

Úskalí kvantifikace IgM v likvoru

Zeman D.¹, Kušnierová P.¹, Gottwaldová J.², Kloudová A.³, Lochman I.³, Ženková J.⁴, Švagera Z.¹, Bartoš V.¹, Všianský F.¹

¹Oddělení klinické biochemie, Ústav laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava

²Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Brno-Bohunice

³Oddělení imunologie a alergologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

⁴Ústav klinické biochemie a hematologie, Fakultní nemocnice Plzeň

SOUHRN

Cíl studie: Měření koncentrací albuminu a imunoglobulinů v likvoru a v séru slouží v likvorové diagnostice k výpočtu intrathékální syntézy imunoglobulinů. Předpokládá se, že hodnotu kvocientu, tj. poměru koncentrací daného proteinu v likvoru a v séru, lze považovat za nezávislou na použité metodě, pokud je párový vzorek likvoru a séra analyzován současně na jedné (likvorové) kalibrační křivce. Pozorované diskrepance mezi likvorovými (ale nikoliv sérovými) koncentracemi IgM stanovenými nefelometricky na analyzátoru Immage a home-made sendvičovou ELISA metodou nás vedly k provedení rozsáhlejší studie srovnávající různé metody stanovení IgM v likvoru a séru.

Typ studie: Porovnání výsledků různých metod používaných pro kvantifikaci IgM v likvoru.

Materiál a metody: Byly srovnány výsledky stanovení koncentrací IgM získané na nefelometrech Immage, Immage 800, BN II, BN ProSpec a metodou ELISA. Vedle likvorových a sérových koncentrací byly srovnány i kvocienty likvor/sérum a výsledek výpočtu intrathékální syntézy podle Reiberova vztahu. Výsledky byly vyhodnoceny metodami Passing-Bablokovy regrese a grafu dle Blanda a Altmana s využitím statistického programu MedCalc.

Výsledky: Zjistili jsme výrazné rozdíly v likvorových koncentracích IgM stanovených nefelometricky na analyzátoch Immage oproti nefelometrickému stanovení na analyzátoch řady BN a „home-made“ sendvičové ELISA metodě, které poskytly významně nižší hodnoty. Hodnoty získané ELISA metodou byly v dobré shodě s hodnotami získanými na analyzátoch řady BN. Sérové koncentrace IgM byly poněkud vyšší při použití ELISA metody. Nebyl zjištěn významný rozdíl mezi hodnotami sérových koncentrací a kvocientů likvor/sérum získanými analýzou séra na likvorové versus sérové kalibrační křivce. Hodnoty kvocientu likvor/sérum byly významně vyšší v případech stanovení na analyzátoch Immage oproti hodnotám získaným analýzou na nefelometrech řady BN i ELISA metodou. V důsledku toho byla z dat získaných na analyzátoch Immage vypočtena intrathékální syntéza IgM u 13 ze 71 vzorků, u kterých nebyla zjištěna z dat získaných na analyzátoru BN ProSpec ani ELISA metodou; u 8 z nich bylo možno považovat vypočtenou intrathékální syntézu za klinicky významnou (intrathékální frakce >10 %).

Závěr: Kvocient likvor/sérum je pro IgM jednoznačně závislý na použité metodě stanovení a v některých případech může dojít i k rozdílnému hodnocení přítomnosti intrathékální syntézy IgM. Dokud se nepodaří příčinu tak výrazně odlišných výsledků koncentrace IgM v likvoru objasnit a odstranit, je žádoucí při měření na analyzátoru Immage hodnotit vypočtenou intrathékální syntézu IgM velmi opatrně a v kontextu celého likvorového nálezu. ELISA metoda je finančně nenákladná, vyžaduje minimální množství vzorku a jeví se jako jediná schopná kvantifikovat IgM prakticky v každém vzorku. Její použití v rutinní praxi je však limitováno vyššími nároky na manuální zpracování, jeví se však jako výhodná metoda minimálně pro experimentální studie, např. sledování rozložení likvorových koncentrací IgM v populaci.

Klíčová slova: mozkomíšní mok, IgM, intrathékální syntéza, nefelometrie, ELISA

SUMMARY

Zeman D., Kušnierová P., Gottwaldová J., Kloudová A., Lochman I., Ženková J., Švagera Z., Bartoš V., Všianský F.: Difficulties of IgM quantitation in cerebrospinal fluid

Objective: Quantitation of albumin and immunoglobulins in CSF and serum serves the purpose of calculation of intrathecal immunoglobulin synthesis. Quotient, i.e., concentration ratio of particular protein in CSF and serum, is assumed to be method-independent value, provided that paired CSF and serum sample is analyzed in parallel using one (CSF) calibration curve. We have observed that CSF (but not serum) IgM concentrations determined by nephelometry on Immage analyzer and by home-made sandwich ELISA were largely discrepant. This has lead us to perform a larger study comparing various methods of IgM determination in CSF and serum.

