

Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku

Mrázová K., Zeman D., Bořecká K., Ženková J., Brož P., Mareš J., Hanzalová J., Král V., Krbková L.

Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP

Česká neurologická společnost ČLS JEP, Sekce klinické neuroimunologie a likvorologie

Česká společnost alergologie a klinické imunologie ČLS JEP

Společnost infekčního lékařství ČLS JEP

1 Úvod

Vyšetření mozkomíšního moku (likvoru) je nepostradatelným diagnostickým nástrojem v péči o pacienty z oboru neurologie, neonatologie, neurochirurgie, infekčního lékařství a dalších. Dobrá mezioborová spolupráce je základem správné indikace vyšetření likvoru, interpretace výsledků a následně též adekvátní terapie.

Cílem dokumentu je snaha o souhrn informací pro laboratoře zabývající se likvorovou diagnostikou a optimalizací preanalytické i vlastní analytické fáze. Z níže uvedených analytických zkoušek se klade důraz na dostupné, pokud možno validované postupy. Pro úplný přehled speciálních vyšetření mozkomíšního moku odkazujeme na zdroje uvedené v seznamu literatury.

Doporučení k vyšetření mozkomíšního moku se týká jak základních statimových (biochemických a cytologických), tak i speciálních analýz, nezahrnuje mikrobiologické vyšetření likvoru. Pracoviště provádějící vyšetření likvoru musí splňovat technické a personální požadavky podle doporučení stanovených odbornými společnostmi a platné legislativy.

Toto doporučení bude revidováno v závislosti na vývoji nových poznatků v oblasti likvorologie a neuroimunologie.

2 Technické a personální požadavky pro laboratoře provádějící cytologicko-biochemickou analýzu likvoru

- Získání osvědčení o odborné způsobilosti k provádění výkonů v neurologické cytologii (cytologii likvoru).
- Platný certifikát pro metody, u kterých je vydáván, popř. osvědčení o účasti v systémech externího hodnocení kvality (EHK) zaměřených na analýzu likvoru.
- Zavedený a fungující systém interního hodnocení kvality (IHK) zaměřeného na analýzu likvoru, včetně výpočtu nejistoty měření u všech analýz, kde je to možné.
- Zavedený systém dvojí kontroly (5 % náhodně vybraných cytologických preparátů podléhá druhému čtení).
- Minimální počet likvorových cytologických analýz 100 za kalendářní rok. Laboratoře s nižším počtem vyšetření by pak měly být metodicky napojeny na laboratoř provádějící likvorologickou diagnostiku

v počtu vyšším než 200 cytologických analýz ročně. Metodickým napojením se rozumí edukace pracovníků nejméně jedenkrát ročně.

3 Spektrum analýz

3.1 Statimové požadavky na laboratoř provádějící vyšetření mozkomíšního moku

3.1.1 Biochemická vyšetření

- Vzhled likvoru.
- Stanovení koncentrace celkové bílkoviny, glukózy a laktátu.
- Spektrofotometrie likvoru.

3.1.2 Cytologická vyšetření

- Stanovení počtu erytrocytů a leukocytů.
- Zhotovení trvalého cytologického preparátu v základním barvení.

Výsledek statim je nutné vydat do 1 hodiny po přijetí materiálu do laboratoře.

3.2 Další doporučená speciální vyšetření likvoru podle typu pracoviště

3.2.1 Biochemie, imunologie

- Stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM a albuminu v séru a likvoru.
- Izoelektrická fokusace se specifickou imunodetekcí oligoklonálních pásů (minimálně ve třídě IgG).
- Detekce likvorey.
- Stanovení diagnostických autoprotilátek v séru a likvoru (např. ANNA-1,2 (Hu,Yo), PCA-1 (Ri), gangliosidy, AQP4, NMDAR).
- Stanovení dalších proteinů v likvoru a séru.

