

# Molekularna dijagnostika infekcija središnjeg živčanog sustava

---

**Pavković, Lucija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:261410>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Lucija Pavković**

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA  
INFEKCIJA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG  
SUSTAVA**

**Završni rad**

**Osijek, 2021**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Lucija Pavković**

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA**  
**INFEKCIJA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG**  
**SUSTAVA**

**Završni rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Tomislav Meštrović

Rad ima 26 listova

***Zahvale:***

*Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Tomislavu Meštroviću na strpljenju, pomoći i vodstvu u izradi ovog završnog rada. Isto tako hvala svim kolegama s fakulteta koji su na bilo koji način pridonijeli mom uspješnom završetku studija.*

*Neizmjeno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i svim bližnjima koji su mi pružali potporu tijekom cijelog školovanja i studiranja.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	<b>Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.</b>
2. CILJEVI.....	<b>Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.</b>
3. METODE.....	3
4. ŽIVČANI SUSTAV.....	4
4.1. Infekcije središnjeg živčanog sustava.....	4
5. DIJAGNOSTIKA INFEKCIJA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA.....	6
5.1. Standardne mikrobiološke tehnike.....	6
5.2. Molekularna mikrobiološka dijagnostika.....	7
6. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE.....	8
7. SEKVENCIRANJE.....	10
8. MENINGITIS.....	11
8.1. Bakterijski meningitis.....	11
8.1.1. Dijagnostika bakterijskog meningitisa .....	12
8.1.2. Liječenje bakterijskog meningitisa .....	13
8.2. Virusni meningitis .....	13
8.2.1. Dijagnostika virusnog meningitisa .....	14
8.2.2. Liječenje virusnog meningitisa.....	14
8.3. Ostale vrste meningitisa.....	15
9. ENCEFALITIS.....	16
9.1. Dijagnostika encefalitisa.....	16
9.2. Liječenje encefalitisa .....	17
10. APSCES MOZGA.....	18
10.1. Dijagnostika aspcesa mozga.....	18
10.2. Liječenje aspcesa mozga .....	18
11. MIJELITIS .....	20
11.1. Dijagnostika mijelitisa.....	20
12. ZAKLJUČAK .....	21
13. SAŽETAK.....	22
14. SUMMARY .....	23
15. LITERATURA.....	24
16. ŽIVOTOPIS .....	26

## POPIS KRATICA

CMV – citomegalovirus (prema engl. *Cytomegalovirus*)

CSL – cerebrospinalni likvor

CT – računalna tomografija (prema engl. *computed tomography*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *Deoxyribonucleic acid*)

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija (prema engl. *fluorescence in situ hybridization*)

HSV – herpes simpleks virus (prema engl. *Herpes simplex virus*)

IgM – imunoglobulini M

mNGS – metagenomsko 'next-generation' sekvenciranje (prema engl. *metagenomic next generation sequencing*)

MR – magnetska rezonanca

PCR – lančana reakcija polimeraze (prema engl. *polymerase chain reaction*)

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze (prema engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

RT – PCR – lančana reakcija polimeraze s reverznom transkriptazom (prema engl. *reverse transcription PCR*)

SŽS – središnji živčani sustav

VZV – varicella-zoster virus (prema engl. *Varicella-zoster virus*)

## 1. UVOD

Ljudski organizam sastoji se od mnogo sustava organa s određenom funkcijom. Njihova međusobna suradnja ostvaruje pravilan rad ljudskog tijela. Povezanost i suradnju sustava organa u održavanju homeostaze organizma postiže se živčanim i endokrinim sustavom. Živčani sustav je centar svih događanja u tijelu, a dijelimo ga na središnji i periferni živčani sustav. Središnji živčani sustav predstavlja dio koji je odgovoran za aktivnost svih dijelova tijela u višestaničnim organizmima te ima specifične imunološke karakteristike koje nam uvelike služe u patogenezi i detekciji infekcija. Središnji živčani sustav čine mozak i leđna moždina, a zaštićen je krvno-moždanom barijerom. Krvno-moždana barijera je splet krvnih žilica koja dijeli moždane stanice od tvari koje cirkuliraju krvotokom. S jedne strane barijera pruža mozgu zaštitu od patogena, a s druge strane može otežati liječenje bolesti mozga jer antibiotici teško prolaze kroz navedenu barijeru.

Infekcije središnjeg živčanog sustava (SŽS) potencijalno su životno ugrožavajuća stanja stoga je bitno što prije dijagnostički i terapijski djelovati (1). Nakon primitka pacijenta pomoću krvnih nalaza, nalaza iz cerebrospinalnog likvora te CT-a ili MRI-a možemo pretpostaviti radi li se o infekciji. Kasnije metode dijagnostike uključuju standardne mikrobiološke metode, a u novije vrijeme sve više se koriste molekularne dijagnostičke metode koje su ubrzale proces otkrivanja uzročnika i omogućile ranije započinjanje antimikrobne terapije. Najčešća molekularna metoda u dijagnostici infekcija SŽS-a jest lančana reakcija polimeraze (polymerase chain reaction; PCR) o kojoj će se raspravljati u daljnjem tekstu. Osim PCR-a, od metoda molekularne dijagnostike u otkrivanju uzročnika infekcija možemo se služiti i sekvenciranjem. Ono nam pomaže otkriti više uzročnika u jednom uzorku u polimikrobnim infekcijama koje na primjer uzrokuju moždani apsces. Infekcije središnjeg živčanog sustava dobile su ime po mjestu koje zahvaćaju. Postoje meningitis, encefalitis, moždani apsces te mijelitis, a svaki od tih kliničkih entiteta mogu uzrokovati različiti uzročnici poput virusa, bakterija, gljiva i parazita. Naravno, neki uzročnici se javljaju puno češće od drugih pa je tako virusni meningitis češća infekcija od bakterijskog meningitisa. Dijagnosticiranje svakog od sindroma može se učiniti i standardnim mikrobiološkim metodama, no zbog potrebne brzine za rezultatima sve češće se koristi molekularna dijagnostika, tj. PCR. PCR nam tako omogućava točnu identifikaciju uzročnika u nekoliko sati, što bi sa standardnim mikrobiološkim metodama, tj. kultivacijom potrajalo i do nekoliko dana.



## **2. CILJEVI**

Ciljevi ovog završnog rada jesu prikazati metode koje se u mikrobiološkom laboratoriju koriste u molekularnoj dijagnostici infekcija središnjeg živčanog sustava, međusobno ih usporediti te istaknuti prednosti i nedostatke u odnosu na standardne mikrobiološke metode. Također, bit će prikazane molekularne metode u sklopu sindromskog pristupa dijagnostici te će rad istaknuti i naglasiti ulogu prvostupnika medicinsko laboratorijske dijagnostike u navedenoj problematici. Osim usporedbi molekularnih i klasičnih metoda dijagnostike, jedan od ciljeva je i dati presjek infekcija središnjeg živčanog sustava.

