). V raziskavi Petzolda in sodelavcev so določali serumsko koncentracijo S100B proteina z ELISA metodo in so postavili 10-krat manjšo mejno vrednost (0,007 µg/L), kot je bila določena srednja koncentracija v naši raziskavi (35). Vzrok je lahko v različnih metodah. Podobno nizke vrednosti (0,0067 µg/L) je dobil tudi Takahashi, ki je koncentracijo S100B proteina prav tako določal z ELISA metodo, vendar z nižjo mejo detekcije (0,0125 µg/L), kot jo je imela naša metoda (38). V raziskavi Perssona, kjer so uporabili RIA metodo, so koncentracije izrazito višje (5,3 µg/L, območje 2,6–11,5 µg/L) v primerjavi z našimi in drugimi podatki iz literature, vzrok je lahko visoka meja detekcije metode (1,0 µg/L) (34).

Razlike v koncentraciji tako serumskega in tudi likvorskega S100B proteina med različnimi raziskavami so precejšnje, kar otežuje primerjanje in interpretacijo rezultatov. Prve raziskave so bile izvedene z laboratorijsko pripravljenimi metodami, ki so se med sabo razlikovale predvsem po analitični občutljivosti in antigenskih prijemališčih. Šele s komercialno dostopnimi reagentnimi kompleti se je metodologija bolj poenotila, še vedno pa obstaja različna analitična občutljivost tudi med temi analiznimi metodami (13, 31, 59, 67).

V naši kontrolni skupini nismo dokazali odvisnosti koncentracije S-S100B proteina od starosti, enako so ugotovili tudi v raziskavi Takahashija (38) in Ingebrigstena (23), medtem ko je Portela ugotovil večje serumske koncentracije S100B proteina pri starejših osebah (40).

V naši raziskavi smo dokazali statistično pomembne razlike v koncentraciji S-S100B proteina med kontrolno skupino in skupino z BM ( $p = 0,001$ ) ter med skupino s KME in BM ( $p = 0,003$ ). Med kontrolno skupino in skupino s KME statistično pomembne razlike nismo dokazali ( $p = 0,527$ ), saj imata skupini enaki srednji vrednosti. Glede na mejno serumsko vrednost, ki jo navaja proizvajalec je bila ta vrednost presežena pri 10 % bolnikov z izključeno okužbo OŽ, pri 20 % bolnikov s KME in pri 48 % bolnikov z BM.

Tudi Karner je v svoji raziskavi dokazal povečane serumske koncentracije S100B proteina pri bolnikih s KME in BM. V primerjavi z našo raziskavo je bil delež

bolnikov s KME s povečanimi koncentracijami S100B proteina višji (26 %) in pri bolnikih z BM nižji (33,3 %) (61).

Še večji delež bolnikov z okužbo OŽ in povečanimi koncentracijami S-S100B proteina je v svoji raziskavi našel Unden s sodelavci. Večje koncentracije od mejne vrednosti 0,15 µg/L je imelo kar 73 % bolnikov z BM in 33 % bolnikov z virusnim meningitisom (9). V raziskavi Undena je bilo v skupino z bakterijskim meningitisom vključenih le 11 bolnikov, pri petih je bil iz likvorja osamljen *S. pneumoniae*. V naši skupini bolnikov z osamitvijo bakterij iz likvorja je mejno vrednost preseglo 10 bolnikov od 18, pri petih je bil iz likvorja osamljen pnevmokok. Večji relativni delež bolnikov z osamitvijo pnevmokoka iz likvorja v raziskavi Undena je lahko vzrok višjemu odstotku bolnikov s preseženo mejno vrednostjo.