3.2.2 Výpočtové vztahy

- Výpočet kvocientu glukózy (Q_{glu}).
- Výpočet koeficientu energetické bilance (KEB).
- Výpočet kvocientu albuminu (Q_{Alb}).
- Odhad intratékální syntézy imunoglobulinů.
- Odhad intratékální syntézy specifických protilátek ve třídách IgG, IgM.

3.2.3 Cytologie

- Další speciální barvení cytologických preparátů (barvení na lipidy, železo (Fe^{3+}) ...).

4 Preanalytická fáze

4.1 Odběr

- Likvor – standardní zkumavky bez aditiv, nejlépe polypropylenové (polypropylenové zkumavky jsou doporučeny zejména pro vzorky určené ke stanovení β -amyloidu ($A\beta_{1-42}$) a celkového tau proteinu).
- Krev (sérum) – standardní zkumavky bez protisrážlivých prostředků, použití separačních gelů a akcelérátorů srážení je možné.
- Krev na vyšetření glukózy, případně laktátu – zkumavky s protisrážlivým a antiglykolytickým prostředkem (fluorid/EDTA/citrát sodný, EDTA/NaF, heparin lithný/monojodacetát), pokud není možné zajistit do 1 hodiny po odběru oddělení séra (plazmy) od elementů.
- Odběr krve má být proveden cca 30 minut před odběrem likvoru, pro imunochemická vyšetření lze akceptovat interval \pm 48 hodin od odběru mozkomíšního moku.

4.2 Transport

Likvor spolu s krví je vhodné přepravovat v obalech určených výlučně pro transport biologického materiálu a chránících před mrazem, vysokou teplotou, světlem a mechanickými otřesy. Materiál musí být řádně označen a doprovázen správně vyplněnou žádankou.

4.3 Zpracování

- Ke kvantitativnímu a kvalitativnímu cytologickému vyšetření je nutné použít nativní necentrifugovaný likvor maximálně do dvou hodin od odběru.
- K biochemickému vyšetření je možné použít likvor, který je centrifugovaný do dvou hodin od odběru.
- Na spektrofotometrické vyšetření je nutné centrifugovat mozkomíšní mok nejdéle do jedné hodiny po odběru. Není-li vyšetření provedeno ihned, supernatant by měl být skladován v temnu při 4°C.

Protože odběr likvoru zpravidla nelze snadno opakovat, v případě nedodržení preanalytických podmínek je třeba informovat klienta o této skutečnosti a dokumentovat ji na výsledkový list. Nelze-li snadno zajistit nový odběr (např. u likvorů z komorových drenáží), požadovaná vyšetření je nutné z dodaného materiálu přesto provést.

4.4 Skladování

Centrifugovaný likvor a sérum lze skladovat pro dodatečné analýzy (zejména stanovení specifických proteinů):

- při teplotě +4 až +8°C likvor 1 týden;
- při teplotě -20°C likvor i sérum 1 rok, opakovaně nerozmrazovat;
- při teplotě -70°C likvor i sérum >1 rok, opakovaně nerozmrazovat.

