

Možnosti imunocytochemického vyšetření nádorových buněk v mozkomíšním moku



Topelex*

Jaroslava Dušková
Ondřej Sobek
Ústav patologie 1.LF UK a VFN
a
Topelex s.r.o.
Praha

Ostrava 2015

Klinické situace vyžadující identifikaci nádorových buněk v mozkomíšním moku

1. Recentně léčený nádorový proces s předpokládaným postižením likvorových prostorů
2. Anamnéza v minulosti (vy)léčené malignity
3. Příznaky nejasného postižení likvorového prostoru - dosavadní nádorová anamnéza nemá

Klinické situace vyžadující identifikaci nádorových buněk v mozkomíšním moku

1. Recentně léčený nádorový proces s předpokládaným postižením likvorových prostorů
2. Anamnéza v minulosti (vy)léčené malignity
3. Příznaky nejasného postižení likvorového prostoru - dosavadní nádorová anamnéza nemá

DIFERENCIÁLNÍ DIAGNÓZA

pro uvedené situace:

- 1) Nádor a/nebo doprovodný zánět, paraneuroencefalitis/meningitis
- 2) Recidiva, následný druhý primární tumor, nenádorový proces
- 3) Vše

Limitovaný vzorek....

- Odebráno není zpravidla více než 8 ml likvoru a vzorek je dělen pro vyšetření:
 - ◆ chemická
 - ◆ mikrobiologická
 - ◆ imunologická
 - ◆ cytologická
- Pokud je základní otázkou nádorové postižení mening, měl by na cytologické vyšetření být směřován objem 3-5 ml; nutno počítat i s možným požadavkem na další materiál

R. M. de May: The Art and Science of Cytopathology, ASC Press, Chicago, 1996

Informace - čím více, tím lépe...

- **Data pacienta** (věk, pohlaví, rasa ...)
- **Klinické příznaky** (nitrolební hypertenze, meningeální dráždění, zánětlivé projevy...)
- **Nemorfologické nálezy** (biochemické, imunologické...)
- **Morfologické nálezy:**
 - ◆ makro - zobrazovací (CT, MRI, arteriografie...)
 - ◆ mikro - předchozí histologická nebo cytologická vyšetření
 - ◆ v případě pozitivní nádorové anamnézy
IMUNOPROFIL PROKÁZANÉHO TUMORU

Co je třeba vzít v úvahu při vyšetření mozkomíšního moku

- i při přítomnosti nádoru intrakraniálně nemusí být nádorové buňky v likvoru
- nádor a jeho léčba mohou být zdrojem atypických nenádorových buněk

Zpracování likvoru pro cytologické a imunocytologické vyšetření

- **Cytospinované preparáty** (500-800 ot. min.) ,
cytosedimentace, cytoblok....
- **Základní obraz morfologický** (MGG, HE,
polychrom, ...)
- **Dobarvení klasickými technikami**
histologické laboratoře (*hlen, PAS, ...levné a
přínosné*)
- **IMUNOCYTOCHEMIE**

Základní hodnocení

- Diagnostický obraz bez atypií - zpráva s negativním nálezem
- Atypické buňky přítomny
maximalizovat
pravděpodobnost
jejich identifikace

Co je třeba vzít v úvahu při imunocytochemickém došetření mozkomíšního moku s atypickými buňkami

- i při přítomnosti nádoru intrakraniálně nemusí být atypické buňky v likvoru nádorové

ZVÁŽIT REAKTIVNÍ A REGRESIVNÍ ATYPIE, ARTEFAKTY

- cytocentrifugace buněk - možné artefakty
 - ◆ shluky
 - ◆ nepravidelná kontura jádra
 - ◆ zvýrazněné nukleoly
 - ◆ vakuolizace cytoplazmy

morfologický překryv
se znaky užívanými v
diagnóze malignity !!!

Zvýšení pravděpodobnosti identifikace atypických buněk jakožto buněk nádorových

- maximální možná extenzita základního vyšetření
 - ◆ odpovídající fixace a následně
 - ◆ dobře zvolený imunocytochemický (mini ☹) panel

Klinické situace vyžadující identifikaci nádorových buněk v mozkomíšním moku

1. Recentně léčený nádorový proces s předpokládaným postižením likvorových prostorů
2. Anamnéza v minulosti (vy)léčené malignity
3. Příznaky nejasného postižení likvorového prostoru - dosavadní nádorová anamnéza nemá



tři různé ALGORITMY A1-A3

Při imunocytochemickém došetření mozkomíšního moku s **atypickými buňkami**

A1 **Recentní nádorový proces se známým imunoprofilem** a předpokládaným postižením likvorových prostor:

- ◆ **porovnat morfolologii**
- ◆ **zadat cílený panel a vzít v úvahu, že ne všechny nádorové buňky exprimují markery prokázané v základním tumoru**