Design: Comparison of various methods used for IgM quantitation in cerebrospinal fluid.

Materials and Methods: Results of IgM determination on nephelometers Immage, Immage 800, BN II, and BN ProSpec, as well as by ELISA method, have been compared. Beside CSF and serum values, CSF/serum quotients and results of calculated intrathecal IgM synthesis according to Reiber's formula have been compared. Results have been evaluated by means of Passing-Bablok regression and Bland and Altman plots, using MedCalc software.

Results: We have found significant differences between CSF IgM concentrations determined by rate nephelometry on Immage analyzers and end-point nephelometry on BN analyzers or ELISA, the latter two giving significantly lower values. CSF IgM concentrations determined by ELISA were in good agreement with those determined on BN analyzers. Serum IgM concentrations were slightly higher using ELISA than using either nephelometric system. We have found no significant difference in either serum IgM or CSF/serum IgM quotient between serum analysis on CSF versus serum calibration curve. IgM quotient values were significantly higher using Immage analyzers than using either BN analyzers or ELISA method. As

a consequence, intrathecal IgM synthesis, based on the Immage data, was calculated in 13 of 71 samples considered negative if data of BN analyzer or ELISA were used; in 8 of these samples, intrathecal IgM synthesis could be considered as clinically significant (intrathecal fraction > 10 %).

Conclusions: CSF/serum IgM quotient is far from to be method-independent; in some cases, discrepant conclusion regarding the presence of intrathecal IgM synthesis can be obtained. Until the cause of this discrepancy is found and removed, the presence of intrathecal IgM synthesis should be judged very carefully and in the context of other CSF findings when using the Immage analyzer for measurement. ELISA method is inexpensive, requires very low amount of the sample, and is the only method able to quantify IgM in almost every CSF sample. Its use in routine practice is, however, limited by higher requirements for manual work. Nevertheless, it should be used at least in experimental studies, i.e. for the purpose of the determination of distribution of CSF IgM concentration within a population.

Keywords: cerebrospinal fluid, IgM, intrathecal synthesis, nephelometry, ELISA

Úvod

Stanovení albuminu a imunoglobulinů v likvoru a v séru lze považovat, spolu s detekcí oligoklonálních IgG pásů, za základní imunochemický panel likvorové diagnostiky. Kvantifikace albuminu a IgG je i v likvoru snadno realizovatelná na většině běžných biochemických analyzátorů; pro kvantifikaci IgA a zejména IgM v likvoru je nutné nefelometrické stanovení s využitím zesílení signálu vazbou protilátek na latexové částice; alternativně lze použít metodu ELISA, která ovšem není komerčně dostupná. Z koncentrací albuminu a imunoglobulinů v likvoru a v séru lze usuzovat na přítomnost intrathékální syntézy imunoglobulinů. Různé likvorové školy preferují různé vztahy; ve střední Evropě je však nejvíce rozšířený výpočet intrathékální syntézy podle Reiberových rovnic [1]. Při jejich použití se vychází z předpokladu, že kvocient – tj. poměr likvorové a sérové koncentrace – je nezávislý na metodě stanovení, ale spoň za předpokladu, že je analyt stanoven paralelně v likvoru i v séru na jedné (a to pochopitelně likvorové) kalibrační křivce [2-5]. Toto doporučení je v našich laboratořích většinou ignorováno, jistě i proto, že analýza „likvorovou“ metodou je nákladnější.

V likvorové laboratoři oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice v Ostravě jsme pro výzkumné účely zavedli ELISA metodu pro stanovení koncentrací IgM v likvoru. Zaujaly nás významně nižší hodnoty získané ELISA metodou oproti hodnotám získaným analýzou na nefelometru Immage. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli koncipovat rozsáhlejší studii srovnávající různé metody kvantifikace IgM v likvoru a v séru.

Materiál a metodika

V 75 náhodně vybraných párových vzorcích likvorů a sér zaslaných k vyšetření na oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice v Ostravě, byly srovnány nejméně dvě metody stanovení IgM. Šlo o následující metody:

1. **Stanovení na analyzátoru Immage** (FN Ostrava, FN Plzeň), resp. Immage 800 (FN Brno-Bohunice) metodou poměrové kinetické nefelometrie. Pracoviště v Ostravě a v Plzni používají pro analýzu sér sérovou kalibrační křivku, pracoviště v Brně stanovuje IgM v párových vzorcích likvorů a sér paralelně na stejné, a to likvorové, kalibrační křivce. Mez stanovitelnosti metodou IGMLC v séru je 64,8 mg/l, v li-

kvoru 0,30 mg/l, CV je 6,0 % (údaje firmy Beckman Coulter Česká republika s.r.o.).

