

LIKVOROVÝ PROFIL U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY MOZKOMÍŠNÍ

MUDr. Jana Bednářová¹, doc. MUDr. Pavel Adam, CSc.²

¹Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno, pracoviště Bohunice

²OKBHI, Nemocnice Na Homolce, Praha

Vyšetření mozkomíšního moku (likvoru) je základním vyšetřením v diagnostice sclerosis multiplex (SM, roztroušená skleróza mozkomíšní). Zavedení nových likvorologických metod v posledním desetiletí výrazně rozšířilo diferenciálně diagnostické možnosti likvorové analýzy. Kromě známých metod, jakými je kvantitativní a kvalitativní cytologie, jsou popsány metody detekce intratekální syntézy imunoglobulinů, stanovení oligoklonálních IgG pásů a zhodnocení stavu hematolikvorové bariéry. Podrobněji je rozebrána tzv. MRZ reakce. Jde o specifickou imunitní reakci v likvoru vyskytující se u chronických zánětlivých autoimunitních onemocnění nervového systému, především u pacientů se sclerosis multiplex.

Klíčová slova: intratekální syntéza, MRZ reakce, hematolikvorová bariéra, cytologie, oligoklonální IgG pásy.

Úvod

Likvorová analýza je jednou ze základních metod v diagnostice neurologických onemocnění. Sama o sobě nevede ke stanovení definitivní diagnózy, avšak společně s moderními zobrazovacími metodami a zejména s klinickým nálezem tvoří nedílnou součást neurologické diagnostiky. V posledních letech zaznamenala likvorologie řadu podstatných změn. Nová koncepce funkce hematolikvorové bariéry (9), rozšířené poznatky z oblasti neuroimunologie (11), metody umožňující stanovení intratekální syntézy celkových i specifických protilátek a stanovení oligoklonálních IgG pásů upevnily klinický význam likvorologického vyšetření (13). V případě sclerosis multiplex zahrnuje likvorová analýza následující vyšetření: kvantitativní a kvalitativní cytologii, zhodnocení funkce hematolikvorové bariéry, stanovení oligoklonálních IgG pásů, kvantitativní stanovení intratekální IgG, IgM, IgA syntézy a vyšetření tzv. MRZ reakce, tedy stanovení intratekální syntézy specifických IgG protilátek proti neurotrofním virům spalniček, zarděnek a planých neštovic.

Cytologie

Cytologické vyšetření je základním vyšetřením likvoru. Standardně prováděnou kvantitativní cytologii, tj. stanovení počtu buněčných elementů v likvoru, je nezbytné doplnit kva-

litativní cytologií, která poskytuje informace o typu a četnosti buněk přítomných v likvoru.

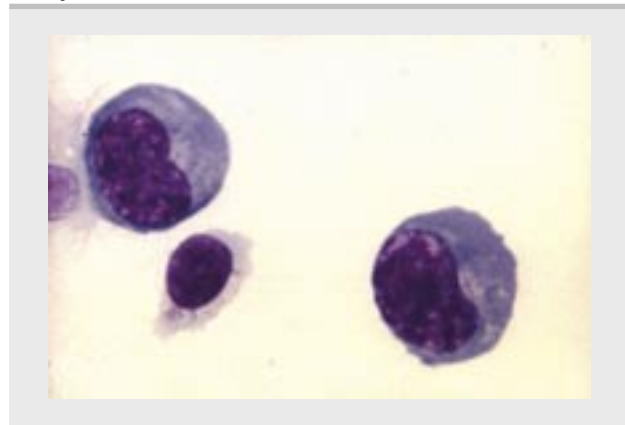
a) Kvantitativní cytologie: počet buněčných elementů je stanoven ve Fuchs-Rosenthalově komůrce o objemu 2,88 μ l. Dřívější horní hranice normy udávaná ve zlomku $\frac{1}{5}$ je nahrazena stanovením počtu buněčných elementů v objemu 1 μ l, což představuje horní hranici normy 5 elementů/ μ l. U diagnózy sclerosis multiplex nacházíme v cytologickém obraze obvykle mírnou pleocytózu, tzn. zvýšený počet buněk, avšak normální počet buněčných elementů tuto diagnózu nevylučuje. Pouze 2% pacientů se sclerosis multiplex mají počet buněk vyšší než 40/ μ l (12). Počet buněk vyšší než 90/ μ l tuto diagnózu prakticky vylučuje (10).