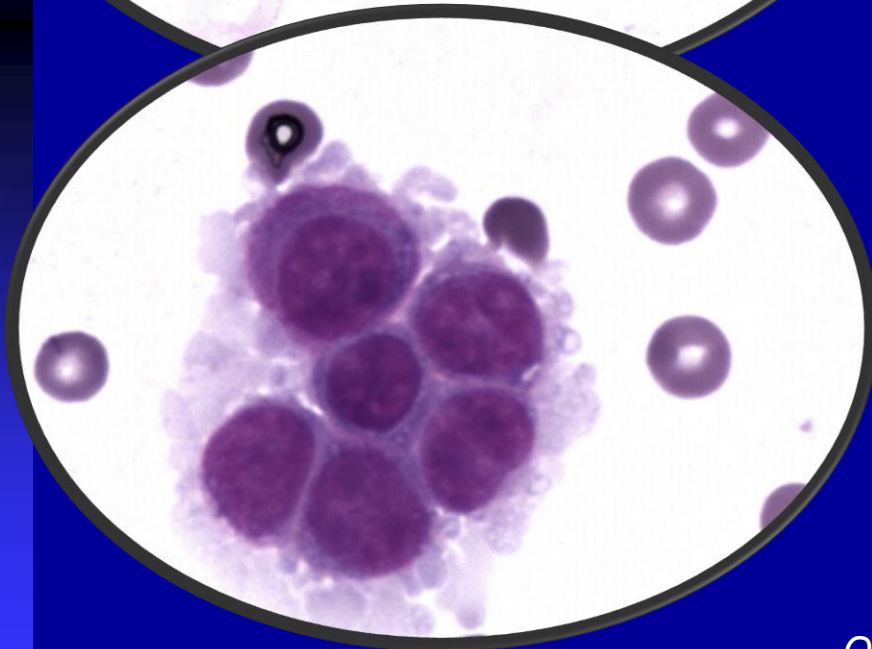
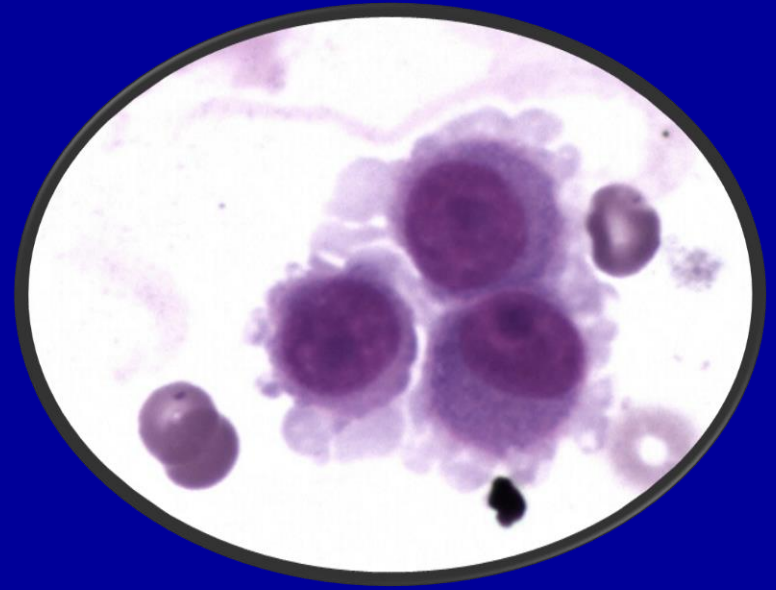
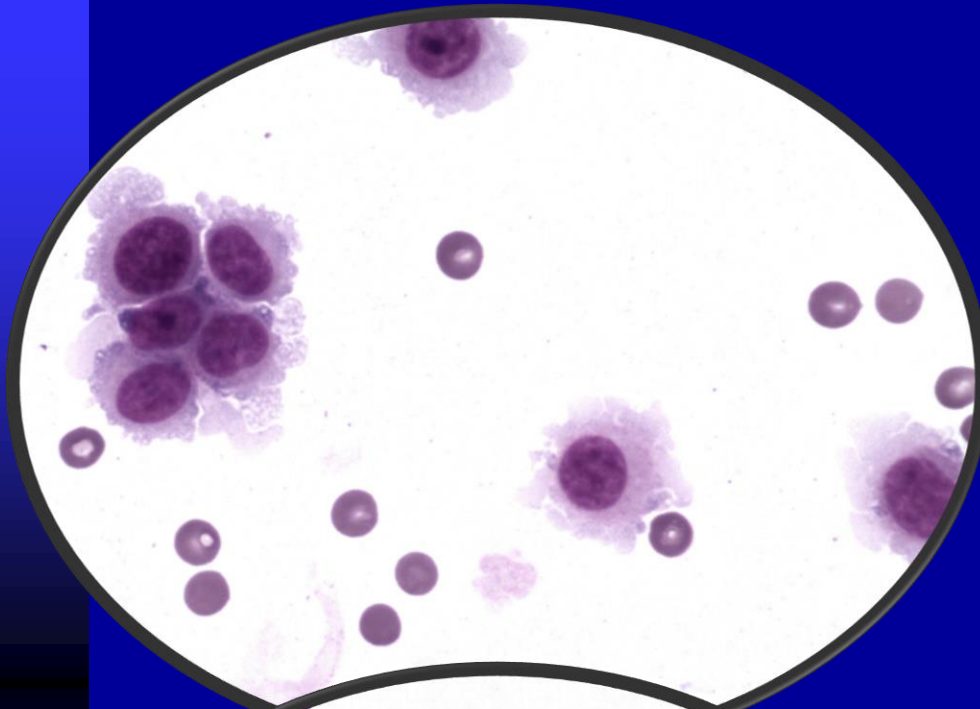
Při imunocytochemickém došetření mozkomíšního moku s **atypickými buňkami**

A1 -pokr.