Podobno kot v naši raziskavi je tudi Hemedova s sodelavci dokazala statistično pomembno večjo koncentracijo S-S100B pri bolnikih z bakterijskim meningitisom v primerjavi s kontrolno skupino ( $p < 0,05$ ) (30). Tudi v Linsovi raziskavi so imeli bolniki z bakterijskim meningitisom statistično pomembno večje koncentracije S-S100B proteina v primerjavi s kontrolno skupino ( $p = 0,008$ ), mejno vrednost je preseglo 36 % bolnikov. V skupini z virusnim meningitisom so bile pri vseh bolnikih koncentracije pod mejno vrednostjo (31), medtem ko je v naši skupini s KME mejno vrednost preseglo 7 (20 %) bolnikov, kar morebiti lahko pripišemo drugi etiologiji bolezni.

Bolniki z BM, potrjenim z osamitvijo bakterij iz likvorja, so imeli v primerjavi z bolniki brez osamitve bakterij iz likvorja večje koncentracije S100B proteina v serumu, vendar razlike v koncentraciji niso bile statistično pomembne ( $p = 0,326$ ), kljub temu da smo dokazali statistično pomembno razliko v koncentraciji likvorskega S100B proteina med tema dvema skupinama bolnikov.

Naši rezultati so v nasprotju z raziskavo Hamedove in sodelavcev, kjer so dokazali statistično pomembno razliko v koncentraciji S-S100B, medtem ko se likvorske koncentracije S100B proteina med bolniki z osamitvijo bakterij v primerjavi z bolniki brez osamitve bakterij iz likvorja niso razlikovale (30).

Prav tako kot v likvorju smo tudi v serumu dobili statistično značilno večje koncentracije S100B proteina pri bolnikih s po Gramu pozitivnim povzročiteljem, v

primerjavi z bolniki s po Gramu negativnim povzročiteljem BM ( $p = 0,044$ ). Vzrok temu je lahko večja koncentracija S100B proteina v likvorju, ob izrazitejšem vnetnem odgovoru organizma na okužbo s po Gramu pozitivnimi bakterijami in posledično večja okvara KMP, preko katere je v sistemski krvni obtok prešlo več S100B proteina. V primeru poškodbe možganskih celic se namreč S100B protein sprošča v izvencelični prostor, od koder verjetno prehaja v kri neposredno preko okvarjene KMP ali pa se prenaša iz likvorja v kri preko arahnoidnih vilijev (3, 35, 39).

V raziskavi Kannerja in sodelavcev so z umetno povzročeno okvaro KMP dokazali povečane serumske koncentracije S100B proteina, s čimer so potrdili, da je eden od vzrokov za povečano serumsko koncentracijo poleg poškodbe možganskih celic tudi okvara KMP (67). Tudi drugi avtorji razlagajo, da do povečane serumske koncentracije S100B proteina pride zaradi okvare KMP (28).

Rezultati naše raziskave so v skladu z rezultati Kannerjeve raziskave, saj imamo pri bakterijskem meningitisu večjo okvaro KMB kot pri KME, zato tudi povečane koncentracije S100B proteina v serumu bolnikov z bakterijskim meningitisom.

V naši raziskavi nismo dokazali, da bi bile povečane koncentracije likvorskega S100B proteina v sorazmerju s povečanimi koncentracijami serumskega S100B proteina pri nobeni od skupin (KO:  $p = 0,756$ , KME:  $p = 0,309$ , BM:  $p = 0,309$ ). Do enakih zaključkov sta prišla v svojih raziskavah tudi Kleindienstova (18) in Karner (61).

Vzrok nesorazmerja med likvorskimi in serumskimi koncentracijami S100B proteina lahko pripišemo temu, da na serumsko koncentracijo S100B proteina vpliva več dejavnikov: likvorska koncentracija S100B proteina, okvara KMB in viri S100B proteina izven OŽ (3,4,9,15,18). V naši raziskavi nismo ocenjevali prepustnosti KMP z merjenjem količnika albumina ( $Q_{alb}$ ), zato ne moremo oceniti, v kolikšni meri prispeva k povečanim serumskim koncentracijam S100B protein, ki prehaja iz likvorja v kri in v kolikšni meri S100B protein iz virov, ki so zunaj OŽ. Pri določanju koncentracije S100B proteina je likvor vzorec izbora, saj predstavlja biološko tekočino, v katero se ob akutni poškodbi možganskih celic sestavine teh celic tudi neposredno sproščajo. Več dejavnikov, ki lahko vpliva na koncentracije S100B proteina v serumu, znižuje zanesljivost določanja koncentracije S100B

proteina v serumu kot pokazatelja poškodb OŽ. Poškodba katerega koli tkiva izven OŽ, ki vsebuje S100B protein, lahko vpliva tudi na povečanje koncentracij S100B proteina v serumu (14, 17, 18).