2. **Stanovení na analyzátoru BN ProSpec** (FN Ostrava), resp. BN II (ZÚ Ostrava) metodou end-point nefelometrie. Pracoviště ve FN Ostrava stanovilo sérovou koncentraci IgM jak paralelně s likvorovou koncentrací na likvorové kalibrační křivce, tak za použití běžného stanovení v séru. Pracoviště ZÚ stanovuje koncentraci IgM v séru na sérové kalibrační křivce. Mez detekce metodou N Latex IgM je 0,13 mg/l, CV je 5,3 % (údaje firmy Siemens s.r.o.).
3. **„Home-made“ sendvičová ELISA metoda** (FN Ostrava) s použitím kozích protilátek proti lidskému IgM (AbD Serotec, kat. č. STAR 145 a STAR 145P). Potah destičky, promytí a blokování volných vazebných míst i ředění vzorků bylo provedeno manuálně, další kroky analýzy probíhaly automaticky na přístroji DSX (Dynex). Ke kalibraci byl použit materiál Human Serum Protein Calibrator (DAKO, kat. č. X0908) ředěný na koncentrace od 1,25 do 40 µg/l. Likvory byly analyzovány v ředění 1/20 a 1/200, séra v ředění 1/100000. Jako chromogen byl použit tetramethylbenzidin (TMB one-step substrate system, DAKO, kat. č. S1599). Mez stanovitelnosti byla 1,25 µg/l, detekční limit 0,625 µg/l. Inter-assay variační koeficient stanovený analýzou kontrolních materiálů Liquichek Spinal Fluid Level 1, Liquichek Spinal Fluid Level 2 (BioRad, kat. č. 751 a 752) a Human Serum Protein Low Control (DAKO, kat. č. X0939) se pohyboval mezi 7,8 a 8,4 %; CV pro kvocient CSF/sérum činil 7,2 %.

Výsledky měření byly vyhodnoceny regresí dle Passing-Babloka a rozdílovým grafem dle Blanda a Altmana s využitím statistického programu MedCalc. Rozdíly mezi metodami byly považovány za významné, pokud 95% interval spolehlivosti pro směrnici neobsahoval jedničku a/nebo 95% interval spolehlivosti pro úsek neobsahoval nulu.

Výsledky a diskuse

Hodnoty sérových koncentrací IgM získané nefelometricky na různých přístrojích vykazovaly minimální rozdíly, zatímco sérové koncentrace IgM stanovené metodou ELISA byly oproti nefelometrickému stanovení o 10 – 15 % vyšší. Zato likvorové koncentrace IgM se překvapivě výrazně liší v závislosti na použité metodě stanovení, přičemž hodnoty pro analyzátor Immage

jsou v oblasti fyziologických nebo jen hraničně zvýšených likvorových koncentrací až několikanásobně vyšší ve srovnání s hodnotami získanými stanovením na analyzátoch řady BN nebo metodou ELISA (Tabulka 1, Tabulka 2). Likvorové koncentrace získané ELISA metodou jsou podobné hodnotám získaným na analyzátoch řady BN, přijatelná shoda mezi těmito metodami je i u kvocientu likvor/sérum (ELISA metodou vychází

nepatrně nižší vzhledem k poněkud vyšším sérovým hodnotám naměřeným ELISA metodou).

Zajímavá zjištění naší studie jsou přehledně shrnuta v Tabulce 1a - 1f, Tabulce 2 a na obr. 1a - 1f. Z hlediska likvorové diagnostiky je však nejdůležitějším výstupem provedených měření výpočet intrathékální syntézy IgM. Proto jsme se na výsledky zaměřili i z tohoto úhlu pohledu (Tabulka 3).