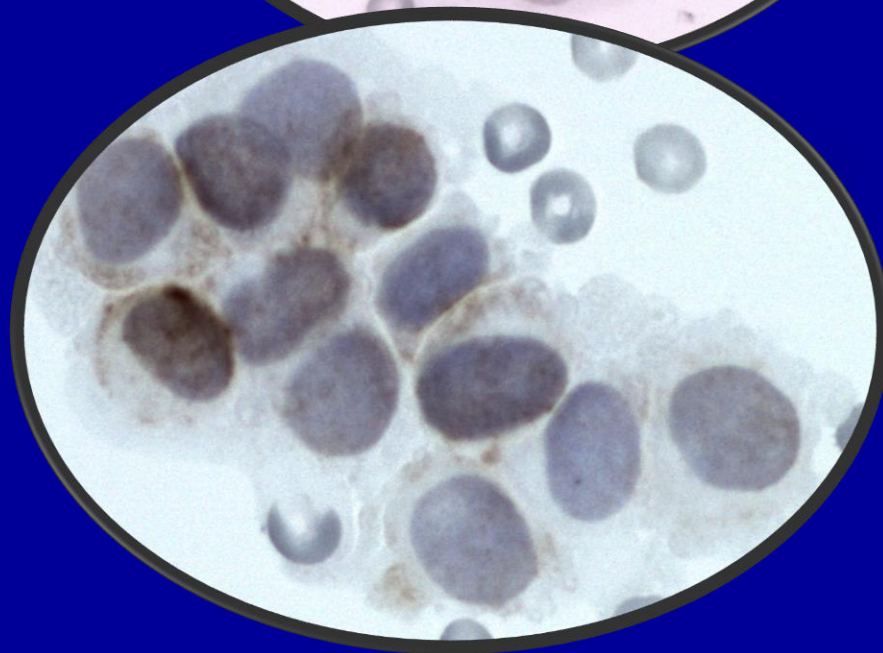
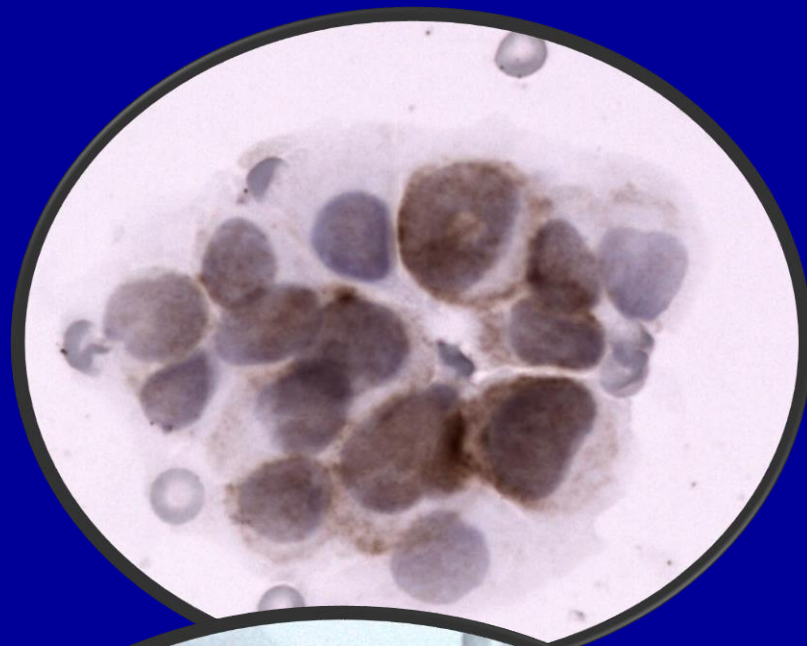
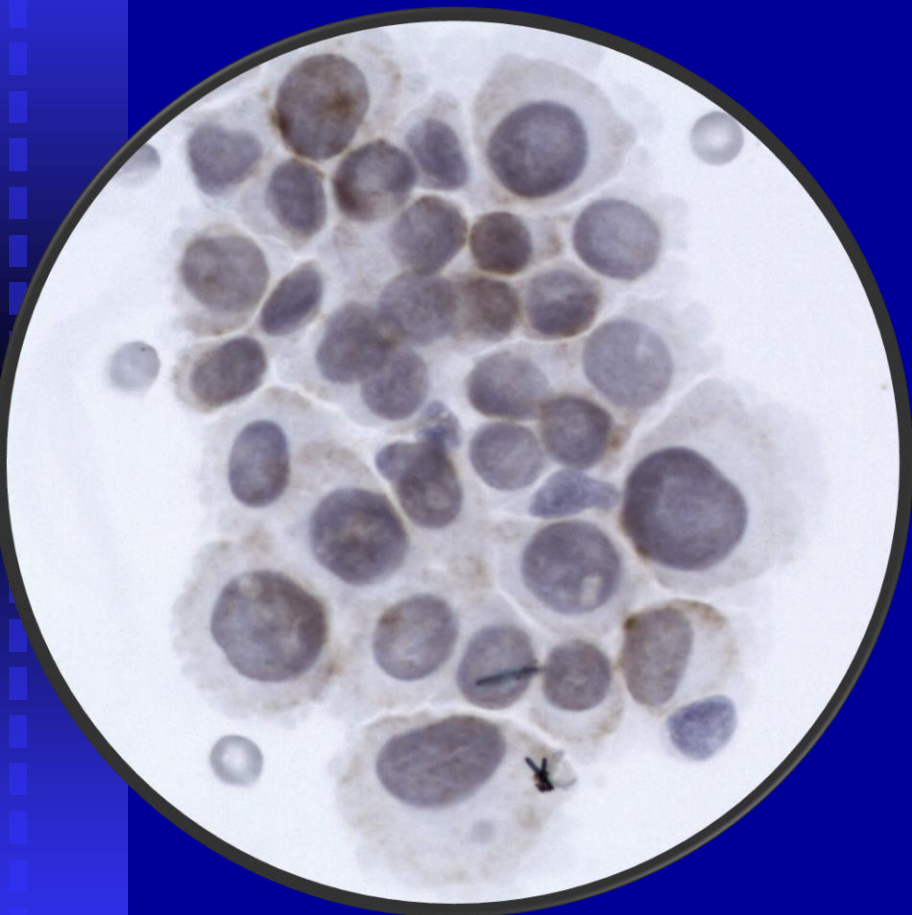
◆ **Imunoreaktivita**

- ◆ ovlivněna fixací - liší se od formolparafinové zjištěné v histologii základního tumoru
- ◆ slabá specificky lokalizovaná pozitivita
- ◆ nespecifická pozitivita v důsledku relativního nadbytku protilátky použité v ředění histopatologickém

