

Priporočeni postopki za osnovne laboratorijske preiskave likvorja

Jasha Modrica KOBE
Živa FLISAR



SLOVENSKÝ ZDRAVSTVENSKE
GYAKLÉN LONDO KEMÉHÍA

ISBN 961-91132-2-5



Ta priporočila izdaja in priporoča Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK), po priporočilih Mednarodnega združenja za klinično kemijo (IFCC-International Federation of Clinical Chemistry), Ameriškega nacionalnega komiteja za klinične laboratorijske standarde (NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards) in Razširjenega strokovnega kolegija za laboratorijsko diagnostiko pri Ministrstvu za zdravje RS Slovenije.

Uredniški odbor: Nadja Plazar (predsednik),
Matilda Korman – Frangeš,
Pika Meško – Brguljan,
Barbara Možina,

PRIPOROČENI POSTOPKI ZA OSNOVNE LABORATORIJSKE PREISKAVE LIKVORJA

Pripravili: Jasna Modrica KOBE
Živa FLISAR

Recenzent: Lukač Bajalo

Lektor: Blanka Husu

Namen priprave priporočenih postopkov za delo v klinično kemijskih laboratorijsih Republike Slovenije je, da z obvezno uporabo le-teh dosežemo, z odgovarjajočo sistemizacijo opreme, pribora in prostora, visoko stopnjo kvalitete dela.

»Priporočeni postopki za osnovne laboratorijske preiskave likvorja« so namenjeni vsem sodelavcem v klinično kemijskih laboratorijsih, zdravstvenim delavcem ter študentom in učencem zdravstvenih šol.

Po sklepu razširjenega strokovnega kolegija za laboratorijsko diagnostiko pri Ministrstvu za zdravje RS se priporočeni postopki uporabljajo za delo v vseh medicinskih laboratorijsih.

Vsebina

1. UVOD
2. LIKVORSKI VZOREC
 - 2.1. Odvzem likvorja
 - 2.2. Likvorske epruvete in vzorec
 - 2.3. Sočasni odvzem venske krvi
 - 2.4. Pošiljanje likvorskega vzorca v laboratorij
 - 2.5. Priprava vzorca za analize
3. OSNOVNE PREISKAVE LIKVORJA
 - 3.1. Organoleptični pregled
 - 3.2. Štetje in diferenciranje levkocitov
 - 3.3. Štetje eritrocitov
 - 3.4. Določitev koncentracije glukoze
 - 3.5. Določitev koncentracije laktata
 - 3.6. Določitev koncentracije skupnih beljakovin
 - 3.7. Določitev koncentracije albumina
 - 3.8. Določitev koncentracije imunoglobulinov
 - 3.9. Mikrobiološka kultura
 - 3.10. Bakteriološki sediment likvorja
 - 3.11. Hitri test za določitev bakterijskega antiga
 - 3.12. Določitev encimske aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH) in izoencimov
 - 3.13. Določitev encimske aktivnosti nevronspecifične enolaze (NSE) in/ali proteina S100
4. RAZPOZNAVANJE LIKVORJA V NOSNI ALI UŠESNI TEKOČINI
5. LITERATURA

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-074:612.82/.83

KOBE, Jasna modrica
Priporočeni postopki za osnove laboratorijske preiskave
likvorja / Jasna Modrica Kobe, Živa Flisar. - Ljubljana : Slovensko
združenje za klinično kemijo, 2004

ISBN 961-91132-2-5
1. Flisar, Živa
214641408

1. UVOD

žganska (cerebrospinalna) tekočina ali likvor se nahaja v subarahnoidalnem prostoru med možganskima ovojnico maia mater in arahnoidea ter kroži skozi možganske prekate v hrbtenjačo. Ščiti možganovino in hrbtenjačo pred udarci ter sodeluje v presnovi, cirkulaciji in hidrataciji celic osrednjega živčnega sistema. Ob rojstvu je volumen likvora 10 do 60 ml, v odraslem obdobju pa 90 do 150 ml. Likvor neprestano nastaja z ultrafiltracijo in aktivnim izločanjem. Pri odraslem se vsako uro obnovi približno 20 ml možganske tekočine, to je 500 ml dnevno. Epitelij horoidnega možganskega pleksusa (v njem nastane večina možganske tekočine) in endotelij možganskih kapilar tvorita v stiku z možgansko tekočino krvno-možgansko in krvno-likvorsko pregrado, ki prepuščata samo določene snovi. Likvor teče od mesta nastajanja vzdož ventrikularnega in lumbalnega dela. Ob tem se zaradi nenehne resorpcije tekočine povečuje koncentracija beljakovin krvnega izvora.

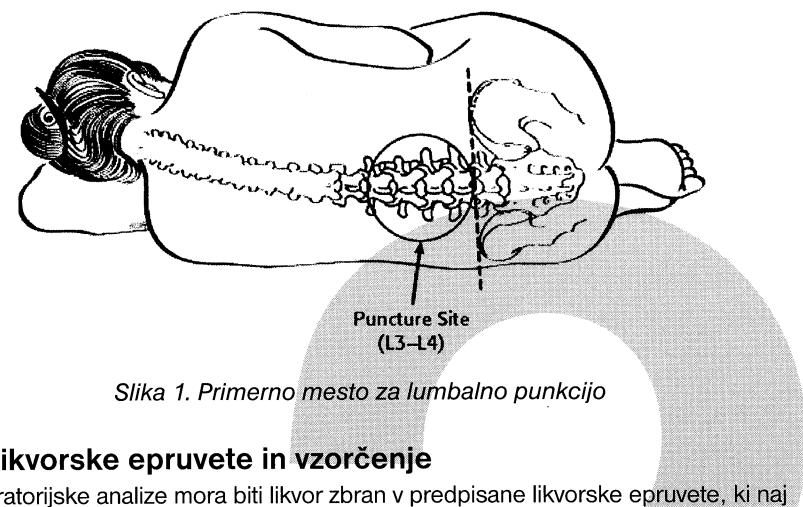
Preiskave likvora so pomembne za hitro diagnostiko bolezni osrednjega živčnega sistema, predvsem za diagnostiko bakterijskih okužb in nevroloških motenj. Pri tem se moramo zavedati, da je likvorski vzorec težko dostopna, enkratna, neponovljiva preiskovalna snov majhne količine. Pravilno vzorčenje v likvorske epruvete, sočasen odvzem krvi, kjer je najmo potrebna primerjava, pravilen in hiter prenos vzorca v laboratorij, izbira zanesljivih analitičnih metod, ki zahtevajo majhno porabo likvora in za mikroskopiranje več strokovnjak, ki pozna likvorsko citologijo in mikrobiologijo, privedejo do pravih rezultatov in prave diagnoze bolezni ter hitrega, ustreznega zdravljenja.

