

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko–technologická

Vyšetření likvoru
Kubátová Eva

Bakalářská práce
2020

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Cerebrospinal fluid analysis
Kubátová Eva

Bachelor work
2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Eva Kubátová**
Osobní číslo: **C17181**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Vyšetření likvoru**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se vyšetření likvoru.
2. V úvodu uvést charakteristiku mozkomíšního moku, vznik, cirkulaci a resorpci.
3. Zmínit indikaci a kontraindikaci odběru mozkomíšního moku.
4. Popsat základní vyšetření mozkomíšního moku (kvalitativní i kvantitativní).

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 13.07.2020

.....

Kubátová Eva

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivé opravování chyb a užitečné rady při tvorbě této práce. Také bych chtěla poděkovat Tereze Nedvědové za vnuknutí nápadu na téma bakalářské práce.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá fyziologií, odběrem, transportem a následným vyšetřením likvoru. Zaměřuje se hlavně na základní vyšetření, kvalitativní i kvantitativní. Popisuje vyšetření fyzikální, chemické, cytologické a mikrobiologické. Vysvětluje principy stanovení a následnou interpretaci jednotlivých výsledků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mozkomíšní mok, vyšetření likvoru, lumbální punkce, fyzikální vyšetření, chemické vyšetření, cytologie, mikrobiologie

TITLE

Cerebrospinal fluid analysis

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with cerebrospinal fluid physiology, lumbal puncture, transportation and analysis. It aims primarily on basic analysis, qualitative and quantitative. It describes physical analysis, chemical analysis, cytology and mikrobiology. It explains principles of analysis and subsequent intepretation of results.

KEYWORDS

Cerebrospinal fluid, cerebrospinal fluid analysis, lumbal puncture, physical analysis, chemical analysis, cytology, microbiology

Seznam obrázků, reakčních schémat a vzorců

Obrázek 1 Cirkulace mozkomíšního moku	14
Obrázek 2 Vyhodnocení NOA a NBA	26
Obrázek 3 Spektrofotometrická křivka likvoru bez přítomnosti barviv	26
Obrázek 4 Spektrofotometrická křivka křivka oxyhemoglobinu	26
Obrázek 5 Spektrofotometrická křivka oxyhemoglobinu a bilirubinu	26
Obrázek 6 Rieberův diagram pro QlgG/Qalb	29
Obrázek 7 Pět výsledných typů elektroforézy IgG	30
Reakční schéma 1 Princip hexokinázové metody	23
Reakční schéma 2 Princip oxidázové metody.....	23
Reakční schéma 3 Princip enzymatického stanovení laktátu.....	24
Vzorec 1 Výpočet normální koncentrace albuminu v likvoru	28
Vzorec 2 Výpočet fLC indexu	31

Seznam použitých zkratk

CNS	centrální nervová soustava
CRP	C–reaktivní protein
CT	počítačová tomografie (computed tomography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
fLC	volné lehké řetězce (free light chains)
GLUT1	glukózový transportní protein typ 1
G6PD	glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
HCG	lidský choriový gonadotropin (human chorionic gonadotropin)
IgG	imunoglobulin G
NBA	absorbance v oblasti píku bilirubinu (net bilirubin absorbance)
NOA	absorbance v oblasti píku oxyhemoglobinu (net oxyhemoglobin absorbance)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
Q _{alb}	koncentrační kvocient albuminu
Q _{IgG}	koncentrační kvocient IgG
SAK	subarachnoidální krvácení

Obsah

Úvod.....	12
1 Mozkomíšní mok	13
1.1 Vznik	13
1.2 Cirkulace	13
1.3 Resorpce.....	14
1.4 Funkce	14
2 Intrakraniální bariéry	16
2.1 Hematoencefalická bariéra	16
2.2 Hematolikvorová bariéra	16
2.3 Likvoroencefalická bariéra	16
3 Vyšetření likvoru	17
3.1 Preamalytická část vyšetření	17
3.1.1 Indikace k odběru	17
3.1.2 Odběr mozkomíšního moku	17
3.1.3 Komplikace po odběru.....	18
3.1.4 Transport, zpracování a uchování materiálu	18
3.2 Fyzikální vyšetření	19
3.2.1 Tlak.....	19
3.2.2 Viskozita	19
3.2.3 Barva	19
3.2.3.1 Subarachnoideální krvácení	20
3.3 Kvalitativní vyšetření	21
3.3.1 Pandyho zkouška	21
3.3.2 Zlatosolová zkouška	21
3.3.3 Benediktova zkouška.....	21
3.3.4 VDRL test.....	21
3.4 Chemické vyšetření.....	22
3.4.1 Glukóza	22
3.4.2 Laktát.....	23
3.4.3 Celková bílkovina	24
3.4.3.1 Vazba barviva.....	24
3.4.3.2 Turbidimetrické stanovení	24

3.4.3.3	Lowryho metoda	25
3.5	Spektrofotometrie	25
3.6	Detekce protilátek	28
3.6.1	Imunoturbidimetrické stanovení	28
3.6.2	Elektroforéza	29
3.7	Cytologické vyšetření	31
3.7.1	Pleiocytóza	32
3.7.1.1	Granulární pleiocytóza	32
3.7.1.2	Mononukleární pleiocytóza	33
3.7.2	Patologická oligocytóza	34
3.7.2.1	Granulocytární oligocytóza	34
3.7.2.2	Lymfocytární oligocytóza	34
3.7.2.3	Monocytární oligocytóza	35
3.8	Mikrobiologické vyšetření	35
3.8.1	Gramovo barvení	35
3.8.2	Bakteriální izolace	37
3.8.3	Latexová aglutinace	38
3.8.4	Imunochromatografické stanovení	39
3.8.5	Polymerázová řetězová reakce	40
3.8.5.1	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	41
3.9	Speciální vyšetření	41
3.9.1	C-reaktivní protein	41
3.9.2	α -fetoprotein a lidský choriový gonadotropin	42
3.9.3	Amyloid- β	42
3.9.4	Tau-protein	43
3.9.5	Neuron specifická enoláza	43
4	Závěr	44
5	Seznam použitých zdrojů	45

Úvod

Mozkomíšňi mok neboli likvor je čirá tekutina, která se vytváří jako ultrafiltrát z plazmy. Je tvořena hlavně v *plexus choroidei* a distribuovaná v komorovém systému, bazálních cisternách a subarachnoidálním prostoru. [1]

Jedná se o velmi užitečný materiál pro výzkum biomarkerů, účely diagnostiky, prognózy, monitorování a identifikaci hlavních příčin neurologických onemocnění. [2]

Je neocenitelný jako diagnostická pomůcka při hodnocení zánětlivých stavů, infekčních nebo neinfekčních onemocnění, neurodegenerativních onemocnění a při leptomeningiálních metastázách. [3]

Změny ve složkách mozkomíšňiho moku mohou být v různých patologických procesech podobné a mohou způsobovat potíže s interpretací. Kombinace souboru vyšetření označovaných jako rutinní parametry zvyšuje diagnostickou citlivost a specifitu. [3]

Analýza se nejčastěji skládá z posouzení fyzikálních vlastností, biochemické analýzy, cytologie, mikrobiologického vyhodnocení a stanovení biomarkerů. [1]

1 Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok je čirá až nažloutlá alkalická tekutina. V porovnání s krevní plazmou obsahuje vyšší koncentrace chloridů, sodíku a hořčíku. Naopak v nižších koncentracích jsou vápník, proteiny a lipidy. [4]

Většina mozkomíšního moku se nachází mezi dvěma měkkými mozkomíšními plenami – *arachnoidea* a *pia mater* v tzv. *spatium subarachnoideum* tedy subarachnoidálním prostoru. Zbývá část (zhruba jedna čtvrtina) je v dutinách centrálního nervového systému (CNS). [5]

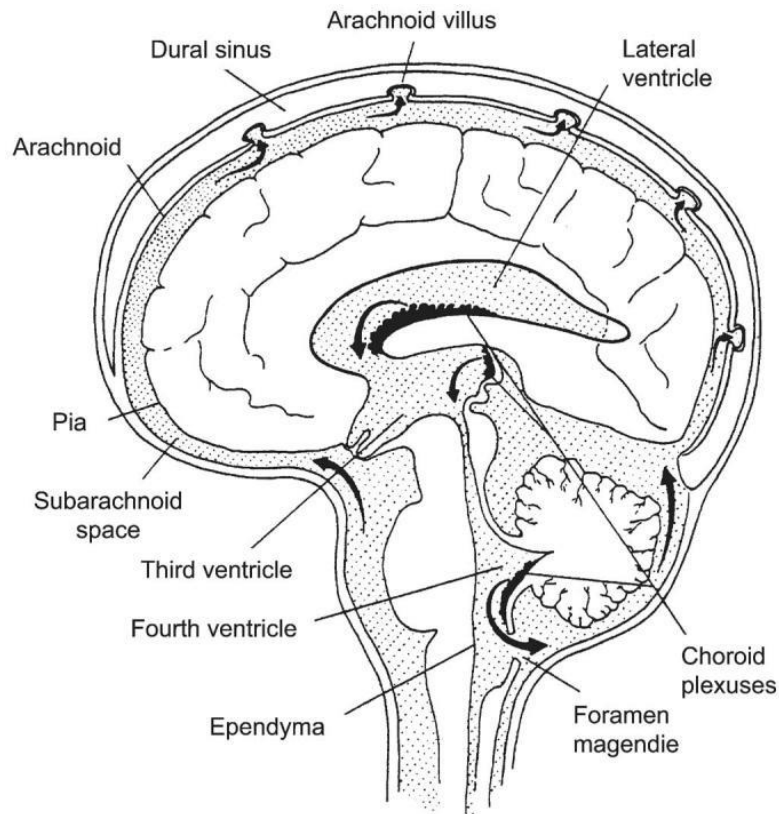
1.1 Vznik

Mozkomíšní mok je z větší části tvořen v *plexus choroidei* a to aktivní sekrecí epiteliálními buňkami. Dále vzniká ultracentrifugací krevní plazmy, kde dochází k přechodu Na^+ , Cl^- a HCO_3^- z krve do mozkových komor. Tím je vytvářen osmotický gradient a společně s ionty dochází k sekreci H_2O . Tento jednosměrný transport iontů je dosažen díky polaritě epitelu, jelikož ionty transportující proteiny v bazální části jsou jiné než ty, které jsou na apikální straně membrány komor. [6]

Mozkomíšního moku je během 24 h vytvořeno zhruba 500 ml a z toho sekrece v *plexus choroidea* tvoří asi 50–70 %. Celkový objem mozkomíšního moku závisí na stáří, velikosti anatomických struktur včetně šíře spinálního kanálu a velikosti spinálního durálního vaku. Při celkovém objemu cca 150 ml se mozkomíšní mok za 24 h obmění přibližně třikrát. [7]

1.2 Cirkulace

Jak je znázorněno na obrázku 1, cirkulace mozkomíšního moku začíná v postranních komorách, kde prochází přes interventrikulární *foramina Monroi* do III. komory. Odtud Sylviovým mokovodem do IV. komory. Dále přes *foramen Mangendie* a *apertures laterales Luschkae* se dostává do cerebelomedulární cisterny. Odtud cirkuluje intrakraniálně při bázi mozku a do subarachnoideálního prostoru a páteřní míchy. [7]



Obrázek 1 Cirkulace mozkomíšního moku [8]

1.3 Resorpce

Mozkomíšní mok je resorbován výběžky arachnoidey do venózních sinusů. Tyto výběžky umožňují přechod mozkomíšního moku do sinusů, ale zároveň zabraňují přechodu krve do subarachnoidálních prostorů. Většina se vstřebává do *sinus sagitalis superior*. [9]

1.4 Funkce

Jednou z nejdůležitějších funkcí mozkomíšního moku je ochrana mozku. Působí totiž jako tlumič nárazů mozku proti lebce. Dále snižuje váhu mozku z 1 500 g na méně než 50 g, čímž se snižuje i síla působící na parenchym a mozkové cévy během poškození. [10]

Dále se podílí na udržení homeostázy. Reguluje rovnováhu elektrolytů a cirkulaci aktivních molekul. Transportuje produkty sekrece *plexus choroideus* na místa jejich působení. [6]

Mozkomíšní mok také napomáhá při odstraňování odpadních produktů metabolismu mozku např. produkty peroxidace, glykosylované proteiny, přebytečné neurotransmitery, pozůstatky z výstelky komor, bakterie, viry a jinak zbytečné molekuly. Nahromadění takovýchto molekul narušuje neuronální fungování mozku.