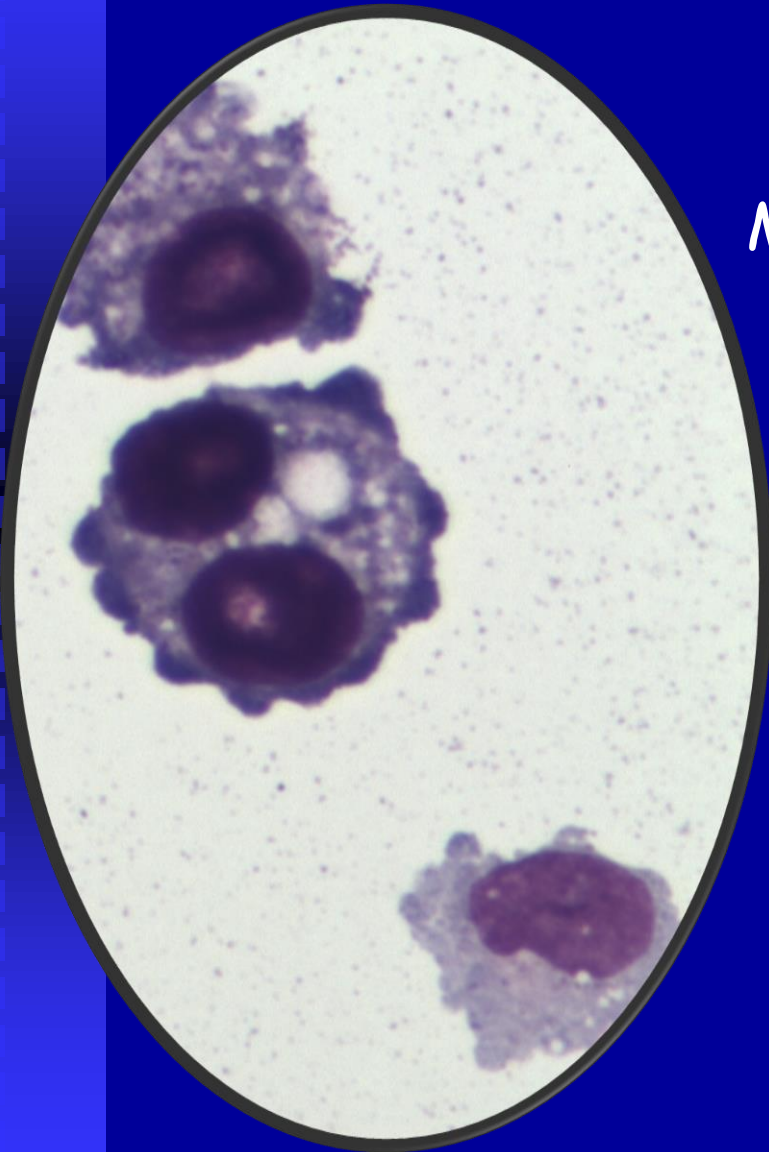
M57. Anamnéza melanomu.
MGG.