### 3. METODE

Pisanje ovog završnog rada pod nazivom „Molekularna dijagnostika infekcija središnjeg živčanog sustava“ temeljilo se na pregledu i sažimanju literature pronađene prilikom pretraživanja znanstvenih baza i portala kao što su PubMed, Cochrane Database of Systematic Reviews (CDSR), Hrčak, CROSB, kao i prikladne literature u udžbenicima i priručnicima novijeg datuma izdanja. Korišteni su i pouzdani internetski izvori medicinskih informacija kao što su Medscape i Mayo Clinic.

Literatura je korištena iz različitih grana medicine (anatomija, infektologija, neurologija) i laboratorijske dijagnostike (mikrobiologija, molekularna dijagnostika). Ključne riječi tijekom pretraživanja literature na hrvatskom jeziku bile su: *središnji živčani sustav, infekcija, meningitis, encefalitis, mikrobiologija, dijagnostika, molekularna dijagnostika*. Ključne riječi prilikom pretraga baza bile su na engleskom jeziku: *central nervous system, infection, meningitis, encephalitis, microbiology, diagnostics, molecular diagnostics*.

Pretraga literature dijelom je vođena PRISMA smjernicama (napose u vidu izbora radova, izvora informacija i strategije pretrage), uzevši u obzir pristup pisanju ovog završnog rada u vidu narativnog preglednog rada.

## 4. ŽIVČANI SUSTAV

Živčani sustav glavni je sustav za kontroliranje, reguliranje i komuniciranje u tijelu. Centar je svih mentalnih aktivnosti uključujući mišljenje, učenje i pamćenje. Zadužen je za održavanje homeostaze te mu u tome pomaže endokrini sustav. Živčani sustav građen je uglavnom od mozga, leđne moždine, živaca te ganglija. Oni zajedno snose zadaću kompleksnih aktivnosti živčanog sustava. S obzirom na različite strukturne i funkcionalne karakteristike glavni živčani sustav možemo podijeliti u dva dijela. Mozak, smješten u lubanjskoj šupljini, i leđna moždina, smještena u kralježničkom kanalu, čine središnji živčani sustav (SŽS). SŽS je zadužen za kontrolu misli, pokreta, emocija. Također kontrolira disanje, otkucaje srca, otpuštanje hormona, tjelesnu temperaturu i još mnogo toga (2). Drugi dio živčanog sustava čini periferni ili autonomni živčani sustav koji se sastoji od živaca koji izlaze iz mozga i kralježničke moždine, a uloga mu je kontroliranje nenamjernih tjelesnih funkcija i regulacija rada žlijezda.

### 4.1. Infekcije središnjeg živčanog sustava

Infekcije SŽS su na svu sreću rijetke, ali ako se dogode izuzetno su ozbiljne i potencijalno smrtonosne ne dijagnosticiraju na vrijeme. Inicijalna klinička prezentacija mnogih SŽS infekcija je nespecifična i čini definitivnu etiologiju dijagnoze izazovnom (3). Da bismo razumjeli patogenezu i kliničke posljedice SŽS infekcija, osnovno znanje iz neuroanatomije i neurofiziologije je važno (4). Cerebralni korteks i kralježnička moždina okruženi su slojevima tri tkiva koje nazivamo moždane ovojnice, mozgovnice (lat. *meninges*, jednina *meninx*). Moždane ovojnice možemo podijeliti u dva sloja nazvana pia mater i arahnoid te treći sloj zvan dura mater. Cerebrospinalna tekućina u kojoj plivaju korteks mozga i kralježnička moždina nalazi se u subarahnoidnom prostoru između sloja pia mater i arahnoid. Iz tog razloga glavni uzorak za otkrivanje infekcija SŽS je cerebrospinalni likvor.

S obzirom na mjesto na kojem se jave, infekcije SŽS dobile su različite nazive. Infekciju mozga, kralježničke moždine i moždane ovojnice nazivamo meningitis, encefalitis, apsces mozga te mijelitis.

Središnji živčani sustav zaštićen je od potencijalno opasnih mikroorganizama krvno-moždanom barijerom koja ima čvrste spojeve koji vežu endotelne stanice žila u ovoj regiji, što krvne žile čini puno manje propusnima nego u ostatku tijela. Pojačana nepropusnost krvno-moždane barijere s jedne strane štiti SŽS, a s druge strane otežava liječenje jer ukoliko

dođe do infekcije, imunoglobulini, komplement i antibiotici ne mogu proći barijeru i ne mogu djelovati na mjestu infekcije.

Krvno-moždana barijera postaje više propusna u trenutku kad se u organizmu aktivira sustavni imuni odgovor nekim patogenom (bakterijama, virusima, parazitima...) što omogućava ulazak različitih tvari u SŽS, pa tako i patogena, što posljedično može izazvati infekciju.

### 5. DIJAGNOSTIKA INFEKCIJA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

Infekcije središnjeg živčanog sustava jedne su od najtežih infekcija kada se govori o morbiditetu i smrtnosti kod pacijenata zbog čega je potrebna i često neophodna hitna i precizna dijagnoza uzročnika. Najčešći simptomi s kojima se pacijent prezentira u hitnoj su glavobolja, vrućica, poremećaj svijesti te poremećaj u ponašanju. Pri sumnji na infekciju SŽS rade se krvna slika, pacijent se šalje na računalnu tomografiju (CT) ili magnetsku rezonancu (MR) te se radi lumbalna punkcija. Većina testova za detekciju infekcije izvodi se na uzorku cerebrospinalnog likvora dobivenog lumbalnom punkcijom. S obzirom da je on u direktnom kontaktu sa živčanim tkivom gdje se infekcija odvija, u njemu možemo pronaći tražene uzročnike. Nekadašnje standardne mikrobiološke metode koje su se koristile za detekciju uzročnika infekcije danas su zamijenile molekularne metode zbog svojih prednosti koje ćemo razjasniti kasnije u tekstu.

#### 5.1. Standardne mikrobiološke tehnike

Prije razvitka molekularnih tehnika u dijagnostici za otkriće patogena koristile su se standardne mikrobiološke metode poput mikroskopiranja, kultivacije, otkrivanje antigena i protutijela. Iako korisne, često su bile nedovoljno brze što je otežavalo dijagnostiku koja (kako smo već spomenuli) treba biti hitna i precizna. Na primjeru najčešćeg uzročnika meningitisa, enterovirusa, može se vidjeti kako su standardne mikrobiološke metode u nedostatku naspram molekularnih metoda.