[10]

2 Intrakraniální bariéry

2.1 Hematoencefalická bariéra

Je to semipermeabilní bariéra, která je tvořena nefenestrovanými kapilárami, na které přiléhají z krevní strany endoteliální buňky. Obvod lumen kapiláry je obklopen jednou endoteliální buňkou. Mají mezi sebou těsná spojení (tight junction). Endoteliální buňky v CNS mají unikátní vlastnosti, které jim umožňují regulaci pohybu iontů a molekul mezi krví a mozkem. [11]

Na abluminární membránu endotelové buňky nasedají nepravidelně pericyty. Jsou to dlouhé buňky podél abluminární membrány endotelu, které můžou překlenout až několik endoteliálních buněk. Obsahují kontraktilní proteiny, díky čemuž mají schopnost korigovat průměr kapiláry. Také se ukázalo, že jsou tyto buňky důležité pro regulaci tvorby hematoencefalické bariéry během vývoje a pro udržení její funkce. [11]

2.2 Hematolivorová bariéra

Hematolivorová bariéra je tvořena buňkami *plexus choroideus* a arachnoideou. Mezi epiteliálními buňkami jsou těsná spojení, která omezují pohyb molekul z fenestrovaných krevních cév do mozkomíšního moku. Díky této funkci se do jisté míry podílí na vzniku mozkomíšního moku. [12]

2.3 Likvoroencefalická bariéra

Její existence se předpokládá na základě existence úzkých extracelulárních prostorů mezi jednotlivými buňkami v CNS a jejich výběžky. Její definice má význam spíše z hlediska kinetiky přesunu látek než z morfologického hlediska. [13]

3 Vyšetření likvoru

3.1 Preanalytická část vyšetření

Preanalytická fáze má velký vliv na konečné výsledky daných vyšetření. Spadají sem neovlivnitelné faktory ze strany pacienta jako věk a pohlaví. Dále je nutné, aby pacient dodržel pokyny lékaře a před odběrem nepil kávu nebo alkohol a nekouřil, protože tyto faktory mohou ovlivnit složení mozkomíšního moku. Ze strany zdravotnického personálu je potřeba dodržet pravidla správného odběru materiálu, transportu, zpracování a následného uchování materiálu. [14, 15]

3.1.1 Indikace k odběru

Nutnost použití mozkomíšního moku k indikaci onemocnění se snížila s příchodem zobrazovacích metod jako je magnetická rezonance nebo počítačová tomografie (CT). Stále jsou však onemocnění, která se bez vyšetření mozkomíšního moku neobejdou. Patří sem hlavně infekce CNS a subarachnoidální krvácení. Dále své uplatnění najde u neurodegenerativních onemocnění a nádorových infiltrací. [16]

Odběr mozkomíšního moku se naopak nedoporučuje u pacientů s trombopenií či jinými krvácivými stavy, s antikoagulační léčbou, při podezření na spinální epidurální absces a pokud je u pacienta pravděpodobnost zvýšeného intrakraniálního tlaku. [15]

3.1.2 Odběr mozkomíšního moku

Mozkomíšní mok se získává pomocí lumbální punkce. Pacient může při odběru sedět, kdy je potřeba, aby se sklonil, jak nejvíc může. Další možná pozice je vleže. Pacient leží na boku a přitažením kolen k hrudi dojde k potřebnému ohnutí zad. Ramena by měl mít ve stejné úrovni jako kolena. V obou pozicích dojde při ohnutí zad k zvětšení prostoru mezi obratlovými výběžky. [17]

Když je pacient ve správné pozici, lékař lokalizuje místo vpichu pohmatem. Jehla může být bezpečně zasunuta do subarachnoidálního prostoru v prostoru L3–4, L4–5 nebo L5–S1, protože je to v dostatečné vzdálenosti od spodního konce míchy. Když je dosaženo subarachnoidálního prostoru, přestane být cítit odpor. Pokud byla jehla zavedena správně, začne mozkomíšní mok po odebrání mandrénu odkapávat do zkumavky. [18]

Množství odebraného mozkomíšního moku by mělo být kolem 12 ml. Odebrané množství ovlivňuje konečné koncentrace vyšetřovaných analytů, zejména proteinů. Pokud je odebráno malé množství, odpovídá složení mozkomíšnímu moku z oblasti durálního vaku. Zatímco větší množství reflektuje složení mozkomíšního moku cirkulujícího v komorách. [14]

Mozkomíšní mok se odebírá do sterilních zkumavek z polypropylenu, a to hlavně kvůli amyloidu- β_{1-42} , který je velmi náchylný k agregaci a jehož již nízká koncentrace slouží k diagnostice Alzheimerovy choroby. Bylo prokázáno, že koncentrace amyloidu- β_{1-42} byla ve skleněných zkumavkách chybně nižší. Pokud byl mozkomíšní mok odebrán cíleně k průkazu Alzheimerovy choroby, přidává se do vzorku ještě polysorbát 20. [15]

Společně s mozkomíšním mokem se odebírá i krev, protože koncentrace analytů v krvi ovlivňuje jejich koncentraci v mozkomíšním moku. Jako antikoagulační činidlo se používá EDTA. [19]

3.1.3 Komplikace po odběru

Mezi nejčastější komplikace po odběru mozkomíšního moku patří bolest hlavy. Kromě bolesti hlavy se může také objevit bolest zad nebo nevolnost. Méně časté je krvácení nebo vznik otoku v místě vpichu. Dále může po odběru dojít ke vzniku infekce z důvodu špatně provedeného aseptického odběru. [14]

3.1.4 Transport, zpracování a uchování materiálu

Mozkomíšní mok je třeba transportovat hned po odběru. Rutinní vyšetření se ideálně provedou do 30–60 minut od odběru při laboratorní teplotě. Nejdéle však do dvou hodin. Pro speciální testy se mozkomíšní mok může uchovávat až měsíc při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud je potřeba vzorky uchovávat déle než měsíc, musí být uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. [20]

Často dochází ke kontaminaci vzorku krví. Pro analyty, které mají v krvi vysokou koncentraci, jako například koagulační proteiny, může vést vyšetření tohoto vzorku k falešné pozitivitě. Krev může být odstraněna po centrifugaci vzorku. Centrifugace mozkomíšního moku se doporučuje při 2000g/10min. Vzorky obsahující více jak 500 erytrocytů/ μl by neměly být použity k vyšetření. [19]

3.2 Fyzikální vyšetření

3.2.1 Tlak

Nejjednodušším způsobem, jak měřit tlak je při lumbální punkci, která je prováděna vleže. Jakmile začne mozkomíšní mok odkapávat, připojí se manometr, pomocí kterého se tlak změří. [21]

Normální tlak je mezi 60 až 200 mm vodního sloupce. U obézních lidí může dosáhnout až 250 mm bez zjevných komplikací. [21]

Zvýšení tlaku může být způsobeno mnoha faktory např. zvýšením objemu ať už samotného mozku při jeho otoku, nádorovým onemocněním nebo vznikem krevní sraženiny. Další příčinou může být zvýšená produkce nebo naopak snížená resorpce mozkomíšního moku a vznik hydrocefalu. [22] Pokud dojde k poruše rovnováhy mezi sekrecí a resorpcí, začne se mozkomíšní mok hromadit v subarachnoideovém prostoru. Dojde k rozšíření tohoto prostoru a spolu s tím i ke zvýšení tlaku, který působí na mozek. Následně dochází k poškození mozku. Pokud hydrocefalus vznikne v růstovém období, kdy ještě nejsou uzavřené lebeční švy, způsobí nadměrné hromadění zvětšení a rozšíření lebky. [4]

3.2.2 Viskozita

Viskozita mozkomíšního moku je při 37 °C $2,8 \cdot 10^{-3}$ mm²/s, což je viskozita podobná vodě. [23] Je pozorována při odběru, kdy mozkomíšní mok odkapává do zkumavky. Její zvýšení může být ukazatelem mucinózního adenokarcinomu nebo kryptokokové meningitidy. [24]

3.2.3 Barva

Mozkomíšní mok je za normálních podmínek čirá, bezbarvá tekutina. Vzorek v průsvitné zkumavce se porovnává se zkumavkou, která obsahuje stejné množství čisté vody. Je doporučeno provádět porovnání proti bílému pozadí za denního světla. Jakákoliv odchylka ukazuje na patologický nález. [24]

Zakalení vzorku je způsobeno větším množstvím buněk. Zákal je možno pozorovat okem při počtu 400 buněk/mm³ a více. Pokud je koncentrace buněk okolo

50 buněk/mm³ můžeme proti světlu pozorovat opalescenci. Dalším důvodem zakalení může být přítomnost bakterií nebo epidurálního tuku. [24]

Jako xantochromní se vzorek označuje, pokud je zbarvený do žluta. Příčinou takového zbarvení je přítomnost bilirubinu, který vzniká rozpadem červených krvinek. Příčinou xantochromie může být akutní mozková hemoragie, mozkové nádory, infekce nebo těžká systémová žloutenka. [25]

Přítomnost oxyhemoglobinu se projeví červeným, růžovým nebo oranžovým zbarvením. Hnědá barva mozkomíšního moku ukazuje na přítomnost methemoglobinu. [24]

Vzácně může mít mozkomíšní mok zelenou barvu. Příčinou je *Pseudomonas aeruginosa*. Tato bakterie produkuje modro-zelený pigment pyocyanin, jehož přítomnost se projeví na barvě odebraného vzorku. [26]

3.2.3.1 Subarachnoideální krvácení

Subarachnoideální krvácení (SAK) je společně s traumatickým odběrem mozkomíšního moku nejčastější příčina přítomnosti krve ve vzorku. [24]

Krvácení je nejčastěji způsobeno rupturou aneurysmatu. Dále může být příčinou arteriovenózní malformace, vaskulitida, traumatické nebo idiopatické stavy. Nejčastěji pacient trpí akutní bolestí hlavy, která s časem nabírá na intenzitě. U vážnějších případů může pacient upadnout do bezvědomí. [1]

V dnešní době se pro diagnostiku SAK využívá CT. To je však považováno za vysoce citlivé až pět dní po SAK a i při klinických příznacích může být CT vyšetření negativní. Pokud je tedy vysoké podezření na SAK a CT je negativní, odebírá se mozkomíšní mok. Přítomnost více než 1 000 erytrocytů/mm³ ve vzorku se považuje za pozitivní nález. [1]

Při traumatické lumbální punkci, tedy když při odběru dojde k poranění epidurální žilní pleteně, je však výskyt erytrocytů také vyšší a vede k falešné pozitivitě. [1]

K odlišení traumatické lumbální punkce a SAK se mozkomíšní mok odebírá do tří zkumavek. Pokud je výskyt erytrocytů v první zkumavce značně vyšší než v poslední odebrané zkumavce, jedná se o traumatickou lumbální punkci. Další metodou je

odstředění mozkomíšního moku a následné zjištění, zdali je vzorek xantochromní. Xantochromii je možno pozorovat již po 12 hodinách, kvůli lýze erytrocytů a uvolňování oxyhemoglobinu, methemoglobinu a bilirubinu. [1]

Pro diagnostiku opakovaného SAK se však vzhled mozkomíšního moku použít nedá, protože pigmenty jsou ve vzorku přítomny až tři týdny po prvním SAK. [1]

3.3 Kvalitativní vyšetření

3.3.1 Pandyho zkouška

Tento test slouží ke stanovení zvýšené hladiny proteinů (hlavně globulinů). K 1 ml roztoku fenolu, pyrogallové kyseliny nebo kresolu se přidá jedna kapka mozkomíšního moku. Reakce je pozitivní, pokud došlo ke vzniku zákalu, popřípadě až mléčné sraženiny podle stupně obsahu proteinu. [27]

3.3.2 Zlatosolová zkouška

Jedná se o koloidní reakci k určení patologické změny bílkovin. Hodnotí se změna koloidního stavu a barvy u koloidního zlata po přidání mozkomíšního moku. Tato metoda se dnes již nepoužívá. Využívá se místo ní například elektroforéza bílkovin. [28]