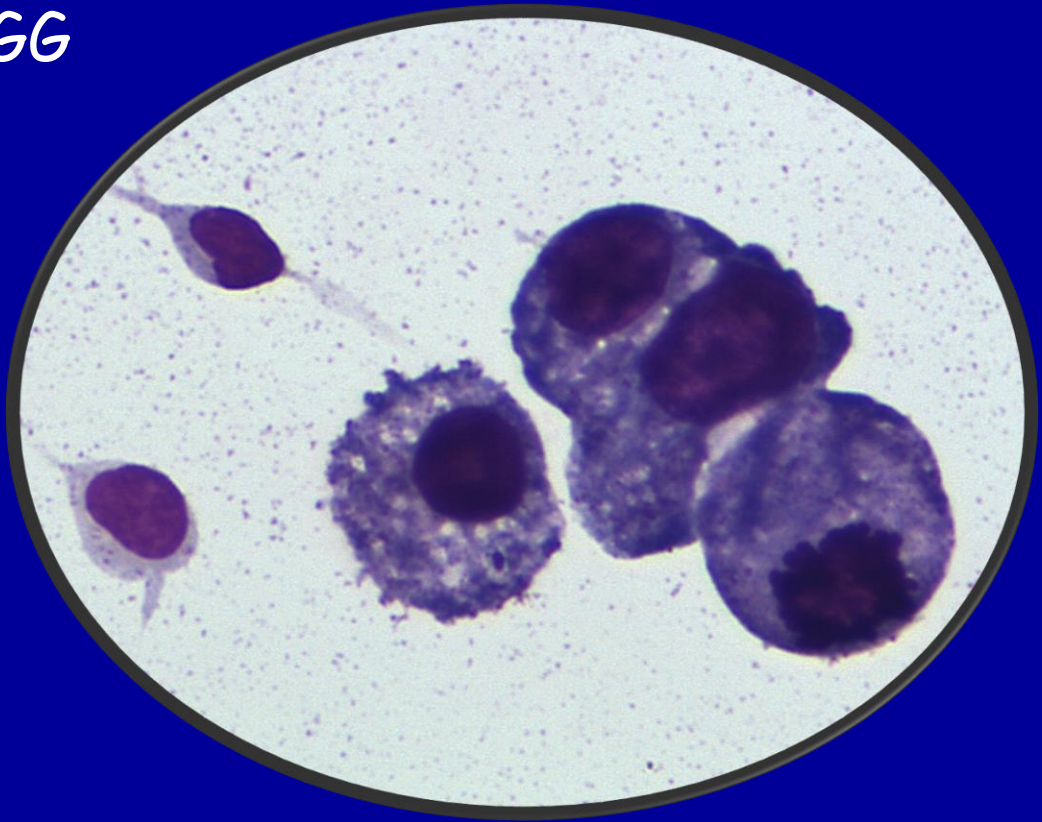
M57. Anamnéza melanomu.
Melan A



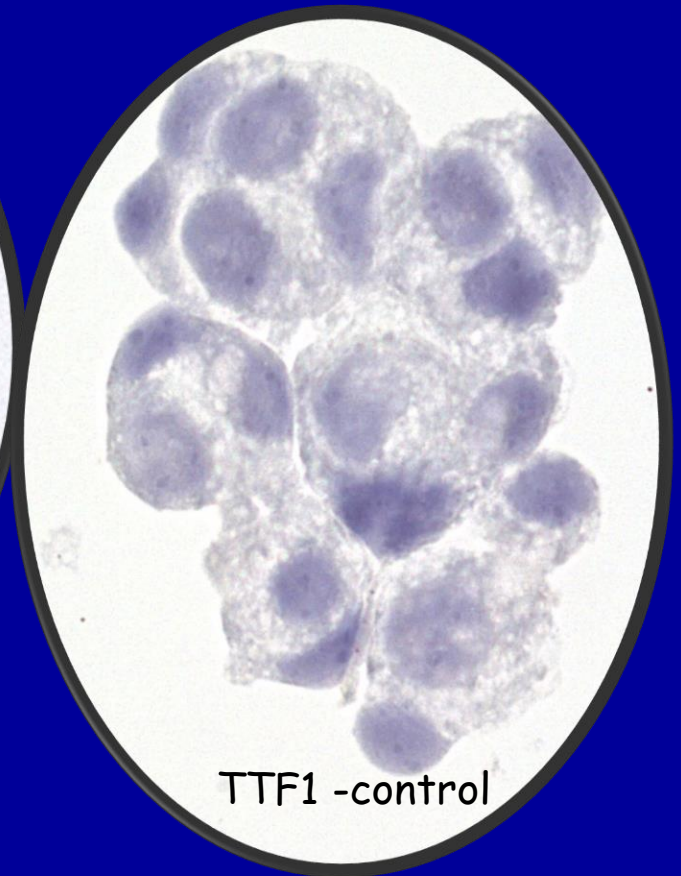
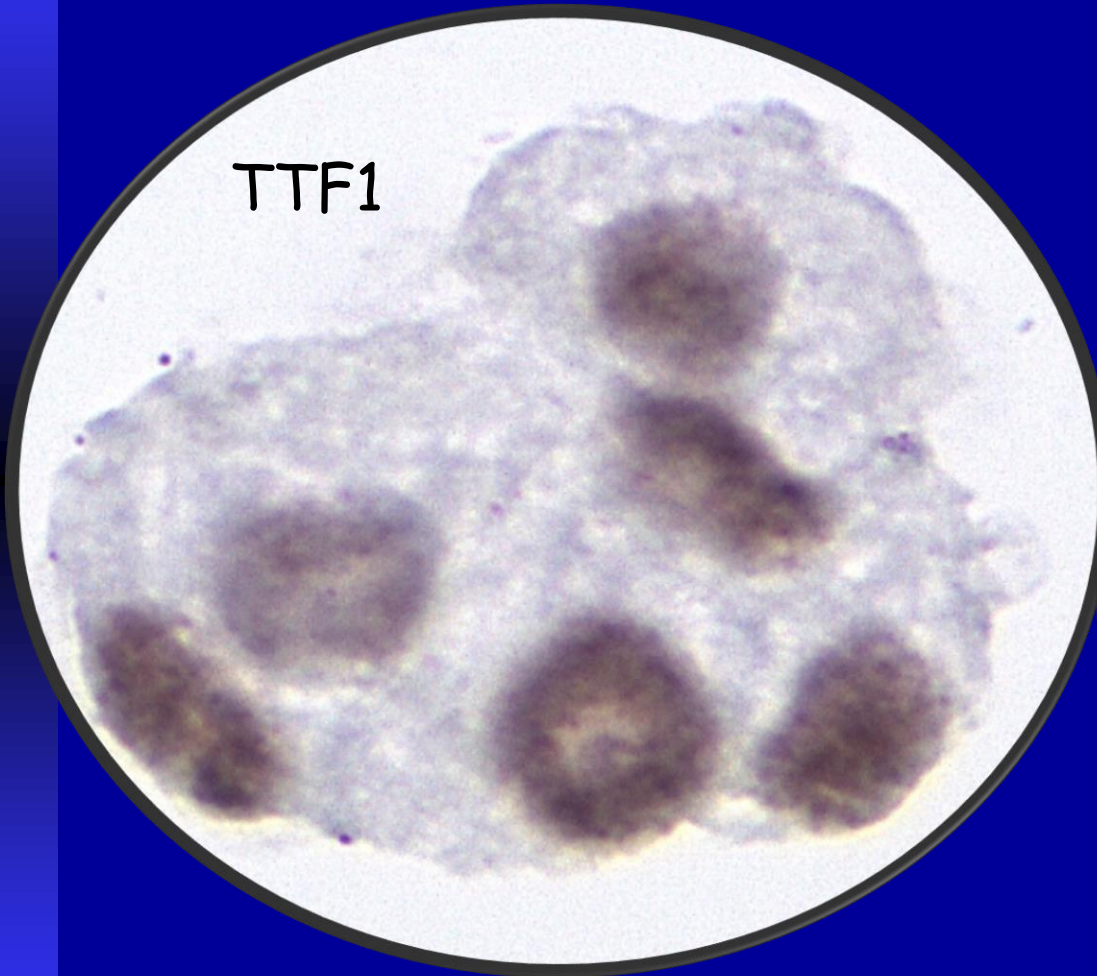
M73. Anamnéza bronchogenného karcinomu



MGG



M73. Anamnéza bronchogenného karcinomu



Cytologické postupy v likvoru

- vyžadují standardizaci
- jsou v rámci laboratoře předmětem akreditace a interní i externí kontroly kvality

Department of Pathology, University of Texas, USA.
Fowler LJ, Lachar WA.:

Application of Immunohistochemistry to Cytology.

Arch Pathol Lab Med. 2008, 132(3):373-83.

