

# Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku

Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP (ČSKB)

Referenční laboratoř MZ pro klinickou biochemii (RL)

Sekce pro neuroimunologii a likvorologii

České neurologické společnosti ČLS JEP

Sekce laboratorní imunologie České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii ČLS JEP (ČSAKI)

*Definitivní verze z prosince 2005 po schválení zainteresovanými odbornými společnostmi je platná od 19. 4. 2006*

Toto doporučení je zdrojem informací pro laboratoře zabývající se likvorovou diagnostikou. Cílem dokumentu je snaha o optimalizaci preanalytické i vlastní analytické fáze. Z níže uvedených analytických zkoušek se klade důraz na dostupné, pokud možno validované postupy. Toto doporučení bude revidováno v závislosti na vývoji nových poznatků v oblasti likvorologie a neuroimunologie.

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

## Technické a personální požadavky:

1. Získání certifikátu od České společnosti pro klinickou cytologii k provádění cytologických vyšetření likvoru.
2. Platné osvědčení o účasti v systémech externího hodnocení kvality (EHK) zaměřené na analýzu likvoru (s ohledem na dokument „Certifikace“, schváleného odbornými společnostmi pro příslušný kalendářní rok).
3. Minimální počet likvorových analýz by měl být 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 analýz ročně. Metodickým napojením se rozumí edukace pracovníků nejméně 1krát ročně.

*Poznámka:* Předpokladem pro získání certifikátu od České společnosti pro klinickou cytologii k provádění cytologických vyšetření likvoru je úspěšné absolvování zkoušky, při které uchazeč analyzuje cytologické preparáty mozkomíšního moku (appendix 1).

## A) Preanalytická fáze

### Odběr:

- Likvor – standardní zkumavky bez protisrážlivých prostředků.
- Krev – standardní zkumavky bez protisrážlivých prostředků (sérum), použití separačních gelů a akcelérátorů srážení je možné.

- Krev na vyšetření laktátu – zkumavky s protisrážlivým a antiglykolytickým prostředkem (EDTA/NaF, heparin litný/monoiodacetát).
- Odběr krve má být proveden cca 30 minut před odběrem likvoru.

### Zpracování:

- K cytologickému vyšetření a stanovení počtu elementů je nutné použít nativní necentrifugovaný likvor do 3 hodin po odběru.
- K biochemickému vyšetření je možné použít likvor, který je centrifugovaný do 3 hodin po odběru, ale pro spektrofotometrické vyšetření se doporučuje centrifugovat mozkomíšní mok do 1 hodiny po odběru.
- Materiál (tj. likvor po oddělení případné korpuskulární fáze) k následnému speciálnímu vyšetření likvoru je nutné předat specializovanému pracovišti nejpozději do 3 dnů.

### Skladování:

Centrifugovaný likvor a sérum lze skladovat pro dodatečné analýzy (zejména stanovení specifických proteinů):  
< 1 týden při teplotě +4 až +8 °C;  
< 1 rok při teplotě -20 °C, opakovaně nerozmrazovat;  
> 1 rok při teplotě -70 °C, opakovaně nerozmrazovat.

## Laboratoř provádějící vyšetření likvoru musí zajistit provedení těchto analýz statimově:

1. Vzhled likvoru.
2. Stanovení celkové bílkoviny kvantitativně.
3. Stanovení glukózy.
4. Stanovení laktátu.
5. Kvantitativní cytologické zhodnocení.
6. Kvalitativní cytologické zhodnocení.
7. Spektrofotometrie likvoru.

Výsledek **statim** je nutné vydat do 1 hodiny po přijetí materiálu v laboratoři.

## Další doporučená speciální vyšetření likvoru podle typu pracoviště:

8. Stanovení IgG, IgA, IgM a albuminu v séru a likvoru s odhadem intratékální syntézy imunoglobulinů a stanovením funkce hemato-likvorové bariéry.

9. Izoelektrická fokusace se specifickou imunodetekcí oligoklonálních pásů IgG.
10. Detekce likvorey.
11. Cytologické preparáty barvené na lipidy, nukleoly, železo (Fe<sup>3+</sup>).
12. Stanovení dalších proteinů v likvoru a séru.