2. LIKVORSKI VZOREC

2.1. Odvzem likvora

Likvorski vzorec odvzame zdravnik, običajno z lumbalno punkcijo, redkeje s subokcipitalno ali z ventrikularno punkcijo. Zdravnik v sterilnih pogojih zabode s tanko iglo v spodnji del hrbtenjačnega kanala, pod točko, v kateri se konča hrbtenjača (med L3 in L4 ali L4 in L5). Preiskovanec ob jemanju vzorca leži ali sedi z usločenim hrbtom. Likvor mora iztekat čim počasneje.

Za mikrobiološke preiskave mora biti likvor odvzet pred začetkom zdravljenja z antibiotiki.



Slika 1. Primerno mesto za lumbalno punkcijo

2.2. Likvorske epruvete in vzorčenje

Za laboratorijske analize mora biti likvor zbran v predpisane likvorske epruvete, ki naj bodo plastične (polipropilenske), prozorne in konične, s pokrovom z navojem. Ob likvorski punkciji je najbolje vzorčiti likvor v tri zaporedne epruvete. Vzorec iz prve epruvete je primeren za biokemične in imunološke analize, iz druge epruvete za mikrobiološke preiskave, iz tretje epruvete za citološke preiskave. Vsaka epruveta mora biti opremljena z imenom in priimkom preiskovanca, datumom in uro likvorske punkcije, vrsto punktata glede na mesto punkcije in zaporedno številko likvorske frakcije.

2.3. Sočasni odvzem venske krvi

Za večino likvorskih preiskav je najmo potrebna primerjava s krvimi analizami (za glukozo, beljakovine), zato potrebujemo tudi serumski vzorec. Venska kri mora biti odvzeta po predpisanim postopku za odvzem venske krvi za biokemične preiskave in največ v treh urah od likvorske punkcije. Najbolje je odvzeti kri eno do dve uri pred likvorsko punkcijo, toliko časa je namreč potrebno, da se vzpostavi ravnotežje med analitično kri in likvorja. V časovnem presledku med odvzemom krvnega in likvorskoga vzorca preiskovanec ne sme dobiti infuzije ali transfuzije.

2.4. Pošiljanje likvorskega vzorca v laboratorij

Likvorski vzorec mora biti dostavljen v laboratorij čim prej po likvorski punkciji. Citološka analiza mora biti narejena najkasneje v eni uri. Hipotoničnost tekočine ter nizka vsebnost beljakovin in maščob, ki pripomorejo k stabilnosti celičnih membran, so vzroki za hitre spremembe likvorskih celic. Število nevtrofilcev se zniža v eni uri za 30 %, v dveh urah za 50 %. Število limfocitov in monocitov ostane nespremenjeno do 3 ure po punkciji. Dve uri po punkciji je hemoliziranih že 40 % eritrocitov in likvor postane ksantokromen. Če likvor stoji, se koncentracija glukoze zmanjšuje, ker jo celice (in bakterije) porablajo, koncentracija laktata pa se povečuje.

Do ene ure po punkciji naj se likvorski vzorec hrani pri sobni temperaturi, do tri ure po punkciji pa v hladilniku. Za mikrobiološko osamitev bakterij hranimo likvor v termostatu (35 - 37 °C), za osamitev virusov pa v hladilniku ali na ledu.

2.5. Priprava vzorca za analize

Običajno dobimo v laboratorij likvorski vzorec samo v eni epruveti. Iz te epruvete ne smemo odviliti vsebine, dokler ne preštejemo in diferenciramo levkocitov oziroma citološko ne ovrednotimo vzorca. Po citološkem pregledu likvor centrifugiramo. Centrifugat, shranjen v hladilniku, je uporaben za večino biokemičnih analiz še en teden. Zamrznjen na - 70 °C je uporaben več mesecev.

3. OSNOVNE PREISKAVE LIKVORJA

Rutinsko opravimo naslednje likvorske preiskave:

1. organoleptični pregled,
2. štetje in diferenciranje levkocitov,
3. štetje eritrocitov,
4. določitev koncentracije skupnih beljakovin,
5. določitev koncentracije glukoze (s sočasno določitvijo v serumu),
6. lahko tudi test za fibrinski derivat D-dimero.
7. Ob sumu o bakterijskem meningitisu razširimo preiskave še na:
8. mikrobiološko kulturo,
9. bakteriološki sediment za prepoznavo bakterijskega povzročitelja bolezni,
10. hitri test za določitev bakterijskega antigena,
11. določitev koncentracije laktata.
12. Po potrebi lahko zdravnik dodatno naroči, da se določijo:
13. koncentracija albumina (s sočasno določitvijo v serumu),
14. koncentracije imunoglobulinov (s sočasno določitvijo v serumu),
15. kvalitativne meritve oligoklonalnih frakcij imunoglobulinov (s sočasno določitvijo v serumu),
16. encimske aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH) in njenih izoenzimov,
17. encimske aktivnosti nevronspecifične enolaze (NSE) in/ali koncentracije proteina S100,
18. asialotransferin (s sočasno določitvijo v serumu).

3.1. Organoleptični pregled

Ko dobimo likvorski vzorec v laboratorij, najprej ocenimo njegov organoleptični videz: bistrost, motnost, eritrokromijo, ksantokromijo, nastanek fibrinske mrežice.