Raiber poroča, da je normalno razmerje med likvorskimi in serumskimi koncentracijami S100B proteina pri preiskovancih brez bolezni OŽ 18 : 1. Okvara KMB, ki vpliva na povečanje koncentracije krvnih beljakovin v likvorju, na koncentracijo beljakovin možganskega izvora v likvorju ne vpliva (33).

Pri kontrolni skupini smo dobili nekoliko nižje razmerje (14,6 : 1), kot ga navaja Raiber. Pri skupini s KME je bilo razmerje nekoliko višje kot pri kontrolni skupini, vendar razlika ni bila statistično pomembna ( $p = 0,081$ ), medtem ko je bila razlika statistično pomembna med kontrolno skupino in BM skupino ( $p < 0,001$ ) ter BM in KME skupino ( $p = 0,013$ ). Prav tako imajo večje razmerje bolniki z osamitvijo bakterij v primerjavi z bolniki brez osamitve bakterij iz likvorja, vendar razlika ni bila statistično pomembna ( $p = 0,326$ ). Tudi v raziskavi Hamedove so določili višje razmerje pri bolnikih z osamitvijo bakterij iz likvorja v primerjavi z bolniki, pri katerih bakterij niso osamili, vendar tudi tu razlika ni bila statistično pomembna ( $p > 0,05$ ) (30). Tudi v skupini z BM so imeli bolniki z okužbo s po Gramu pozitivno bakterijo višje razmerje kot okuženi s po Gramu negativno bakterijo, vendar tudi tu razlika ni bila statistično pomembna ( $p = 0,930$ ). Podobnih primerjav v literaturi nismo zasledili.

Povečano razmerje v skupini z BM dokazuje da je stopnja poškodbe astrocitov pri BM večja kot pri KME, zato so večje koncentracije tako v serumu in likvorju in tudi razmerje med likvorsko in serumsko koncentracijo S100B proteina, kar potrjuje intratekalno sintezo S100B proteina.

V nekaterih raziskavah, kjer so določali koncentracije S100B proteina v likvorju in serumu, so hkrati ugotavljali tudi povezanost z ostalimi laboratorijskimi preiskavami, ki se običajno določajo pri diagnostiki okužb OŽ.

V naši raziskavi smo le pri skupini bolnikov z BM ugotovili, da je bila povečana koncentracija Lc-S100B proteina v sorazmerju s povečano koncentracijo likvorskih beljakovin ( $p = 0,01$ ). Pri bolnikih z BM povečana koncentracija Lc-S100B ni bila v

sorazmerju s povečano koncentracijo Lc-levkocitov, S-CRP, K-levkocitov ter zmanjšano koncentracijo Lc-glukoze.

V drugih raziskavah so dokazali korelacijo tudi z ostalimi parametri. V raziskavi Spinnelle in sodelavcev so pri otrocih z bakterijskim meningitisom dokazali sorazmerje med povečano koncentracijo Lc-S100B ter povečano koncentracijo proteinov ( $p = 0,003$ ) in zmanjšano koncentracijo glukoze ( $p = 0,05$ ). Tako kot v naši raziskavi pa niso dokazali sorazmerja s povečano koncentracijo levkocitov v likvorju (32). Tudi v raziskavi Infanteja so pri bolnikih z meningitisom različnega vzroka dokazali sorazmerje med povečano koncentracijo Lc-S100B ter povečano koncentracijo Lc-levkocitov ( $p = 0,014$ ), Lc-beljakovin ( $p = 0,018$ ) in zmanjšano koncentracijo Lc-glukoze ( $p = 0,028$ ) (20). Tudi pri nedonošenih otrocih z bakterijskim meningitisom so Gazzolo in sodelavci dokazali sorazmerje za iste preiskave kot Infante: Lc-levkocite ( $p < 0,001$ ), Lc-beljakovine ( $p < 0,01$ ) in Lc-glukozo ( $p < 0,01$ ) (29). Povezanost med povečano likvorsko koncentracijo S100B proteina in povečano koncentracijo beljakovin ( $p < 0,05$ ) in zmanjšano koncentracijo glukoze ( $p < 0,01$ ) je dokazala v raziskavi na otrocih tudi El Seifyjeva s sodelavci (28).