Mikroskopiranje mikroorganizama općenito nije dovoljno osjetljivo i specifično da bi se konkretno identificirao uzročnik kao što to radimo molekularnim metodama, ali nam služi za utvrđivanje postoje li mikroorganizmi uopće u uzorku likvora te ako postoje kakva im je morfologija. Također, bojenjem po Gramu možemo razlikovati jesu li bakterije gram pozitivne ili gram negativne – i tako se ograničiti na jednu vrstu uzročnika u daljnjoj pretrazi.

Kultivacija je uzgoj mikroorganizama na različitim agarima ovisno o potrebama traženog uzročnika. I virusi se mogu kultivirati na staničnoj kulturi, no primjerice, kultivacija enterovirusa ima osjetljivost između 65 i 75%, što nam nije baš pouzdano za dijagnozu te je za neke serotipove poznato da jako slabo rastu ili uopće ne rastu.

## 5. DIJAGNOSTIKA INFEEKCIJA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

Nadalje, serološko testiranje u mikrobiologiji predstavljaju samo posredni ili retrospektivni dokaz o infekciji središnjeg živčanog sustava. Enterovirusima nedostaje zajednički antigen što znači da je nemoguća općenita detekcija antitijela ili antigena

Slični problemi se pronalaze i kod detekcije herpes simpleks virusa (HSV) jer mu je kultura na stanicama slabo osjetljiva, a antitijela koja se javljaju u organizmu kao odgovor na HSV javljaju se tek 10 ili 12 dana nakon infekcije, što znači da nije idealno za ranu dijagnozu.

### 5.2. Molekularna mikrobiološka dijagnostika

Molekularne metode neizostavni su dio suvremene kliničke dijagnostike infektivnih bolesti zbog visoke osjetljivosti, specifičnosti i brzine testiranja. Omogućavaju nam otkrivanje patogena koje nismo u mogućnosti otkriti standardnim mikrobiološkim metodama poput kultivacije te onih patogena kod kojih je kultivacija zahtjevana, tj. ne daje rezultat u klinički značajnom vremenu. Molekularna dijagnostika je skup testova koji se koriste u analizi bioloških markera u genomu i proteomu primjenom molekularne biologije na medicinska ispitivanja (5). qPCR (lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu), hibridizacijske metode i sekvenciranje nukleinskih kiselina metode su koje se najčešće koriste u mikrobiologiji. Testovi mogu biti dizajnirani kao kvalitativni ili kvantitativni te se koriste za detekciju uzročnika, davanje odgovarajuće terapije te praćenje uspješnosti same terapije. Tehnike molekularne dijagnostike uključuju: molekularno kloniranje, gel elektroforezu, makromolekularni blotting i sondiranje, PCR, fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH), analiza DNA mikromreže i spektralna kariotipizacija. Uspoređujući ih sa standardnim mikrobiološkim metodama, molekularne metode pokazuju bolje rezultate detekcije s većom osjetljivošću, specifičnošću i sve to u manjem vremenskom razdoblju. Za detekciju infekcija središnjeg živčanog sustava dominantno se koriste tehnike lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

## 6. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE

Razvoj PCR molekularnih tehnika započeo je revoluciju u polju mikrobiološke dijagnostike, osobito kod infekcija SŽS. Svojom visokom osjetljivošću i specifičnošću postao je zlatni standard dijagnostike virusnih, bakterijskih i gljivičnih infekcija SŽS. PCR je tehnika koju koristimo za pravljenje više kopija nekog segmenta DNA čime stvaramo veliki broj kopija od početno jako malog uzorka. Amplifikacija DNA segmenta nam tako omogućuje detekciju patogena kao što su virusi ili bakterije, te provođenje znanstvenih istraživanja koja se koriste DNA manipulacijom. PCR ima tri glavna koraka: denaturaciju, hibridizaciju i polimerizaciju te se odvija u tri ciklusa. Denaturacija se odvija na 95 °C gdje se ciljna DNA odmotava. Hibridizacija se odvija između 55-65 °C te se u tom ciklusu početnice vežu za ciljne dijelove DNA. Treći korak je polimerizacija na 72 °C gdje se DNA polimeraza veže i stvara komplementarni lanac ciljne DNA koji se u iduća dva ciklusa opet može odmotati i amplificirati kako bi se kasnije lakše detektirao veći broj kopija ciljne DNA. S obzirom da se prilikom provođenja PCR reakcije potrebno manipulirati i otvarati tube sa sadržajem za analizu, rizik od kontaminacije kod klasičnog PCR-a je jako velik za razliku od analiziranja real-time PCR-om.

PCR ima svoje varijacije kao što su lančana reakcija polimeraze s reverznom transkriptazom (RT-PCR), real-time PCR (kvantitativni PCR, qPCR) i Multiplex PCR.

Lančana reakcija polimeraze s reverznom transkriptazom služi za amplifikaciju RNA što uvelike pomaže u detekciji RNA-virusnih infekcija te u nekim slučajevima služi za praćenje odgovora na terapiju. Dokazano je da otkrivanje enterovirusa RT-PCR-om na vrijeme omogućava olakšani i kraći boravak u bolnici, smanjuje nepotrebnu upotrebu antibiotika te reducira izvođenje nepotrebnih dodatnih laboratorijskih testova.

Real-time PCR je, za razliku od konvencionalnog PCR-a, zatvoreni sustav te je zlatni standard za testiranje pacijenata s virusnim infekcijama. Uzorak s mogućim virusnim patogenom se uzme te se iz njega ekstrahira RNA koju pomoću reverzne transkriptaze prevedemo u DNA. Zatim, DNA analiziramo u qPCR sustavu. Za razliku od konvencionalnog PCR-a gdje prisutnost ili odsutnost mikroorganizma vidimo tek na kraju trećeg ciklusa, u qPCR vizualiziramo rezultate pomoću fluorescentne boje nakon svakog ciklusa te ga tako pratimo u stvarnom vremenu. U svakom slučaju, uvođenje real-time PCR-a imalo je znatan utjecaj na rano otkrivanje nekih infekcija središnjeg živčanog sustava.

Multiplex PCR koristi dva ili više para početnica koje su specifične za različite ciljne DNA; dakle, postoji više od jedne ciljne DNA koja se umnaža u isto vrijeme (6). Ipak, važno je razumjeti da Multiplex PCR panel nije prilagođen za sve pacijente, osobito za one imunokompromitirane, te nije primarno osmišljen kako bi testirao na patogene u bolničkim uvjetima, stoga se ne bi trebao koristiti u specifičnim okolnostima (7).