3.3.3 Benediktova zkouška

Jedná se o test přítomnosti redukujících cukrů ve vzorku. Ke vzorku mozkomíšního moku se přidá Benediktovo činidlo (obsahující síran měďnatý). Hodnotí se barevná změna, ke které dojde vlivem redukce barviva. Pokud k redukci dojde, pozorujeme barevnou změnu z původní modré barvy na hnědou. Intenzita barevné změny odpovídá koncentraci redukujících sacharidů. [29]

3.3.4 VDRL test

Jedná se o netreponemový test k indikaci přítomnosti *Treponema pallidum* v mozkomíšním moku, kde způsobuje neurosyfilis. Test je založen na detekci protilátek, které produkuje napadené tělo. Ke vzorku se přidává specifický antigen. Pokud je protilátka přítomna, dojde k shlukování, které je odečítáno mikroskopicky. [30]

3.4 Chemické vyšetření

3.4.1 Glukóza

Glukóza tvoří hlavní zdroj energie pro mozek. Její koncentrace v mozkomíšním moku se nazývá glykorachie a její normální hodnoty jsou 2,8–4,4 mmol/l, což je zhruba 60 % oproti koncentraci v krvi. [31]

Vysoká koncentrace se nazývá hyperrachie, není však tolik klinicky významná. Vyskytuje se spíše společně s hyperglykemií. [32]

Nízká koncentrace glukózy se nazývá hypoglykorachie. Nejčastější příčinou jsou bakteriální nebo mykózní onemocnění a méně často jsou to virová onemocnění. [32]

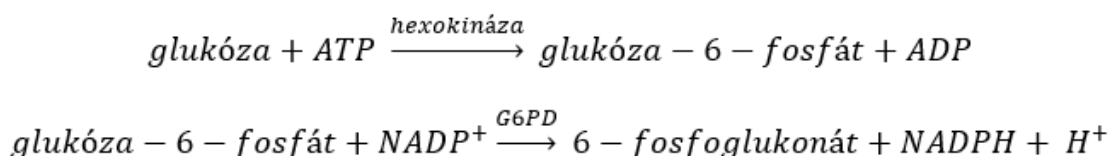
Protože koncentrace glukózy v mozkomíšním moku je závislá na koncentraci glukózy v krvi, vytváří se z těchto dvou hodnot poměr, který je nápomocen při určení diagnózy. Rovnovážného stavu mezi koncentracemi je dosaženo 4 až 6 hodin po jídle, a proto by se měla lumbální punkce u pacienta provádět na lačno. Poměr se normálně pohybuje v rozmezí od 0,5 do 0,8. [33]

U meningitidy naznačuje nízká hladina glukózy v mozkomíšním moku a nízký poměr glykorachie/glykémie spíše na bakteriální než virové onemocnění. [33]

Další příčinou snížené koncentrace je syndrom GLUT-1 deficience. Glukóza se přes hematoencefalickou bariéru dostává pomocí transportního proteinu GLUT1. Při mutaci genu SLC2A1 tento protein nefunguje. Typický klinický nález je tedy hypoglykorachie s glykemií v normě a poměr glykorachie/glykémie je nižší než 0,4. [34]

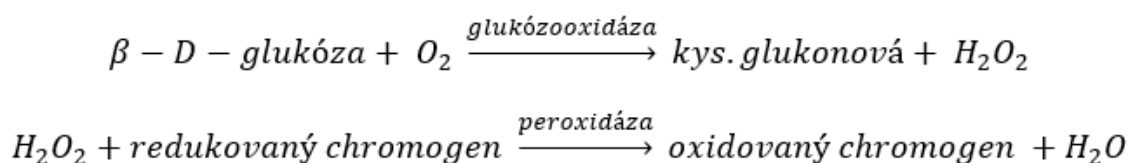
Pro stanovení koncentrace glukózy v mozkomíšním moku se používá hexokinázová metoda nebo glukózooxidázová metoda. [35, 36]

Hexokinázová metoda se skládá se ze dvou spřažených enzymových reakcí (viz reakční schéma 1). V první reakci dochází k přeměně glukózy na glukóza-6-fosfát za přítomnosti enzymu hexokinázy. Ve druhé reakci je přeměněn glukóza-6-fosfát za přítomnosti glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6PD) na 6-fosfoglukonát. Při druhé reakci je NADP⁺ přeměněno na NADPH + H⁺. Touto přeměnou dochází k nárůstu absorbance při 340 nm. Množství vzniklého NADPH + H⁺ je přímo úměrné koncentraci glukózy. [35, 36]



Reakční schéma 1 Princip hexokinázové metody [35]

Glukózooxidázová metoda je specifická pro β -D-glukózu a také se skládá ze dvou reakcí (viz reakční schéma 2). V první reakci dochází k oxidaci β -D-glukózy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku za katalýzy glukózooxidázy. Ve druhé reakci je přidán chromogen a peroxidáza. Vznikne barevný produkt, který se měří fotometricky. [35, 36]



Reakční schéma 2 Princip oxidázové metody [35]

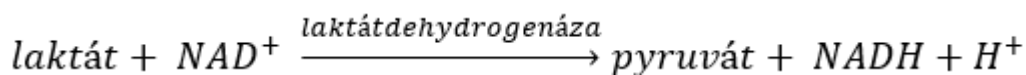
3.4.2 Laktát

Koncentrace laktátu v mozkomíšním moku je 1,3–2,4 mmol/l a není závislá na koncentraci v séru. [37]

Mnohonásobně zvýšená koncentrace se nachází u bakteriální meningitidy a pomáhá tak k jejímu rozlišení od ostatních meningitid, kdy je koncentrace laktátu zvýšená pouze mírně. U bakteriální meningitidy totiž pravděpodobně dochází k anaerobní glykolýze v důsledku sníženého průtoku krve mozkiem a absorpce kyslíku. Proto mohou být hodnoty laktátu i více než 6 mmol/l. Sledování koncentrace laktátu v průběhu léčby onemocnění nám poskytuje informace o úspěšnosti léčby. [37, 38]

Dále je zvýšená hodnota laktátu u neurodegenerativních onemocnění nebo u mitochondriálních dysfunkcí. [39]

Koncentrace laktátu v mozkomíšním moku se stanovuje pomocí enzymatické reakce, kde dochází k přeměně laktátu na pyruvát a NAD^+ na $NADH + H^+$ za přítomnosti enzymu laktátdehydrogenázy (viz reakční schéma 3). Je měřen nárůst absorbance při 340 nm, který odpovídá koncentraci laktátu. [31]



Reakční schéma 3 Princip enzymatického stanovení laktátu [31]

3.4.3 Celková bílkovina

Koncentrace celkové bílkoviny v mozkomíšním moku je 0,45 g/l a klinicky významné je hlavně její zvýšení. Hematolivorová bariéra se skládá z různých struktur, které jsou důležité pro difúzi a filtraci makromolekul z krve do mozkomíšního moku. Její integrita a objemový tok mozkomíšního moku určuje obsah proteinu v mozkomíšním moku. Proto se celková koncentrace bílkovin používá v krajních případech pro hrubý odhad funkce hematolivorové bariéry u některých onemocnění jako je třeba hnisavá meningitida, stenóza spinálního kanálu nebo polyneuroradikulitida. Na zvýšené koncentraci bílkovin se však podílí více faktorů, které nemusí přímo souviset s onemocněním. Patří sem koncentrace bílkovin v krvi, místo vpichu a objem odebraného vzorku nebo intratekálně produkované proteiny. Proto je kromě celkové bílkoviny nutno provést další vyšetření například albuminu a výpočet albuminového kvocientu nebo stanovení imunoglobulinů. [3, 40]

U novorozenců jsou koncentrace proteinu vysoké, ale postupně se snižují během prvního roku života a v dětství jsou udržovány na nízké úrovni. U dospělých se koncentrace s věkem opět zvyšuje. [3]

3.4.3.1 Vazba barviva

Jedna z metod stanovení proteinů v likvoru je stanovení pomocí navázání barviva. Jako barvivo je nejpoužívanější pyrogalolová červeň. Dojde k navázání barviva na bílkovinu a vzniku barevného komplexu, jehož absorpance je přímo úměrná koncentraci bílkovin. Fotometrické měření se provádí při 600 nm. [17]

3.4.3.2 Turbidimetrické stanovení

Turbidimetrické stanovení proteinu využívá činidla, která bílkoviny vysráží a vzniklý zákal je měřen turbidimetricky. Jako srážecí činidlo se nejčastěji používá benzethoniumchlorid dále je možno použít kyselinu trichloroctovou nebo sulfosalicylovou. [17]

3.4.3.3 Lowryho metoda

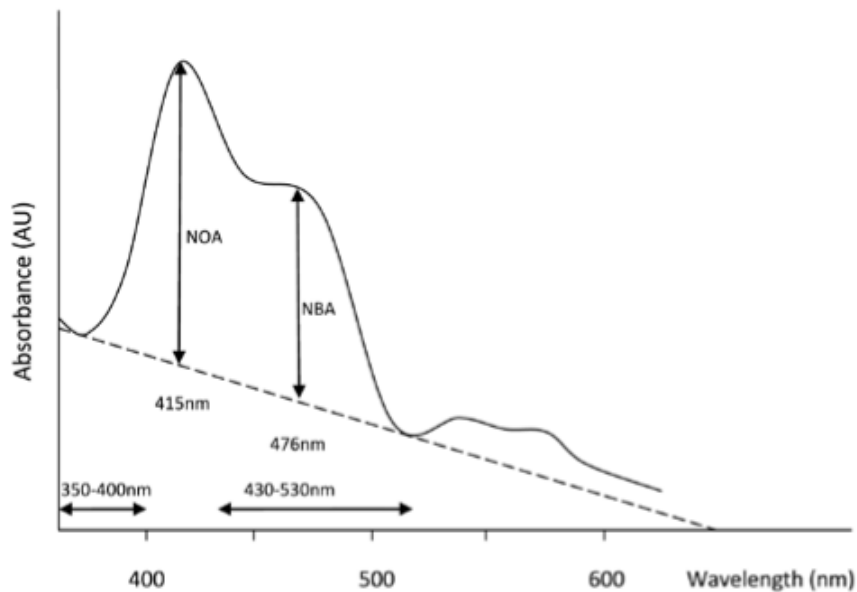
Lowryho metoda stanovení bílkovin je založena na reakci biuretu s dalšími kroky a reagensy na zvýšení citlivosti. Jako činidlo se používá kyselina fosfomolybdenová/fosfowolframová také známá jako Folin-Ciocalteuovo činidlo. Toto činidlo reaguje s měďnatými ionty a postranními řetězci tyrosinu, tryptofanu a cysteinu za vzniku modrozelené barvy, která může být detekována mezi 650 nm a 750 nm. Nevýhodou této metody je, že mezi interferenční faktory patří běžné látky jako K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ , EDTA, Tris-HCl, uhlohydráty a redukční činidla. Další nevýhodou je, že činidlo je reaktivní pouze krátkou dobu po přidání a je destruktivní pro proteiny, takže jakmile vzorek proteinu reaguje s barvivem, nemůže být už použit. [41]

3.5 Spektrofotometrie

Absorbance mozkomíšního moku při určitých vlnových délkách světelného spektra poskytuje informace o koncentraci různých pigmentů, které vznikají při rozkladu erytrocytů. Maximální absorbance se vyskytuje u každého produktu v různé vlnové délce. Proto nám měření celého spektra poskytne informace o přítomnosti daných pigmentů. [42]

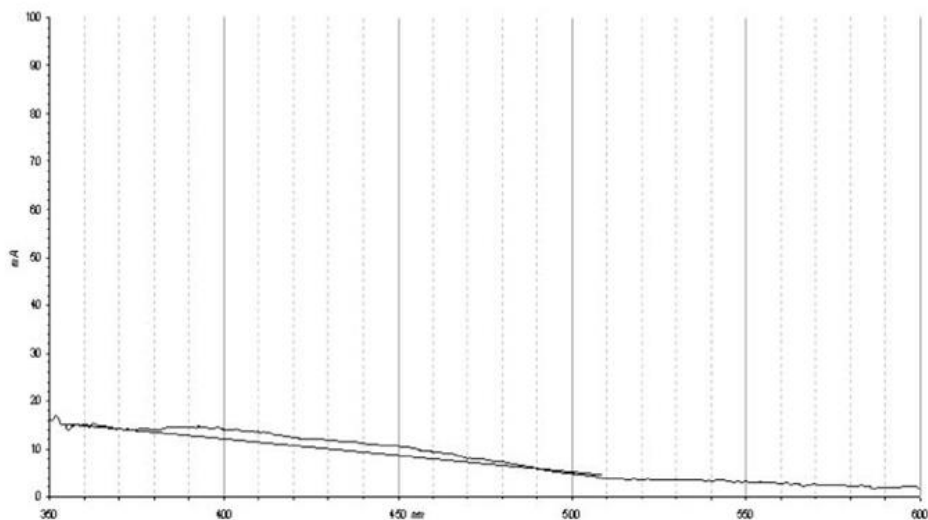
Provádí se u pacientů s podezřením na SAK, u kterých je CT negativní. Důležité je, aby vzorek mozkomíšního moku byl odebrán až 12 hodin po začátku krvácení, aby došlo ke vzniku bilirubinu. Také by se mělo jednat o poslední odebraný vzorek, aby se snížila možnost interference oxyhemoglobinem. Vzorek se musí uchovávat mimo světlo, aby nedošlo k degradaci bilirubinu. Vzorek je třeba hned po přijetí centrifugovat a vyšetřit. [43]