Table 1: Comparison of different methods using Passing-Bablok regression

a) BN ProSpec (x)^a vs. Immage (y)^b

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	55	72	55
Regression equation	$y=0.4741 + 1.2865 \cdot x$	$y=-0.0214 + 1.0625 \cdot x$	$y=0.1500 + 1.8569 \cdot x$
95% CI for intercept	0.3502 to 0.5724	-0.0799 to 0.0397	0.0116 to 0.3200
95% CI for slope	1.1550 to 1.5972	1.0077 to 1.1192	1.4150 to 2.2801
Range:	x: 0.15-8.77 mg/l y: 0.48-11.60 mg/l	x: 0.17-2.96 g/l y: 0.17-3.95 g/l	x: 0.076-9.977 y: 0.161-12.889

b) Immage (x)^b vs. Immage 800 (y)^a

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	18	20	18
Regression equation	$y=-0.0069 + 0.9363 \cdot x$	$y=0.0996 + 0.9473 \cdot x$	$y=-0.0035 + 0.9563 \cdot x$
95% CI for intercept	-0.1018 to 0.1268	0.0575 to 0.1445	-0.1231 to 0.1127
95% CI for slope	0.8131 to 1.0379	0.8967 to 1.0068	0.8372 to 1.0858
Range:	x: 0.46-2.27 mg/l y: 0.44-1.96 mg/l	x: 0.17-2.18 g/l y: 0.26-2.26 g/l	x: 0.242-2.204 y: 0.259-2.159

c) BN ProSpec (x)^a vs. BN II (y)^b

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	14	19	14
Regression equation	$y=-0.0111 + 1.0484 \cdot x$	$y=-0.0406 + 1.0843 \cdot x$	$y=0.0014 + 1.0524 \cdot x$
95% CI for intercept	-0.0865 to 0.0694	-0.1581 to 0.0392	-0.0419 to 0.0498
95% CI for slope	0.9063 to 1.3740	0.9828 to 1.1665	0.9111 to 1.1846
Range:	x: 0.15-3.20 mg/l y: 0.15-3.04 mg/l	x: 0.39-2.96 g/l y: 0.39-3.23 g/l	x: 0.076-4.618 y: 0.115-5.429

d) BN ProSpec (x)^a vs. ELISA (y)^a

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	55	72	55
Regression equation	$y=-0.0024 + 1.0203 \cdot x$	$y=-0.0693 + 1.1785 \cdot x$	$y=-0.0144 + 0.9352 \cdot x$
95% CI for intercept	-0.0381 to 0.0232	-0.1332 to 0.0162	-0.0458 to 0.0045
95% CI for slope	0.9531 to 1.0861	1.1077 to 1.2396	0.8805 to 1.0280
Range:	x: 0.15-8.77 mg/l y: 0.15-9.48 mg/l	x: 0.17-2.96 g/l y: 0.16-3.38 g/l	x: 0.076-9.977 y: 0.068-10.689

e) ELISA (x)^a vs. Immage (y)^b

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	73	75	73
Regression equation	$y=0.4445 + 1.3399 \cdot x$	$y=0.0310 + 0.9110 \cdot x$	$y=0.2380 + 1.9086 \cdot x$
95% CI for intercept	0.3068 to 0.4827	-0.0100 to 0.0799	0.0765 to 0.2914
95% CI for slope	1.1752 to 1.5929	0.8704 to 0.9490	1.6119 to 2.5234
Range:	x: 0.03-9.48 mg/l y: 0.33-11.00 mg/l	x: 0.16-3.38 g/l y: 0.17-3.95 g/l	x: 0.035-10.689 y: 0.146-12.889

f) BN ProSpec CSF (x) vs. serum (y) assay for serum IgM and Q (CSF/serum)

	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	38	25
Regression equation	$y=0.0004 + 1.0556 \cdot x$	$y=-0.0010 + 0.9498 \cdot x$
95% CI for intercept	-0.0642 to 0.0737	-0.0398 to 0.0155
95% CI for slope	0.9866 to 1.1155	0.8945 to 1.0557
Range:	x: 0.20-2.96 g/l y: 0.20-3.16 g/l	x: 0.076-4.618 y: 0.072-5.442

^a CSF and serum analyzed together using CSF calibration curve

^b CSF and serum analyzed separately using different calibration curves

Table 2: Results of eight CSF samples analyzed on 3 different Immage analyzers, BN ProSpec analyzer, and by ELISA (concentrations in mg/l)

Sample	Immage1 (FN Ostrava)	Immage2 (FN Plzeň)	Immage 800	BN ProSpec	ELISA
1	0.412	<0.300	<0.300	<0.144	<0.025
2	<0.300	0.323	0.330	<0.144	0.041
3	1.29	0.900	1.20	0.802	0.698
4	0.613	0.520	0.443	<0.144	0.120
5	0.583	0.480	0.523	<0.144	0.294
6	1.58	1.50	1.09	0.716	0.812
7	1.16	1.03	0.695	0.152	0.173
8	0.756	0.740	0.803	0.426	0.362