- Likvor je v zdravih fizioloških razmerah brezbarvna bistra tekočina, z izjemo likvorja novorojenčkov, ta je obarvan nežno rumeno.
- Vzroki za motnost likvorja: veliko število levkocitov (več kot $200 \times 10^6/L$) ali bakterij, povečana koncentracija beljakovin ali maščob. Motnost ocenimo z 0 (bister likvor), 1 (opazna motnost v primerjavi z vodo), 2 (motnost dopušča branje besedila skozi epruveto), s 3 (motnost ovira branje besedila skozi epruveto), s 4 (skozi epruveto ne vidimo besedila).
- Rožnato obarvan, eritrokromen likvor, je lahko posledica poškodbe žile ob odvzemuh likvorja ali pa bolezenske krvavitev v možganih (subaraknoidalne, intrakranialne).

V prvem primeru lahko že ob sami punkciji ugotovimo, da ne gre za bolezensko krvavitev, ker izteka neenakomerno krvav likvor, na začetku je bolj krvav kot potem. Če likvor nekaj časa stoji pri sobni temperaturi, se pojavi na dnu epruvete krvni strdek. Po centrifugirjanju je centrifugat običajno bister. Presejalni test z urinskim trakom za hemoglobin je v centrifugatu negativen.

Ob bolezenski eritrokromiji je likvor v vseh frakcijah enakomerno krvav. Če pri sobni temperaturi stoji dalj časa, se na dnu epruvete ne pojavi krvni strdek. Po centrifugirjanju je centrifugat obarvan rožnato do rumeno (ksantokromen).

Presejalni test z urinskim trakom za hemoglobin je v centrifugatu pozitiven.

Eritrokromijo opazujemo pred belim ozadjem in jo ocenjujemo z 0 (likvor je brezbarven), 1 (likvor je rožnat), 2 (likvor je oranžen), s 3 (likvor je rumen ali rjav).

Do $30 \times 10^6/\text{L}$ eritrocitov v likvorju z očesom še ne zaznamo spremembe barve.

Ne moremo razlikovati sveže možganske krvavitve od krvavitve zaradi poškodbe žile ob likvorski punkciji, vendar je v eritrokromnem likvorju, ki je posledica možganske krvavitve, test za fibrinski derivat D-dimero pozitiven. Za določitev D-dimere uporabimo imunokemijski aglutinacijski test z delci lateksa.

- Če likvor centrifugiramo in je centrifugat obarvan rožnato ali rumeno, je likvor ksantokromen. Ksantokromijo ocenjujemo z 0 (centrifugat je brezbarven) ali 1 (centrifugat je rožnat ali rumen). Ksantokromijo povzročijo:

- oksihemoglobin iz razpadnih eritrocitov;
- bilirubin, ker se po 12 do 24 urah oksihemoglobin razgradi ali ker je koncentracija direktnega bilirubina v krvi povečana ($> 160 \mu\text{mol}/\text{L}$) ali ker je motena prepustnost krvno-likvorske bariere;
- visoka koncentracija proteinov ($> 1,50 \text{ g}/\text{L}$);
- povečana koncentracija karotenov v krvi;
- melanin v likvorju pri melanosarkomu možganskih ovojnici.

Spektrometrična določitev ksantokromije je mnogo bolj občutljiva in specifična kot določitev z očesom. Posnamemo absorpciojsko krivuljo centrifugata ksantokromnega likvora v območju značilnih valovnih dolžin od 350 nm do 600 nm za oksihemoglobin, methemoglobin in bilirubin.

Oksihemoglobin ima značilno krivuljo s poudarjenim absorpciojskim vrhom pri valovni dolžini 415 nm ter z dvema manjšima vrhovoma pri 540 nm in 575 nm. Svoj najvišji absorpciojski vrh doseže 24 do 36 ur po krvavitvi, iz likvorja pa izgine čez pet do deset dni.

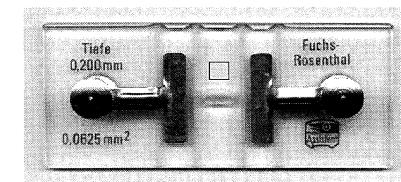
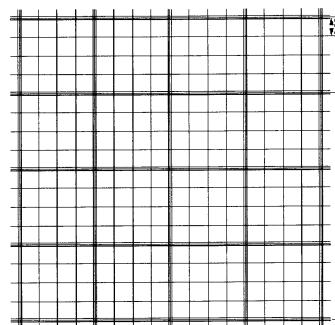
Methemoglobin ima podobno krivuljo, le da je vrh pri 540 nm nekoliko višji od vrha pri 575 nm.

Bilirubin ima značilno krivuljo z razpotegnjениm absorpciojskim vrhom pri 460 nm. V likvorju se pojavi 12 do 24 ur po krvavitvi, doseže svoj najvišji vrh dva do štiri dni po krvavitvi in izgine iz likvorja po dveh do štirih tednih.

- Ob zvišani koncentraciji fibrinogena v likvorju se po določenem času (po 12 do 24 urah pri sobni temperaturi) pojavi fibrinska mrežica. Fibrinska mrežica se pogosto pojavi pri tuberkuloznem meningitisu, zato pripravimo iz nje bakteriološki preparat in ga nato barvamo po Ziehl-Neelsenu ali z avraminom ter iščemo bacile tuberkuloze.

3.2. Štetje in diferenciranje levkocitov

Likvorske celice moramo prešteti in diferencirati čim prej, najkasneje v eni uri po likvorski punkciji. Likvorske levkocite vitalno obarvamo s kislo raztopino fenolnega fuksina po Deemeju (zmešamo 10 delov likvora in 1 del raztopine fenolnega fuksina, to pomeni razredčitev likvora 10/11) ter jih preštejemo v Fuchs-Rosenthalovi komori (v 16 kvadratih površine 1,6 mm, ob globini komore 0,2 mm) z mikroskopom povečave 200- do 400-krat). Če uporabimo nativni, neobarvni likvor, moramo za štetje uporabiti fazni mikroskop. Rezultat dobimo tako, da prešteto število levkocitov delimo s 3 in ga izrazimo s celim številom v $10^6/\text{L}$. Ob zelo visokem številu levkocitov likvor razredčimo s fiziološko raztopino in v izračunu števila levkocitov upoštevamo razredčitev.