Měření se provádí v rozmezí 350 až 600 nm, což na grafu představuje osa x. Na ose y je absorbance, a to od 0 do 0,1. Hodnotí se dvě hodnoty: NBA (absorbance v oblasti píku bilirubinu) a NOA (absorbance v oblasti píku oxyhemoglobinu). NBA se nachází v rozmezí 490 až 530 nm a pík v tomto rozmezí nám svědčí o přítomnosti bilirubinu. NOA se nachází u 413–415 nm, což je absorpční maximum oxyhemoglobinu a pík v této části grafu značí jeho přítomnost (obr. 2). [43]



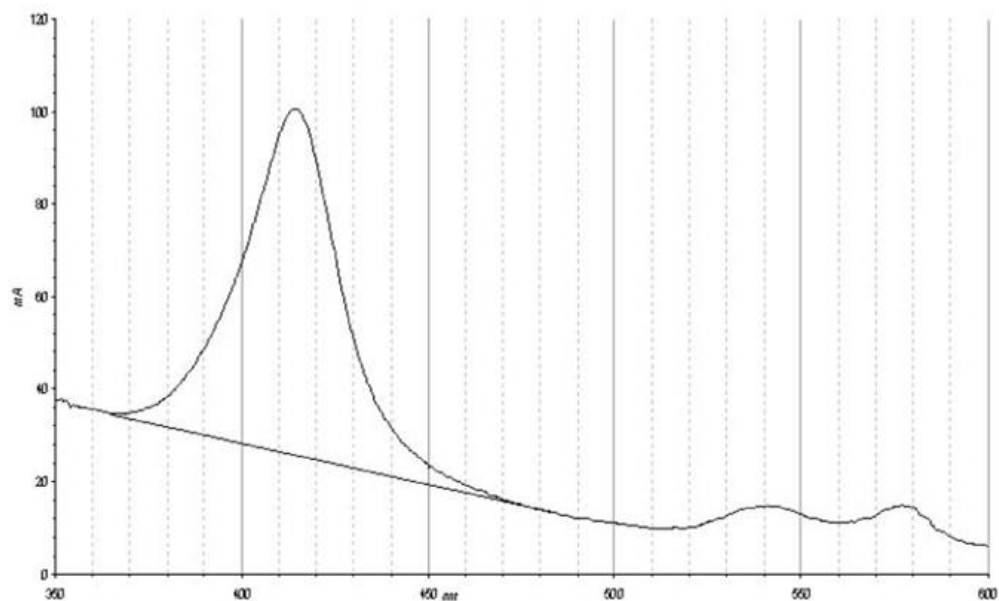
Obrázek 2 Vyhodnocení NOA a NBA [45]

Za normálních podmínek mozkomíšní mok neobsahuje žádná barviva. Při fyziologickém nálezu se tedy na grafu nenachází žádný pík, který by indikoval jejich přítomnost (obr. 3). V tom případě lze vyloučit jakékoliv krvácení v průběhu předchozích 12 hodin. [42]



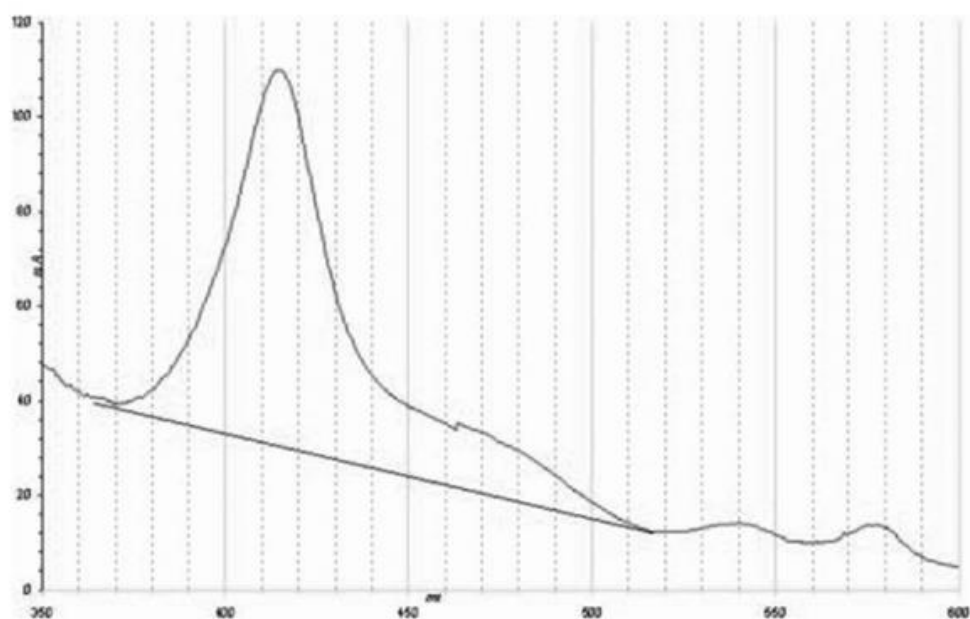
Obrázek 3 Spektrofotometrická křivka likvoru bez přítomnosti barviv [44]

Přítomnost oxyhemoglobinu, kterou nám indikuje pík při 415 nm (obr. 4), znamená krvácení, které ještě není starší 12 hodin, a tedy ještě nedošlo ke konverzi na bilirubin. [43]



Obrázek 4 Spektrofotometrická křivka oxyhemoglobinu [44]

Přítomnost oxyhemoglobinu i bilirubinu značí krvácení starší 12 hodin a ukazuje na SAK (obr. 5). [43]



Obrázek 5 Spektrofotometrická křivka oxyhemoglobinu a bilirubinu [44]

Analýza pomocí spektrofotometrie je považována za citlivý a spolehlivý test pro prokázání xantochromie. Poskytuje objektivní a kvantitativní výsledek, čímž zabraňuje subjektivitě při hodnocení zbarvení okem. [42]

3.6 Detekce protilátek

3.6.1 Imunoturbidimetrické stanovení

U této metody se využívá tvorby komplexů antigen-protilátka v roztoku a s tím spojený vznik zákalu. Měření se provádí v zóně přebytku, kde je koncentrace protilátky udržována konstantní a množství vytvořeného komplexu antigen–protilátka závisí přímo na koncentraci antigenu ve směsi. [44]

U mozkomíšního moku se používá především ke stanovení albuminu a imunoglobulinů, zejména imunoglobulinu G (IgG), který je z nich diagnosticky nejdůležitější. [3]

Koncentrace albuminu není ovlivněna syntézou intratekálních proteinů. Jeho koncentrace závisí na koncentraci v krvi. Z poměru koncentrace albuminu v likvoru a séru se vypočítá kvocient (Q_{alb}), který se v současné době používá k hodnocení propustnosti hematoencefalické bariéry. Dále koncentrace albuminu závisí na věku. Nejnižší hodnoty jsou u novorozenců a s věkem se postupně zvyšuje, proto se při výpočtu normální hodnoty albuminu musí přihlídnout k věku (vzorec 1). [3, 45]

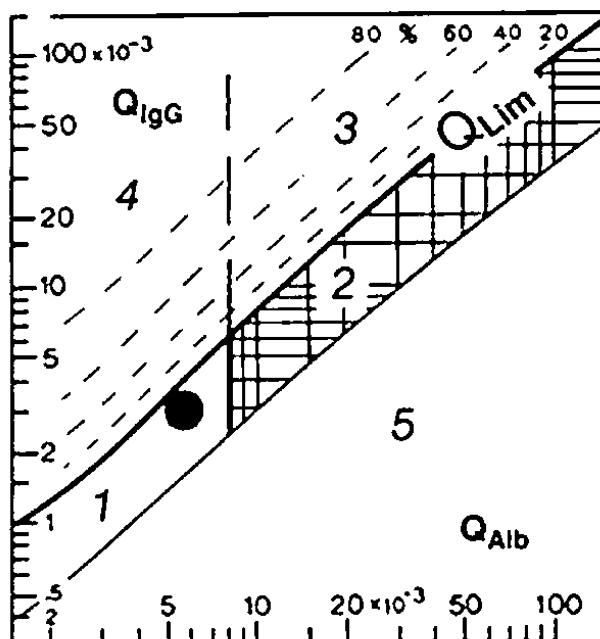
$$\text{Albumin} = \left(\frac{4 + \text{věk}}{15} \right) \cdot 10^{-3}$$

Vzorec 1 Výpočet normální koncentrace albuminu v likvoru [45]

Kvocient likvor/sérum IgG (Q_{IgG}) odráží jak rychlost propustnosti IgG do mozkomíšního moku z krve, tak intratekální syntézu IgG. [45]

Z poměru Q_{IgG}/Q_{alb} se vypočítá IgG index. Jeho zvýšení nad hodnotu 0,7 naznačuje existenci intratekální syntézy IgG. Tento výpočet se nedá použít, jestliže hodnoty Q_{alb} jsou vyšší než 20. Znamená to, že je poškozena hematolikorová bariéra a docházelo by k falešně pozitivním výsledkům. [45, 46]

Dále se k vyhodnocení propustnosti hematoencefalické bariéry a intratekální syntézy používá Reiberův diagram. K hodnocení je třeba stanovit koncentraci albuminu a imunoglobulinu v séru a mozkomíšním moku. Poté se vypočítá kvocient likvor/sérum a výsledky jsou zaneseny do diagramu (obr. 6). [47]



Obrázek 6 Rieberův diagram pro Q_{lgG}/Q_{alb} [48]

Výsledky můžeme zařadit do pěti zón. V první jsou hodnoty odpovídající normální funkci bariéry. Pokud se hodnoty vyskytují ve druhé části grafu, je funkce bariéry narušena. Výsledky nad Q_{Lim} vypovídají o zvýšené koncentraci IgG. Pokud se nachází ve třetí zóně, je jejich zvýšená koncentrace způsobena porušenou funkcí bariéry. Zóna čtyři svědčí o intratekální syntéze IgG. Poslední, pátá zóna, je výsledkem chybného vyšetření. [48]

Syntéza intratekálních imunoglobulinů svědčí o onemocnění CNS a je spojeno s lokální imunitní reakcí. Pro detekci intratekální syntézy IgG je detekce oligoklonálních proužků IgG lepší než index IgG a nelineární vzorec jak z hlediska citlivosti, tak specifičnosti. [3]

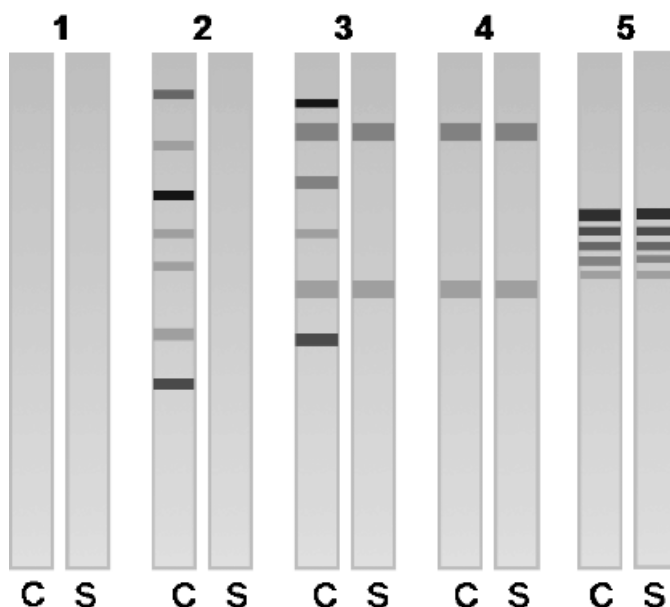
3.6.2 Elektroforéza

Použitím elektroforetických technik je možné klasifikovat humorální odpověď podle počtu produkovaných klonů protilátek (monoklonální, oligoklonální, polyklonální). Toho se využívá k průkazu oligoklonálních proužků IgG. V dnešní době se nejčastěji používá izoelektrická fokusace a následná imunofixace. [3]