Table 3: Cases with intrathecal IgM synthesis according to Reiber's formula

Sample	Intrathecal IgM fraction (IgM _{IP}) [%]					
	Immage ^b	Immage 800 ^a	BN ProSpec ^a	BN ProSpec ^b	BN II ^b	ELISA ^a
1	6.49	n.d.	negative	n.d.	n.d.	negative
2	2.26	n.d.	negative	n.d.	n.d.	negative
3	5.37	n.d.	negative	n.d.	n.d.	negative
4	27.22	n.d.	negative	n.d.	n.d.	negative
5	64.49	n.d.	55.27	n.d.	n.d.	50.35
6	58.53	n.d.	46.43	n.d.	n.d.	50.00
7	58.01	n.d.	60.29	n.d.	n.d.	45.89
8	66.91	n.d.	52.27	n.d.	n.d.	55.80
9	46.18	32.45	negative	negative	n.d.	negative
10	74.79	negative	negative	negative	n.d.	negative
11	negative	68.13	negative	negative	n.d.	negative
12	9.49	23.39	negative	negative	n.d.	negative
13	41.24	41.20	negative	negative	n.d.	negative
14	5.20	negative	negative	negative	n.d.	negative
15	35.35	n.d.	negative	negative	negative	negative
16	1.08	n.d.	negative	negative	negative	negative
17	37.41	n.d.	negative	negative	negative	negative

^a CSF and serum analyzed together using CSF calibration curve

^b CSF and serum analyzed separately using different calibration curves

Ve 4 vzorcích byla detekována intrathékální syntéza IgM všemi použitými metodami. Ve třech případech byla detekována při stanovení na analyzátoch Immage a Immage 800, ale nikoliv při stanovení na přístroji BN ProSpec (bez ohledu na to, zda byla sérová koncentrace stanovena na sérové nebo likvorové kalibrační křivce)

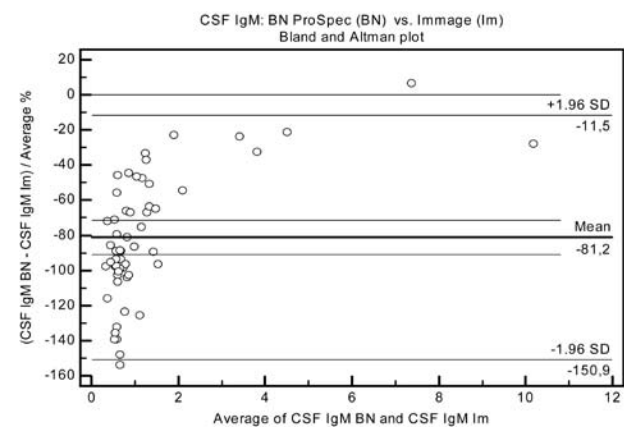
nebo ELISA metodou. V dalších třech případech byla intrathékální syntéza IgM detekována při analýze na jednom ze dvou analyzátorů Immage a nikoliv na druhém; ani v jednom z těchto případů nebyla prokázána dalšími metodami (ELISA, BN ProSpec). Konečně v dalších 7(!) případech byla intrathékální syntéza IgM detekována

pouze při stanovení na analyzátoru Immage a nikoliv při použití ostatních metod (ve 3 z těchto případů byl párový vzorek analyzován i na analyzátoru BN II).

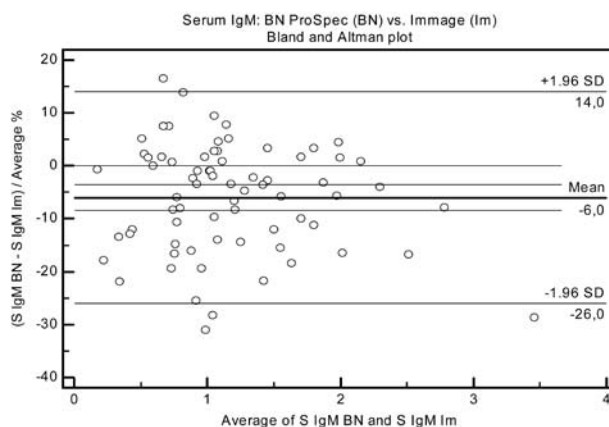
U části případů s diskrepantními výsledky byla vy počtená intrathékální frakce <10 %, což bývá považováno za nesignifikanční výsledek. Přesto zůstává 8 případů, v nichž byla při stanovení na některém z analyzátorů Immage zjištěna intrathékální syntéza IgM v rozporu s výsledky ostatních metod.