b) Kvalitativní cytologie: v lumbálním likvoru se za normálních okolností vyskytují dva buněčné druhy – lymfocyty (70%) a monocyty (30%). Pro diagnózu sclerosis multiplex je typická přítomnost plazmocytů a aktivovaných B-lymfocytů zpravidla nepřesahujících 5% v diferenciálním cytologickém obraze. Plazmatické buňky jsou posledním diferenciačním stupněm vývoje B-lymfocytů produkujícím protilátky. Morfologicky jsou charakterizovány excentricky uloženým jádrem s kondenzovaným chromatinem, perinukleárním projasněním a bazofilní cytoplazmou. Aktivované B-lymfocyty představují vývojový mezistupeň mezi B-lymfocylem a plazmocylem (14).

Hematolikvorová bariéra

Hematolikvorová bariéra je tvořená chorioideálním plexem a endotelem kapilár. Dominantním transportním mechanismem přes hematolikvorovou bariéru je difuze proteinů ze séra do likvoru. Dle fyzikálních zákonů difuze prostupují větší molekuly pomaleji (např. IgM) a vytvářejí tak strmější hematolikvorový gradient než molekuly menší (např. IgG a albumin). Zvýšení koncentrace určitého proteinu v séru má za následek zvýšení koncentrace téhož proteinu v likvoru, avšak gradient vyjádřený poměrem koncentrace proteinu v likvoru a séru zůstává konstantní. Při poruše hematolikvorové bariéry dochází k patologickému zvýšení koncentrace proteinu v likvoru. Stav hematolikvorové bariéry je běžně vyjadřován tzv. albuminovým koncentračním kvocientem (Qalb), což je poměr koncentrace albuminu v likvoru a v séru (1). Koncentrace

Obrázek 1. Cytologický nálezy u sclerosis multiplex – asi v 60% případů nacházíme lehkou lymfocytární pleocytózu s přítomností plazmocytů morfologicky charakterizovaných zhrubělým chromatinem, perinukleárním projasněním a bazofilní cytoplazmou. Tyto buňky jsou zodpovědné za intratekální produkci imunoglobulinů.



Tabulka 1. Věkově vázané referenční hodnoty Q alb

	do 15 let	do 40 let	do 60 let
Q alb $\times 10^{-3}$	≤ 5	$\leq 6,5$	≤ 8

albuminu jsou stanoveny nefelometricky. Zvýšená koncentrace albuminu v likvoru svědčí vždy pro dysfunkci hematolickvorové bariéry, jelikož albumin pochází výhradně ze séra. Referenční hodnoty Qalb jsou různé pro jednotlivé věkové skupiny. U sclerosis multiplex je funkce hematolickvorové bariéry obvykle normální nebo pouze lehce porušena (15).

Oligoklonální IgG pásy

Stanovení oligoklonálních IgG pásů v séru a likvoru metodou izoelektrické fokusace s následným imunoblotem a enzymovým barvením umožňuje kvalitativní vyjádření intratekální IgG syntézy (1, 7). Mezinárodní konsenzus pro detekci oligoklonálních IgG pásů rozlišuje pět vzorců oligoklonálního IgG při párové analýze séra a likvoru (1):

typ 1: normální likvor

typ 2: oligoklonální IgG pásy pouze v likvoru

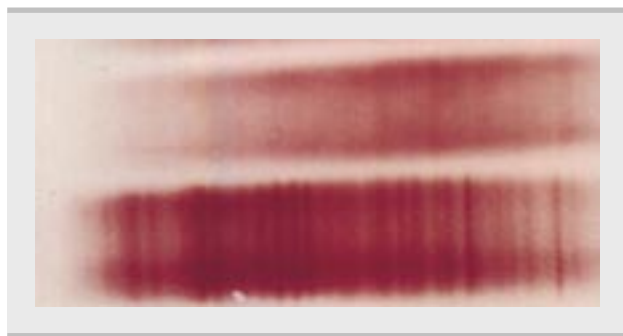
typ 3: oligoklonální IgG pásy v likvoru a navíc identické pásy v likvoru a séru