5 Analytická fáze

5.1 Doporučené metodické postupy prováděných vyšetření v likvoru

5.1.1 Biochemie, imunologie

- Vzhled likvoru: hodnocení se provádí před a po centrifugaci likvoru.
 - Stanovení koncentrace celkové bílkoviny: benzethonium chlorid nebo pyrogallolová červeň.
 - Stanovení koncentrace glukózy: GOD POD fotometricky nebo GOD elektrochemicky nebo metodou s hexokinázou.
 - Stanovení koncentrace laktátu: LOD POD fotometricky, UV fotometricky nebo LOD elektrochemicky.
 - Spektrofotometrie likvoru: hodnocení absorbance oxyhemoglobinu, bilirubinu, případně methemoglobinu při 350-700 nm.
 - Stanovení koncentrace albuminu: imunonefelometrie nebo imunoturbidimetrie.
 - Stanovení koncentrace IgG: imunonefelometrie nebo imunoturbidimetrie.
 - Stanovení koncentrace IgM, IgA: imunonefelometrie s latexovými částicemi, imunoturbidimetrie s latexovými částicemi, popřípadě ELISA.
 - Izoelektrická fokusace oligoklonálních IgG pásů s imunodetekcí: imunofixace nebo imunoblot.
 - Detekce likvorey: imunonefelometrické stanovení β -trace proteinu (L prostaglandin D syntáza) nebo izoelektrická fokusace s imunodetekcí β 2 transferinu.
 - Stanovení autoprotilátek: nepřímá imunofluorescence, imunoblot, případně immunoanalýza.
 - Stanovení dalších specifických proteinů: immunoanalytické metody s vysokou analytickou citlivostí (LIA, RIA, IRMA, ELISA, imunonefelometrie, imunoturbidimetrie).
- Upozornění: Metody užívané pro stanovení koncentrací v séru i v likvoru (např. stanovení albuminu, imunoglobulinů atd.) by měly být založeny pro oba materiály na stejném principu.*

5.1.2 Výpočtové vztahy

- Kvocient glukózy:

$$Q_{\text{glukóza}} = \frac{\text{glukóza}_{\text{CSF}}}{\text{glukóza}_{\text{Sérum (Plazma)}}}$$

- Koefficient energetické bilance (KEB):

$$KEB = 38 - 18 \cdot \frac{\text{laktát}_{\text{CSF}}}{\text{glukóza}_{\text{CSF}}}$$

- Kvocient albuminu:

$$Q_{\text{Alb}} = \frac{\text{albumin}_{\text{CSF}}}{\text{albumin}_{\text{Sérum}}}$$

- Odhad intratékální produkce imunoglobulinů – např. podle Reibera: graficky odečtem z příslušného diagramu nebo numericky výpočtem z Reiberovy rovnice. Výpočet vychází ze zjištění limitního kvocientu imunoglobulinu Q_{lim} , který vyjadřuje maximální hodnotu kvocientu imunoglobulinu při dané hodnotě kvocientu albuminu očekávanou v nepřítomnosti intratékální syntézy:

$$Q_{\text{lim}} = \frac{a}{b} \cdot \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + b^2} - c$$

Hodnoty albuminu v likvoru a v séru je třeba dosadit ve stejných jednotkách. Hodnoty parametrů a/b, b² a c jsou uvedeny v následující tabulce:

	a/b	b ²	c
IgG	0.93	6.10 ⁻⁶	1.7.10 ⁻³
IgA	0.77	23.10 ⁻⁶	3.1.10 ⁻³
IgM	0.67	120.10 ⁻⁶	7.1.10 ⁻³

Vlastní výpočet intratékální syntézy (v mg/l jako Ig_{loc} nebo v procentech jako intratékální frakce Ig_{IF}) spočívá v porovnání zjištěného kvocientu imunoglobulinu Q_{Ig} s příslušným kvocientem limitním Q_{lim Ig}.

$$Ig_{loc} [mg/l] = (Q_{Ig} - Q_{lim Ig}) \cdot Ig_{sérum} [mg/l]$$

$$Ig_{IF} [\%] = 1 - \left(\frac{Q_{lim Ig}}{Q_{Ig}} \right) \cdot 100$$

neboli $Ig_{IF} [\%] = \left(\frac{Ig_{loc}}{Ig_{CSF}} \right) \cdot 100$

Jednoduchým orientačním vztahem pro odhad intratékální syntézy IgG je tzv. IgG index:

$$IgG \text{ index} = \frac{Q_{IgG}}{Q_{Alb}}$$

Hodnota > 0,7 svědčí pro intratékální syntézu IgG. Byla navržena řada dalších způsobů odhadu intratékální syntézy imunoglobulinů výpočtem; zde uvádíme pouze nejčastěji používané.

Výpočet intratékální syntézy IgG je méně senzitivní než detekce oligoklonálních IgG pásů izoelektrickou fokusací.

