

## Úskalí kvantifikace IgM v likvoru

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

<sup>1</sup>Oddělení klinické biochemie, Ústav laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava

<sup>2</sup>Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Brno-Bohunice

<sup>3</sup>Oddělení imunologie a alergologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

<sup>4</sup>Ústav 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