U izoelektrické fokusace dochází k dělení na základě gradientu pH podle izoelektrického bodu. Dojde k oddělení jednotlivých populací IgG a ty jsou následně precipitovány v gelu imunofixací. Po fixaci se imunoprecitát obarví. [49]

Jelikož imunoglobuliny v plazmě mohou přecházet skrze bariéru do mozkomíšního moku, je důležité provést zároveň i stanovení IgG v krvi a výsledky mezi sebou porovnat. [3]

Při porovnávání výsledků z mozkomíšního moku a séra můžeme pozorovat 5 charakteristicky různých typů výsledku (obr. 7). [50]



Obrázek 7 Pět výsledných typů elektroforézy IgG [50]

Typ 1 je normální obraz, kde nejsou identifikovány žádné proužky. Typ 2 označuje intratekální syntézu, kde jsou vidět proužky pouze v likvoru. Typ 3 má shodné proužky se sérem, ale vyskytují se zde proužky specifické pro likvor. Jako typ 4 se označuje obraz, kde jsou proužky shodné jak v séru, tak v likvoru, což prokazuje, že IgG se pasivně rozptýlil do CNS. Typ 5 se vyskytuje vzácně, a je to v případě, že v séru i likvoru je pás monoklonálních IgG. [50]

Elektroforéza proteinu v séru a likvoru slouží k určení diagnózy mnohočetného myelomu, gamapatií a demyelinizačních onemocnění CNS, a to hlavně roztroušené sklerózy. [46]

Další možností průkazu intratekální syntézy imunoglobulinů je průkaz volných lehkých řetězců (fLC). Jejich vyšetření vykazuje mnohem větší citlivost a lze je prokázat i u vzorků s negativními oligoklonálními proužky. [51]

K určení jejich syntézy se využívá výpočet fLC indexu, ve kterém se vypočítá poměr fLC v likvoru a séru a tento poměr se vztahuje na Q_{alb} (vzorec 2). [51]

$$fLC\ index = \frac{fLC_{likvor}/fLC_{s\acute{e}rum}}{Q_{alb}}$$

Vzorec 2 Výpočet fLC indexu [51]

Hodnoty vyšší než 6 vypovídají o intratekální syntéze imunoglobulinů. [52]

Některé studie prokázaly, že existuje vztah mezi benigní prognózou u roztroušené sklerózy a chybějící nebo nejistitelnou humorální imunitní odpovědí v mozkomíšním moku. [51]

3.7 Cytologické vyšetření

Analýza buněk mozkomíšního moku je důležitá pro diagnostiku akutních infekcí, subarachnoideálního krvácení a neoplastických nemocí. Zatímco kvantifikace krevních buněk je automatizovaná, u buněk mozkomíšního moku se stále převážně používá hodnocení pomocí světelného mikroskopu. [53]

Cytologické vyhodnocení by mělo být provedeno do dvou hodin po odběru, nejlépe však do 30 minut, kvůli lýze erytrocytů a lymfocytů. [3]

Buněčnost, tedy počet buněk v mozkomíšním moku, se obvykle počítá ve Fuchsově–Rosenthalově komůrce, a to v objemu 3 μ l. Proto se počty buněk vztahují na tento objem. Dále je možné výsledek korigovat na 1 μ l. [3]

K získání dostatečného počtu buněk pro cytologii se vzorek mozkomíšního moku centrifuguje. Mezi další možnosti patří například membránová filtrace nebo využití sedimentační komůrky. [3]

Nejčastějším barvením, které se používá pro buněčnou diferenciaci, je barvení May–Grünwald–Giemsa. Pro detekci maligních buněk je možné využít i speciální barvení. [3]

Lymfocyty a monocyty v klidové fázi se v mozkomíšním moku mohou vyskytovat i normálně, a to v poměru 7:3 s tolerancí do 10 % aktivovaných lymfocytů. Dále se tam mohou vyskytovat buňky výstelky likvorových cest. Žádné jiné buňky se za normálních okolností ve vzorku nenacházejí. Normální hodnoty pro buňky, které se v mozkomíšním moku vyskytují, jsou 10 elementů/3 μ l nebo 4 elementy/1 μ l. [3, 54]

3.7.1 Pleiocytóza

Pleiocytóza je zvýšený počet elementů ve vzorku. Dále se dělí podle převažujícího typu buněčných elementů. Výjimkou je nález nádorových elementů, které se značí jako nádorová pleiocytóza a nedělí se podle počtu převažujících elementů. [54]

3.7.1.1 Granulární pleiocytóza

U této pleiocytózy převažuje zastoupení granulocytů. Mnohem častěji se jedná o neutrofilní granulocyty. Méně časté jsou eosinofilní granulocyty. [55]

Neutrofilní granulocyty patří mezi elementy nespecifické imunity. Mají schopnost fagocytózy, a proto se často vyskytují u hnisavých infekcí, kde se podílí na imunitní reakci fagocytózou extracelulárních bakterií. Jejich zvýšený počet můžeme tedy konkrétně nalézt u bakteriálních meningitid. Mohou také pohlcovat virové partikule, a proto je jejich počet zvýšen i v časném stádiu virového postižení CNS. U virových infekcí se vyskytují pouze na začátku infekce, protože poté přechází nespecifická imunita v imunitu specifickou. [54, 55]

Neutrofilní granulocyty se také mohou vyskytovat v cytologickém obraze u pacientů po subarachnoidálním krvácení. Hlavním chemotaktickým faktorem a příčinou aktivace neutrofilů je v tomto případě především složka komplementu C5a. [54]

Eosinofilní granulocyty se mohou vyskytovat při reparaci a regeneraci tkáně, po proběhlém postižení CNS. Pokud je jejich počet výrazně zvýšený, ukazuje to na probíhající parazitární onemocnění. [54]

Mezi vzácné klinické obrazy se zvýšeným počtem eosinofilních granulocytů patří tzv. eosinofilní meningitida. Nejedná se o zánětlivé onemocnění, ale o celkovou závažnou alergickou reakci organismu. [55]

3.7.1.2 Mononukleární pleiocytóza

Do této skupiny patří zvýšený počet lymfocytů a monocytů. [55]

U lymfocytární pleiocytózy převažuje zastoupení lymfocytů, které jsou v aktivované formě. Patří sem regulační T_H lymfocyty, cytotoxické T_C lymfocyty, B lymfocyty a NK buňky. U chronického průběhu zánětu přechází B lymfocyty v plazmatické buňky. Pomocí světelné mikroskopie lze diferencovat až tato pozdější stadia B lymfocytů. [54, 55]

Lymfocyty se mohou vyskytovat v normálním cytologickém obraze při tzv. preventivní neuroprotekcii v případě systémových zánětlivých onemocnění. V takovém případě jsou jejich fyziologické hodnoty 60–80 % z celkového počtu buněk. [54]

Zvýšený počet lymfocytů se vyskytuje hlavně u serózních zánětů, jejichž původci mohou být buď virová agens, nebo může jít o spirochetální onemocnění. [55]

Převaha elementů monocytární řady se nazývá monocytární pleiocytóza. Jejich normální hodnoty v mozkomíšním moku tvoří 20–40 % z celkového počtu buněk. Monocyty se při aktivaci zvětšují a jsou více patrné vakuoly, popřípadě se přeměňují v makrofágy. Monocytárně-makrofagický systém v organismu plní funkci imunitního dozoru. Elementy mají schopnost fagocytózy a pohlcují různé částice endogenního i exogenního systému. Pohlcené částice po zpracování prezentují na svém povrchu. Aktivují tak složky specifické imunity a z klinického hlediska tím umožňují snadnější určení etiologické diagnózy. Proto je při hodnocení důležité zhodnotit nejen kvantitu těchto buněk, ale také příslušné morfologické znaky a identifikaci fagocytovaného substrátu. [3, 54, 55]

Erytrofágy se vyskytují u čerstvých intermeningeálních krvácení. Jejich přítomnost ve vzorku je již 12–22 hodiny po krvácení. [3]

Siderofágy bývají přítomny u staršího krvácení. Obsahují hemosiderin a jsou pozorovány 1–2 dny po krvácení a mohou přetrvávat týdny. [3]

Makrofágy obsahující hematoidin (krystalizovaný bilirubin, degradovaný z hemoglobinu) se mohou objevit asi 2 týdny po krvácení. [3]

Leukofágy se dělí do dvou skupin, podle druhu leukocytů, který je fagocytován. Granulocyty, a to hlavně neutrofilní, jsou fagocytovány v terminálních fázích hnisavých zánětů. Naopak elementy lymfocytární řady jsou fagocytovány v terminálních fázích nehnisavých zánětů. [55]

Lipofágy označují destrukci tkáně CNS u mozkových ischemií a degenerativních onemocnění, protože fagocytují nekrotickou tkáň CNS. Vyznačují se přítomností tukových kapének v cytoplasmě. [3]

Přítomnost makrofágů bez detekovatelného intracelulárního materiálu je nespecifický nálezný, který se vyskytuje při herniaci disků, maligní meningeální infiltraci, spinálních nádorech, traumatu hlavy, cévní mozkové příhodě, vaskulitidě, infekcích a subarachnoideálním krvácení. [3]

3.7.2 Patologická oligocytóza

U patologické oligocytózy nedochází k celkovému zvýšení buněčných elementů. Celkový počet elementů je v normálních hodnotách, ale převládá pouze jedna složka buněk. [55]

Toto vyhodnocení je komplikované, protože se pracuje s velmi nízkým počtem elementů. Některé druhy oligocytóz plynule přechází v pleiocytózu. [55]

3.7.2.1 Granulocytární oligocytóza

Ve vzorku se nachází vysoký počet neutrofilních granulocytů. Netvoří přechod ke granulocytární pleiocytóze. Na rozdíl od granulocytární pleiocytózy, která se vyskytuje u hnisavých infekcí, se totiž vyskytuje v iniciačních fázích nehnisavých zánětů. Dále se může objevit u časných stadií mozkové ischemie. [55]

3.7.2.2 Lymfocytární oligocytóza

Vyšší přítomnost aktivovaných lymfocytárních elementů se vyskytuje u roztroušené sklerózy a u některých serózních neuroinfekcí. U chronického průběhu infekce se mohou vyskytovat i plazmatické buňky. Tento druh oligocytózy tvoří plynulý přechod k lymfocytární pleiocytóze. [55]

3.7.2.3 Monocytární oligocytóza

Pro tuto oligocytózu je charakteristický zvýšený počet monocytů, popřípadě makrofágů. Vyskytuje se v terminálních fázích všech neuroinfekcí, u polyradikuloneuritidy Guillain–Barré a u destruktivních procesů CNS. [55]

Pokud jsou přítomny makrofágy je u nich třeba identifikovat specifické substráty fagocytózy pro lepší zařazení nálezu. [55]

3.8 Mikrobiologické vyšetření

Do mikrobiologické laboratoře se dostává mozkomíšní mok od pacientů s podezřením na meningitidu, pneumonii nebo u nevysvětlitelných horečnatých stavů. [56]

Identifikace původce onemocnění probíhá na základě specifické morfologie kolonií na různých agarech, barvicích vlastností u Gramova barvení nebo detekcí specifických antigenů. [56]

Mezi nejčastější patogeny, které způsobují meningitidu u novorozenců, patří *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* a bakterie rodu *Enterobacteriaceae*. U dospělých jsou to potom *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* (typ b), *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Listeria monocytogenes*. [57]

3.8.1 Gramovo barvení

Jedná se o empirickou metodu pro rozlišení bakteriálních druhů do dvou velkých skupin na základě chemických a fyzikálních vlastností jejich buněčných stěn. Gramovo barvení, které je základem diagnostiky infekčních onemocnění, je široce dostupné, levné a rychlé. [56, 58]