Upozornění: Odhad intratékální produkce imunoglobulinů výpočtem je nespolehlivý v případě makroskopické krevní příměsi nebo je-li pacient krátce (< 1 týden) před odběrem vzorku krve a likvoru léčen infuzemi albuminu, imunoglobulinů nebo plazmaferézou. U pacientů mladších 2 let (koncentrace imunoglobulinů v likvoru u dětí je nižší a stoupá s věkem) se mohou naměřené hodnoty imunoglobulinů v likvoru nacházet pod mezí stanovitelnosti dané metody a v tomto případě intratékální produkci imunoglobulinů nepočítáme.

- Odhad intratékální produkce specifických protilátek (IgG, popř. IgM, IgA):

a) při $Q_{Ig} \leq Q_{lim Ig}$ $AI = \frac{Q_{spec.Ig}}{Q_{Ig}}$

b) při $Q_{Ig} > Q_{lim Ig}$ $AI = \frac{Q_{spec.Ig}}{Q_{lim Ig}}$

AI: antibody index (protilátkový index)

Q_{spec.Ig}: poměr koncentrací specifických IgG (popř. IgM, IgA) protilátek v likvoru a séru (koncentrace

specifických protilátek se udávají v arbitrárních jednotkách, tj. Q_{spec.Ig} je bezrozměrný, stejně jako Q_{Ig}). Fyziologicky je hodnota AI blízka 1,0 (specifické protilátky procházejí z krve do likvoru stejně jako ostatní protilátky téže třídy). Hodnoty 1,3 – 1,5 se obvykle považují za hraniční, hodnoty > 1,5 svědčí pro intratékální syntézu. **Protilátkový index nelze počítat, pokud jsou koncentrace specifických protilátek v likvoru a/nebo séru mimo kalibrační rozsah – v takovém případě je nutné analýzu opakovat ve vhodném ředění! Neměřitelně nízké koncentrace specifických protilátek v likvoru svědčí pro nepřítomnost intratékální syntézy těchto protilátek, ale AI v takovém případě nepočítáme!**

5.1.3 Cytologie

- **Kvantitativní cytologické zhodnocení:** ve Fuchsově-Rosenthalově komůrce, počet jaderných elementů po obarvení kyselým fuchsinem, popř. jiným barvivem zdůrazňujícím jaderné elementy (toluidinová modř) a počet erytrocytů bez obarvení.
- **Kvalitativní cytologické zhodnocení:** cytologický preparát, základní barvení podle Papanheima (May-Grünwald, Giemsa-Romanowski) nebo podle Papanicolaoua, cytologický preparát k průkazu lipidů, cytologický preparát k průkazu trojmocného železa (Fe³⁺), popř. další speciální barvicí techniky.

5.1.4 Analytické požadavky

- Přehled přípustných relativních odchylek od vztažných hodnot D_{max} a přehled kombinovaných rozšířených nejistot při EHK SEKK jsou průběžně aktualizovány a zveřejňovány na stránkách www.sekk.cz.
- Pro ilustraci uvádíme i odkaz na analytické znaky vybraných metod v likvorologii podle RILIBÁK 2014. www.westgard.com/rilibak.htm.

5.2 Kalibrace

Doporučený kalibrační materiál pro likvorové metody je součástí souprav výrobců, pouze u metody glukóza a laktát je vhodný i běžně používaný sérový kalibrátor.

5.3 Kontrola kvality

5.3.1 Biochemie

- Pro analýzy likvoru se doporučuje kontrolní materiál s likvorovou maticí.
- Účast v systémech externího hodnocení kvality (EHK) zaměřených na analýzu likvoru (například program EHK SEKK, RfB, UK NEQAS, INSTAND,...).

5.3.2 Cytologie

- Druhý odečet 5 % náhodně vybraných preparátů.
- Účast v systémech externího hodnocení kvality (EHK) zaměřených na analýzu likvoru (například program EHK SEKK, RfB, UK NEQAS,...).