Za pozornost a kritické zamyšlení stojí i podíl výsledků nižších než dolní mez stanovitelnosti: analyzátor Immage vydal výsledek <0,300 mg/l ve 2 z 75 vzorků, zatímco analyzátor BN ProSpec <0,144 mg/l v 17 z 72 vzorků (!). ELISA metoda v základním ředění 1/20 „selhala“ v jediném případě (<0,025 mg/l v 1 ze 75 vzorků).

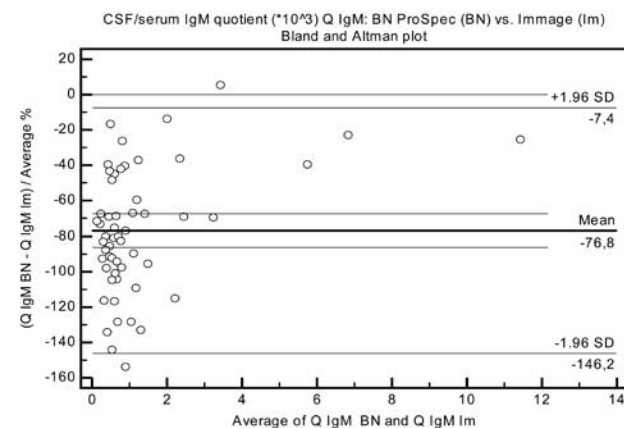
Hypotézu, že zjištěné diskrepance závisí na použitém analytickém systému a nikoliv na jiných faktorech, jsme ověřili srovnáním stanovení na různých analyzáto-



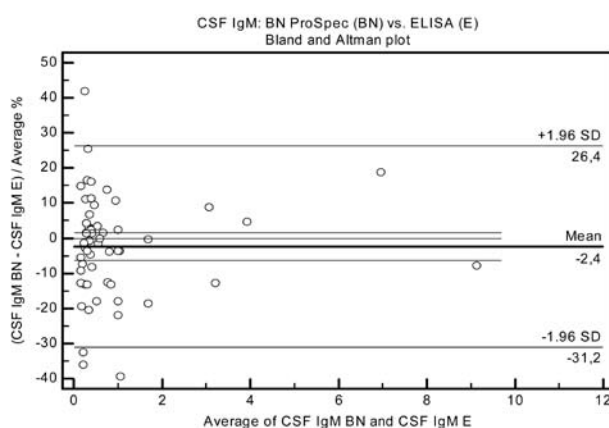
a)



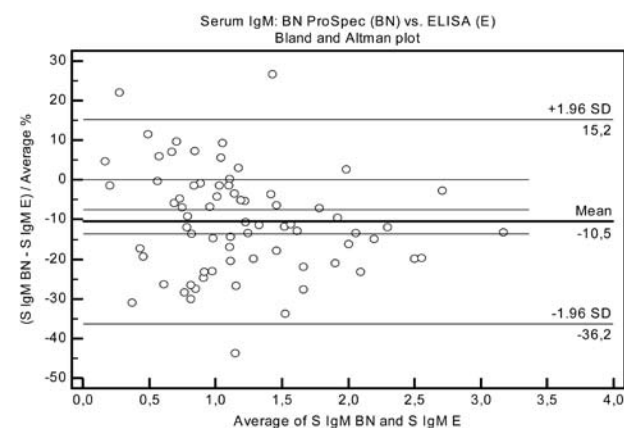
b)



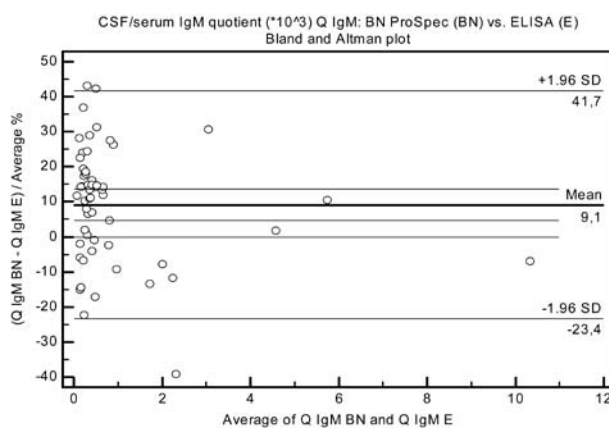
c)



d)



e)



f)