Ostrava 2015

Despite published warnings of the dangers of constantly varying methodology on both intralaboratory and postlaboratory testing, **we seem to forget the warnings when pressed by the clinician to be as specific as possible with our diagnosis using less and less material.**

Obvyklé nedostatky publikovaných výstupů imunocytochemických postupů:

- Jako **odpovídající ±kontroly** jsou použity histopatologické formolparafinové řezy.
- pro zvýšení výpovědní hodnoty testu by měly být v laboratoři k dispozici **STEJNĚ zpracované** vzorky s pozitivně a negativně reagujícími buňkami (*pozn JD: zde mohou posloužit preparáty pořízené do rezervy z výpotků s ověřenými imunoreaktivitami*)
- **komerční nabídka** histologických kontrolních preparátů bude nepochybně sledována i obdobnými cytologickými

Při imunocytochemickém došetření mozkomíšního moku s **atypickými buňkami**

A2 **Anamnéza v minulosti (vy)léčené malignity**

- ◆ zvážit recentní cyto nálezy v kontextu anamnestického tumoru
- ◆ v případě **přípustné morfolgie** zadat **potvrzující marker (y)** a případně nejdůležitější vylučující marker diferenciálně diagnostický
- ◆ v případě odlišné morfolgie zvážit reaktivní povahu buněk a postupovat dle algoritmu 3.

Obvyklé nedostatky publikovaných výstupů imunocytochemických postupů:

- Ředění protilátky není odpovídající . Z nadbytku může vznikat falešná pozitivita
- Některá **fixativa** oslabují/ruší reaktivitu s určitými protilátkami : alkoholová - hormonální receptory, S100
- Některé cytoblokové metody (teplý agar) mají horší shodu imunoreaktivity s histologií než jiné (plazma-trombin)

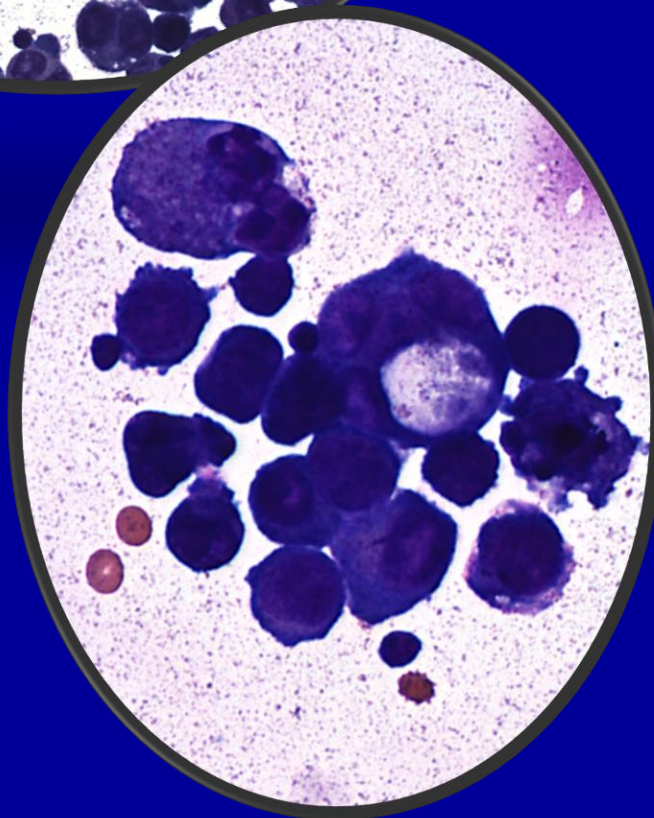
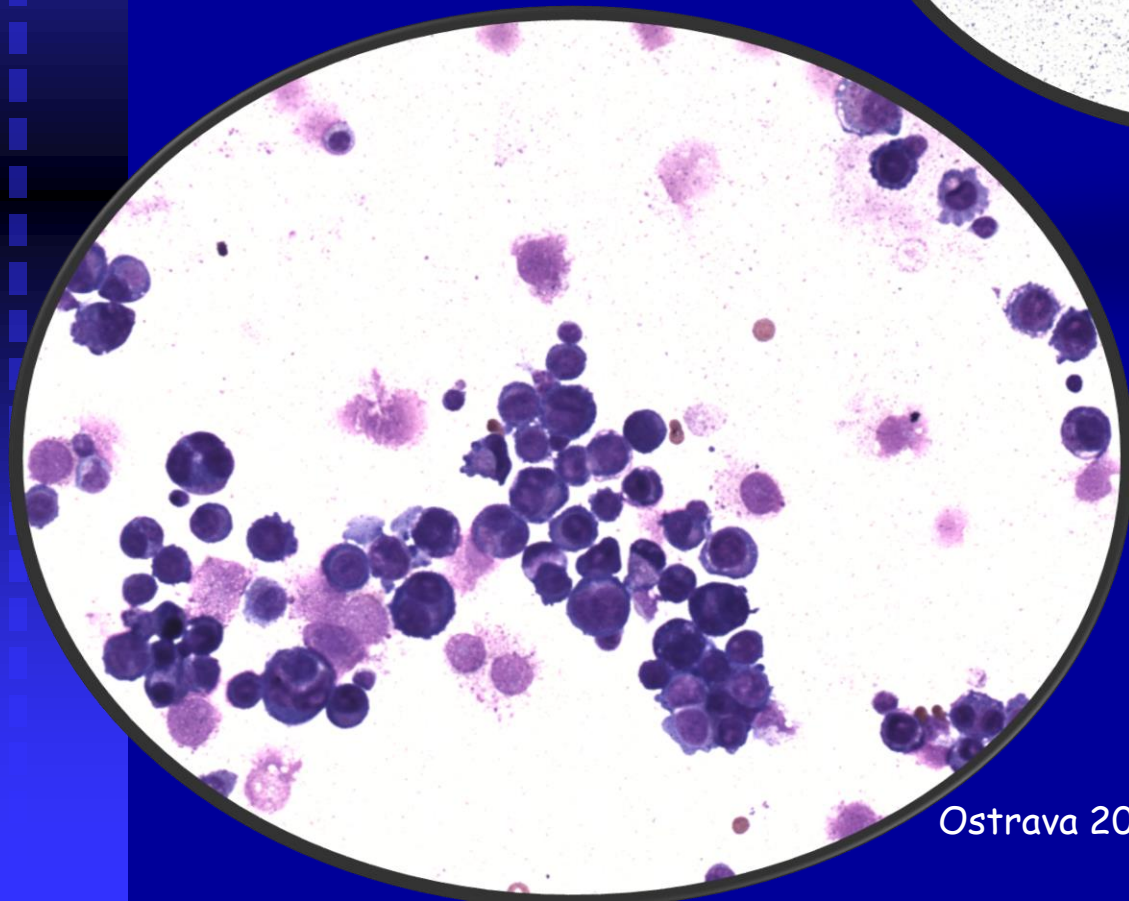
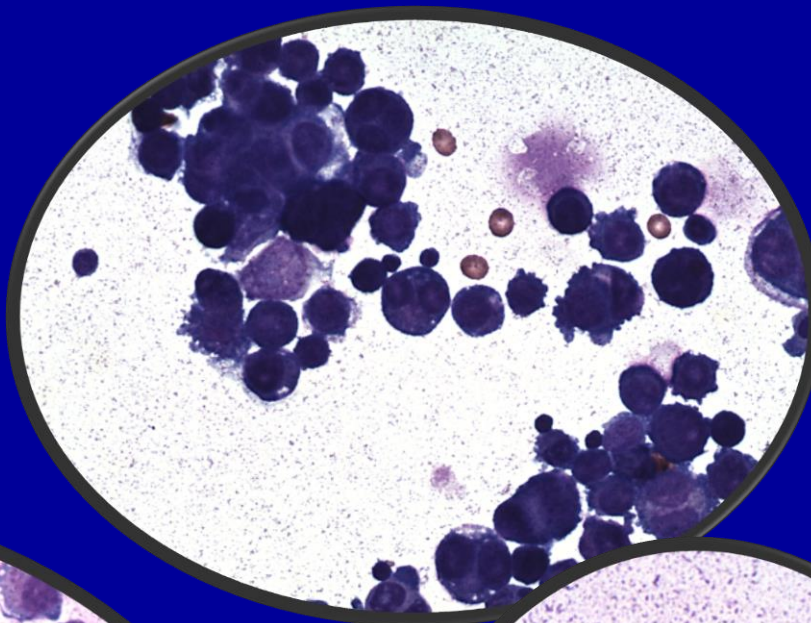
Obvyklé nedostatky publikovaných výstupů imunocytochemických postupů - interpretační