typ 4: identické oligoklonální IgG pásy v likvoru a séru

typ 5: monoklonální pásy v likvoru a séru

Lokalizace a počet pásů nemají obecně diferenciativní diagnostický význam, většinou se však nacházejí v alkalické oblasti elektroforetického pole (10). U pacientů s diagnózou sclerosis multiplex je stanovení oligoklonálních IgG pásů pozitivní v 98 % vyšetřených vzorků likvoru. Nejčastěji se u sclerosis multiplex vyskytuje typ 2, tj. přítomnost oligoklonálních IgG pásů pouze v likvoru, méně často typ 3, tj. přítomnost oligoklonálních IgG pásů v likvoru a navíc identické pásy v likvoru a séru. Přítomnost oligoklonálních IgG pásů není pro sclerosis multiplex specifická, vyšetření je obecně pozitivní u autoimunitních orgánových a systémových onemocnění a u infekčních procesů (16).

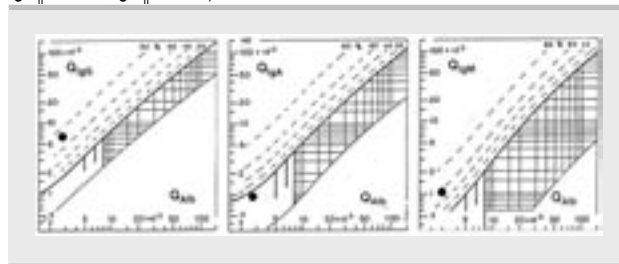
Obrázek 2. Oligoklonální IgG pásy v likvoru – typ 2 dle Mezinárodního konsenzu. Jsou charakterizovány přítomností pásů pouze v likvoru predilekčně v alkalické oblasti.



Intratekální IgG, IgM, IgA syntéza

Patologické zvýšení koncentrace proteinu v likvoru je způsobeno buď dysfunkcí hematolickvorové bariéry (viz výše) a/nebo intratekální syntézou daného proteinu. Intratekální syntéza pochází z perivaskulárních infiltrátů proliferačních B-lymfocytů (10). Pro výpočet intratekální produkce imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM) bylo v minulosti navrženo několik formulí s lineární závislostí mezi poruchou hematolickvorové bariéry a stupněm intratekální syntézy. Mezi nejznámější

Obrázek 3. Reiberův diagram. V uvedeném grafu je charakteristický obraz intratekální produkce imunoglobulinů u sclerosis multiplex s dominantní IgG syntézou, s přítomností IgM syntézy a s negativní IgA syntézou (v tomto případě $IgG_{IF} = 73\%$, $IgM_{IF} = 56\%$).



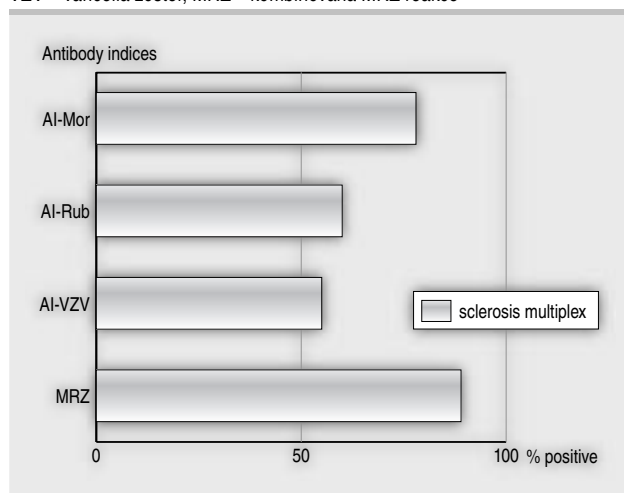
patří Linkův index a Tourtellotova formule (6, 17). Obě tyto formule jsou však zatíženy rizikem falešně pozitivních nálezů při středním a vyšším stupni poruchy hematolickvorové bariéry. V současnosti je nej přesnější metodou ke stanovení intratekální syntézy, bariérové dysfunkce a charakteristické imunoglobulinové odpovědi u jednotlivých neurologických chorob využití Reiberova diagramu, z něhož je patrné, zda se jedná o normální nález, dysfunkci hematolickvorové bariéry, nebo intratekální syntézu s přítomností nebo bez přítomnosti dysfunkce hematolickvorové bariéry. Koncentrace imunoglobulinů v séru a likvoru jsou stanoveny nefelometricky, popř. metodou ELISA. Množství intratekálně syntetizovaných imunoglobulinů (Ig) je vyjádřeno matematicky buď jako množství Ig přidané k likvorové koncentraci Ig (Ig_{loc} v mg/l), nebo jako intratekální frakce (Ig_{IF} v %) srovnávající Ig_{loc} vzhledem k celkové koncentraci Ig v likvoru. U diagnózy sclerosis multiplex je frekvence výskytu intratekální syntézy jednotlivých tříd imunoglobulinů při kvantitativním vyjádření následující: intratekální IgG syntéza v 72 %, IgM syntéza ve 20 % a IgA v 9 % případů (8).