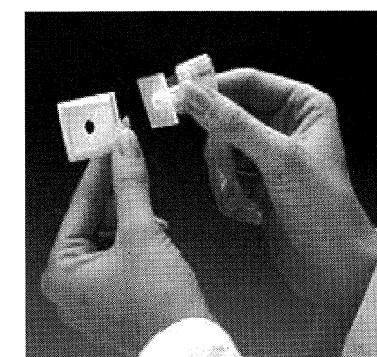


Slika 2. Fuchs-Rosenthalova mrežica in komora

Levkocite lahko v komori tudi ločimo na monojetrne in polimorfonuklearne celice, vendar je za to potrebna velika izkušenost pri mikroskopiranju. Rezultat zapišemo s celim številom v $10^6/\text{L}$. Dobljeno število vsake vrste levkocitov delimo s 3 in kot rezultat uporabimo približek najbližjemu celemu številu. (Primer: dobili smo 16 levkocitov, in sicer 2 neutrofilna granulocita, 10 limfocitov, 4 monocite. Rezultat zapišemo: $5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov oziroma $1 \times 10^6/\text{L}$ neutrofilnih granulocitov, $3 \times 10^6/\text{L}$ limfocitov, $1 \times 10^6/\text{L}$ monocitov.)

Če celice v komori težko prepoznamo ali če so spremenjene ali netipične, pripravimo citološki sediment s pomočjo citocentrifuge ali s postopkom spontanega sesedanja celic na objektno steklo.

- Citocentrifuga je posebne vrste centrifuga, ki z nizko centrifugalno močjo (40–80 x g) omogoči pospešeno kopiranje celic na majhni površini objektnega stekla, pri tem ostanejo celice nepoškodovane. Ob kivetu, ki ima odprtino zgoraj in ob strani, vstavimo filtrirni papir s stranski odprtini prilegajočo se luknjico in objektno steklo z luknjici prilegajočim se označenim delom površine. V zgornjo odprtino kivete s pipeto vnesemo približno 0,5 ml dobro premešanega likvora in centrifugiramo 10 minut. Celice se kopijo na označeni površini objektnega stekla, filtrirni papir pa vsrkva odvečno tekočino. Tako pripravljen sediment pustimo, da se posuši na zraku.



Slika 3. Notranjost citocentrifuge, kiveta in objektno steklo

- Če nimamo citocentrifuge, označimo na objektnem steklu majhen del površine (velikosti najmanjšega kovanca), nanjo kanemo približno 0,5 ml dobro premešanega likvorja in pustimo najmanj 2 uri v blažni komori, da se celice same od sebe sesedejo. Odvečno tekočino previdno odstranimo s filtrirnim papirjem in počakamo, da se sediment posuši na zraku.

Citološke pripravke barvamo po Pappenheimu (po May-Grünwald-Giemsi), tako kot krvne slike, in diferenciramo levkocite na njihove vrste oz. prepoznamo in ovrednotimo druge prisotne celice. Diferenciramo čim večje število levkocitov. Rezultat diferenciacije levkocitov izrazimo z absolutnim številom v $10^6/L$, druge celice pa opišemo.

Likvorski *limfociti* so podobni krvnim in so večinoma (75–95 %) T-limfociti. Mogoči so tudi reaktivni limfociti in jih utegnemo zamenjamo z limfoblasti. Tudi pri novorojenčkih so limfociti zelo podobni blastom, saj imajo bazofilno citoplazmo, nežen jednini kromatin in v jedru nukleole. Limfocitna pleocitoza je značilna za virusne okužbe mening.

Prisotnost *plazmatk* v likvorju nakazuje akutno virusno obolenje ali pa kronično bolezni, npr. tuberkulozo, sarkoidozo, multiplo sklerozu.

Likvorski *monociti* so podobni krvnim, večinoma pa so že razviti do makrofagov. So najbolj raznovrstni po videzu in po obliki. V Fuchs-Rosenthalovi komori je težko razlikovati monocite od limfocitov, posebno pri novorojenčkih. V citološkem sedimentu, dobljenem s citocentrifugiranjem, se monociti velikokrat združujejo v skupine in so zato podobni ependimskim celicam ali pa jih lahko zamenjamo z malignimi celicami. Monocitna pleocitoza pogosto spremišja multiplo sklerozu in sindrom Guillain-Barré.

Pojav *nevtrofilnih granulocitov* v likvorju je značilen za bakterijski meningitis, lahko prevladujejo tudi pri glivičnem meningitisu ali v zgodnji fazi tuberkulognega meningitisa. Nevtrofilni granulociti se pojavijo tudi ob možganskem abscesu, subduralnem empiemu, možganskem infarktu, travmatski poškodbi glave, pri tumorju z metastazami, pa tudi po spinalni anesteziji ali po mielografiji.

Eozinofilni granulociti so v likvorju prisotni pri nekaterih parazitskih (pri cisticerkozi, Toxocari cati) ali glivičnih okužbah, pri akutnem polinevritisu in idiopatskem eozinofilnem meningitisu.

Bazofilni granulociti so v likvorju redki.

V likvorju lahko najdemo tudi *maligne celice*, ki izvirajo ali iz možganskih tumorjev ali pa so metastatske celice.

V likvorju odraslih oseb je običajno prisotnih največ $5 \times 10^6/L$ levkocitov. Pri otrocih, mlajših od enega leta, je v likvorju navadno do $30 \times 10^6/L$, v obdobju od prvega do četrtega leta do $20 \times 10^6/L$ in v starosti od štirih let do pubertete do $10 \times 10^6/L$ levkocitov. Običajno so v likvorju samo limfociti (60 ± 20 %) in monociti (30 ± 15 %), lahko tudi posamični nevtrofilni granulociti (2 ± 4 %).

Če ponovimo likvorsko punkcijo v 8 do 12 urah po prvi punkciji, lahko dobimo povišano število nevtrofilnih granulocitov in monocitov (makrofagov) zaradi prve punkcije.

Če se ob likvorski punkciji poškoduje krvna žila, se pojavi v likvorju krvni in likvorski levkociti. Približno število likvorskih levkocitov ocenimo tako, da od števila preštetih levkocitov odštejemo $1 \times 10^6/L$ levkocitov za vsakih $1000 \times 10^6/L$ eritrocitov.