## B) Analytická fáze

### Doporučené metodické postupy prováděných vyšetření likvoru:

1. Vzhled likvoru: hodnocení se provádí před centrifugací likvoru a po jeho centrifugaci.
2. Stanovení celkové bílkoviny: benzethonium chlorid nebo pyrogallolová červeň.
3. Stanovení albuminu: imunoturbidimetrie nebo imunonefelometrie.
4. Stanovení IgG: imunonefelometrie.
5. Stanovení IgM, IgA: imunonefelometrie s latexovými částicemi.
6. Stanovení dalších specifických proteinů: imunanalytické metody s vysokou analytickou citlivostí (LIA, RIA, IRMA, ELISA, imunonefelometrie atd.).
7. Stanovení glukózy: GOD-POD fotometricky nebo GOD elektrochemicky nebo metodou s hexokinázou.
8. Stanovení laktátu: LOD-POD fotometricky UV fotometricky nebo LOD elektrochemicky.
9. 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.
10. Kvalitativní cytologické zhodnocení: cytologický preparát, základní barvení: podle Pappenheima (May-Grünwald, Giemsa-Romanowski) nebo podle Papanicolaoua.
11. Cytologický preparát k průkazu lipidů, nukleolů, železa (Fe<sup>3+</sup>): speciální barvicí techniky.
12. Spektrofotometrie likvoru: ve viditelném spektru stanovení oxyhemoglobinu, methemoglobinu a bilirubinu s vyloučením hyperbilirubinémie.
13. Odhad intratékální produkce imunoglobulinů podle Reibera: graficky odečtem z příslušného diagramu

nebo numericky výpočtem z Reiberovy rovnice (podrobnosti jsou dostupné na [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz)).

14. Izoelektrická fokusace oligoklonálních IgG pásů s imunodetekcí: imunofixace nebo imunoblot.
15. Detekce likvorey: imunonefelometrické stanovení β-trace proteinu (L-prostaglandin D syntáza) nebo izoelektrická fokusace s imunodetekcí β-2-transferinu nebo β-trace proteinu.

### C) Požadované analytické znaky vybraných metod v likvorologii

#### Analytické vlastnosti

V tabulce 1 jsou uvedeny u vybraných likvorových metod (celková bílkovina, albumin, glukóza, laktát, IgG, IgM a IgA) některé analytické znaky (reprodukovatelnost, bias a toleranční limity) podle doporučení společnosti Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, kterou vede prof. Reiber v Německu (tj. doporučená kritéria kvality podle Rilibäk pro rok 2004, dostupné například na [www.uke.uni-hamburg.de/extern/dgln/qualitaetskontrolle.htm](http://www.uke.uni-hamburg.de/extern/dgln/qualitaetskontrolle.htm)).

#### Kalibrační materiál

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

#### Kontrolní materiál

Doporučený kontrolní materiál uvádí appendix 2.

#### Literatura – viz apendix 3.

Na 1. revizi doporučení pracovali:

Doc. MUDr. Adam Pavel, CSc.

RNDr. Andrýs Ctirad, Ph.D.

RNDr. Friedecký Bedřich, Ph.D.

MUDr. Kalla Karel

RNDr. Ing. Kelbich Petr

RNDr. Král Vlastimil, CSc.

MUDr. Marečková Helena, CSc.

MUDr. Mrázová Kateřina

Ing. Ženková Jana

**Tab. 1** Požadované analytické znaky vybraných metod v likvorologii

Metoda	Celková bílkovina	Albumin	Glukóza	Laktát	IgG	IgM	IgA
CV [%] reprodukovatelnost podle Rilibäk 2004	8,00	8,00	5,00	7,00	7,00	9,00	10,0
Bias [%] podle Rilibäk 2004	8,00	8,00	6,00	7,00	7,00	9,00	10,0
Toleranční limity [%] podle Rilibäk 2004	27,0	27,0	18,0	23,0	24,0	31,0	32,0
Doporučený kalibrační materiál	součástí použitého setu		běžně používaný sérový		součástí použitého setu		
Doporučený kontrolní materiál	speciální likvorový nebo močový		běžně používaný sérový, speciální likvorový, močový (glukóza)		speciální likvorový		

## Apendix 1

### Získání odborné způsobilosti v oblasti cytologie likvoru

Odbornou způsobilost v oblasti cytologie likvoru získává vysokoškolák pracující na pracovištích klinické biochemie ověřením znalostí před komisí jmenovanou katedrou patologie IPVZ.