Mozkomíšní mok by měl být řádně odstředěn, aby se získal sediment pro daný postup. Správný nátěr by měl mít jednu vrstvu mikroorganismů, dostatečně hustou pro vizualizaci, ale zároveň tenkou, aby odhalila morfologické vlastnosti. Měla by se používat čistá sklíčka. [56]

Pozitivní a negativní kmeny kontroly kvality by měly být testovány společně s neznámými vzorky. Kromě známých referenčních kmenů pro *Neisseria meningitidis*,

Streptococcus pneumoniae a *Haemophilus influenzae* zahrnují referenční kmeny, které lze použít ještě *Staphylococcus aureus* pro gram-pozitivní koky a *Escherichia coli* pro gram–negativní tyčky. [56]

V poslední době je Gramovo barvení nahrazováno molekulárními testy. Stále má však své uplatnění při včasné diagnóze. Klinicky užitečný výsledek Gramova barvení poskytuje informace nejenom o tvaru a barvitelnosti buněčné stěny bakterií, ale správně provedené barvení a jeho vyhodnocení může poskytnout i informace k identifikaci na základě ukazatelů patogeneze a indikátorů infekční patologie specifické pro každý mikroorganismus. Dále také slouží k posouzení kvality klinického vzorku. [59]

Složení buněčné stěny u gram–pozitivních a gram–negativních bakterií je rozdílné. Při barvení preparátu krystalovou violetí a následným mořením pomocí jodu dojde ke vzniku komplexu. [60]

U gram–pozitivních bakterií nedojde k vymytí vzniklého komplexu pomocí organického rozpouštědla, protože jejich buněčná stěna obsahuje silnou vrstvu peptidoglykanu a kyselinu teichoovou. Proto jsou gram–pozitivní bakterie v preparátu modré až fialové. [60]

U gram–negativních bakterií se vzniklý komplex vymývá a dochází k jejich odbarvení. Pro zvýraznění se tedy dobarvují kontrastními barvivy jako je například safranin nebo karbolfuchsin. V preparátu mají potom gram–negativní bakterie červenou barvu. [60]

Nátěr se připraví nakapáním jedné až dvou kapek dobře promíchaného sedimentu mozkomíšního moku na sklíčko tak, aby kapka vytvořila jednu velkou mírně zakalenou suspenzi. Při přípravě nátěru z izolované kultury se dá na sklíčko jedna až dvě kapky destilované vody nebo fyziologického roztoku a vytvoří se mírně zakalená suspenze buněk. Vytvořená suspenze musí být před samotným barvením zcela suchá. Na suspenzi se nanese 95% methanol a po uplynutí dvou minut se opláchne destilovanou vodou. Místo methanolu se k fixaci může použít i protažení sklíčka nad plamenem. Sklíčko se však nesmí příliš zahřát, protože by došlo k poškození buněk. [56]

Poté se sklíčko nechá jednu minutu v krystalové violeti. Barva se opláchne destilovanou vodou a poté se na něj nanese jód, který působí jako mořidlo, protože váže fialové barvivo alkalických krystalů na buněčnou stěnu. Opět se opláchne destilovanou vodou. Dále se nátěr odbarvuje pomocí 95% ethanolu, dokud dochází k vymývání barvy (zhruba 5–10 sekund). Na závěr se na nátěr nanese na třicet sekund safranin nebo lze místo safraninu použít na deset až patnáct sekund karbolfuchsin. Sklíčko se opláchne destilovanou vodou, přebytečná voda se slije a nátěr se nechá uschnout na vzduchu. Zaschlý obarvený nátěr se poté pozoruje pod mikroskopem. Pozoruje se při zvětšení 1000x za použití olejové imerze. [56]

3.8.2 Bakteriální izolace

Kultivace mozkomíšního moku je považována za diagnostický referenční standard. Bakteriální izolace je důležitá pro testování citlivosti na antibiotika a také pro molekulární epidemiologii. [58]

Kultivace mozkomíšního moku vyžaduje minimálně den a více a má omezenou citlivost, která se pohybuje kolem 70–90 %. Na citlivost má vliv charakteristika pacienta, používaný laboratorní postup i kultivovaný patogen. Důležitou roli hrají i antibiotika, která jsou často podávána již před lumbální punkcí a značně snižují množství vykultivovaných kolonií. [58]

Pro očkování bakterií je vhodné zvolit správné kultivační médium, k čemuž nám pomůže předběžná diagnostika pomocí Gramova barvení. Pokud nebyly v nátěru pozorovány žádné mikroorganismy nebo není interpretace nátěru zcela jasná, je nutné inokulovat celou škálu médií. Mezi nejčastěji používaná média patří krevní agar, čokoládový agar a McConkey agar. Další doplňující půda může být například Löwenstein–Jensenova půda. [57]

Růst na McConkey agaru naznačuje přítomnost bakterií rodu *Enterobacteriaceae*. Bakterie by měli být dále identifikovány pomocí metod a medií doporučených pro enterické patogeny. [57]

Kolonie gram–pozitivních koků s úzkou zónou β –hemolýzy může být *Streptococcus agalactie*. Jeho přítomnost se potvrzuje reverzním CAMP testem. [57]

Ploché kolonie s konkávním středem a neúplnou hemolýzou jsou pravděpodobně *Streptococcus pneumoniae*. Pro jeho potvrzení se používá optochinový test. Kdy se na krevní agar hustě naočkuje čistá kultura podezřelého kmene a umístí se sem optochinový disk. Po inkubaci přes noc budou pneumokoky vykazovat kolem disku inhibiční zónu. [57]

Kolonie *Haemophilus influenzae* porostou pouze na čokoládovém agaru a jako satelitní kolonie v blízkosti stafylokokové čáry na krevním agaru. [57]

Za meningokoky lze považovat gram–negativní diplokoky, které rostou jak na krevním agaru, tak na agaru čokoládovém. Pro jejich potvrzení se používá oxidázový test. Bližší určení se provádí pomocí latexové aglutinace s příslušnými antiséry. [57]

Kolonie gram–pozitivních tyčinek s úzkou zónou β –hemolýzy na krevním agaru ukazuje na přítomnost *Listeria monocytogenes*. Její přítomnost se potvrzuje pomocí katalázové reakce nebo pomocí růstu a černém zbarvení na agaru obsahujícím žluč. [57]

Pokud je podezření na tuberkulózní meningitidu, měla by být naočkována Löwenstein–Jensenova půda. Inkubace v tomto případě trvá po dobu šesti týdnů. Během prvních dvou až tří dnů by se zkumavky s půdou měli inkubovat ve vodorovné poloze se šroubovým uzávěrem uvolněným na půl otáčky. Zkumavky by měly být kontrolovány na růst v týdenních intervalech. [57]

3.8.3 Latexová aglutinace

Tento test využívá sérum obsahující bakteriální protilátky nebo komerčně vyráběné antisérum namířené proti kapsulárním polysacharidům patogenů. [61]

Jedná se o rychlý a jednoduchý test. Neměl by být využíván pro rutinní diagnostické vyšetření. Jeho využití by mělo být hlavně pro detekci bakteriálních antigenů u vzorků, kde vyšlo Gramovo barvení negativní. Dále se může využít pro detekci bakterií náročných na kultivaci. [62]

Pro latexovou aglutinaci jsou využívány komerční soupravy. Při použití těchto testů by se měli přesně dodržovat pokyny výrobce obsažené v soupravě. Je velmi důležité, aby soupravy byly před použitím uchovávány v chladu, protože vysoké teploty mohou

vést k nespolehlivosti výsledků testu, ještě před datem expirace soupravy. Pro dosažení nejlepších výsledků je doporučeno testovat supernatant centrifugovaného vzorku co nejdříve. [56]

Provedení testu je velmi snadné. Na jednorázovou kartičku, která je v sadě nebo na podložní sklíčko, se dá kapka od každého činidla. Ke každé kapce latexového činidla se přidá 30–50 µl supernatantu mozkomíšního moku. Vzorky se ručně promíchají kývavým pohybem. Při míchání a dávkování činidel nesmí dojít ke křížové kontaminaci. Vizuální výsledek aglutinační reakce se hodnotí za jasného světla proti tmavému pozadí. U pozitivního výsledku dojde k aglutinaci latexových částic, což značí přítomnost vyšetřovaného antigenu. U negativního výsledku zůstává suspenze homogenní s mléčným zakalením. V takovém případě se ve vyšetřovaném vzorku daný antigen nevyskytuje. [56]

3.8.4 Imunochromatografické stanovení

Tento test je založen na vertikálním imunochromatografickém stanovení specifického antigenu v mozkomíšním moku a je vhodný pro okamžité testování odebraného vzorku, protože není potřeba předchozího odstředování. [56, 63]

Stanovení probíhá na proužku obsahujícím nitrocelulózovou membránu potaženou monoklonálními detekčními protilátkami, aby zachytili rozpustné polysacharidové antigeny specifické pro určité séro skupiny v mozkomíšním moku. [56]

Pokud je přítomen specifický antigen, vytvoří se mezi tímto antigenem a jemu příbuznou značenou protilátkou komplex. Vytvořený značený imunokomplex antigen-protilátka je pak vázán druhou protilátkou. [64]

Výsledky jsou ve formě viditelných proužků. U pozitivního výsledku dojde k vytvoření dvou viditelných proužků. V případě, že je vzorek negativní, nedojde ke vzniku značeného imunokomplexu antigen-protilátka. Vznikne tedy pouze jeden proužek, protože dojde k navázání detekční protilátky a druhé protilátky, která slouží jako kontrola. [64]

3.8.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR), funguje na principu amplifikace malého množství cílené DNA. V současné době se používá pro definitivní identifikaci hlavně virových infekcí CNS, jako je například enterovirová meningitida. Také se používá pro pomalu rostoucí bakterie, například *Mycobacterium tuberculosis*. [65]

V zásadě závisí technika PCR na cyklech s opakovaným zahříváním a ochlazováním pro denaturaci DNA a enzymatické replikace DNA. Používají se zde krátké fragmenty DNA, které se nazývají primery. Primery obsahují sekvence komplementární k cílové oblasti DNA a umožňují sekvenačně specifickou amplifikaci DNA. [66]

Metoda PCR zahrnuje tři kroky: denaturaci, hybridizaci a elongaci. [67]

V prvním kroku je DNA denaturována při vysokých teplotách (90–97 °C po dobu 20–30 sekund). K amplifikaci segmentu DNA pomocí PCR se vzorek nejprve zahřeje, aby DNA denaturovala nebo se rozdělila na dva kusy jednořetězcové DNA. [67]

K fázi hybridizace dochází při nižších teplotách (50–60 °C). To umožňuje primerům hybridizovat se svými příslušnými komplementárními templátovými vlákny. Nově vytvořený řetězec DNA primeru připojený k templátu se potom použije k vytvoření identických kopií z původních požadovaných vláken. DNA polymeráza přidává dostupné nukleotidy na konec primerů. [67]

Třetí fáze probíhá při přibližně 72 °C po dobu 2–5 minut. Primery, které dosedly na jednořetězcovou DNA tak vytvořili úsek, na který se může navázat DNA polymeráza. DNA polymeráza se naváže a začíná syntézu DNA. DNA polymeráza enzymaticky sestavuje a syntetizuje nový řetězec DNA komplementární k templátu DNA ve směru od 5'-konce k 3'-konci a dochází k elongaci. [67]

Obecně téměř všechny aplikace PCR používají tepelně stabilní DNA polymerázu (enzym zvaný Taq polymeráza). V důsledku toho je možné sériově opakovat postup tepelného cyklování, sestávající ze střídavých kroků ohřevu a chlazení. Taq polymeráza syntetizuje dva nové řetězce DNA, přičemž původní řetězec používá jako templát. Tento proces má za následek zdvojení původní DNA, přičemž každá z nových

molekul obsahuje jeden starý a jeden nový řetězec DNA. Pak lze každý z těchto řetězců použít k vytvoření dvou nových kopií. [66, 67]

Jak postup tepelného cyklování postupuje, syntetizovaný fragment DNA se sám používá jako templát pro replikaci a uvádí se do pohybu řetězová reakce, ve které je templát DNA exponenciálně amplifikován. [66]

Provedením simultánní detekce a identifikace specifického patogenu může být dosaženo za použití jediné efektivní platformy, kdy je použita sada primerů a sond, které mohou detekovat všechny běžné činitele způsobující nejčastější onemocnění CNS. [65]