Tako v naši raziskavi kot v ostalih štirih je bilo dokazano sorazmerje med koncentracijama beljakovin v likvorju in S100B proteina v likvorju, kar je pričakovano, saj je S100B protein ena izmed beljakovin, ki ga izmerimo skupaj z ostalimi beljakovinami kot celokupno koncentracijo beljakovin v likvorju. Zakaj nismo dokazali povezanosti med Lc-S100B in ostalimi parametri ni povsem jasno. Eden od možnih vzrokov je lahko razlika v starosti in manjša homogenost skupin v primerjavi z našo skupino.

V naši raziskavi se likvorski S100B protein ni izkazal kot diagnostično občutljivejši in bolj specifičen pokazatelj za razlikovanje bakterijskega meningitisa od virusnega meningitisa v primerjavi z ostalimi običajnimi laboratorijskimi preiskavami, ki se izvajajo pri diagnostiki okužb OŽ. Do podobnih zaključkov je prišel tudi Lins, ki je v raziskavi dokazal, da pri okužbah OŽ pride do sprememb v koncentraciji Lc-S100B, vendar te spremembe nimajo večje diferencialno diagnostične vrednosti v primerjavi z običajnimi laboratorijskimi preiskavami (31).

V naši raziskavi je bil najboljši diagnostični pokazatelj za razlikovanje med bakterijskim in virusnim meningitisom koncentracija beljakovin v likvorju (koncentracije večje od 1,46 µg/L imajo diferencialno diagnostično občutljivost 96 % in specifičnost 97 %), sledi CRP (koncentracije nad 105 mg/L imajo diferencialno diagnostično občutljivost 80 % in specifičnost 97 %), koncentracija glukoze v likvorju (pri koncentracijah pod 0,2 mmol/L je diferencialno diagnostična občutljivost 68 % in specifičnost 100 %), likvorski levkociti (pri koncentracijah nad  $1641 \times 10^6/L$  je diferencialno diagnostična občutljivost 76 % in specifičnost 100 %). Na petem mestu je koncentracija likvorskega S100B proteina, kjer imamo pri koncentracijah nad 1,60 µg/L 100 % občutljivost in 71 % specifičnost za razlikovanje BM od KME. Pri bolnikih z okužbo osrednjega živčevja pri koncentracijah, ki so večje od 1,60 µg/L, z 71 % zanesljivostjo potrdimo bakterijsko okužbo OŽ (PNV), pri koncentracijah nižjih od te vrednosti pa lahko s 100 % zanesljivostjo izključimo bakterijsko okužbo OŽ (NNV). Ostale preiskave, kot so koncentracija krvnih levkocitov in koncentracija serumskega S100B proteina, so kot diferencialno diagnostični parametri manj zanesljivi kot Lc-S100B.

Gazzolo je v svoji raziskavi nedonošenčkov z bakterijskim meningitisom postavil mejno vrednost za koncentracijo S100B proteina pri 1,0 µg/L z 91 % diagnostično občutljivostjo in 82 % specifičnostjo (29). Pri tej koncentraciji smo v naši raziskavi sicer dobili 100 % občutljivost, vendar je bila specifičnost le 26 %, saj je imelo tudi 25 bolnikov s KME v likvorju večje koncentracije S100B proteina od 1,0 µg/L.