6 Seznam zkratk

AI	protilátkový index (antibody index)
ANNA-1, 2 (Hu, Yo)	antineuronální nukleární protilátky typ 1, 2 (antineuronal nuclear antibodies type 1, 2)
AQP4	aquaporin 4
CSF	likvor, mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid)
D_{max}	maximální povolená chyba odvozená z cyklů externího hodnocení kvality
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylendiaminetetraacetic acid)
EHK	externí hodnocení kvality
ELISA	enzymová imunoanalýza založená na imunosorbentech (enzyme-linked immunosorbent assay)
GOD	enzym glukózaoxidáza
IgA	Imunoglobulin třídy A
IgG	Imunoglobulin třídy G
IgIF	intratékální frakce imunoglobulinu (%)
Ig_{loc}	množství imunoglobulinu produkovaného v CNS (mg/l)
IgM	Imunoglobulin třídy M
IHK	interní hodnocení kvality
INSTAND	německá organizace provádějící EHK
IRMA	imunoradiometrická analýza (immunoradiometric assay)
KEB	koeficient energetické bilance
LIA	luminiscenční imunoanalýza (luminiscence immunoassay)
LOD	enzym laktát oxidáza
NaF	natrium fluorid
NMDAR	N-methyl-D-aspartátový receptor
PCA-1	protilátky proti antigenům Purkyňových buněk (Purkinje cell antibodies type 1)
POD	enzym peroxidáza
QAlb	kvocient albuminu
Q_{glu}	kvocient glukózy
Q_{Ig}	kvocient imunoglobulinu
Q_{lim}	limitní kvocient imunoglobulinu
$Q_{spec.Ig}$	kvocient specifických protilátek
RfB	Referenční ústav pro bioanalytiku (Referenzinstitut für Bioanalytik)
RIA	radioimunoanalýza (radioactive immunoassay)
RILIBÄK	Pokyny Německé lékařské asociace k zabezpečení jakosti laboratorních výsledků (Die Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen in der Heilkunde)
SEKK	česká organizace provádějící EHK
UK NEQAS	Národní služba pro vnější posuzování kvality ve Velké Británii (United Kingdom National External Quality Assessment Service)

7 Literatura

1. **Adam, P.** *Cytologie likvoru*. Pardubice: Stapro 1995.
2. **Adam, P., Táborický, L., Sobek, O. et al.** Cerebrospinal Fluid. *Advances in Clinical Chemistry*, 2001, 36, p. 1-62. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Academic Press 2001.
3. **Adam, P., Táborický, L., Sobek, O. et al.** *Proteinologie mozkomíšního moku*. Praha: Medica News Publishers 2002.