MRZ reakce

Intratekální syntéza specifických antivirových protilátek třídy IgG proti neurotropním virům spalniček (morbili – M), zarděnek (rubeola – R) a viru planých neštovic (varicella zoster – Z) je označována jako MRZ reakce. Koncentrace jednotlivých specifických protilátek v séru a likvoru jsou stanoveny metodou ELISA. Intratekální syntéza specifických protilátek je vyjádřena matematicky tzv. specifickým protilátkovým indexem – AI (antibody index). Protilátkový index (AI) umožňuje odlišit patologickou, intratekálně syntetizovanou frakci specifických protilátek v likvoru od specifických protilátek sérového původu přestupujících přes porušenu hematolickvorovou bariéru. Teoreticky je normální hodnota AI = 1,0. Referenční rozmezí je vymezeno intervalem 0,7–1,3. Hodnoty AI > 1,4 jsou patologické a indikují intratekální syntézu specifických protilátek (2).

MRZ reakce je specifická pro chronická autoimunitní závažná onemocnění nervového systému, především sclerosis multiplex, dokonce i v době prvních klinických příznaků. Asi 84–94 % pacientů se sclerosis multiplex má pozitivní kombinovanou MRZ reakci, tj. protilátkovou intratekální syntézu (AI > 1,4) proti jednomu, dvěma nebo třem z uvedených neurotropních virů. Frekvence positivity jednotlivých protilátek je

Graf 1. Výskyt MRZ reakce u sclerosis multiplex. Mor – morbilli, Rub – rubeola, VZV – varicella zoster, MRZ – kombinovaná MRZ reakce



u spalniček 78 %, u zarděnek 60 % a u VZV 55 %. Kombinace M + R, M + Z, R + Z nebo M + R + Z prakticky vylučují jiné, tzn. akutní infekční onemocnění, resp. koincidenci dvou či více akutních infekčních onemocnění, a jsou důkazem přítomnosti chronického autoimunitního onemocnění nervového systému. U jiných neurologických onemocnění, např. u neuroborreliózy, neurosyfilis nebo neurotuberkulózy, je frekvence výskytu kombinované MRZ reakce nižší než 0,1 %, s omezením na výjimečné případy chronického průběhu onemocnění (10).

Diagnostický význam přítomnosti MRZ reakce v případě podezření na sclerosis multiplex je odlišný od přítomnosti oligoklonálního IgG. Nepřítomnost oligoklonálních IgG pásů je významným diferenciálně diagnostickým parametrem svědčícím v neprospěch pozitivní diagnózy sclerosis multiplex, avšak oligoklonální IgG pásy jsou pro sclerosis multiplex zcela nespecifické. Pozitivní MRZ reakce již v období prvních

často monosymptomatických příznaků svědčí pro chronický autoimunitní proces. MRZ reakce však také není specifická pro sclerosis multiplex a může být přítomna i u jiných autoimunitních onemocnění postihujících nervový systém, např. u lupus erythematosus, Sjogrenova syndromu nebo Wegenerovy granulomatózy (5).