3.8.5.1 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Normálně se PCR provádí ve zkumavce a po dokončení reakce se produkty reakce (amplifikované fragmenty DNA) analyzují a vizualizují gelovou elektroforézou. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce umožňuje analýzu produktů, zatímco reakce probíhá. Toho je dosaženo použitím různých fluorescenčních barviv, která reagují s amplifikovaným produktem a mohou být měřena pomocí přístroje. [66]

3.9 Speciální vyšetření

3.9.1 C–reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) je reaktant akutní fáze uvolňovaný z jater v reakci na zánět. Jeho zvýšenou hladinu můžeme nalézt již 6 hodin po prvním podnětu. Nejvyšších hodnot je dosaženo po 36 hodinách. [68]

Jednou z jeho hlavních funkcí je vázat se na fosfolipidové komponenty poškozených buněk nebo bakterií, což vede k aktivaci klasické cesty komplementu. [68]

Jak v séru, tak v mozkomíšním moku je využíván k rozlišení bakteriální meningitidy od aseptické nebo virové meningitidy. U bakteriální meningitidy mohou hodnoty CRP dosahovat ke koncentraci 40 mg/l a vyšší. [68]

Stanovení CRP vykazuje vysokou citlivost a specifitu. Přesto se nedoporučuje využít toto stanovení jako jediné kritérium k určení diagnózy. [68]

3.9.2 α -fetoprotein a lidský choriový gonadotropin

Nádory intrakraniálních zárodečných buněk patří mezi vzácné novotvary vyskytující se hlavně u dětí a dospívajících. Protože nádory mohou produkovat α -fetoprotein a/nebo lidský choriový gonadotropin (HCG), mohou jejich zvýšené hodnoty v mozkomíšním moku sloužit jako nádorové markery. Často se používají ke sledování odezvy na terapii. [69]

Protože tyto nádory často ovlivňují neurohypofýzu, mohou být zaměněny s tuberoinfundibulární hypofyzitidou a jinými supraselárními lézemi, což nepříznivě ovlivňuje nebo oddaluje správnou léčbu. Koncentrace HCG v séru může být někdy velmi nízká nebo těžko interpretovatelná, a proto je v takových situacích využíváno stanovení HCG v mozkomíšním moku. [70]

α -fetoprotein patří k nejpoužívanějším diagnostickým biomarkerům na základě svého použití při screeningu malignit. Jeho použití jako biomarkeru má však své omezení. Například hladina α -fetoproteinu není při HCG vždy zvýšená. Dále může být hladina α -fetoproteinu zvýšená během onemocnění jater, u kterého není přítomna rakovina. [71]

Koncentrace α -fetoproteinu a HCG se stanovuje pomocí imunoanalytických metod. [70]

3.9.3 Amyloid- β

Amyloid- β je produkován nepřetržitě jako rozpustný protein během normálního buněčného metabolismu a je vylučován do extracelulárního prostoru, a tedy i do mozkomíšního moku. Jedná se o produkt proteolytického štěpení a je odvozený od amyloidového prekurzorového proteinu. [72]

Jeho snížená koncentrace se nachází u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Toto snížení může být způsobeno depozicí amyloidu- β (konkrétně amyloidu- β_{42}) v senilních placích. Mozková depozice amyloidu- β_{42} pravděpodobně začíná již před tím, než se nemoc stane klinicky zjevná. Je považován za marker fáze, což znamená, že odráží přítomnost onemocnění v určitém stadiu. [72]

Nízké hladiny byly také nalezeny u demence s Lewyho tělísky a mírné až střední snížení bylo zjištěno u určitého procenta pacientů s frontotemporální demencí a vaskulární demencí. [72]

Stanovení tohoto amyloidu se provádí metodou ELISA. [72]

3.9.4 Tau–protein

Tau je mozkový fosfoprotein, který podporuje sestavení a stabilitu neuronálních axonů vazbou na mikrotubuly. [72]

Při Alzheimerově chorobě dochází k jeho hyperfosforylaci a začne tvořit neurofibrilární spleti. To vede k depozici neurofibrilárních plaků a dezintegraci mikrotubulů. Proto je jeho zvýšená koncentrace jeden z hlavních ukazatelů Alzheimerovy choroby. [72]

Zvýšená koncentrace se může vyskytovat i u jiných neurodegenerativních onemocnění jako je například Creutzfeldt–Jakobova nemoc. Dále může být u traumatického poškození mozku, mozkových komplikací po operaci aorty nebo při akutní ischemické mozkové příhodě. Stanovení se provádí metodou ELISA. [72]

3.9.5 Neuron specifická enoláza

Jedná se o dimerní izoenzym glykolytického enzymu enolázy a pochází z neuronálních cytoplazmatických a neuroendokrinních buněk. Tento izoenzym je vysoce rozpustný protein, který se po poranění tkáně snadno uvolňuje do mozkomíšního moku. Role neuron specifické enolázy v CNS není dosud zcela pochopena, ale některé studie poukázaly na její neuroprotektivní roli. Bylo zaznamenáno, že během vývoje CNS se podílí na tvorbě membránových struktur a podílí se na všech energeticky závislých buněčných procesech. Také je nezbytná pro udržení excitability neuronální membrány. [73]

Jelikož je neuron specifická enoláza nedílnou součástí cytoplazmy a dendritu neuronů, nachází se v mozkomíšním moku pouze v malých koncentracích. Zvýšená koncentrace je u ischemie mozku, kdy je funkční poškození nebo strukturální deficit buněčné membrány následováno časným uvolněním izoenzymu z poškozených neuronů. Stanovení se provádí pomocí imunohistochemických metod. [73]

4 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala vyšetřením likvoru. V první části jsem se zaměřila na fyziologii likvoru, jeho vznik, cirkulaci a resorpci. V práci je popsán odběr likvoru pomocí lumbální punkce. Správné provedení odběru hraje velkou roli při následných vyšetřeních. Při nesprávném odběru může dojít k znehodnocení vzorku krví, což je nežádoucí hlavně pokud je vzorek vyšetřován při podezření na SAK. Kromě odběru jsou zde popsány indikace a kontraindikace k samotnému odběru, správný transport a následné uchování jednotlivých vzorků.

Druhá část práce je věnována jednotlivým vyšetřením. Je zde popsáno fyzikální vyšetření, které se provádí hned po odběru a slouží spíše jako vyšetření podpůrné. U chemického vyšetření jsou popsána stanovení základních parametrů likvoru, jako je například koncentrace glukózy, laktátu nebo celkové bílkoviny. Změny v koncentracích těchto látek, ukazují na probíhající patologický proces, neslouží však k přesnému určení diagnózy. Na základě výsledků z chemického vyšetření se poté provádí další podrobnější vyšetření. Svou roli hraje i vyšetření protilátek, které nejen vypovídá o probíhajícím zánětu, ale také slouží k hodnocení propustnosti hematoencefalické bariéry. O zánětu nás dále informuje vyšetření mikrobiologické a cytologické. Z cytologického vyšetření získáváme podrobnější informace o daném zánětu, zatímco pomocí mikrobiologického vyšetření zjišťujeme jeho příčinu.

5 Seznam použitých zdrojů

- [1] HRISHI A a M SETHURAMAN. Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis and Interpretation in Neurocritical Care for Acute Neurological Conditions. *Indian Journal of Critical Care Medicine : Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine* [online]. 2019 [cit. 2020-03-18], **23**(2), 115–119. ISSN 0972-5229. Dostupné z: doi:10.5005/jp-journals-10071-23187
- [2] TEUNISSEN C. E., C. VERHEUL a E. A. J. WILLEMSE. The use of cerebrospinal fluid in biomarker studies. In: et al, ed. *Handbook of Clinical Neurology* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [cit. 2020-07-04], Cerebrospinal Fluid in Neurologic Disorders, 3–20. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804279-3.00001-0
- [3] DEISENHAMMER F, A. BARTOS, R. EGG et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *European Journal of Neurology* [online]. 2006, [cit. 2020-07-09] **13**(9), 913–922. ISSN 1468-1331. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01493.x
- [4] MERKUNOVÁ A a M OREL. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1521-6.
- [5] ČIHÁK R, M GRIM, R DRUGA et al. *Anatomie 3*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-1132-X.
- [6] SAKKA L, G COLL a J CHAZAL. *Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid*. - PubMed - NCB/ [online]. [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22100360>
- [7] NEVŠÍMALOVÁ S, J TICHÝ a E RŮŽIČKA. *Neurologie*. Praha: Galén Karolinum, 2002. ISBN 978-80-7262-160-6.
- [8] BROWN P. D, S. L. DAVIES, T. SPEAKE et al. Molecular Mechanisms of Cerebrospinal Fluid Production. *Neuroscience* [online]. 2004, [cit. 2020-03-11] **129**(4), 957–970. ISSN 0306-4522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2004.07.003
- [9] HIRSCH N. Cerebrospinal fluid and its physiology. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. 2013, [cit. 2020-03-11] **14**(9), 379–380. ISSN 1472-0299. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpaic.2013.06.001
- [10] TELANO L.N a S BAKER. Physiology, Cerebral Spinal Fluid (CSF). In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519007/>
- [11] DANEMAN R a A PRAT. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2015, [cit. 2020-03-11] **7**(1). ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a020412

- [12] MILLER A.D a J.F ZACHARY. Nervous System. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease (Sixth Edition)* [online]. Missouri: Mosby, 2017 [cit. 2020-03-11], 805–907. ISBN 978-0-323-35775-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-35775-3.00014-X
- [13] TROJAN S. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2003. ISBN 978-80-247-0512-5.
- [14] DEISENHAMMER F, F SELLEBJERG, CH.E TEUNISSEN et al. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*. B.m.: Springer, 2015. ISBN 978-3-319-01225-4.
- [15] DEISENHAMMER F, TEUNISSEN CH.E, HAYRETTIN T et al. *Cerebrospinal Fluid in Neurologic Disorders*. B.m.: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-804324-0.
- [16] ALSUWAILEM M.H, A.H ALKHATEM a A.A ALSHABIB. Lumbar Puncture : Indications, Complications, Technique and CSF Analysis in Pediatric Patients. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* [online]. 2018, [cit. 2020-03-11] **70**(4), 638–643. ISSN 16872002, 20907125. Dostupné z: doi:10.12816/0043818
- [17] RIOND B., F. STEFFEN, O. SCHMIED et al. Total protein measurement in canine cerebrospinal fluid: agreement between a turbidimetric assay and 2 dye-binding methods and determination of reference intervals using an indirect a posteriori method. *Veterinary Clinical Pathology* [online]. 2014, [cit. 2020-04-01] **43**(1), 78–88. ISSN 1939-165X. Dostupné z: doi:10.1111/vcp.12107
- [18] BABAPOUR M, F.H BOUWMAN, R.E.R SLOT et al. Lumbar puncture in patients with neurologic conditions. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* [online]. 2017, [cit. 2020-03-11] **8**, 108–110. ISSN 2352-8729. Dostupné z: doi:10.1016/j.dadm.2017.04.008
- [19] HAYASHI N, M MATSUMAE, S YATSUSHIRO et al. Quantitative Analysis of Cerebrospinal Fluid Pressure Gradients in Healthy Volunteers and Patients with Normal Pressure Hydrocephalus. *Neurologia medico-chirurgica* [online]. 2015, [cit. 2020-04-01] **55**(8), 657–662. ISSN 0470-8105. Dostupné z: doi:10.2176/nmc.oa.2014-0339
- [20] KARIMI-BUSHERI F. *Biobanking in the 21st century*. B.m.: Springer, 2015. ISBN 978-3-319-20579-3.
- [21] DOHERTY C.M a R.B FORBES. Diagnostic Lumbar Puncture. *The Ulster Medical Journal*. 2014, **83**(2), 93–102. ISSN 0041-6193.
- [22] PINTO V.L, P TADI a A ADEYINKA. Increased Intracranial Pressure. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482119/>

- [23] KALVACH P. *Mozkové ischemie a hemoragie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2010. ISBN 978-80-247-2765-3.
- [24] IRANI D.N, ed. *Cerebrospinal fluid in clinical practice*. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2009. ISBN 978-1-4160-2908-3.
- [25] DUGAS C a P.C BOLLU. Xanthochromia. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526048/>
- [26] ESCOTA G, J COMO a H KESSLER. The Green Cerebrospinal Fluid. *The American Journal of Medicine* [online]. 2011, [cit. 2020-03-11] **124**(5), 411–413. ISSN 0002-9343, 1555-7162. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2011.01.002
- [27] Pandys reaction Definition and Examples - Biology Online Dictionary. *Biology Articles, Tutorials & Dictionary Online* [online]. 2019 [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: <https://www.biologyonline.com/dictionary/pandys-reaction>
- [28] MASOPUST J. *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-649-3.
- [29] CHEESBROUGH M. *District laboratory practice in tropical countries*. 2. vyd. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. Tropical health technology. ISBN 978-0-511-58130-4.
- [30] NAYAK S a B ACHARJYA. VDRL Test and its Interpretation. *Indian Journal of Dermatology* [online]. 2012, [cit. 2020-04-01] **57**(1), 3–8. ISSN 0019-5154. Dostupné z: doi:10.4103/0019-5154.92666
- [31] LEEN W.G, M.A WILLEMSSEN, R.A WEVERS a ET AL. Cerebrospinal Fluid Glucose and Lactate: Age-Specific Reference Values and Implications for Clinical Practice. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(8) [cit. 2020-03-30]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0042745
- [32] WELCH H a R HASBUN. Lumbar puncture and cerebrospinal fluid analysis. In: *Handbook of Clinical Neurology* [online]. B.m.: Elsevier, 2010 [cit. 2020-03-28], Bacterial Infections of the Central Nervous System, 31–49. Dostupné z: doi:10.1016/S0072-9752(09)96003-1
- [33] VERBEEK M.M, W.G LEEN, M.A WILLEMSSEN et al. Hourly analysis of cerebrospinal fluid glucose shows large diurnal fluctuations. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [online]. 2016, [cit. 2020-03-25] **36**(5), 899–902. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1177/0271678X16637612
- [34] AULICKÁ Š, K ČESKÁ a H OŠLEJŠKOVÁ. Syndrom GLUT-1 deficiencie – expandující klinické spektrum léčitelného onemocnění. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2018, **81**(2), 171–173.

