

# Stanovení bilirubinu v mozkomíšním moku chemickou cestou

P. Kubáč

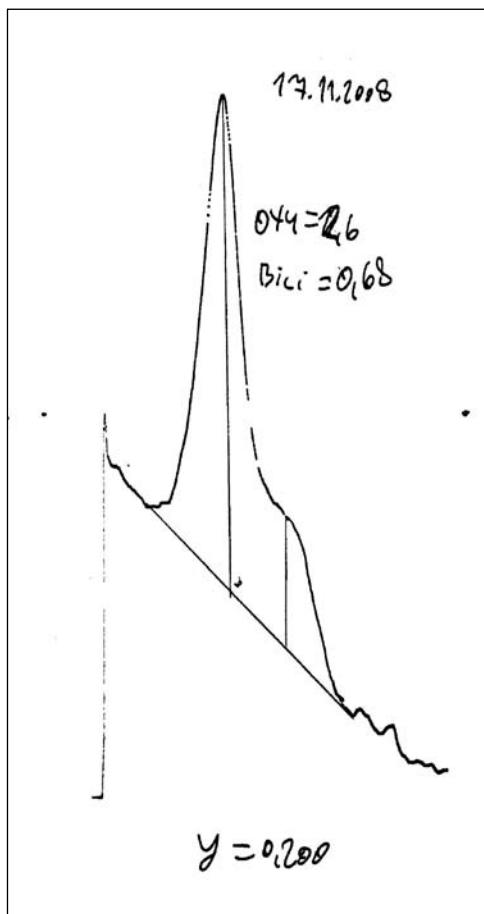
Omezený objem kostěné mozkovny činí z každého zvětšení objemu tkáně uvnitř lebky potenciálně smrtelný patologický stav. Nezanedbatelná část sub-arachnoideálních krvácení (SAK) tvoří spontánní ruptury aneurysmat mozkových tepen, které se, mimo jiné, projevují ukrutnou bolestí hlavy, proto z hlediska diferenciální diagnostiky je potřeba každou těžkou bolest hlavy považovat za možné SAK ohrožující pacienta na životě.

Zlatým standardem diagnostiky SAK jsou zobrazovací metody (CT a magnetická rezonance), které jsou schopny v prvních 24 hodinách odhalit až 95 % SAK (2). Přesto zbývá 5 % zejména malých krvácení, která nejsou zobrazovacími metodami viditelná a mimo to u krvácení starších než 48 hodin klesá podíl rentgenologicky diagnostikovatelných případů až na 50 % (2).

Laboratoř spolupracující s velkým neurologickým, nebo neurochirurgickým oddělením je proto vystavena požadavkům na rychlou a přesnou diagnostiku SAK metodami chemické analýzy mozkomíšního moku. Tradičně se provádí rozpočet buniček a pozorování zbarvení centrifugovaného likvoru – xantochromie. U nálezu erytrocytů v likvoru však laboratoř není schopna rozlišit, zda tyto pochází z krvácení uvnitř CNS, nebo z arteficiálního krvácení způsobeného samotnou lumbální punkcí. Detekce xantochromie likvoru má problém s nízkou citlivostí, subjektivností hodnocení a zejména v současné době oficiální nedůvěry v lidské schopnosti s tím, že po sobě nezanechává archivovatelný, strojem generovaný, důvěryhodný záznam.

Z tohoto důvodu v posledních 25 letech 20 století se rozvinula metoda chemické detekce krvácení do CNS založená na přímé spektrofotometrii mozkomíšního moku. Princip této metody vychází z toho, že dříve popisovaná xantochromie se objektivně měří jako spektrofotometrická křivka ve viditelném světle při vlnových délkách 333 – 666 nm (obr. 1).

Při SAK se do mozkomíšního moku dostávají erytrocyty, jejichž hemolýzou se uvolňuje oxyhemoglobin (absorbční maximum při 414 nm) ten je makrofagickými buňkami bílých krevních řad odbouráván na nekonjugovaný bilirubin (absorbční pás s maximem