3.3. Štetje eritrocitov

Eritrocite štejemo v Fuchs-Rosenthalovi komori v nativnem likvorju pri 200-kratni povečavi mikroskopa, na enak način kot levkocite. Rezultat izrazimo s številom eritrocitov v $10^6/L$. Če je likvor močno krvav, eritrocitov ne moremo prešteti.

3.4. Določitev koncentracije glukoze

Glukoza je osnovni energijski vir za možganske celice. Koncentracija glukoze v likvorju je odvisna od koncentracije glukoze v krvi in znaša v vzorcu lumbalne punkcije v običajnih fizioloških razmerah dve tretjini (60–80 %) koncentracije krvne glukoze. To razmerje se z naraščanjem koncentracije glukoze v krvi zmanjšuje in koncentracija glukoze v likvorju nikoli ne preseže $16,7 \text{ mmol/L}$. Vedno moramo primerjalno določiti tudi koncentracijo krvne glukoze.

Zelo nizke vrednosti glukozne koncentracije v likvorju povzročijo :

- bakterijske okužbe (pri bakterijskem, tuberkuloznem meningitisu),
- visoko število levkocitov (lahko tudi pri virusnem meningitisu),
- visoko število eritrocitov (ob subarahnoidalni krvavitvi),
- tumor mening,
- fiziološka krvna hipoglikemija.

Koncentracijo glukoze v likvorju določimo po istem postopku kot v serumu ali plazmi z eno izmed encimskih metod (z glukozaoksidazno, glukozadehidrogenazno, heksokinazno metodo).

Pri zdravem odraslem človeku je koncentracija glukoze v likvorju med 2,5 in 3,9 mmol/L. Količnik likvor_{glukoza} / serum_{glukoza} < 0,31 nam da skoraj zanesljiv podatek o hipoglikorahiji.

3.5. Določitev koncentracije laktata

Koncentracija laktata v likvorju ni odvisna od njegove koncentracije v krvi, ampak od anaerobne presnove v možganskih celicah. Za določitev koncentracije laktata moramo centrifugirani likvorski vzorec takoj po punkciji stabilizirati z inhibitorjem glikolize (natrijevim fluoridom, kalijevim oksalatom) in ga do analize hraniti v hladilniku ali na ledu.

Koncentracijo laktata v likvorju določimo po istem postopku kot v serumu z encimsko metodo.

Koncentracija D-laktata v likvorju se poveča predvsem zaradi bakterijske ali glivične okužbe v možganih. Glikoliza je pospešena tudi pri možganski hipoksiji in ischemiji (možganskem infarktu, cerebralni arteriosklerozi), ob zvišanem intrakranialnem pritisku (pri tumorjih) in pri otrocih z nekaterimi prirojenimi presnovnimi napakami, ki prizadenejo osrednji živčni sistem (pri pomanjkanju piruvat-dehidrogenaze, mitohondrijski miopatiji, pomanjkanju biotinidaze). V teh primerih je povečana koncentracija L-laktata.

Pri zdravem odraslem človeku je koncentracija laktata v likvorju med 1,2 in 2,1 mmol/L, pri otrocih med 1,1 in 1,8 mmol/L.

3.6. Določitev koncentracije skupnih beljakovin

Koncentracija skupnih beljakovin v lumbalnem likvorju je nižja od 1-odstotne koncentracije v serumu. Večina beljakovin (83 %) pri zdravem človeku prehaja v

likvor iz plazme z difuzijo, ki je odvisna od velikosti beljakovine in njene koncentracije v krvi. Največji delež odpade na albumine. Beljakovine prehajajo v likvor tudi z aktivnim prehajanjem (CRP) iz krvi in iz možganskih nevronov ali celic glije (τ -protein, nevronspeficka enolaza, protein S100). Lahko nastajajo v lokalnih plazmatkah (intratekalna sinteza IgG, IgA, IgM) in lahko se zaradi vpliva lokalnih encimov spremenijo (transferin v asialotransferin).

Povečane koncentracije likvorskih beljakovin so posledica:

- vnetja mening (pri purulentnem, tuberkuloznem meningitisu),
- motene likvorske cirkulacije (pri spinalnem tumorju, encefalitisu, sindromu Guillain–Barré),
- lokalnega nastajanja imunoglobulinov (pri multipli sklerozi, nevroboreliozi, oportunističnih infekcijah, abscesih),
- eritrocitov v likvorju pri možganski krvavitvi ali zaradi nabodene žile ob likvorski punkciji.

Za določanje koncentracije skupnih beljakovin v likvorju so na voljo številne metode:

- motnostne: turbidimetrične ali nefelometrične (z raztopino sulfosalicilne kislina, triklorocetne kislina, z benzenonijevim kloridom);
- kolorimetrične: spektrofotometrične (po Lowryju s Folinovim fenolnim reagentom, po Bradfordu z raztopino Coomassie Brilliant Blue G-250, z modificirano biuretno metodo).

Najpogosteje se uporabljajo turbidimetrične metode, ker so hitre, nezapletene in omogočajo meritve na obstoječih instrumentih. Njihova slabost pa je večja občutljivost za albumine kot za globuline. Natančnejše so kolorimetrične metode, a so zamudnejše. Najboljša je tista metoda, ki je dovolj točna, zahteva majhno količino likvorja in je hitra.

Ob rojstvu je, zaradi nezrelosti krvno-možganske pregrade in upočasnjenega pretoka likvorja, koncentracija beljakovin med 0,30 g/L in 1,40 g/L. Pri približno šestih mesecih starosti doseže koncentracija beljakovin v lumbalnem likvorju vrednosti odraslih zdravih ljudi, te so med 0,15 g/L in 0,45 g/L. Po 40. letu starosti začnejo koncentracije beljakovin v likvorju spet počasi naraščati. Koncentracije beljakovin v cisternalnem ali ventrikularnem likvorskem punktatu so nižje za 15 do 20 % od lumbalnih vrednosti.