Závěr

Detekce oligoklonálních IgG pásů přináší pozitivní výsledky v 98 % vyšetřených vzorků likvoru u pacientů s diagnózou sclerosis multiplex. Intratekální syntéza jednotlivých tříd imunoglobulinů vyjádřená kvantitativně je přítomna u IgG v 72 %, u IgA v 9 % a u IgM ve 20 %. Uvedená kvalitativní a kvantitativní stanovení intratekální syntézy zejména třídy IgG jsou v případě sclerosis multiplex vysoce senzitivní, avšak zcela nespecifická. Zavedení specifické MRZ reakce do likvorologické diagnostiky umožňuje detekovat chronická autoimunitní onemocnění CNS, především sclerosis multiplex, již v době prvních klinických příznaků (5). Etiologie a patofyziologie MRZ reakce nebyla dosud plně objasněna. Ve tkáních nervového systému nebyla nikdy prokázána perzistence antigenů (např. viru spalniček) (4). Přítomnost MRZ reakce je vysvětlována moderní teorií imunitní sítě, ve které každá imunologická reakce indukovaná konkrétním antigenem postihuje celou imunitní síť (18). Kromě specifických protilátek proti vyvolávajícímu agens je zvýšena rovněž produkce mnoha dalších protilátek a autoprotilátek – tzv. polyspecifická imunitní odpověď. Polyspecifická protilátková odpověď může v CNS perzistovat i tehdy, chybí-li korespondující antigen (12). Diagnostický význam MRZ reakce je stále více akceptován (3). V případě sclerosis multiplex MRZ reakce svou specifiitou vhodně doplňuje vysoce senzitivní, avšak méně specifické stanovení oligoklonálních IgG pásů, a tím výrazně rozšiřuje diferenciálně diagnostické možnosti likvorové analýzy.

Literatura

- Andersson M, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 897–902.
- Felgenhauer K, Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Invest* 1992; 70: 28–37.
- Ferrante P, Mancuso R. CSF Analysis in Multiple Sclerosis. Milano, Springer Verlag 1996: 1–14.
- Godec MS, et al. Absence of measles, mumps and rubella viral genomic sequences from multiple sclerosis brain tissue by polymerase chain reaction. *Ann Neurol* 1992; 32: 401–404.
- Graef IT, Henze I, Reiber H. Polyspezifische Immunreaktion im ZNS bei Autoimmunerkrankungen mit ZNS-Beteiligung. *Z Arztl Fortbild* 1994; 88: 587–591.
- Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG disorders. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37: 397–401.
- Peter JB, Bowman RL. Intra-blood-brain barrier synthesis of IgG: comparison of IgG synthesis formulae in a computer model and in 1,629 consecutive specimens. *Neurology* 1992; 42: 510–515.
- Reiber H. Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler* 1998; 4: 99–107.
- Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid – a concept common to normal blood – CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994; 122: 189–203.
- Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 1: 101–122.
- Reiber H, Sindic CJM, Thompson EJ. Cerebrospinal fluid – clinical neurochemistry of neurological diseases. Heidelberg, Springer, 2001.
- Reiber H, Ungefehr S, Jacobi Ch. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998; 4: 111–117.
- Sindic C, Monteyne P, Laterre E. The intrathecal synthesis of virus specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1994; 54: 75–80.
- Štourač P. Atypické mononukleáry v mozkomíšním moku imitující lymfom u pacienta s virovou meningoencefalitidou. Diferenciálně-diagnostická cytologická kritéria. *Klin Biochem Metab* 1995; (Suppl 3): 40–41.
- Štourač P. Diferenciálně-diagnostický význam funkce hematolymphové bariéry a oligoklonální syntézy IgG u sclerosis multiplex. *Klin Biochem Metab* 1998; 4 (6/27): 210–212.
- Štourač P. Oligoklonální IgG syntéza u autoimunitních neurologických paraneoplastických syndromů. *Klin Biochem Metab* 2000; 4 (8/29): 224–228.
- Tourtellotte WW. On cerebrospinal fluid immunoglobulin-G (IgG) quotients in multiple sclerosis and other diseases. A review and a new formula to estimate the amount of IgG synthesized per day by the central nervous system. *J Neurol Sci* 1970; 10: 279–304.
- Varela FJ, Coutinho A. Second generation immune networks. *Immunol Today* 1991; 12: 159–166.