Obr. 1

při 460 nm). Teprve přítomnost bilirubinu v mozkomíšním moku je spolehlivým důkazem SAK, protože hemoglobin uvolněný při arteficiální kontaminaci likvoru krví při lumbální punkci se nestačí metabolizovat na bilirubin. Mimo to spektrofotometrií detekujeme i další pigmenty původem z hemoglobinu - methemoglobin je produkt oxidace centrálního atomu železa v hemové struktuře oxyhemoglobinu. (absorbční maximum při 408 nm). Jeho úloha v diagnostice SAK není v literatuře jednoznačně popisována, původně se předpokládalo že je známkou intracerebrálních hematomů v těsné blízkosti mozkových komor. Nyní je spíše považován za důkaz SAK podobně jako bilirubin. Z naší dlouholeté praxe spíše vyplývá že methemoglobin vzniká při masivních krváceních a dlouho probíhající úklidové reakci, po krvácení, jako výraz vyčerpání antioxidační kapacity mozkomíšního moku. Posledním pigmentem detekovaným v likvoru je konjugovaný bilirubin (absorbční maximum při 425 nm). Vzhledem k tomu že jediným místem konjugace bilirubinu v organismu jsou játra,

je nálezkem konjugovaného bilirubinu důkazem zpětného průniku bilirubinu přes hemato-likvorovou bariéru, buď z důvodů jeho vysoké sérové koncentrace, nebo při poškození (zvýšení) propustnosti hemato-likvorové bariéry zánětlivými nebo nádorovými procesy.

Zatímco technické provedení spektrofotometrie je dnes v době spektrofotometrů napojených na PC velmi snadné, interpretačně je toto vyšetření složité, srovnatelné např. s odečtem EKG křivky, proto se doposud v České republice neustálil jednotný pracovní postup. Na některých pracovištích odečítají spektrofotometrické křivky neurologové, jinde je při požadavku na spektrofotometrii likvoru mimo pracovní dobu volán biochemik, který z domova přijede vyšetření interpretovat. Na našem pracovišti by to znamenalo několik desítek výjezdů analytika ke spektrofotometrii ročně, proto vyšetřujeme spektrofotometrii až dopoledne následujícího dne.

Tento systém jsme však považovali za velmi nevyhovující a hledali jsme metodu, jak detekci možného krvácení do CNS automatizovat. Proto nás velice zaujala práce (1) autorů z Nového Zélandu, kteří na svém pracovišti zavedli screeningové vyšetřování bilirubinu v mozkomíšním moku chemickou cestou. Bohužel metodika z původní práce předpokládala na analyzátoru pipetovat až 100  $\mu\text{l}$  vzorku, což je pro náš analyzátor Abbott Architect Ci8200 nedostupné.

Naše pracoviště vydává výsledky spektrofotometrie likvoru tradičně nikoliv v absorbancích ale v SI jednotkách, orientační referenční rozmezí pro přímou spektrofotometrii bilirubinu v likvoru je 0,4  $\mu\text{mol/l}$ . Dlouhodobé zkušenosti a klinická opatrnost ovšem velí věnovat zvýšenou pozornost už vzorkům s obsahem bilirubinu nad 0,2  $\mu\text{mol/l}$ , což je v dobré shodě s původní prací (1), která používá jako Cut off hodnotu 0,150  $\mu\text{mol/l}$ .

Referenční rozmezí pro komerčně dostupné soupravy pro stanovení sérového bilirubinu tradičně bývá 17  $\mu\text{mol/l}$  což je 100x více než hodnoty, které je

nutné měřit v mozkomíšním moku. Bylo tedy třeba vyjít z některé komerční soupravy a tu učinit 100x citlivější. Důkladnou rešerší literatury jsme dospěli ke 4 potenciálním metodikám stanovení bilirubinu v mozkomíšním moku

1. Přímá spektrofotometrie na automatickém analyzátoru - má výhodu největší citlivosti (směrnice kalibrační křivky je až 4x větší než u ostatních metod, ale redukovat změření celé spektrofotometrické křivky na měření nejen při několika vlnových délkách se nám jevílo jako nebezpečné.
2. Stanovení bilirubinu reakcí s diazotovanou kyselinou sulfanilovou dle Jendrassika a Grófa (5) v kyselém prostředí s fotometrií při 530 nm.
3. Stanovení dle Jendrassika a Grófa – Dumasova varianta – s alkalizací výsledné reakční směsi a fotometrií při 580 nm – tato varianta se používá, protože reakční produkt má při těchto reakčních podmínkách asi o 30 % vyšší molární absorpční koeficient, alkalizací se však reakční směs naředí, proto zisk citlivosti se na směrnici kalibrační křivky příliš neprojeví.
4. Stanovení reakcí bilirubinu s diazotovanými deriváty 2, 4 dichloranilinu. Tato metoda jakožto non IFCC není v našich laboratořích příliš populární, ale pro stanovení bilirubinu v likvoru se ukázala jako nejlepší, při stejné navážce vzorku jako metodika dle Jendrassika a Grófa má až 3x vyšší směrnici kalibrační křivky a blíží se svou citlivostí přímé fotometrii.