## 7. SEKVENCIRANJE

Metagenomsko sekvenciranje sljedeće generacije (Next Generation Sequencing) u biti predstavlja testiranje na sve nukleinske kiseline u uzorku koji može sadržavati više populacija različitih mikroorganizama. U tom smislu bi rezultati dijagnostičke obrade trebali pomoći pridružiti nukleinske kiseline njihovim referentnim genomima kako bismo otkrili koji su mikroorganizmi prisutni i u kojim omjerima. S obzirom da postoji veliki broj uzročnika u infekcijama poput meningitisa, etiologija infekcije često ostaje nepoznata pa se u tu svrhu razvilo mNGS (8). Općenito, sekvenciranje se može podijeliti u dvije skupine: short-read i long-read sekvenciranje. Metagenomsko sekvenciranje najčešće koristi short-read sekvenciranje što još zovemo 'shotgun' sekvenciranje. Ovom metodom možemo identificirati nove patogene, a čak je dokazana i prednost nad kultivacijom u pacijenata s apscesom mozga i bakterijskim meningitisom; primjerice, uzročnik se može uspješno identificirati čak i kada je standardna kultura bila negativna te kad je otkriveno više vjerojatnih bakterija kada je kultura otkrila samo jedan organizam (18). Svakako pri korištenju ove metode treba biti oprezan jer kontaminacija može dati lažne rezultate koji na kraju mogu utjecati na terapiju i ishod bolesti.

## 8. MENINGITIS

Meningitis je upala već spomenutih moždanih ovojnica koje štite mozak i leđnu moždinu. Upala najčešće zahvaća meke ovojnice, pia mater i arahnoidu, a rjeđe duru mater. Virusi i bakterije čine većinu uzročnika meningitisa, no i gljive i paraziti mogu izazvati infekciju. Može se pojaviti kod bilo koga, ali najčešće obole djeca i mladi. Simptomi uključuju: vrućicu, glavobolju i ukočen vrat. S obzirom na posljedice koje meningitis može izazvati, kao što je sepsa, potrebno je što prije potražiti liječničku pomoć ukoliko se uoče simptomi. Prenosi se kapljičnim putem poput kihanja, kašljanja i slično, a liječi se ovisno o uzročniku.

Bakterijski meningitis puno je rjeđi od virusnog, ali je i puno ozbiljniji.

### 8.1. Bakterijski meningitis

Probijanje krvno moždane barijere i dospjeće bakterija u subarahnoidni prostor uzrokuje akutnu upalu moždanih ovojnica, tj. bakterijski meningitis. U medicini se označuje kao hitno stanje jer vrlo brzo može izazvati smrtni ishod, a karakterizira ga veliki broj leukocita u cerebrospinalnom likvoru.

*Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes* i *Streptococcus pneumoniae* su tri vrste bakterija koje su najčešće odgovorne za upalu moždanih ovojnica. Osim njih postoje još *Haemophilus influenzae* te drugi aerobni gram-negativni bacili.

*Streptococcus pneumoniae* najčešće uzrokuje meningitis kod novorođenčadi, mlade djece i odraslih. Može se prevenirati cjepivom koje je danas ušlo i u obavezan kalendar cijepljenja.

*Neisseria meningitidis* općenito uzrokuje infekcije gornjeg respiratornog sustava, ali ako uđu u krvotok mogu biti uzročnici meningitisa. Infekcija je vrlo zarazna i zahvaća tinejdžere i mlade.

*Listeria monocytogenes* možemo pronaći u nepasteriziranim sirevima, hot-dogovima i mesu. Bakterija može izazvati infekciju u trudnicama, novorođenčadi, starijim ljudima i u imunokompromitiranih. *Listeria* može proći kroz placentu pa infekcije u kasnoj trudnoći mogu biti fatalne.

*Haemophilus influenzae* vodeći je uzrok bakterijskog meningitisa u djece no uvođenjem obaveznog cijepljenja protiv *Haemophilus influenzae* tipa B, incidencija (pojavnost) bakterijskog meningitisa uzrokovana tim uzročnikom drastično se smanjila.

### 8.1.1. Dijagnostika bakterijskog meningitisa

Na akutni bakterijski meningitis treba posumnjati u djece mlađe od dvije godine s letargijom, progresivnom iritabilnošću, prodornim plačem, napetom fontanelom, meningealnim znakovima ili hipotermijom (9). U bolesnika starijih od dvije godine života na meningitis treba posumnjati u slučaju pojave meningealnih znakova ili neobjašnjivog poremećaja svijesti, osobito u onih s vrućicom ili rizičnim faktorima (9). Navedeni simptomi upućuju liječnika na pretrage cerebrospinalnog likvora (CSL). Također, preporučuje se učiniti CT kako bi se isključila ekspanzivna tvorba s pomakom moždanih masa te izbjegla moguća hernijacija mozgovine (1). Lumbalnom punkcijom dobiveni likvor ide na analizu koja mora uključivati: citologiju, biokemiju i bakteriologiju.

Tipični nalaz likvora pri bakterijskom meningitisu može prikazivati povišeni tlak likvora, povećani broj neutrofila ( $>2000/\mu\text{L}$ ), povišene bjelančevine i sniženu glukozu zbog oštećenog transporta glukoze u SŽS te povećane potrošnje od strane neutrofila i bakterija. Bjelančevine su u pravilu  $> 100 \text{ mg/dL}$ . Bakterijske kulture su pozitivne u 90% slučajeva.

Atipičan nalaz kod bakterijskog meningitisa javlja se ukoliko je uzročnik *Listeria monocytogenes*. Takav nalaz je mononuklearan uz relativno mali broj stanica, ali uz prisutnu hipoglikorahiju.

U razvijenim zemljama, najčešći pristup za detekciju i karakterizaciju patogena bakterijskog meningitisa jesu kultivacija, bojenje po Gramu i lateks aglutinacija. Svaki od njih ima svoje prednosti i nedostatke. Kultivacija, iako jako korisna u otkrivanju rezistentnosti bakterije, razvitku budućih lijekova i promatranju patofiziologije patogena, ima nisku stopu pozitivnih kultura zbog predanalitičkih grešaka koje su neizbježne. Bojenje po Gramu je važno i jeftino, no ne daje nikakav uvid u etiologiju uzročnika. Nadalje, lateks aglutinacija je podložna subjektivnom očitavanju rezultata, što nije baš pouzdano. Sve ove nedostatke možemo nadomjestiti molekularnom dijagnostikom koju možemo primijeniti na prethodno izoliranu DNA iz kliničkog uzorka za analizu. PCR kao metoda molekularne dijagnostike uvelike olakšava otkrivanje vrste bakterijskih uzročnika u kliničkom uzorku jer mu nisu potrebni žive ili netaknute stanice (10).

PCR detekcija *N. meningitidis*, *H. influenzae*, i *S. pneumoniae* može se postići detekcijom nekoliko potencijalnih gena.