Pri poškodbi žile ob likvorski punkciji določimo skupno koncentracijo likvorskih in serumskih beljakovin. Dejansko likvorsko koncentracijo beljakovin ocenimo tako, da (ob bolezensko nespremenjenih serumskih beljakovinah in številu eritrocitov v krvi) odštejemo od izmerjene vrednosti proteinov 0,015 g/L za vsakih 1000×10^6 /L eritrocitov.

3.7. Določitev koncentracije albumina

Kadar želimo oceniti funkcijo krvno-likvorske pregrade ali delež intratekalno sintetiziranih imunoglobulinov ima določanje koncentracije albumina v likvorju večji pomen od določanja koncentracije skupnih beljakovin. Koncentracija albumina v likvorju je dober pokazatelj pretoka likvorske tekočine, saj prehaja ves albumin v likvor iz krvi z difuzijo v horoidnem pleksusu in se nato vzdolž ventrikularnega in lumbalnega dela skoncentrira zaradi reabsorpceje tekočine. Vedno primerjalno analiziramo tudi serumski vzorec. Likvor in serum analiziramo sočasno, na istem analizatorju, z isto metodo in isto umeritveno krivuljo. Kri mora biti odvzeta v treh urah pred likvorskou punkcijo ali po njej.

Koncentracijo albumina v likvorju in serumu določimo nefelometrično z imunokemijsko metodo in izračunamo količnik med obema koncentracijama ($Q_{\text{alb}} = \frac{Lc_{\text{alb}}}{S_{\text{alb}}}$). Zaradi nizkih koncentracij beljakovin v likvorju moramo serum razredčiti do reda velikosti likvorskih koncentracij beljakovin.

Razmerje med likvorskim in serumskim albuminom je spremenjeno pri Guillain–Barré polinevritisu, herpetičnem encefalitisu, tuberkuloznom ali gnojnem meningitisu, nevroboreliozi, možganskem infarktu, virusnem meningitisu in oportunističnih meningoencefalitisih.

Koncentracija albumina v likvorju je običajno nižja od 350 mg/L, vendar brez primerjave s koncentracijo albumina v serumu ni mogoče sklepati o hitrosti pretoka ali nastajanja likvorja, torej o funkciji krvno-likvorske pregrade.

Količnik Qalb je pri odraslih do 40 let največ do $6,5 \times 10^{-3}$, pri starejših od 40 let največ do $8,0 \times 10^{-3}$. Ob rojstvu je količnik $8 - 28 \times 10^{-3}$, nato se hitro znižuje in je v starosti od štirih mesecev do 6 let $0,5 - 3,5 \times 10^{-3}$ in od 7 do 15 let manjši od 5×10^{-3} . Za starost nad 5 let lahko izračunamo referenčno vrednost za Q_{alb} po naslednji formuli: $Q_{\text{alb}} = (4 + \text{starost} / 15) \times 10^{-3}$.

Če referenčne vrednosti Q_{alb} za lumbalni likvor pri odraslem delimo z 2,3, dobimo referenčne vrednosti za ventrikularni likvor, če jih delimo z 1,6, dobimo referenčne vrednosti za cisternalni likvor.

3.8. Določitev koncentracije imunoglobulinov

Likvorski imunoglobulini so pri zdravem človeku poliklonalni in prehajajo v likvor pretežno iz seruma skozi krvno-likvorsko pregrado. Ob bolezenskih pojavih lahko pride do sinteze večjih koncentracij tudi intratekalno. Hkrati z likvorskimi določimo vedno tudi koncentracije serumskih imunoglobulinov. Kri mora biti odvzeta v treh urah pred likvorskou punkcijo ali po njej.

Koncentracije imunoglobulinov se lahko povečajo zaradi:

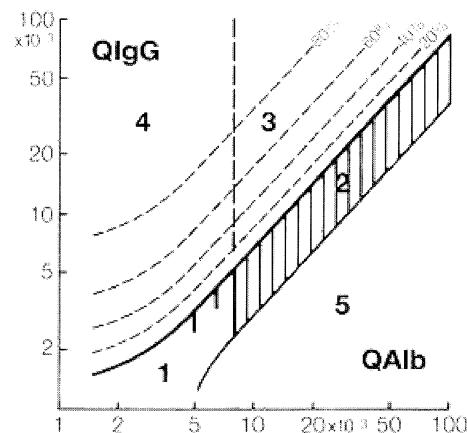
- porasle koncentracije imunoglobulinov v serumu,
- upočasnjenega pretoka likvorja (disfunkcije krvno-likvorske pregrade),
- lokalne sinteze imunoglobulinov v možganih,
- kombinacije naštetih posameznih vzrokov.

Koncentracije imunoglobulinov v likvorju so običajno naslednje: IgG med 17 in 34 mg/L, IgA med 1,2 in 5,0 mg/L ter IgM do 0,7 mg/L; vendar brez primerjave s koncentracijami imunoglobulinov v serumu in brez upoštevanja Qalb ni mogoče pojasniti rezultatov analize.

Koncentracije imunoglobulinov v likvorju in serumu določimo imunokemijsko in izračunamo količnik med obema koncentracijama ($Q_{\text{Ig}} = \frac{Lc_{\text{Ig}}}{S_{\text{Ig}}}$) za vsako vrsto imunoglobulinov posebej.

Razmejitev med serumskimi in intratekalno sintetiziranimi imunoglobulinimi v likvorju dobimo z Reiberjevim grafom (hiperboličnim statističnim matematičnim modelom): na absciso vnesemo količnik $Q_{\text{alb}} = \frac{Lc_{\text{alb}}}{S_{\text{alb}}}$, na ordinato pa količnik $Q_{\text{Ig}} = \frac{Lc_{\text{Ig}}}{S_{\text{Ig}}}$. Kadar so naročene koncentracije vseh treh vrst imunoglobulinov, prikažemo tri grafe: za količnik IgG, IgA in IgM. Preiskave vedno analiziramo v parih: Lc-albumin in S-albumin, Lc-IgG in S-IgG, Lc-IgA in

S-IgA, Lc-IgM in S-IgM, Lc-oligoklonalne frakcije in S-oligoklonalne frakcije. Vsi pari morajo biti analizirani z isto metodo, na istem analizatorju, z isto umeritveno krivuljo, v zaporednih meritvah. Tako se morebitna analitična napaka kaže na obeh vzorcih enako in se pri izračunu količnikov iznīči.