Linearita většiny komerčních souprav pro stanovení bilirubinu dosahuje 300  $\mu\text{mol/l}$  i více, to je dostatečný nadbytek koncentrace reaktantů, proto jsme další úpravy ve smyslu zvyšování koncentrací diazoniových solí v reakční směsi nepovažovali za účelné. Místo toho jsme se soustředili na dosažení maximálního poměru navážky vzorku ku konečnému objemu reakční směsi

	Jendrassik Gróf Lachema	Jendrassik Gróf Dumas upravený	Bilirubin celkový Biovendor	Bilirubin liquid Biovendor upravený
Vzorek	50	20	6,7	20
R1 ( $\mu\text{l}$ )	700	160	160	160
R2 ( $\mu\text{l}$ )	200	40	40	40
Poměr Vzorek /celkový objem	1 : 19	1 : 11	1 : 31	1 : 11

**Tabulka 1: Srovnání parametrů původních a modifikovaných vyšetření**

Metodiku dle bodu 3 a 4 jsme testovali na automatickém biochemickém analyzátoru Abbott Architect Ci 8200. K tomu jsme vyvinuli metodiku

kalibrace a kontroly, u které by se kalibrační a kontrolní materiály svými koncentracemi co nejvíce blížily očekávaným koncentracím ve vzorcích (0,2

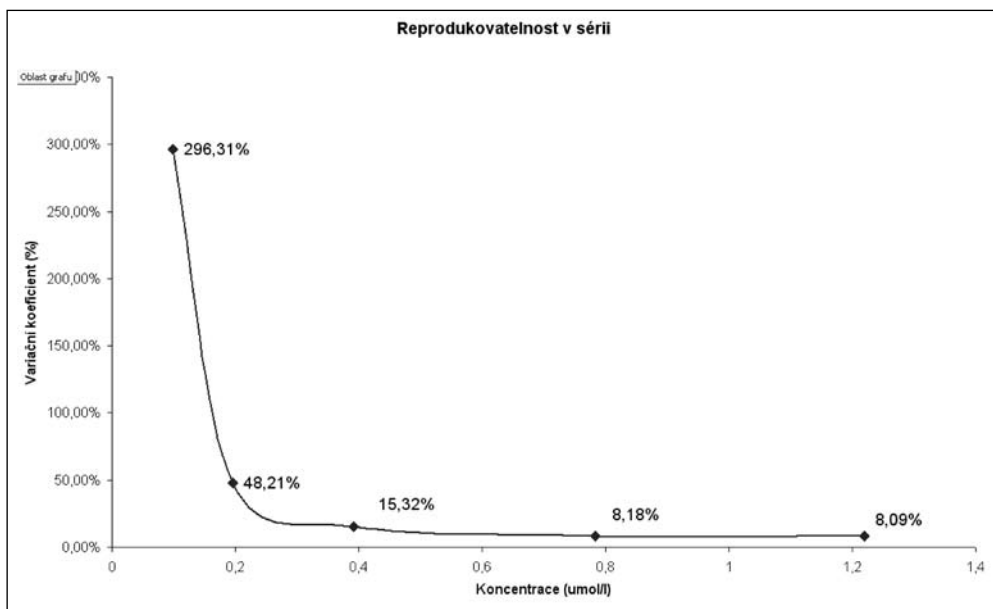
– 0,4  $\mu\text{mol/l}$ ). Pro kalibraci jsme zvolili kalibrátor Roche Calibrator C.f.a.s ref. 10759350, který má atestovanou hodnotu 98  $\mu\text{mol/l}$  pro kalibraci tímto materiálem jsme zvolili automatické 30násobné ředění fyziologickým roztokem přímo v analyzátoru, tak aby se dala kalibrace likvorového bilirubinu zařadit mezi ostatní kalibrace běžných metod pomocí stejného kalibrátoru.

Přesnost zvoleného analytického postupu jsme testovali metodou měření reprodukovatelnosti geometrické řady standardů. Při přípravě standardů jsme vycházeli z primárního standardu Lachema BIL ST ref. 10003139 o koncentraci 361  $\mu\text{mol/l}$ , z tohoto standardu jsme naředili geometrickou řadu 0,09; 0,18; 0,36; 0,72 a 1,8  $\mu\text{mol/l}$ . Pro ředění jsme použili „umělý likvor“ – fyziologický roztok doplněný lyofilizovaným lidským albuminem do koncentrace 0,5 g/l albuminu.