V raziskavi El Seifyjeve, v kateri so proučevali S100B protein pri otrocih z bakterijskim meningitisom, so določili nižje diagnostične mejne vrednosti. Za Lc-S100B pri 0,84 µg/L in S-S100B pri koncentraciji 0,20 µg/L. V naši raziskavi smo imeli pri koncentraciji 0,84 µg/L S100B proteina v likvorju 100 % občutljivost in 14 % specifičnost. Pri koncentraciji 0,20 µg/L S100B proteina v serumu smo določili 40 % občutljivost in 91 % specifičnost.

## 6. SKLEPI

V naši raziskavi smo na podlagi izmerjenih koncentracij S100B v likvorju in serumu ter ostalih običajnih laboratorijskih preiskav v likvorju in krvi pri kontrolni skupini, pri bolnikih z bakterijskim meningitisom in bolnikih z virusnim meningitisom prišli do naslednjih dognanj:

1. Povečana koncentracija proteina S100B v likvorju je zanesljiv pokazatelj poškodbe astrocitov in intratekalne sinteze S100B proteina, in je posledica različnih patofizioloških procesov, ki potekajo med okužbo OŽ. Koncentracija S100B proteina je večja pri bolnikih z bakterijskim meningitisom kot pri bolnikih z virusnim meningitisom, kar pomeni, da je koncentracija odraz večje poškodbe astrocitov.
2. Pri bolnikih z okužbo OŽ koncentracije S100B proteina v likvorju, ki so nižje od 1,60 µg/L, s 100 % zanesljivostjo izključujejo bakterijsko okužbo OŽ.
3. Serumska koncentracija S100B proteina pri bolnikih z bakterijskim meningitisom je lahko dodatni kriterij za uvedbo protimikrobnega zdravljenja.
4. Povečane likvorske koncentracije S100B proteina ne spremlja sorazmerno povečana serumska koncentracije, saj na koncentracijo S100B proteina v serumu ne vpliva le koncentracija S100B proteina v likvorju, ampak tudi okvara KMP in viri S100B proteina izven OŽ.
5. Pri bolnikih s KME se koncentracija Lc-S100B povečuje s starostjo.
6. Pri bolnikih z BM je povečana koncentracija Lc-S100B v sorazmerju s povečano koncentracijo beljakovin v likvorju.
7. Povečana koncentracija S100B proteina v likvorju ni v sorazmerju s povečano koncentracijo Lc-levkocitov, K-levkocitov, S-CRP in zmanjšano koncentracijo Lc-glukoze.
8. Bolniki z osamitvijo bakterij iz likvorja imajo večje koncentracije Lc-S100B proteina v primerjavi z bolniki brez osamitve bakterij iz likvorja, vendar razlika ni statistično pomembna.

9. Bolniki z okužbo s po Gramu pozitivno bakterijo imajo v likvorju večjo koncentracijo S100B proteina kot bolniki z okužbo s po Gramu negativno bakterijo.
10. Koncentracija likvorskega S100B proteina je lahko napovedni pokazatelj poteka bolezni, saj smo največje koncentracije likvorskega S100B proteina izmerili pri bolnikih, ki so imeli težji potek bolezni.
11. Likvorska koncentracija S100B proteina je zanesljivejši diferencialno diagnostični parameter za razlikovanje bakterijskega meningitisa od virusnega meningitisa kot koncentracija levkocitov v krvi in manj zanesljiv diferencialno diagnostični parameter kot koncentracija beljakovin, glukoze in levkocitov v likvorju ter CRP v serumu in levkocitov v periferni krvi.

Koncentracija S100B proteina v likvorju nam lahko služi kot napovedni dejavnik težjega poteka bakterijskega in virusnega meningitisa ter v nejasnih primerih tudi kot dodatni laboratorijski kriterij za razlikovanje bakterijskega meningitisa od virusnega meningitisa.