Slika 4. Reiberjev graf – primer za IgG

S črtkano navpičnico je označena referenčna vrednost za Q_{alb} , ustrezna starosti preiskovanca. Položaj pike ustreza koordinatam količnikov Q_{alb} in Q_{IgG} , Q_{IgA} ali Q_{IgM} . Če je pika levo od referenčne vrednosti za Q_{alb} (4 in 1), je funkcija krvno-likvorske pregrade v redu. Položaj pike desno od referenčne vrednosti za Q_{alb} pomeni disfunkcijo krvno-likvorske pregrade (3 in 2). Položaj pike nad zgornjo krivuljo (polno, poudarjeno črto) pomeni opazno intratekalno sintezo ustreznega imunoglobulina (4 in 3). Večji oddaljenosti pike od krivulje ustreza večja intratekalna sinteza imunoglobulinov. Črtkane vzporednice zgornje krivulje označujejo delež intratekalne sinteze v odstotkih. Položaji pike med krivuljama, zgornjo in spodnjo hiperbole (1 in 2), so meje biološko variabilnih običajnih vrednosti brez intratekalne sinteze imunoglobulinov. Pod spodnjo hiperbolico (5) so vrednosti, ki jim ne moremo zaupati, ker so rezultat večjih napak pri delu, na primer nepravilnega odvzema ali zamenjave vzorcev. S številko 1 je označeno polje med hiperbolama levo od referenčne vrednosti za Q_{alb} . Na začetku bolezni lahko pride stičišče koordinat količnikov v ta del diagrama in to pomeni, da gre morda za neznatno intratekalno sintezo imunoglobulina, ki jo lahko potrdimo le z dodatno preiskavo Lc-, S-oligoklonalne frakcije.

Oligoklonalne frakcije imunoglobulinov v likvorju in serumu odkrivamo z metodo imunofiksacije po končanem izoelektričnem fokusirjanju na poliakrilamidnem ali agaroznem gelu. Vsaka frakcija imunoglobulinov v likvorju, ki je ne zaznamo v serumu, pomeni omejeno intratekalno sintezo in bolezensko vrednost.

3.9. Mikrobiološka kultura

Ob sumu o bakterijskem meningitisu pošljemo v laboratorij sterilno odvzet likvorski vzorec za mikrobiološko kulturo. Likvor zasejejo v tioglikolatni bujon, na krvni agar s stafilocokno črto, na čokoladni agar, po potrebi še na agar za rast anaerobnih bakterij. Povzročitelja iščemo tudi v krvi in drugih telesnih tekočinah. Ob pozitivnem rezultatu se določi z antibiogramom tudi občutljivost mikroorganizma za antibiotike. Zelo natančna metoda za dokaz povzročitelja meningitisa, še posebno v diagnostiki virusnih meningitisov, je metoda pomnoževanja nukleinskih kislin s polimerazo (PCR).

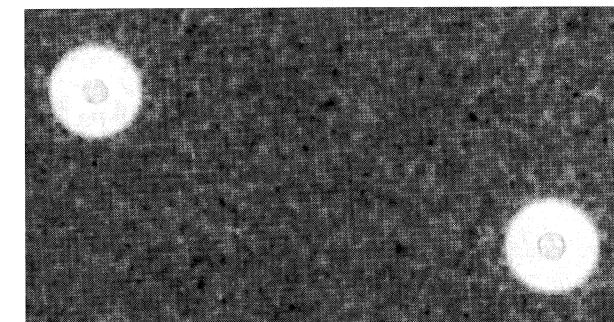
3.10. Bakteriološki sediment likvorja

Gnojni meningitis zahteva hitro prepoznavo povzročitelja in takojšnje antibiotično zdravljenje, zato presejalno iščemo bakterije v obarvanih bakterioloških sedimentih likvorja.

Za pripravo bakteriološkega sedimenta centrifugiramo likvor 20 do 30 minut z veliko centrifugalno močjo in iz sedimenta pripravimo tanek bakteriološki razmaz velikosti najmanjšega kovanca. Fiksiran preparat (fiksacija nad plamenom) barvamo po Gramu. Najpogosteje se uporablja barvanje s kristalvijičnim oksalatom in safraninom ali, za fluorescenco, z akridinoranžnim barvilom. Ob sumu o mikobakterijski okužbi (*Mycobacterium tuberculosis*, acidorezistentnih bacilih) barvamo fiksirani preparat po Ziehl-Neelsenu ali, za fluorescenco, z avraminom. S svetlobnim ali fluorescenčnim mikroskopom z največjo povečavo iščemo v obarvanih bakterioloških razmazih najpogosteje bakterijske povzročitelje meningitisov: *Escherichia coli* (po Gramu negativne bacile), *Streptococcus agalactiae* (po Gramu pozitivne koke v verižicah), *Streptococcus pneumoniae* (po Gramu pozitivne lancetaste diplokokе s kapsulo), *Haemophilus influenzae* (po Gramu negativne polimorfne kokobacile s kapsulo), *Neisseria meningitidis* (po Gramu negativne diplokokе, podobne kavinemu zrnu) in druge.

S tem presejalnim postopkom lahko v pol ure dobimo hiter odgovor o mogočem povzročitelju meningitisa, čeprav pri četrtni bolnikov z akutnim bakterijskim meningitisom ne najdemo bakterij v likvorskem vzorcu. Dokončno diagnozo potrdi osamitev bakterije iz likvorja ali krvi.

Ko sumimo o glivičnem, kriptokoknem (*Cryptococcus neoformans*) meningitisu, primešamo likvorskemu sedimentu kapljico indijskega črnila, prenesemo vzorec na objektno steklo, pokrijemo s krovnim stekлом in mikroskopiramo s 400-kratno povečavo ter iščemo kvasovke z značilno debelo kapsulo



Slika 5. Kriptokoka

3.11. Hitri test za določitev bakterijskega antiga

S hitrim aglutinacijskim testom ali z encimsko-imunske reakcijo lahko določimo specifične bakterijske antigene v likvorju. Z inkubacijo likvorja v vodni kopeli pri 80-100 °C in s centrifugiranjem odstranimo iz likvorja moteče beljakovine. S tovarniško pripravljenimi protitelesi najpogostejših bakterijskih povzročiteljev meningitisa testiramo vzorec likvorskoga centrifugata. Test je specifičen, vendar ima majhno občutljivost, bakterij v likvorju mora biti zelo veliko (10^4 - 10^5), da dobimo pozitivni rezultat.