Obor patologie je garantem morfologických vyšetření. Zkušební komise je tříčlenná.

Uchazeč o ověření znalostí se hlásí na katedru patologie IPVZ. Pokud se sejde alespoň cca 5 uchazečů, stanoví se termín zkoušky tak, aby jej uchazeč měl k dispozici s šestitýdenním předstihem.

Zkouška sestává ze dvou teoretických otázek týkajících se cytologie likvoru, ohodnocením buněk na promítaných obrázcích (dia) a zhodnocením preparátů.

Po úspěšném složení zkoušky obdrží uchazeč od IPVZ osvědčení o odborné způsobilosti v oblasti cytologie likvoru.

## Apendix 2

### Kontrolní materiál

Doporučený kontrolní materiál pro metodu **celková bílkovina, albumin** je likvorový nebo močový, např. BIORAD (Liquichek Spinal Fluid Control, Liquichek Urine Chemistry Control), DADE BEHRING (N/T Protein Control LC), MAS CSF a UrichemTRAK (dodává firma MEDISTA), RANDOX (CSF Control – assayed, Urine Control – assayed), popř. kontrolní materiál dodávaný v soupravách výrobců.

Pro **glukózu** je vhodný běžně používaný sérový kontrolní materiál, kterých je na trhu velký výběr, močový nebo likvorový např. BIORAD (Liquichek Spinal Fluid Control, Liquichek Urine Chemistry Control), MAS CSF a UrichemTRAK (MEDISTA), RANDOX (CSF Control – assayed, Urine Control – assayed) a další.

Pro **laktát** je vhodný též jako pro glukózu běžně používaný sérový kontrolní materiál nebo likvorový, např.

BIORAD (Liquichek Spinal Fluid Control), MAS CSF (MEDISTA), RANDOX (CSF Control – assayed).

Pro likvorové metody **IgG, IgM a IgA** je doporučován kontrolní likvorový materiál výrobců souprav např. DADE BEHRING (N/T Protein Control LC) nebo dalších firem dodávajících likvorovou kontrolu kvality např. BIORAD (Liquichek Spinal Fluid Control), MAS CSF (MEDISTA), RANDOX (CSF Control – assayed).

## Apendix 3

### Literatura

1. Adam, P. *Cytologie likvoru*. Pardubice : Stapro 1995.
2. Lamers, K. J. B., Wevers, R. A. Cerebrospinal Fluid Diagnostics: Biochemical and Clinical 3. Aspects. *Klin. Biochem. Metab.*, 1995, 24, 2, s. 63–75.
3. 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, s. 1308–1326.
4. Masopust, J. *Klinická biochemie*. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření. Praha : Karolinum 1998, s. 667–690.
5. Glosová, L. *Cytologický atlas mozkomíšního moku*. Praha : Galén 1998.
6. Adam, P., Táborský, L., Sobek, O., Hildebrandt, T., Kelbich, P., Průcha, M., Hyánek, J. Cerebrospinal Fluid. *Advances in Clinical Chemistry*, 2001, 36, p. 1–62. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Academic Press 2001.
7. Adam, P., Táborský, L., Sobek, O., Kelbich, P., Průcha, M. *Proteinologie mozkomíšního moku*. Praha : Medica News Publishers 2002.
8. Zima, T. et al. *Laboratorní diagnostika*. Praha : Galén 2002, s. 363–388.
9. Adam, P., Táborský, L., Sobek, O., Kelbich, P. *Cytology of Cerebrospinal Fluid*. Praha : Medica News Publishers 2003.
10. Racek, J. et al. *Klinická biochemie*. 2. vydání, Praha : Galén a Karolinum 2006.