## 7. LITERATURA

1. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GC. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* 2006; 396: 201–214.
2. Donaldson C, Barber KR, Kaj CM, Shaw gs. Human S100b protein: Formation of a tetramer from syntetic calcium-binding site peptides. *Protein science* 1995; 4: 765–772.
3. Michetti F, Gazzolo D. S100B protein in Biological Fluids: A Tool for Perinatal Medicine. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 2097–2104.
4. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: Beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology and Neuroscience* 2003; 21: 97–108.
5. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 19: 739–744.
6. Leung IKM, Mani RS, Kay CM. Isolation, characterization and metal-ion-binding properties of the  $\alpha$ -subunit from S-100a protein. *Biochem J* 1986; 237: 257-264.
7. Unden J, Christensson B, Bellner J, Alling C, Rommer B. Serum S100B Levels in Patients with Cerebral and Extracerebral Infectious Disease. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 10–13.
8. Sangtec Medical. Santegc®100 A biochemical marker for diagnosis and monotoring of brain damage.
9. Sindic CJM, Chalon MP, Cambasio CL, Laterre EC, Masson PL. Assessment of damage to the central nervous system by determination of S-100 protein in the cerebrospinal fluid. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1982; 45: 1130–1135.
10. Heizmann CW. S100B protein in Clinical Diagnostics: Assay Specificity. *Clinical Chenistry* 2004; 50: 249–251.

11. Shashoua VE, Hesse GW, Moore BW. Proteins of the Brain Extracellular Fluid: Evidence for Release of S-100 protein. *Journal of Neurochemistry* 1984; 42: 1536–1541.
12. Donato R. Functional roles off S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochemica et Biophysica acta* 1999; 1450: 191–231.
13. Green AJE, Keir G, Thompson EJ. A specific and sensitive ELISA for measuring S-100b in cerebrospinal fluid. *Journal of Immunological Methods* 1997; 205: 35–41.
14. Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia* 2008; 4: 198–204.
15. Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. Neurotropic, protein S100 $\beta$  stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3554–3558.
16. Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B. Evidence for a Wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neuroscience* 2007;
17. Gang S, Li G. Extracerebral origin of S100B and its influence on the serum S100B level in patients. *Juornal of Chinese Clinical Medicine* 2007; 2: 570–574.
18. Kleindienst A, Bullock MR. A Critical Analysis of the Role of the Neurotrophic Protein S100B in Acute Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 2006; 23: 1185–1200.
19. Hu J, Ferreria A, Van Eldik LJ. S100 $\beta$  Induces Neuronal Cell Deth Trough Nitric Oxide Release from Astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 1997; 69: 2294–2301.
20. Infante JR, Torres-Avisbal M, Martinez A, Vallejo JA, Aguilera C, Contreras P, Benitez A, Latre JM. Evaluation of Tumor Marker S-100 in Cerebrospinal Fluid from Subjects with Nonischemic Brain Pathologies. *Tumor Biology* 2000; 21: 38–45.
21. Böttinger BW, Möbes S, Glätzer R, Bauer H, Greis A, Bärtsch, Motsch J, Martin E. Astroglial Protein S-100 Is an Early and Sensitive marker of Hypoxic Brain Damege and Outcome After Cardiac Arrest in humans. *Circulation* 2001; 103: 2694–2698.