Test uporabimo kot presejalni test, negativni izvid ne izključuje bakterijske okužbe. Metoda je posebej uporabna takrat, ko je bolnik že dobil antibiotično terapijo in zato v bakteriološkem sedimentu ne najdemo bakterij, pa tudi kultura ostane sterilna.

3.12. Določitev encimske aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH) in izoencimov

Laktat-dehidrogenaza prehaja v likvor skozi krvno-likvorsko pregrado in iz celičnih elementov v likvorju (levkocitov, tumorskih celic, bakterij). Likvorske vrednosti znesejo približno 10 % krvnih vrednosti in se gibljejo med 0,18 in 0,40 µkat/L. Običajna porazdelitev posameznih izoencimov v likvorju je $LDH_1 > LDH_2 > LDH_3, LDH_4 \text{ in } LDH_5$ pa sta komaj zaznavna.

Encimska aktivnost LDH in njenih izoencimov določimo v likvorju z istimi postopki, kot jih uporabljamo za določitev v serumu.

Encimska aktivnost LDH se poveča ob neoplazmah. Močno povečana je pri okužbah mening v osrednjem živčevju. Pri bakterijskih okužbah je zvišana encimska aktivnost izoencimov LDH_4 in LDH_5 , ki prevladujeta v granulocitih ($LDH_5 > LDH_4 > LDH_3 > LDH_2 > LDH_1$), pri virusnih okužbah pa izoencimov LDH_2 in LDH_3 , ki prevladujeta v limfocitih ($LDH_2 > LDH_3 > LDH_1$). Encimska aktivnost LDH se lahko porabi tudi kot pozitiven presejalni test ob sumu o intrakranialni krvavitvi pri novorojenčkih in za oceno obsežnosti možganskega infarkta.

3.13. Določitev encimske aktivnosti nevronspecifične enolaze (NSE) in/ali koncentracije proteina S100

Ob zapletih pri akutnih ishemičnih cerebrovaskularnih boleznih se priporoča določitev in spremljanje encimske aktivnosti nevronspecifične enolaze (NSE) in/ali koncentracije proteina S100 v likvorju (in serumu).

Nevronspecifična enolaza (NSE) je $\gamma\gamma$ -dimer glikolitičnega izoencima enolaze in se nahaja v citoplazmi nevronov. Fiziološke koncentracije so v likvorju in serumu približno enake. V serumu je vsebovana v koncentracijah nižjih od 12,5 µg/L. Podobne koncentracije, ki s fiziološkim staranjem narastejo do največ 16 µg/L, so tudi v likvorju. Iz povečane koncentracije v likvorju in serumu je mogoče ugotoviti obseg možganskega infarkta in postihemičnih poškodb možganskih celic. Povečanje encimske aktivnosti nad 50 µg/L je slaba napoved za bolnika.

V družini proteinov S100 je 17 različnih monomer. Monomeri α - in β -podskupine sta v visokih koncentracijah predvsem v citoplazmi celic glije in se ob celični smrti sproščata, pri tem se koncentracija proteina S100 v likvorju in serumu poveča.

Fiziološke koncentracije v likvorju so pod 0,15 µg/L. Koncentracije, nižje od 20 µg/L, obetajo dober izid cerebrovaskularnega ishemičnega dogodka, koncentracije nad 100 µg/L pa kažejo na slab izid dogodka.

Encimska aktivnost nevronspecifične enolaze in koncentracijo proteina S100 v likvorju in serumu določamo imunokemijsko z uporabo dvojnih protiteles in z luminometrično, encimsko (EIA, ELISA) ali fluorimetrično meritvijo.

4. RAZPOZNAVANJE LIKVORJA V NOSNI ALI UŠESNI TEKOČINI

V primerih, ko po težjih poškodbah glave domnevamo, da je tekočina, ki v majhnih količinah neprestano izteka iz nosu ali ušesa, morda likvor, to ugotovimo tako, da v svežem vzorcu te tekočine določimo asialotransferin (včasih smo ga imenovali tudi τ -protein). Primerjalno analiziramo tudi serum iste osebe, da izključimo morebitno vsebnost genetskih različic transferina.

Likvor in serum analiziramo s postopkom elektroforezne ločbe na agaroznem gelu in določimo asialotransferin z imunoperoksidazno reakcijo.

$T(\tau\tau)$ -protein je star naziv za asialotransferin in je v frakciji prebeta elektroforezno ločenih likvorskih beljakovin. Da ne bi prišlo do pomote moramo vedeti, da ime τ -protein uporabljamo tudi za povsem drugačno beljakovino v možganskem tkivu, ki spada v družino mikrotubulnih beljakovin.

Za razpoznavanje likvorja v nosni tekočini lahko določimo tudi koncentracijo glukoze v preiskovani tekočini. V nosnem izločku je koncentracija glukoze nižja (do 0,6 mmol/L) kot v likvorju (2,5 – 3,9 mmol/L).



5. LITERATURA

1. Kobe JM, Malešić I. Algorithms of cerebrospinal fluid laboratory examinations in infectious diseases. Biochimia Medica 2002; 1-2: 27-34.
2. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) protein based on CSF/serum quotients. Clin Chem 1995; 41/2: 356-63.
3. Reiber H et al. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis international consensus by an internet-based group discussion. Clin Chem Lab Med 2003; 42: 331-7.
4. Felgenhauer K. Laboratory diagnosis of neurological diseases. In: Thomas L. Clinical laboratory diagnostics 5th ed. Frankfurt/Main, TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998: 1308-26.
5. Topić E. Differential diagnosis and prognostic markers of stroke. In: New trends in classification, monitoring and management of neurological diseases/ 3rd FESCC continuous postgraduate course in clinical chemistry. Zagreb, Medicinska naklada, 2003: 9-14.