- [35] ARNESON W.L a J.M BRICKELL. *Clinical Chemistry: A Laboratory Perspective*. B.m.: F.A. Davis, 2007. ISBN 978-0-8036-1861-9.
- [36] LARSON D. *Clinical Chemistry - E-Book: Fundamentals and Laboratory Techniques*. B.m.: Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN 978-0-323-29253-5.
- [37] HUY N.T, N.T.H THAO, D.T.N DIEP et al. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis. *Critical Care* [online]. 2010, [cit. 2020-03-30] **14**(6), 240. ISSN 1364-8535. Dostupné z: doi:10.1186/cc9395
- [38] MALIK M.A, M NAZIR, W.A WANI a et al. *Cerebrospinal fluid lactate: a differential biomarker for bacterial and viral meningitis in children | Elsevier Enhanced Reader* [online]. 2018 [cit. 2020-03-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2017.03.007
- [39] ALBANESE M, S ZAGAGLIA, D LANDI et al. Cerebrospinal fluid lactate is associated with multiple sclerosis disease progression. *Journal of Neuroinflammation* [online]. 2016, [cit. 2020-03-30] **13**(1), 36. ISSN 1742-2094. Dostupné z: doi:10.1186/s12974-016-0502-1
- [40] TUMANI H a H HEGEN. CSF Total Protein. In: *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015 [cit. 2020-04-01], 107–109. ISBN 978-3-319-01225-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-01225-4_8
- [41] SHEN CH. Quantification and Analysis of Proteins. In: *Diagnostic Molecular Biology* [online]. B.m.: Academic Press, 2019 [cit. 2020-04-01], 187–214. ISBN 978-0-12-802823-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802823-0.00008-0
- [42] WOOD M. J, G. DIMESKI a A. M. NOWITZKE. CSF spectrophotometry in the diagnosis and exclusion of spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Journal of Clinical Neuroscience* [online]. 2005, [cit. 2020-03-31] **12**(2), 142–146. ISSN 0967-5868. Dostupné z: doi:10.1016/j.jocn.2004.05.009
- [43] BEETHAM R. CSF spectrophotometry for bilirubin – why and how? *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2009, [cit. 2020-03-31] **69**(1), 1–7. ISSN 0036-5513, 1502-7686. Dostupné z: doi:10.1080/00365510802651866
- [44] ECKERSALL D.P. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: J.J KANEKO, J.W HARVEY a et al, ed. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)* [online]. San Diego: Academic Press, 2008 [cit. 2020-04-20], s. 117–155. ISBN 978-0-12-370491-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-370491-7.00005-2
- [45] AKAISHI T, K NARIKAWA, Y SUZUKI a et al. Importance of the quotient of albumin, quotient of immunoglobulin G and Reibergram in inflammatory

- neurological disorders with disease-specific patterns of blood–brain barrier permeability. *Neurology and Clinical Neuroscience* [online]. 2015, **3**(3), 94–100. ISSN 2049-4173. Dostupné z: doi:10.1111/ncn3.158
- [46] MONTENEGRO P.A a S.M JUÁREZ. *The Blood-Brain Barrier: New Research* [online]. Hauppauge: Nova Science Publishers, Incorporated, 2012 [cit. 2020-04-20]. ISBN 978-1-62100-812-5. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/upce-ebooks/detail.action?docID=3021263>
- [47] KARAMEHIC J, M DELICSARAC, D SUBASIC et al. Reibergram and Oligoclonal Bands in Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Medical Archives* [online]. 2012, [cit. 2020-04-20] **66**(4), 222. ISSN 0350-199X. Dostupné z: doi:10.5455/medarh.2012.66.222-225
- [48] JESSE S, J BRETTSCHEIDER, S SÜSSMUTH et al. Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases. *Journal of neurology* [online]. 2010 [cit. 2020-04-20], **258**, 1034–41. Dostupné z: doi:10.1007/s00415-010-5876-x
- [49] NAKASHIMA I, K FUJIHARA, S SATO a et al. Oligoclonal IgG bands in Japanese patients with multiple sclerosis. A comparative study between isoelectric focusing with IgG immunofixation and high-resolution agarose gel electrophoresis. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 2005, [cit. 2020-04-20] **159**(1), 133–136. ISSN 0165-5728. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2004.09.011
- [50] BONNAN M Intrathecal Immunoglobulin Synthesis in MS—A Complete Reappraisal. *Trending Topics in Multiple Sclerosis* [online]. 2016 [cit. 2020-07-09]. Dostupné z: doi:10.5772/63201
- [51] PRESSLAUER S, D MILOSAVLJEVIC, W HUEBL et al. Kappa Free Light Chains: Diagnostic and Prognostic Relevance in MS and CIS. *PLoS ONE* [online]. 2014, [cit. 2020-07-09] **9**(2) . ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0089945
- [52] ZEMAN D, P KUŠNIEROVÁ, P HRADÍLEK a et al. Oligoclonal IgG and free light chains – comparison between agarose and polyacrylamide isoelectric focusing. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2019, [cit. 2020-04-26] **82/115**(1), 68–75. ISSN 12107859, 18024041. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn201968
- [53] STRIK H, H LUTHE, I NAGEL a ,ET AL. Automated cerebrospinal fluid cytology: limitations and reasonable applications. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. 2005, **27**(3), 167–173.
- [54] KELBICH P, P ADAM, O SOBEK et al. Základní vyšetření likvoru v diagnostice postižení centrálního nervového systému. *Neurologie pro praxi*. 2009, **10**(5), 285–289. ISSN 12131814, 18035280.

- [55] ADAMM P, D DOLEŽIL, P KELBICH et al. Speciální likvorologie: diagnostické možnosti cytologie mozkomíšního moku : návrh klasifikace cytologických nálezů, klinický přínos a meze používaných metodik. *Labor aktuell*. 2009, (3), 9–14. ISSN 1214-7672.
- [56] CASTILLO D, B HARCOURT, C HATCHER et al. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae* [online]. 2019 [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt06-culture-id.html>
- [57] VANDEPITTE J, K ENGBAEK, P PIOT et al. *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology* [online]. Albany: World Health Organization, 2003 [cit. 2020-06-28]. ISBN 978-92-4-068011-1. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/upce-ebooks/detail.action?docID=284672>
- [58] WU H.M, S.M CORDEIRO, B.H HARCOURT et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae meningitis diagnosis. *BMC Infectious Diseases* [online]. 2013, [cit. 2020-06-28] **13**(1), 26. ISSN 1471-2334. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2334-13-26
- [59] THOMSON R.B. Commentary: One Small Step for the Gram Stain, One Giant Leap for Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2016, [cit. 2020-06-28] **54**(6), 1416–1417. ISSN 0095-1137, 1098-660X. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00303-16
- [60] OTO M a M ANNIKA. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum Press, 2014. ISBN 978-80-246-2414-3.
- [61] BROUWER M.C, A.R TUNKEL a D BEEK. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2010, [cit. 2020-06-28] **23**(3), 467–492. ISSN 0893-8512, 1098-6618. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00070-09
- [62] MOHAMMADI S.F, A.B PATIL, S.D NADAGIR a et al. Diagnostic value of latex agglutination test in diagnosis of acute bacterial meningitis. *Annals of Indian Academy of Neurology* [online]. 2013, [cit. 2020-06-28] **16**(4), 645–649. ISSN 0972-2327. Dostupné z: doi:10.4103/0972-2327.120491
- [63] YANSOUNI C.P, E BOTTIEAU, P LUTUMBA a et al. Rapid diagnostic tests for neurological infections in central Africa. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2013, **13**(6), 546–558. ISSN 1473-3099. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(13)70004-5
- [64] OSEI-BIMPONG A a J BURTHEM. Supplementary Techniques Including Blood Parasite Diagnosis. In: *Dacie and Lewis Practical Haematology* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [cit. 2020-06-27], s. 93–111. ISBN 978-0-7020-6696-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-6696-2.00006-0

- [65] ROTHMAN R, P RAMACHANDRAN, S YANG et al. Use of Quantitative Broad-based Polymerase Chain Reaction for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid. *Academic Emergency Medicine* [online]. 2010, [cit. 2020-06-28] **17**(7), 741–747. ISSN 1553-2712. Dostupné z: doi:10.1111/j.1553-2712.2010.00790.x
- [66] TAKAHASHI T, M TAMURA a T TAKASU. The PCR-Based Diagnosis of Central Nervous System Tuberculosis. *Tuberculosis Research and Treatment* [online]. 2012 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1155/2012/831292
- [68] SCHELD W.M, R.J WHITLEY a CH.M MARRA. *Infections of the Central Nervous System* [online]. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2014 [cit. 2020-07-03]. ISBN 978-1-4963-0595-4. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/upce-ebooks/detail.action?docID=2031632>
- [68] SCHELD W.M, R.J WHITLEY a CH.M MARRA. *Infections of the Central Nervous System* [online]. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2014 [cit. 2020-07-03]. ISBN 978-1-4963-0595-4. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/upce-ebooks/detail.action?docID=2031632>
- [69] SEREGNI E., M. MASSIMINO, S.N MOLTENI a et al. Serum and Cerebrospinal Fluid Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and alpha-fetoprotein (AFP) in Intracranial Germ Cell Tumors. *The International Journal of Biological Markers* [online]. 2002, [cit. 2020-07-03] **17**(2), 112–118. ISSN 1724-6008. Dostupné z: doi:10.1177/172460080201700206
- [70] GONZÁLEZ-SÁNCHEZ V, O MORENO-PÉREZ, P.S PELLICER a et al. Validation of the human chorionic gonadotropin immunoassay in cerebrospinal fluid for the diagnostic work-up of neurohypophyseal germinomas. *Annals of Clinical Biochemistry* [online]. 2011, [cit. 2020-07-03] **48**(5), 433–437. ISSN 1758-1001. Dostupné z: doi:10.1258/acb.2010.010074
- [71] SPEAR B. T. Alpha-Fetoprotein. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* [online]. San Diego: Academic Press, 2013 [cit. 2020-07-03], 89–91. ISBN 978-0-08-096156-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00039-5
- [72] GALIMBERTI D a E SCARPANI. *Biomarkers for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease* [online]. New York: Nova Science Publishers, Incorporated, 2008 [cit. 2020-07-03]. ISBN 978-1-60876-317-7. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/upce-ebooks/detail.action?docID=3018476>
- [73] SELAKOVIC V., R. RAICEVIC a L. RADENOVIC. The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *Journal of Clinical Neuroscience* [online]. 2005, [cit. 2020-07-03] **12**(5), 542–547. ISSN 0967-5868. Dostupné z: doi:10.1016/j.jocn.2004.07.019