Při testech citlivosti metody jsme vyšli z výrobcem doporučeného poměru reagensů a postupně jsme redukovali objem reakční směsi až do celkového objemu těsně nad 200  $\mu\text{l}$ , což je objem bezpečně analyzovatelný na většině automatických analyzátorů, zároveň jsme zvyšovali objem pipetovaného vzorku

z výrobcem doporučeného objemu až po limit daný technickými možnostmi analyzátoru. Pro každý zvolený poměr - Vzorek R1, R2 - jsme analyzovali reprodukovatelnost na všech hladinách geometrické řady standardů 10x, pak jsme pro každou hladinu vypočetli variační koeficient a posoudili shodu naměřeného průměru s očekávanou koncentrací.

Tímto testováním jsme vyloučili metodiku dle bodu 3 - Stanovení dle Jendrassika a Grófa v Dumasově modifikaci, která ani při maximální pipetovatelné navážce vzorku neměla dostatečnou citlivost na hladinách pod 1  $\mu\text{mol/l}$ . Naopak metodika dle bodu 4 – Souprava Biovondor - Bilirubin Celkový ref. 10552 s diazotovaným dichloranilinem měla při změně pipetovacího poměru z výrobcem doporučených 1:31 na 1:11 použitelný variační koeficient pro koncentrace nad 0,2  $\mu\text{mol/l}$ . Naopak při vyšších navážkách vzorku se i s naším umělým likvorem začal objevovat matricový efekt, který se projevil jako porucha správnosti projevující se systematickým posunem všech koncentrací geometrické řady standardů k vyšším hodnotám bez ohledu na koncentraci bilirubinu. Variační koeficienty výsledné modifikace jsou v Grafu 1.



**Graf 1**

Při všech stanoveních bilirubinu interferuje hemolýza, která způsobuje systematický posun výsledků k nižším hodnotám. Proto výrobci diagnostických souprav zakazují vyšetřovat hemolytické vzorky. Vyloučit přítomnost hemoglobinu v mozkomíšním moku pacienta podezřelého se subarachnoideálního krvácení není možné, proto jsme vítěznou variantou

museli otestovat i z hlediska interference hemoglobinu. To jsme provedli analýzou geometrické řady standardů, které tentokrát byly rozpuštěné ve fyziologickém roztoku s přidavkem hemoglobinu, který jsme získali hemolýzou hematologického – koagulačního vzorku destilovanou vodou. Analýzou vzorků s postupně se zvyšující hladinou

hemoglobinu jsme nezjistili výraznou interferenci až do koncentrací hemoglobinu 1000 mg/l, což je 200x více než je náš Cut-off limit pro přímou spektrofotometrii stanovenou hodnotu oxyhemoglobinu v likvoru, která je 5 mg/l.

Posledním problémem byla volba kontrolního materiálu pro rutinní denní kontrolu metodiky. Zvolili jsme Roche Precinorm U ref 10171743, který

má atestovanou hodnotu 24  $\mu\text{mol/l}$ , tento materiál analyzujeme po automatickém 20 násobném naředění fyziologickým roztokem nejméně jednou za 24 hodin. Výsledná hodnota 1,2  $\mu\text{mol/l}$  představuje patologickou hladinu. Jako fyziologickou hladinu používáme destilovanou vodu bez jakéhokoliv obsahu bilirubinu. Rekapitulace použitých parametrů metodiky je v tabulce 2.

Použitá diagnostická souprava	Biovendor Bilirubin Celkový kat č. 10552
Objem vzorku	20 $\mu\text{l}$
Objem Akceleratoru (R1)	160 $\mu\text{l}$
Objem reagensie (R2)	40 $\mu\text{l}$
Primární vlnová délka	548nm
Sekundární vlnová délka	660nm
Doba měření blanku	270 s
Doba měření vzorku	600 s
Doporučený kalibrátor	Roche Calibrator C.f.a.s. kat č. 10759350 ředěný 30x
Doporučená kontrola LOW	Destilovaná voda
Doporučená kontrola HIGH	Roche Precinorm U kat č. 10171743 ředěný 20x
CUT OFF limit	0,2 $\mu\text{mol/l}$

**Tabulka 2 - Rekapitulace parametrů použité metody měření**

Metodiku chemického vyšetření mozkomíšního moku jsme zařadili mezi ostatní vyšetření, která provádíme u každého analyzovaného likvoru. Ve zkušebním období jsme analyzovali 99 vzorků paralelně chemickým vyšetřením a přímou spektrofotometrií, ani v testovacím období ani v rutinním provozu se nevyskytl jediný případ falešně negativního vyšetření. Korelaci mezi chemicky a spektrofotometricky naměřenými vzorky dokumentuje Graf 2.