- přísně ve vazbě na morfologii
- jedna protilátka zpravidla nestačí pro specifikaci diagnózy v rámci dg. diferenciální
- Panely nejsou specifické pro určitou diagnózu: v reprezentativním provedení mají jistou predikční hodnotu

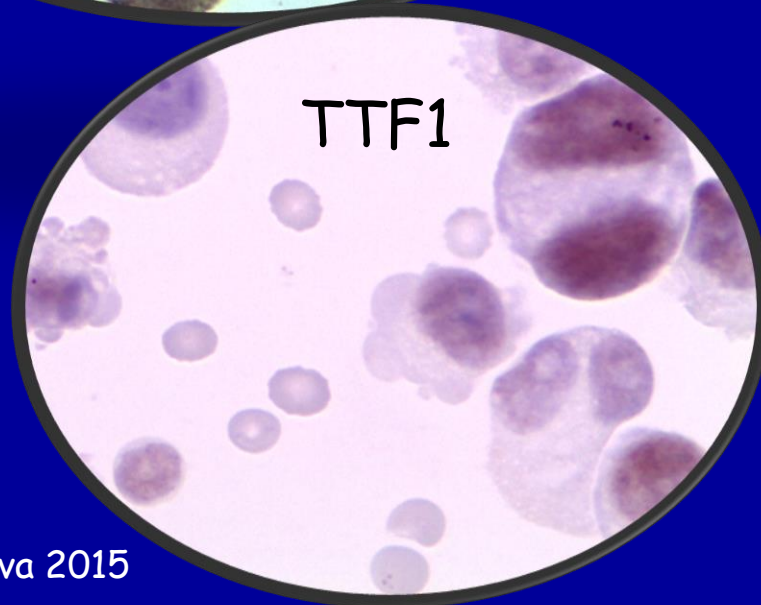
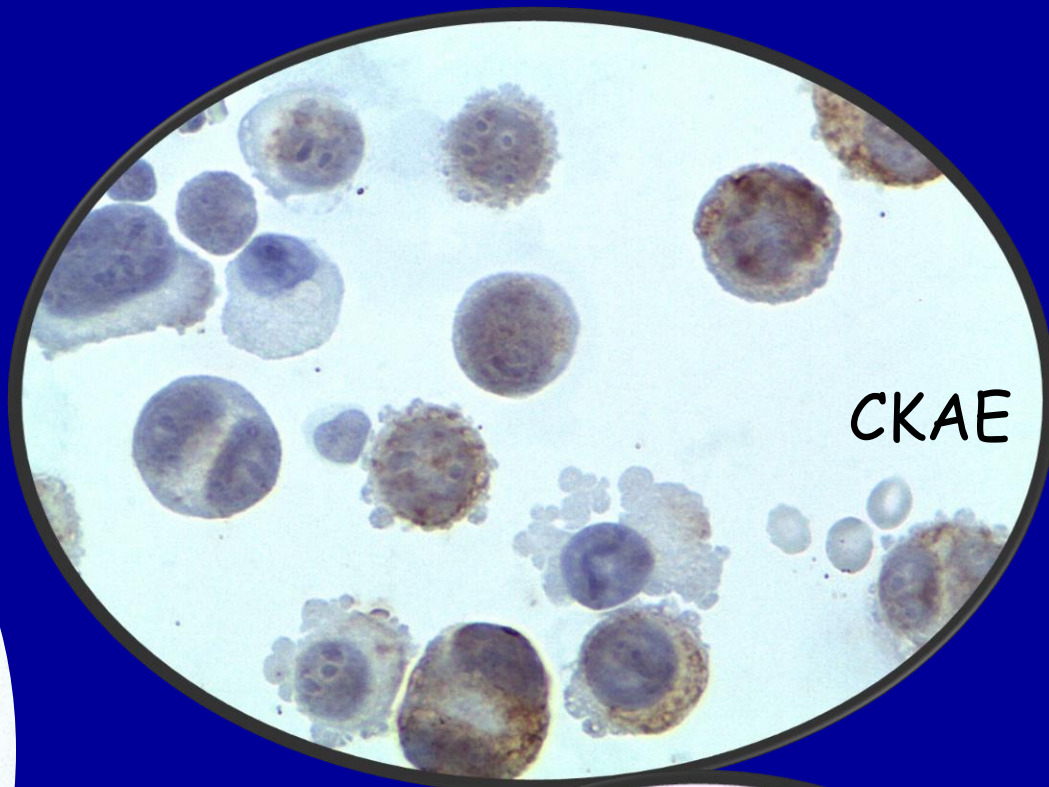
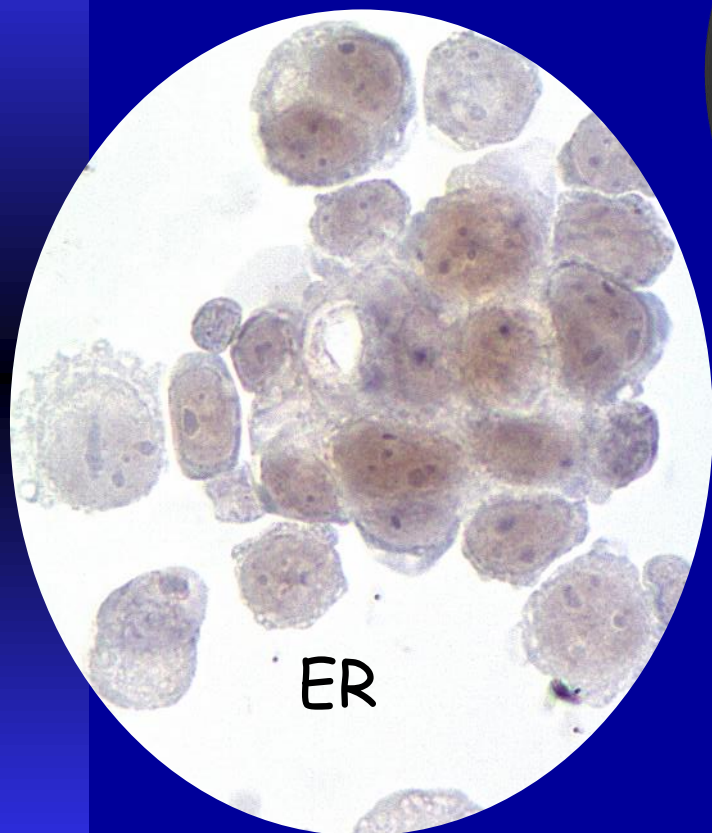