Tako *N. meningitidis* ima dva gena koja možemo detektirati, *ctrA* i *sodC*. Gen *ctrA* visoko je očuvan među izolatima odgovorima za invazivne meningokokne infekcije, a koristi se i u real-time PCR-u i u konvencionalnom PCR-u za detekciju *N. meningitidis*, a nalazi se unutar lokusa kapsule. Međutim, budući da najmanje 16% prenesenih meningokoka nema *ctrA* gen, real-time PCR za otkrivanje svih meningokoka nedavno je razvijen i validiran (10). Ovaj test cilja na gen Cu-Zn superoksid dismutaze, *sodC*, koji nije genetski povezan s lokusom kapsule (10). Preporuka za detekciju *N. meningitidis* PCR metodama je korištenje *sodC* gena.

*H. influenzae* posjeduje gen za kodiranje proteina D, *hpd*, lipoprotein koji se nalazi na površinama svih kapsuliranih i nekapsuliranih *H. influenzae*. S obzirom na njegovu rasprostranjenost, najviše se koristi u razvijanju real-time PCR-a za detekciju *H. influenzae*.

Za *S. pneumoniae* razvijen je i konvencionalni i real-time PCR u svrhu detekcije. Geni koji se detektiraju pneumolizin (*ply*), autolizin (*lytA*) te gen za pneumokoknu površinsku adheziju (*psaA*). Preporuča se detekcija *lytA* gena zbog visoke očuvanosti unutar vrste te zbog razlikovanja *S. pneumoniae* od genotipno sličnih vrsta.

### 8.1.2. Liječenje bakterijskog meningitisa

Liječenje bakterijskog meningitisa s obzirom na njegov mogući smrtni ishod odvija se u jedinicama intenzivnog liječenja. Terapija može biti antimikrobna, simptomatska, potporna i imunomodulirajuća. Antimikrobna terapija može biti empirijska i etiološka ako je uzročnik utvrđen. Ceftriakson se preporučuje zato što djeluje na meningokok, pneumokok, hemofilus, a također dobro prodire u CSL (1). Simptomatsko liječenje bakterijskog meningitisa važno je započeti odmah u početku same bolesti. Potporno liječenje uključuje zbrinjavanje zatajivanja ili disfunkcije pojedinih organskih sustava u sklopu JIL-a uz invazivno praćenje (1). Imunomodulirajuće liječenje se odvija primjenom deksametazona prije ili zajedno s prvom dozom antimikrobne terapije.

## 8.2. Virusni meningitis

Sve češćim procjepljivanjem protiv bakterijskih uzročnika meningitisa, incidencija bakterijskog meningitisa se smanjuje, a virusnog povećava. Virusni meningitis se obično pojavljuje u obliku vrućice, glavobolje, fotofobije, ukočenog vrata, te nerijetko mučnine i povraćanja (11). Ponekad bolest prođe i asimptomatski. Rano uočavanje simptoma i

dijagnostika su od velike važnosti jer se u početku bolesti još ne zna je li u pitanju bakterijski, puno opasniji, ili virusni meningitis. Virusni meningitis obično ima dobru prognozu i samoograničavajuća je bolest. Najčešći uzročnici svih dobnih skupina su enterovirusi (Coxsackie ili Echovirusi). Herpesvirusi koji uzrokuju meningitis su herpes simplex virus (HSV) 1 i 2, varicella-zoster virus (VZV), citomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus i humani herpesvirus 6. Drugi uzročnici još su adenovirusi, arbovirusi, influenza i parainfluenza virus te mumps.

Virusni meningitis javlja se u male djece, a incidencija se s godinama smanjuje (11).

### **8.2.1. Dijagnostika virusnog meningitisa**

Dijagnoza virusnog meningitisa također započinje lumbalnom punkcijom i uzimanjem cerebrospinalnog likvora za analizu. Karakteristično za virusni meningitis u CSL-u možemo pronaći mononuklearnu pleocitozu, iako u početku može postojati prevlast neutrofila. Kultivacija nije optimalna metoda dijagnoze jer općenito treba više dana da bi kolonije narasle, a s obzirom da se u početku ne zna je li uzročnik bakterija ili virus potrebna je brža dijagnostika. Nadalje, PCR testovi mogu biti korisni u otkrivanju nekih virusnih uzročnika kao što su enterovirusi, VZV i HSV.

Enterovirusi su RNA virusi koji se mogu pronaći u cerebrospinalnom likvoru u slučajevima kad je nastupila infekcija. Real-time PCR je visoko specifičan i osjetljiv te mu treba malo vremena za detekciju enterovirusa, stoga je njegova uporaba u dijagnostici preporučljiva. Osim toga, postoje kitovi za detekciju enterovirusa koji koriste real-time PCR nakon ekstrakcije virusne RNA. VZV i herpes simpleks virus preporučeno se dijagnosticiraju PCR-om jer je visoko osjetljiv i visoko specifičan u vrlo malo vremena što odgovara potrebama dijagnostike meningitisa.

### **8.2.2. Liječenje virusnog meningitisa**

U većini slučajeva nema specifičnog tretmana za virusni meningitis. Većina ljudi koja oboli općenito se oporave u 7 do 10 dana.

### 8.3. Ostale vrste meningitisa

Osim bakterija i virusa, uzročnici meningitisa još mogu biti gljive i paraziti.

Gljivični meningitis javlja se ukoliko se gljivična infekcija iz nekog drugog dijela organizma proširi do mozga ili leđne moždine ili udisanjem gljivičnih spora. Simptomi i dijagnostika su slični kao kod bakterijskog meningitisa. Dakle, pri sumnji na meningitis radi se lumbalna punkcija i analizira CSL ovisno na kojeg uzročnika sumnjamo. Najčešći uzročnici su *Cryptococcus*, *Candida*, *Histoplasma*, i *Coccidioides*. Infekcija nije zarazna i ne može se prenijeti s osobe na osobu.

## 9. ENCEFALITIS

Encefalitis je upala moždanog parenhima prouzročena izravnim prodorom virusa u mozak ili je posljedica hipersenzitivnosti na virus ili pak drugi strani protein (12). Kao i kod virusnog meningitisa, uzročnici encefalitisa su herpes simpleks tip 1, varicella zoster virus, enterovirusi i arbovirusi. HSV tip 1 odgovoran je za 60-70% slučajeva encefalitisa. Može se pojaviti sporadično ili epidemijski (1). Upala moždanog parenhima često je popraćena i upalom moždanih ovojnica pa govorimo o meningoencefalitisu, a ako je uhvaćena i kralježnička moždina, govorimo o encefalomijelitisu. Virusni uzročnici najčešće zahvaćaju cijeli mozak, no dominantna upala može biti izražena samo na jednom dijelu. Bulbarni oblici encefalitisa su oni koji zahvaćaju produženu moždinu, o rombencefalitisu govorimo ako su zahvaćeni i pons i mali mozak, a o cerebelitisu govorimo ukoliko je zahvaćen samo mali mozak. Simptomi se razlikuju od onih kod meningitisa, a uključuju: halucinacije, ponavljanje nekih motoričkih aktivnosti kao što su odijevanje i skidanje, napadaji, jaka glavobolja i ataksija. Preboljeni encefalitis za sobom može ostaviti mnoge posljedice kao što su epilepsija, depresija, poremećaji koncentracije, spavanja, poremećaj ličnosti, oštećenje intelektualnih funkcija te ispadi osjeta i motorike.