Fig. 1. Bland and Altman plots for comparison between results of CSF IgM, Serum IgM, and Q (CSF/Serum) IgM using different methods

rech Immage (n=20 pro srovnání Immage vs. Immage 800, n=8 vzorků likvoru pro srovnání na dvou analyzátořech Immage a analyzátořu Immage 800, Tabulka 2) a srovnáním stanovení na nefelometru BN ProSpec se stanovením na nefelometru BN II (v principu stejný systém) na omezeném počtu vzorků (n=19, Tabulka 1c), kde byl k dispozici dostatek likvoru pro takové srovnání. Při použití párových t-testů byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi výsledky stanovení na analyzátořech Immage (resp. Immage 800), ale hodnoty kvocientu likvor/sérum se statisticky významně nelišily, přestože byla séra měřena v jednom případě na likvorové, ve druhém případě na sérové kalibrační křivce. Mezi výsledky získanými na analyzátořech BN nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Zbývá pokusit se zodpovědět, proč nebyly diskutované diskrepance zjištěny v rámci kontrolních cyklů SEKK. Důvod vidíme v zaslání vzorků s mnohem vyšší koncentrací IgM v likvoru než je v naprosté většině reálných vzorků; zde se rozdíly mezi jednotlivými stanoveními již do značné míry stírají, což naznačují i naše výsledky (obr. 1a).

ELISA metody pro stanovení IgM v likvoru byly popsány již koncem 70. a počátkem 80. let minulého století [6, 7]. Stojí za zmínku, že v původní Reiberově práci [1], jejímž výsledkem byla formulace vztahů pro výpočet intrathékální syntézy, bylo pro stanovení koncentrací IgM použito enzymoimunoanalytického stanovení. V naší modifikaci ELISA metody jsme volbou optimální koncentrace protilátky k potahu (0,5 mg/l) a použitím tetramethylbenzidinu jako substrátu dosáhli meze stanovitelnosti 1,25 µg/l a meze detekce 0,625 µg/l; na rozdíl od nefelometrie tedy naše ELISA metoda umožňuje stanovení koncentrace IgM v prakticky každém likvorovém vzorku. Další udávanou předností ELISA metody je možnost jejího použití pro zamražené vzorky, kde může být nefelometrické stanovení problematické [5].

Naše studie je bezesporu významně limitována nízkým počtem likvorových vzorků s výrazně zvýšenými koncentracemi IgM, jakož i nízkým počtem vzorků použitých pro srovnání mezi jednotlivými pracovišti na stejném typu analyzátořu. To je dáno limitovaným množstvím materiálu pro vyšetření. Naproti tomu náhodný výběr vzorků dobře odráží zastoupení koncentrací IgM v reálné praxi a tedy podle našeho názoru věrohodně reflektuje problém, s nímž je třeba při analýze IgM v likvorové diagnostice počítat.

Závěr

Výsledky naší studie odporují předpokladu, že kvocient likvor/sérum je nezávislý na použité metodě, a to i tehdy, jsou-li párové vzorky likvorů a sér analyzovány paralelně na stejné kalibrační křivce. Naopak doporučení analyzovat sérum pro výpočet kvocientu na likvorové a nikoliv sérové kalibrační křivce, jakkoliv je intuitivně dobře pochopitelné, výsledky naší práce nepodporují. To má svůj praktický dopad, protože analýza séra na sérové kalibrační křivce je u obou použitých

nefelometrických systémů levnější. ELISA metoda má oproti nefelometrickému stanovení výhodu možnosti měření podstatně nižších koncentrací, a tedy stanovení koncentrace IgM v téměř všech vzorcích likvoru. Proto zaslouží přednost v experimentálních pracích, např. při zkoumání rozložení hodnot likvorových koncentrací IgM v populaci. Přes částečnou automatizaci však zůstává mnohem pracnější než nefelometrické stanovení a mj. i v souvislosti s procesem de facto povinné akreditace a velmi obtížně splnitelných podmínek nastavených pro validaci „home-made“ metod nelze reálně očekávat její používání v rutinním provozu. Pokud se nepodaří problém rozdílných koncentrací IgM mezi oběma na trhu dominujícími systémy stanovení uspokojivě vyřešit a předejít tak „falešně“ pozitivním výsledkům výpočtu intrathékální syntézy, přicházela by teoreticky v úvahu možnost zpracování rozsáhlého souboru pacientů s předpokládanou nepřítomností intrathékální syntézy IgM s následnou empirickou úpravou parametrů a/b , b^2 a c Reiberovy hyperbolické funkce pro limitní kvocient v případě analýzy na systémech Immage. V každém případě považujeme při použití tohoto systému v případě nízkých koncentrací IgM v likvoru (<1,5 mg/l) za žádoucí hodnotit výpočet intrathékální syntézy velmi zdrženlivě, popřípadě nahradit komentářem „nelze spolehlivě stanovit“. Je také možné, že v blízké budoucnosti dozná rozšíření detekce oligoklonálních IgM pásů [8], doporučená v recentním přehledném článku i našimi autory [9]. Metoda však zdaleka není přijímána bez výhrad [10-12] a pro optimální provedení teoreticky vyžaduje předběžnou kvantifikaci IgM, aby mohlo být aplikováno adekvátní a v likvorovém i sérovém vzorku srovnatelné množství IgM pro separaci v gelu.