4. **Adam, P., Táborický, L., Sobek, O. et al.** *Cytology of Cerebrospinal Fluid*. Praha: Medica News Publishers 2003.
5. **Bořecká, K., Adam, P., Sobek, O. et al.** Coefficient of energy balance: Effective tool for early differential diagnosis of CNS diseases. *BioMed Research International* 2013, article ID 745943, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/745943>.
6. **Comabella, M., Montalban, X.** Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.*, 2014, 13(1), p. 113-26.
7. **Cruickshank, A., Auld, P., Beetham, R. et al.** Revised national guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid haemorrhage. *Ann. Clin. Biochem.*, 2008, 45, p. 238-244.
8. **Deisenhammer, F., Bartos, A., Egg, R. et al.** Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol.*, 2006, 13(9), p. 913-922.
9. **Deisenhammer, F., Bartoš, A., Egg, R. et al.** Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In: *Gilhus, N. E., Basrnes, M. P., Brainin, M. (Eds.) European Handbook of Neurological Management: Volume 1, 2nd Edition*. Blackwell Publishing Ltd. 2011, p. 5-17.
10. **Dujmovic, I., Deisenhammer, F.** Stability of cerebrospinal fluid/serum glucose ratio and cerebrospinal fluid lactate concentrations over 24 h: analysis of repeated measurements. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009, 48(2), p. 209-212.
11. **Dujmovic, I.** Cerebrospinal Fluid and Blood Biomarkers of Neuroaxonal Damage in Multiple Sclerosis. *Mult Scler Int [Internet]*. 2011 May 2 [cited 2014 Mar 13]; 2011. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/msi/2011/767083/abs/>
12. **Felgenhauer, K.** Laboratory Diagnosis of Neurological Diseases. In *Thomas, L. (ed.) Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. Frankfurt/Main : TH-Books Verlagsgesellschaft mbH 1998, p. 1308-1326.
13. **Felgenhauer, K., Reiber, H.** The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin. Invest.*, 70, 1992, p. 28-37.
14. **Glosová, L.** *Cytologický atlas mozkomíšního moku*. Praha: Galén 1998.
15. **Kelbich, P., Hejčl, A., Selke Krulichová, I. et al.** Coefficient of energy balance, a new parameter for basic investigation of the cerebrospinal fluid. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2014, 52(7), p. 1009-17.
16. **Lamers, K. J. B., Wevers, R. A.** Cerebrospinal Fluid Diagnostics: Biochemical and Clinical Aspects. *Klin. Biochem. Metab.*, 1995, 24, 2, p. 63-75.
17. **Lewczuk, P., Beck, G., Esselmann, H. et al.** Effect of Sample Collection Tubes on Cerebrospinal Fluid Concentrations of Tau Proteins and Amyloid β Peptides. *Clin. Chem.*, 2006 Feb 1, 52(2), p. 332 4.
18. **Mantur, M., Łukaszewicz-Zajac, M., Mroczko, B., Kułakowska, A. et al.** Cerebrospinal fluid leakage – Reliable diagnostic methods. *Clin. Chim. Acta*, 2011, 12, 412(11-12), p. 837-40.
19. **Masopust, J.** *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Praha: Karolinum 1998, p. 667-690.
20. **Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B. et al.** Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.*, 2011, 69(2), p. 292-302.
21. **Racek, J. et al.** *Klinická biochemie. 2. vydání*, Praha, Galén 2006, 269-278.

22. **Reiber, H., Peter, J. B.** Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol. Sci.*, 2001, 184, p. 101-122.
23. **Reiber, H., Lange, P.** Quantification of virus specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin. Chem.*, 37, 1991, p. 1153-1160.
24. **Sobek, O., Adam, P., Koudelková, M.** Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení Sekce neuroimunologie a likvorologie České neurologické společnosti JEP. *Cesk. Slov. Neurol. N.*, 2012, 75/108 (2), p. 159-163.
25. **Steele, R. W., Marmer, D. J., O'Brien, M. D. et al.** Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.*, 1986, 23(5), p. 965-6.
26. **Teunissen, C. E., Petzold, A., Bennett, J. L. et al.** A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*. 2009 Dec 1, 73(22), p. 1914-22.
27. **Vanderstichele, H., Bibl, M., Engelborghs, S. et al.** Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement.*, 2012, 8(1), p. 65-73.
28. **Wick, M. (Ed.).** *Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie*, 3. vydání, 2014, dostupné na: www.dgln.de (sekce Empfehlungen – Methodenkatalog)
29. **Wright, B. L. C., Lai, J. T. F., Sinclair, A. J.** Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J Neurol.*, 2012, 259(8), p. 1530-45.
30. **Zima, T. et al.** *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén 2013 (3. vydání), p. 463-495.
- Definitivní verze č. 2 po schválení zainteresovanými odbornými společnostmi je platná od 24. 11. 2016

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Kateřina Mrázová

ULBLD VFN a 1. LF UK

U Nemocnice 2

128 08 Praha 2

tel.: 224 962 898

e-mail: Katerina.Mrazova@vfn.cz