### 9.1. Dijagnostika encefalitisa

Na dijagnozu uvijek treba posumnjati u bolesnika sa simptomima u vezi sa središnjim živčanim sustavom, napose ako su prisutni simptomi akutnoga upalnog odgovora (1). Obično se radi MR mozga i analiza likvora, ponekad zajedno s drugim pretragama da se ustanovi uzročnik bolesti (12). Lumbalna punkcija pokazuje broj bijelih krvnih stanica u CSL-u ispod  $500/\text{mm}^3$  s predominacijom mononuklearnih stanica (4). Proteini u CSL-u su normalni ili malo povišeni a glukoza je većinom normalna, osim kod infekcije herpesom.

Jedna od najuspješnijih koristi od PCR je dijagnoza virusnih infekcija središnjeg živčanog sustava. Savršen je alat za identifikaciju organizama koji se teško ili se ni ne mogu kultivirati. PCR je jeftin i brz način dijagnosticiranja za razliku od tradicionalnih kultivacija za koje je potrebno od 1 do 28 dana da bi kultura porasla. Za razliku od kultura koje mogu dati negativne rezultate čak i nakon malih doza antivirusnih lijekova, analiza CSL PCR-om zadržava svoju osjetljivost nakon nekoliko kratkih doza antivirusne terapije ili pasivne imunizacije (13). PCR se također preferira prije serologije, jer za razvitak antitijela na neki antigen treba proći nekoliko dana, ako ne i tjedana, što produžuje vrijeme prije početka

terapije koja može biti od velikog značaja za daljnji ishod bolesti. Na kraju, PCR CSL-a je puno manje invazivna metoda nego biopsija mozga koja se prije smatrala zlatnim standardom za dijagnozu mnogih infekcija središnjeg živčanog sustava HSV-om. Iako se koriste i kvalitativne metode, preporučeno je korištenje kvantitativnog PCR i RT-PCR.

U molekularnoj dijagnostici infekcija s HSV-1/2 primjenjuju se PCR testovi u stvarnom vremenu (14). Također, to je metoda izbora za HSV encefalitisa.

Enterovirusi detektiraju se RT-PCR-om koji omogućuje brzu dijagnostiku za razliku od kultivacije za koju bi bilo potrebno 4 do 8 dana. PCR za enteroviruse visoko je osjetljiv i specifičan te ima veliku prednost nad standardnim mikrobiološkim metodama dijagnostike

Osim običnih PCR napredaka, u zadnje vrijeme radi se na razvijanju Multiplex PCR-a koji će biti u mogućnosti iz jednog uzorka CSL-a napraviti test na više uzročnika virusnog encefalitisa. Za sada su razvijeni multiplex PCR za herpesviruse s enterovirusima s obzirom da su za obje vrste uzročnika zlatnim standardom za dijagnostiku proglasili upravo PCR.

Arbovirusi su još u redu čekanja za razvoj molekularnih metoda specifičnih za njih u sklopu dijagnoze infekcija središnjeg živčanog sustava. Za njih se za sada koristi mjerenje intratekalne sinteze virusno-specifičnih IgM protutijela (13).

### **9.2. Liječenje encefalitisa**

Antivirusno liječenje, ukoliko je moguće, treba započeti što prije. Uspješnost u liječenju pokazao je aciklovir u liječenju encefalitisa uzrokovanog HSV i VZV-om. Uz to sve potrebna je potporna terapija koja uključuje liječenje vrućice, dehidracije, poremećaja elektrolita i konvulzija(12).



## 10. APSCES MOZGA

Intrakranijalni apscesi su rijetke, ozbiljne infekcije opasne po život (19). Oni uključuju apsces mozga i subduralni ili ekstraduralni empijem. Apsces može nastati direktnim širenja kranijalne infekcije ili hematogenim širenjem. Izravno širenje sa zaraznog mjesta obično uzrokuje jedan apsces, a bakterije se mogu proširiti od dentalne infekcije, osteomijelitisa, sinusitisa i sl. Hematogeno širenje je povezano s bakterijemijom i obično uzrokuje više apscesa lociranih oko srednje cerebralne arterije. Najčešći uzročnici apscesa mozga (AM) su bakterije; tako gotovo svaka bakterija patogena za čovjeka može prouzročiti AM (1). Ipak, uzročnici se razlikuju po dobi pacijenta, lokalizaciji, patogenezu te imunosnom statusu bolesnika. U odraslih česti su uzročnici aerobni, mikroaerofilni i anaerobni streptokoki. Stafilokoki su čest uzročnik nakon traume glave, neurokirurške operacije ili endokarditisa (15).

### 10.1. Dijagnostika apscesa mozga

Simptomi moždanog apscesa u početku su nespecifični zbog čega dolazi do odgode dijagnoze (19). Najčešći simptomi su vrućica, česta glavobolja, zbunjenost, mučnina, povraćanje i sl. Laboratorijski, hematološki i biokemijski nalazi od male su pomoći pri dijagnozi, a lumbalna punkcija se smatra nepotrebnom zbog opasnosti od posljedičnog uklještenja mozga i moždane smrti. Suvremena dijagnostika moždanih apscesa temelji se na računalnoj tomografiji (CT) s kontrastom ili magnetskoj rezonanci (MR) kojoj se više daje prednost.

S obzirom da moždani apsces uzrokuje više bakterija odjednom, standardne mikrobiološke metode često nisu dovoljne za utvrđivanje svih uzročnika već samo površno nekih koje se uspiju identificirati. Dakle, postoji potreba za metodama otkrivanja cijelog spektra bakterija prisutnih u uzorcima intrakranijalnog apscesa. Metagenomska analiza paralelnim sekvenciranjem bakterijskih gena 16S-rRNA uspješno je primijenjena za otkrivanje sastava mikrobnih zajednica, a čini se pogodna i za molekularnu dijagnozu polimikrobnih infekcija kao što je moždani apsces (16). Uzorci se dobiju neurokirurškom drenažom apscesa.