Literatura

1. **Reiber, H.** Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 1994, 122, p. 189-203.
2. **Reiber, H.** External quality assessment in clinical neurochemistry: Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/Serum quotients. *Clin. Chem.* 1995, 41/2, p. 256-263.
3. **Reiber, H., Peter, J. B.** Cerebrospinal fluid analysis: disease-related patterns and evaluation programs. *J. Neurol. Sci.* 2001, 184, p. 101-122
4. **Reiber, H., Thompson, E. J., Grimsley, G. et al.** Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: International consensus by an internet-based group discussion. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41 (3), p. 331-337.
5. **Wick, M. (Ed.)**. *Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie*, 2. vydání, 2004, <http://www.uke.de/extern/dgln/pdf/Methodenkatalog.pdf>
6. **Dinesen, B., Saxtrup Nielsen, O.** A sensitive enzyme immunoassay for the quantitation of human IgM. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1979, 39, p. 449-454.
7. **Hirohata, S., Yamada, A., Inoue, T.** A sensitive and simple method for determination of IgM in cerebrospinal fluid by a solid-phase enzyme immunoassay. Comparison of two different methods. *J. Neurol. Sci.* 1985, 67, p. 115-118.

8. **Villar, L. M., González-Porqué, P., Masjuán, J., Álvarez-Cermeño, J. C., Bootello, A., Keir, G.** A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J. Immunol. Methods* 2001, 258, p. 151-155.
9. **Sobek, O., Adam, P., Koudelková, M., Štourač, P., Mareš, J.** Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení Sekce neuroimunologie a likvorologie České lékařské společnosti JEP. *Čes. a Slov. Neurol. Neurochir.* 2012, 75 (2), p. 159-163.
10. **Wurster, U.** Oligoklonale Banden IgG, IgA, IgM – Metodische Probleme und klinische Wertigkeit. 4. *Dresdner Liquorsymposium*, 2010. dostupné na: http://www.uke.de/extern/dgln/pdf/Oligoklonale_Banden.pdf
11. **Stauch, C., Reiber, H., Rauchenzauner, M. et al.** Intrathecal IgM synthesis in paediatric MS is not a negative prognostic marker of disease progression: quantitative versus qualitative IgM analysis. *Mult. Scler.* 2010, 12, p. 327-334.
12. **Reiber, H., Rostasy, K.** Response to the letter of Villar et al. „Quantitative and qualitative IgM analysis in CSF“. *Mult. Scler.* 2012, 18, p. 252-253.

Práce byla zčásti podpořena firmami Beckman Coulter Česká republika s.r.o. a Siemens s.r.o. formou poskytnutí originálních reagentů pro část prováděných analýz.

Autoři také děkují laborantkám Úseku analýzy likvoru Ústavu laboratorní diagnostiky, Oddělení klinické biochemie FN Ostrava I. Faruzelové, L. Fürstové, Z. Jakimové a L. Ježkové za pečlivě a nad rámec pracovních povinností provedená srovnávací nefelometrická měření.

Do redakce došlo 22. 5. 2012

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Ing. David Zeman, Ph.D.
Oddělení klinické biochemie
Ústav laboratorní diagnostiky
Fakultní nemocnice Ostrava
17. listopadu 1790
708 52 Ostrava-Poruba
e-mail: david.zeman@fno.cz

Erratum

Mikulášová, A., Kuglík, P., Smetana, J., Grešliková, H., Říhová, L., Klincová, M., Hájek, R.: Úloha chromozomových aberací v patogenezi monoklonální gamapatie nejasného významu. *Klin. Biochem. Metab.* 20 (41), 2012, No. 2, p. 91–96.

Chybná dedikace: Tato práce byla podpořena výzkumnými záměry Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021622434 a MSM0021622415, grantem Grantové agentury České republiky GAP304/10/1395 a granty Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví: NT11154-4, NS10406-3 a NT12130-4. Autor práce je stipendista programu Brno Ph.D. talent – financuje statutární město Brno.

Korekce: Tato práce byla podpořena výzkumnými záměry Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021622434 a MSM0021622415, grantem Grantové agentury České republiky GAP304/10/1395 a granty Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví: NT13492, NT11154, NS10406 a NT12130. Autor práce je stipendista programu Brno Ph.D. talent – financuje statutární město Brno.