Přesto metodiku stanovení bilirubinu v likvoru chemickou cestou považujeme jen za pomocné, screeningové vyšetření a v případě pozitivního nálezu, stejně jako v případě ordinace spektrofotometrie ošetřujícím lékařem doplňujeme spektrofotometrii ve stejném režimu jako doposud tj. co nejdříve když je vysokoškolač - analytik k dispozici na pracovišti.

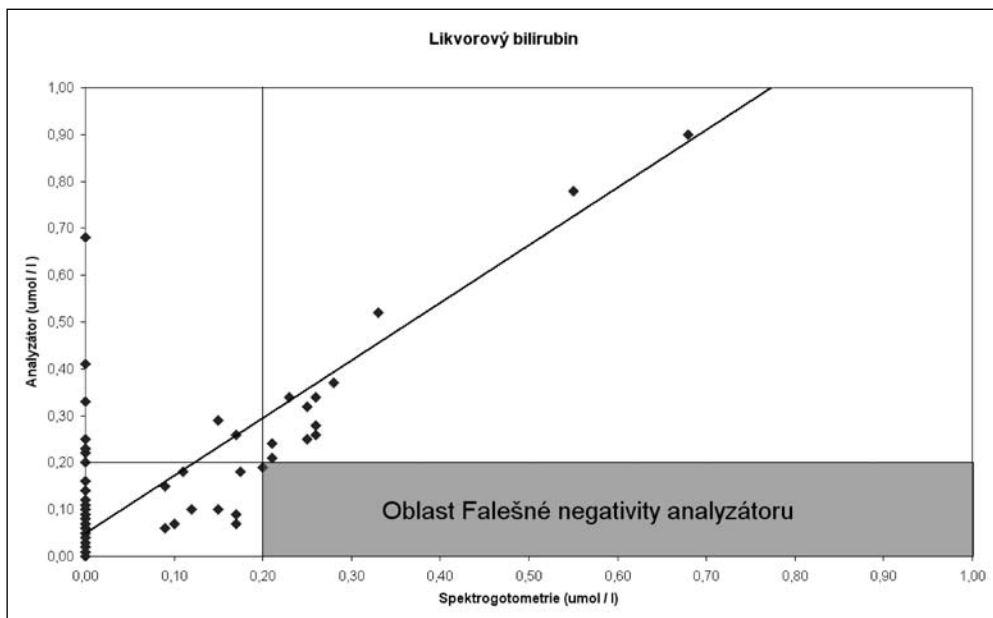
Zavedením tohoto vyšetření získali naši neurologové časný marker vylučující SAK. Naopak rutinním vyšetřováním každého likvoru jsme získali možnost varovat klinika na možné krvácení do CNS i tam kde tomu logika případu nenasvědčuje. Z pohledu laboratorních pracovníků polevil časový tlak kliniků na rychlé provedení spektrofotometrie likvoru, která se přesunula do pozice „konfirmačního vyšetření“.

Kromě toho měřením důležitého analytu dvěma zcela odlišnými metodami se zvýšila i důvěryhodnost naší vydávaných výsledků.

## LITERATURA:

1. Prospective Validation of Cerebrospinal Fluid Bilirubin in suspected Subarachnoid Haemorrhage; Ann. Clin. Biochemistry 2007 MAR; vol. 44; p. 140-144
2. Detection of Xanthochromia in Cerebrospinal Fluid, Ainsley H. Chalmers; and Michelle Kiley Clinical Chemistry; No. 8, 1998; vol 44 p. 1740 -1742,
3. CSF spectrophotometry in the diagnosis of subarachnoid haemorrhage A M Cruickshank; J Clin Pathol 2001; vol 54:827-830
4. The determination of Bilirubin with the photoelectric colorimeter; Helga Tait-Malloy; The journal of Biological chemistry 1936; vol 119/2 p. 481 - 490
5. Candidate Reference Method for Determination of Total Bilirubin in Serum: Development and Validation; Basil T. Dumas, et al. Clinical chemistry 1985; Vol 31/11, p. 1779-1789 (1985)

6. Inaccurate Values for Direct Bilirubin with Some Commonly Used Direct Bilirubin Procedures; Kwok-Ming Chan, et al Clinical Chemistry 1985; vol 31/9, p. 1560-1563
7. Příbalový leták Lachema Bilirubin Liquid 350
8. Příbalový leták Biovendor Bilirubin Celkový



**Graf 2**