## 10.2. Liječenje apscesa mozga

Liječenje AM je kombinacija kirurškog liječenja i antimikrobne terapije, no najbitnije je liječenja primarnog mjesta infekcije odakle je sve proizašlo. Kirurško liječenje se danas zamjenjuje manje invazivnom, a jednako učinkovitom serotaksijskom aspiracijom pod kontrolom CT-a ili MR-a. Antimikrobna terapija se primjenjuje ukoliko je apsces lokaliziran na mjestu nedostupnom za kirurški zahvat ili ukoliko postoji više apscesa. Spektar antimikrobnih lijekova treba prilagoditi vrsti uzročnika koje smo ranije identificirali. U svakom slučaju, kombinacija kloksacilina, cefalosporina treće generacije i metronidazola najčešća je inicijalna kombinacija antibiotika kojom se počinje liječenje AM-a (1). Ukoliko je apsces nastao zbog traume kloksacilin se treba zamijeniti vankomicinom. Liječenje se provodi u trajanju od 6 do 8 tjedana te po potrebi produljuje.

## 11. MIJELITIS

Mijelitis je upala kralježničke moždine izazvana infekcijom ili autoimunim odgovorom. Infekcija može zahvatiti cijeli poprečni presjek ili samo neurone u prednjim rogovima. Ukoliko je u pitanju cijeli poprečni presjek, simptomi su simetrična slabost te osjetni ispad ispod razine lezije popraćeno jakim boli s trncima. Ako su zahvaćeni samo neuroni glavni znak upale je asimetrična flacidna slabost inervirane muskulature, refleksi su sniženi ili odsutni uz malo osjetnih znakova. Oštećenje mijelina na obje strane kralježničke moždine zove se transverzalni mijelitis, on može biti prvi znak multiple skleroze. Infekcije koje mogu uzrokovati mijelitis jesu bakterijske, gljivične, parazitarne i virusne.

### 11.1. Dijagnostika mijelitisa

Mijelitis se dijagnosticira na temelju odgovora na pitanja o simptomima, na temelju anamneze, kliničke procjene funkcije živaca te laboratorijskih testova (17). Test koji nam također može prikazati upalni proces kralježničke moždine jest magnetna rezonanca. Lumbalna punkcija nakon analize CSL pokazuje veliki broj leukocita ili proteina imunskog sustava, što može upućivati na upalu. CSL također možemo testirati na uzročnike upale te određene karcinome. Na kraju, izrada krvne slike potvrđuje ili osporava dijagnozu.

Molekularnom dijagnostikom potrebno je učiniti test na najčešće virusne uzročnike, a to su: herpes virusi poput VZV, HSV, CMV, EBV, flavivirusi poput West Nile virusa i Zika virusa, virus gripe, ehovirus, hepatitis B, mumps i rubela.

Osim provedbe PCR-a za otkriće uzročnikom potrebno je kultivirati bakterije te provesti serološke pretrage.

## 12. ZAKLJUČAK

Temeljem pregleda i sažimanja literature pronađene prilikom pretraživanja znanstvenih baza, portala, stručnih knjiga i priručnika, možemo zaključiti kako su se dogodila znatna poboljšanja u polju molekularne dijagnostike za dijagnozu meningitisa i encefalitisa u zadnjih nekoliko godina. Multiplex PCR tako olakšava i ubrzava dijagnozu svojom sposobnošću testiranja na više uzročnika, što nam pomaže kod polimikrobnih infekcija. S obzirom na malu količinu uzorka koja se dobije lumbalnom punkcijom, korištenjem prijašnjih standardnih metoda dijagnostike bilo je potrebno racionalno rasporediti količinu uzorka pri dijagnozi, a s današnjim napretkom PCR reakcija, osobito multiplex PCR-a, ta ista mala količina dovoljna je za detekciju i svu potrebnu identifikaciju patogena ukoliko su prisutni. Metagenomsko istraživanje se sve više koristi u istraživanjima, ali i u slučajevima gdje je nemoguće otkriti patogena već poznatim i validiranim metodama. U skorij budućnosti se očekuje uvođenje NGS metoda kao dijagnostički alat zbog svog brzog razvijanja i nepristranog pristupa, a postoji mogućnost da to jednog dana zamijeni i multiplex PCR. Iako je molekularna dijagnostika veliki dio budućnosti dijagnostike infekcija središnjeg živčanog sustava, i dalje se preporučuje pristup dijagnozi koji se temelji na prikupljanju detaljne anamneze pacijenata, obraćanju pažnje na kliničku prezentaciju te provedbu komplementarnih testova kako bismo bili što sigurniji u rezultate. Dakle, unatoč specifičnosti i osjetljivosti molekularnih metoda, svakako se svaki dobiveni rezultat mora potvrditi i usporediti s kliničkim simptomima, tj. nužna je laboratorijsko-klinička korelacija. U tom pogledu, uloga prvostupnika medicinsko-laboratorijske dijagnostike sve je važnija, jer razvijanjem tehnologije se razvija i kompleksnost testova koji se provode, a za koje su prvostupnici educirani.

## 13. SAŽETAK

**CILJ:** Cilj ovog završnog rada bio je predstaviti molekularne metode dijagnostike infekcija središnjeg živčanog sustava te ih usporediti s standardnim mikrobiološkim metodama. Također, rad prikazuje molekularne metode u sklopu sindromskog pristupa dijagnostici te daje presjek infekcija središnjeg živčanog sustava.

**MATERIJALI I METODE:** Završni rad pisan je pomoću stručne literature dobivene pretraživanjem znanstvenih baza na internetu (PubMed, Cochrane Database of Systematic Reviews, Hrčak, CROSBİ), stručnih udžbenika te priručnika prikladnih tema. Literatura je korištena iz raznih grana medicine i laboratorijske dijagnostike. Pretraga literature dijelom je vođena PRISMA smjernicama.

**REZULTATI:** Molekularna dijagnostika u vidu dijagnostike infekcija središnjeg živčanog sustava sve više izbacuje standardne mikrobiološke metode iz svakodnevne prakse. Svojom visokom osjetljivošću i specifičnošću puno brže detektira patogene, što smanjuje troškove, olakšava liječenje te skraćuje boravak u bolnici. Shodno tome, molekularna dijagnostika danas postaje novi „zlatni standard“ za dijagnostiku različitih zaraznih bolesti, a između ostalog i infekcija središnjeg živčanog sustava. Metode koje se primjenjuju u molekularnoj dijagnostici jesu: tehnike hibridizacije, tehnike amplifikacije signala, tehnike amplifikacija nukleinskih kiselina (kao što je, primjerice, metoda lančane reakcije polimerazom ili PCR) te tehnike sekvenciranja dijelova genoma ili čitavog genoma uzročnika. Dominantno se u dijagnostici infekcija središnjeg živčanog sustava koristi tehnika lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR).