22. Rosén H, Rosengren J, Herlitz J, Blomstrand C. Increased Serum Levels of the S-100 Protein are associated With Hypoxic Brain Damage After Cardiac Arrest. *Stroke* 1998; 29: 473–477.
23. Ingebrigsten T, Romner B. Biochemical serum markers for brain damage: A short review with emphasis on clinical utility in mild head injury. *Restorative Neurology and Neuroscience* 2003; 21: 171–176.
24. Biberthaler P, Linsenmeier U, Pfeifer KJ, Krotez M, Mussack T, Kanz KG, Hoecherl EFJ, Jonas F, Marzi I, Leucht P, Jochum M, Mutschler W. Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: A prospective multicenter study. *Shock* 2006; 25: 446–453.
25. Laskowitz DT, Warner DS. The use of S100B as a biomarker in subarachnoidal hemorrhage: Clarity in its promise and limits. *Crit Care Med* 2008; 36: 2452–2543.
26. Jaunalksne I, Romanov T, Nikiforenko J, Sarkova G, Donina S, Nuke I, Engele L. S-100 protein and melanoma. *Acta Medica Lituanica* 2005; 12: 75–77.
27. Green AJE, Thompson EJ, Stewart GE, Zeidler M, McKenzie JM, MacLeod M-A, Ironside JW, Will RG, Knight RSG. Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J. neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2001; 70: 744–748.
28. El Seify MY, Habeeb NM, El Masry OE, El-Khawas HM, El Hadidi ES. Clinical Utility of S-100 B Protein and Urokinase Plasminogen Activator Receptor in Children with meningitis and Encephalitis. *Egypt J. Neurol. Psychiat. Neurosurg.* 2007; 44: 225–234.
29. Gazzolo D, Grutzfeld D, Michetti F, Toesca A, Lituania M, Bruschetti M, Dobrzanska A, Bruschetti P. Increased S100B in Cerebrospinal Fluid of Infants with Bacterial Meningitis: Relationship to Brain Damage and Routine Cerebrospinal Fluid Findings. *Clinical Chemistry* 2004 50: 941–944.
30. Hamed SA, Hamed AE, Zakary MM. Oxidative Stress and S-100B protein in children with bacterial meningitis. *BMC Neurology* 2009; 9.

31. Lins H, Wallesch C-W, Wunderlich MT. Sequential analysis of cerebral damage of neurobiochemical markers of cerebral damage in cerebrospinal fluid and serum in CNF infection. *Acta Neurol Scand* 2005; 112: 303–308.
32. Spinella PC, Donoghue A, Rajendra A, Drott RH; Dominguez TE, Halfaer M. Cerebrospinal fluid levels of S-100 $\beta$  in children and its elevation in pediatric meningitis. *Pediatr Crit Care Med* 2004; 5: 53–57.
33. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clinica Chemica Acta* 2001; 310: 173–186.
34. Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, Pahlman S. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 1987; 18: 911–918.
35. Petzold A, Keir G, Lim D, Smith M, Thompson EJ. Cerebrospinal fluid (CSF) and serum S100B: Release and wash-out pattern. *Brain Research Bulletin* 2003; 61: 281–285.
36. Nygaard Ø, Langbakk B, Romner B. Age- and Sex-Related Changes of S-100 Protein Concentrations in Cerebrospinal Fluid and Serum in Patients with no Previous history of Neurological Disorder. *Clinical Chemistry* 1997; 43: 541–543.
37. Van Engelen BGM, Lamers KJB, Gabreels FJM, Wawers RA, Van Geel WJA; Borm GF. Age-Related Changes of Neuron -Specific Enolase, S-100 Protein, and Myelin Basic Protein Concentration in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry* 1992; 38: 813–816.
38. Takahashi M, Chameczuk, Hong Y, Jackowski G. Rapid and Sensitive Immunoassay for the Measurement of Serum S100B Using Isoform-specific Monoclonal Antibody. *Clinical Chemistry* 1999; 45: 1307–1311.
39. Castellani C, Stojakovic T, Cichocki M, Scharnagl H, Erwa W, Gutman A, Weiberg A-M. Reference ranges for neuroprotein S-100B: from infants to adolescent. *Clin Chem Med Lab* 2008; 46: 1296–1299.
40. Portela VC, Tort ABL, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB; Walz R, Rotta LN, Silva CT, Busnello JV, Kapczinski F, Gonçalves CA, Souza DO. The serum S100B Concentration is Age Dependent. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 950–952.