**ZAKLJUČAK:** Standardni PCR, multiplex PCR te metagenomske metode dijagnostike svojom brzinom, specifičnošću i osjetljivošću pomažu ne samo u detekciji patogena već ih možemo koristiti i za praćenje terapije, genotipizaciju, za analizu rezistentnosti mikroorganizama pa čak i za indirektno praćenje kinetike replikacije. Svojim napretkom postaju „zlatni standard“ mikrobiološke dijagnostike te zamjenjuju standardne metode koje su sporije te kod kojih postoji veća šansa za kontaminaciju. Otvorenom suradnjom kliničara i prvostupnika medicinsko-laboratorijske dijagnostike postiže se brža i efikasnija dijagnostika infekcija središnjeg živčanog sustava uz pomoć molekularnih metoda.

**KLJUČNE RIJEČI:** *središnji živčani sustav, infekcija, meningitis, encefalitis, mikrobiologija, dijagnostika, molekularna dijagnostika*

## 14. SUMMARY

### **Molecular diagnostic approaches for central nervous system infections**

**AIM:** The aim of this thesis was to present molecular methods for diagnosing central nervous system infections and to compare them with standard microbiological methods. Also, the thesis presents molecular methods as an inherent part of a syndromic approach to diagnose these infections, and gives a review of central nervous system infections.

**MATERIALS AND METHODS:** The thesis has used studies obtained by searching scientific databases on the Internet (PubMed, Cochrane Database of Systematic Reviews, Hráček, CROSB), professional textbooks and manuals on relevant topics. The literature that has been used covers various branches of medicine and laboratory diagnostics. PRISMA guidelines were partly consulted for the development of search strategy.

**RESULTS:** Molecular diagnostics of the central nervous system infections is increasingly replacing standard microbiological methods from the quotidian practice. With their high sensitivity and specificity, pathogen detection is much faster, which reduces costs, facilitates treatment and shortens hospital stay. Consequently, molecular diagnostics is becoming the new “gold standard” for the diagnosis of various infectious diseases – including central nervous system infections. Methods used in such molecular diagnostic approaches are: hybridization techniques, signal amplification techniques, nucleic acid amplification techniques (such as polymerase chain reaction or PCR) and sequencing techniques of parts of the genome or the entire pathogen genome. The technique of real-time PCR polymerase chain reaction is predominantly used in the diagnosis of central nervous system infections.

**CONCLUSION:** Due to their speed, specificity and sensitivity, standard PCR, multiplex PCR and metagenomic diagnostic methods aid not only in pathogen detection, but can also be used to monitor therapy, for genotyping purposes, to analyze resistance of microorganisms and even to indirectly monitor replication kinetics. The technological progress makes them a “gold standard” of microbiological diagnostics and replaces standard methods that are slower and have a higher chance of contamination. Through the open cooperation of clinicians and bachelors of medical-laboratory diagnostics, faster and more efficient diagnosis of infections of the central nervous system can be achieved with the use of molecular methods.

**KEY WORDS:** *central nervous system, infection, meningitis, encephalitis, microbiology, diagnostics, molecular diagnostics*

**15. LITERATURA**

1. Begovac J i suradnici. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
2. Medical News Today. All about the central nervous system. Dostupno na: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/307076>. Datum pristupa: 08.09.2021
3. He, T., Kaplan, S., Kamboj, M. et al. Laboratory Diagnosis of Central Nervous System Infection. *Curr Infect Dis Rep* 18, 35 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11908-016-0545-6>. Datum pristupa: 08.09.2021.
4. Southwick SF. Infectious Disease: A Clinical Short Course. 4. izd, Gainesville, Florida: McGraw Hill: 2020.
5. ResearchGate [Internet]: Orakpoghenor, Ochuko & Markus, Talatu. Diagnostic Techniques in Molecular Biology -An Overview. *MedRead J Fam Med*. 2020;1(2): 1008.
6. ResearchGate [Internet]: Lu et al. Molecular Techniques in the Diagnosis of Central Nervous System Infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2002. 4(4):339-350.
7. Vetter P., Schibler M., Herrmann J.L., Boutolleau D. Diagnostic challenges of central nervous system infection: extensive multiplex panels versus stepwise guided approach. *Clin Microbiol Infect*. 2019; 26(6): 706-712.
8. Hasan, M.R., Sundararaju, S., Tang, P. i suradnici. A metagenomics-based diagnostic approach for central nervous system infections in hospital acute care setting. *Sci Rep*. 2020; 10: 1-11.
9. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Akutni bakterijski meningitis. Dostupno na adresi: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/meningitis/akutni-bakterijski-meningitis>. Datum pristupa: 16.09.2021.
10. WHO manual. Laboratory Methods for the diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Atlanta: CDC; 2011.
11. StatPearls [Internet]: Cantu RM, M Das J. Viral Meningitis. 2021. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545217/>. Datum pristupa: 13.09.2021.
12. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Encefalitis. Dostupno na adresi: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/infekcije-mozga/encefalitis>. Datum pristupa: 13.09.2021.
13. DeBiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):903-925.

14. Židovec Lepej S. Molekularna dijagnostika infektivnih bolesti. *Paediatr Croat.* 2011; 55 (1): 43-50
15. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Apsces mozga. Dostupno na adresi: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/infekcije-mozga/apsces-mozga>. Datum pristupa: 13.09.2021.
16. Stebner A., Ensser A., Geißdörfer W., Bozhkov Y., Lang R. Molecular diagnosis of polymicrobial brain abscesses with 16S-rDNA-based next-generation sequencing. *Clin Microbiol Rev.* 2021;27(1): 76-82.
17. MayoClinic [Internet]: Transverse myelitis. Dostupno na: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/transverse-myelitis/symptoms-causes/syc-20354726>. Datum pristupa: 13.09.2021.
18. Houlihan CF, Bharucha T, Breuer J. Advances in molecular diagnostic testing for central nervous system infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2019 Jun;32(3):244-250.
19. Medscape [Internet]: Brook I. Brain Abscess. Dostupno na adresi: <https://reference.medscape.com/article/212946-overview>. Datum pristupa: 13.09.2021.



## 16. ŽIVOTOPIS

### **OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Lucija Pavković

**Datum i mjesto rođenja:** 21.10.1999., Požega

**Adresa:** Slavonska 13, 34000 Požega

**Mobitel:** +385994960000

**E-mail:** lpavkovic@mefos.com

### **OBRAZOVANJE:**

2018. – 2021. Medicinski fakultet u Osijeku, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko  
laboratorijska dijagnostika

2014. – 2018. Gimnazija Požega, opća gimnazija

2008. – 2014. Glazbena škola Požega

2006. – 2014. Osnovna škola "Dobriša Cesarić" Požega