41. Abdesselan OB, Vally J, Adam C, Foglietti M-J, Beaudeau J-L. Reference Value for Serum S-100B Protein depend on the Race of Individuals. *Clinical Chemistry* 2003; 49: 836–837.
42. Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A. *Infekcijske bolezni*. Ljubljana: Tangram, 1992; 30-57, 387–391.
43. Nau R, Brück W. Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends in Neurosciences* 2002; 25: 38–44.
44. Weber JR, Tuomanen EI. Cellular damage in bacterial meningitis: An interplay of bacterial and host driven toxicity. *Journal of Neuroimmunology* 2007; 184: 45–52.
45. Tang LM, Chen ST, Hsu WC, Lyu RK. Acute bacterial meningitis in adults: a hospital-based epidemiological study. *Q J Med* 1999; 92: 719–725.
46. Tunkel AR, Hartman JB, Kaplan SL; Kaufman BA, Roos LR, Scheld WM, Whitley RJ. Practice Guidelines for the Management of Bacterial Meningitis. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39: 1267–84.
47. Klein NC, Cunha BA. Bacterial Meningitis: Would You Miss This Diagnosis?. *Case Studies in Infectious Disease*.
48. Jereb M, Muzlovič I, Avšič-Županc T, Karner P. Severe tick-borne encephalitis in Slovenia: Epidemiological, clinical and laboratory findings. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 13–14: 623–626.
49. Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Annu Rev Med* 1993; 44: 103–120.
50. Jereb M, Muzlovič I, Avšič-Županc T, Karner P. Severe tick-borne encephalitis in Slovenia. Epidemiological, clinical and laboratory findings. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 13-14: 623–626.
51. Lešničar J. Klopni meningoencefalitis. In: Lešničar J, Strle F, eds. *Klopni meningoencefalitis, lymfska borelijoza*. Celje 1992: 3–70.
52. Lothar T. *Clinical Laboratory Diagnostics*. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges., 1998; 1308–1325.
53. Thompson RB, Bertram H. Laboratory diagnosis of central nervous system infections. *Infectious Disease Clinics of North America* 2001; 15: 1047–1071.

54. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, Sellbjerg F. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from EFNS task force. *European Journal of Neurology* 2006; 13: 913–922.
55. Beek D, Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EFM. Community-Acquired Bacterial Meningitis in Adults. *N Engl J Med* 2006; 354: 44–53.
56. Spanos A, Harrell FE, Durack DT. Differential Diagnosis of Acute meningitis. *JAMA* 1989, 262: 2700–2707.
57. Seehusen D, Reeves MD, Fomin DA. Cerebrospinal Fluid Analysis. *American family physician* 2003; 68: 1103–1108.
58. 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; 23–24: 765–768.
59. Leib SL, Tauber MG. Pathogenesis of bacterial meningitis, *Infectious Disease Clinics of North America* 1999; 13: 527–548.
60. Müller K, Elverland A, Bertil R, Waterloo K, Langbakk B, Unden J, Ingerbrigsten T. Analysis of protein S-100B in serum: a methodological study. *Clin Chem Lab* 2006; 44: 1111–1114.
61. Karner P. Protein S-100 pri bolnikih s klopnim meningoencefalitisom in gnojnim meningitisom. *Respiracijski center 50 let, zbornik predavanj*, 2007; 25–30.
62. Weisfelt M, Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, Gans J. Attenuated cerebrospinal fluid leukocyte count and sepsis in adults with pneumococcal meningitis: a prospective cohort study. *BMC Infectious Disease* 2006; 6.
63. Pintado V, Meseguer MA, Fortun J, Cobo J, Navas E, Querada C, Corral I, Moreno S. Clinical Study of 44 Cases of *Staphylococcus aureus* Meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 864–868.
64. Fong IW, Ranalli P. *Staphylococcus aureus* Meningitis. *Quarterly Journal of Medicine* 1984; 210: 289–299.
65. Koedel U, Scheld MS, Pfister H-W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet* 2002; 2: 721–736.
66. Haglund M, Günther G. Tick-borne encephalitis–pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 2003; 21: S1/11–S1/18.

67. Hallen M, Carlhed R, Karlsson M, Hallgren T, Bergenheim M. A comparison of two different assays for determining S-100B in serum and urine. *Clin Chem Med Lab* 2008; 47: 1025–1029.
68. Kanner AA, Marcki N, Fazio M, Mayberg MR et al. Serum S100 $\beta$ . A Noninvasive Marker of Blood-Brain Barrier Function and Brain Lesions. *Cancer* 2003; 97: 2806–2813.