Při imunocytochemickém došetření mozkomíšního moku s **atypickými buňkami**

- A3 . Příznaky nejasného postižení likvorového prostoru - dosavadní nádorová anamnéza nemá
- ◆ situace vyžadující širší rozřazovací panel - 3 ml likvoru je zde minimum

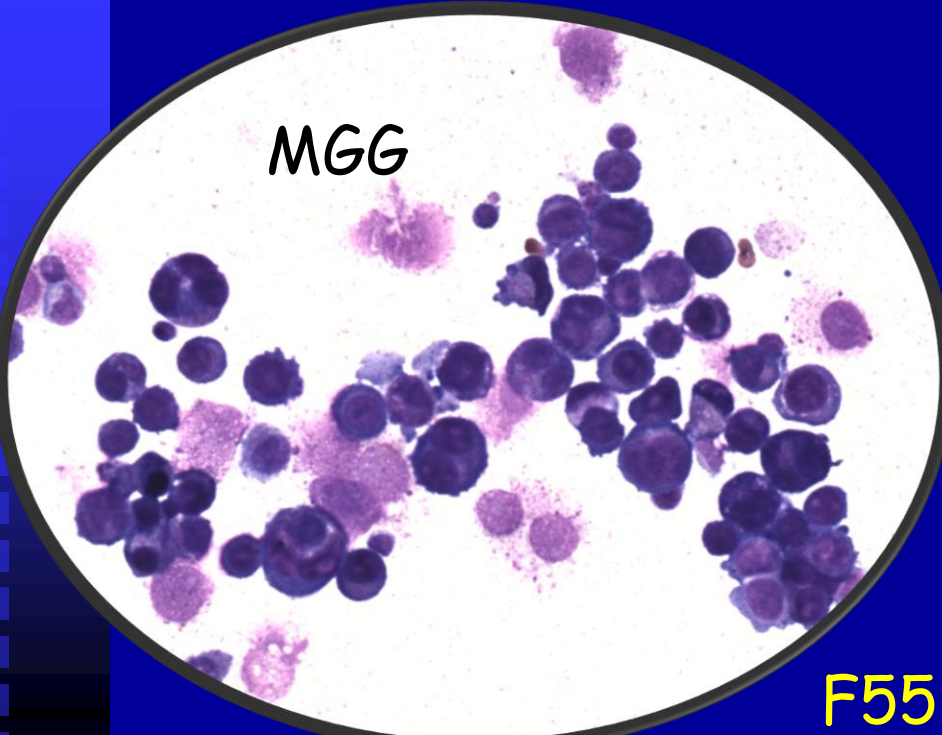
F55. Cefalea.
Negativní anamnéza.



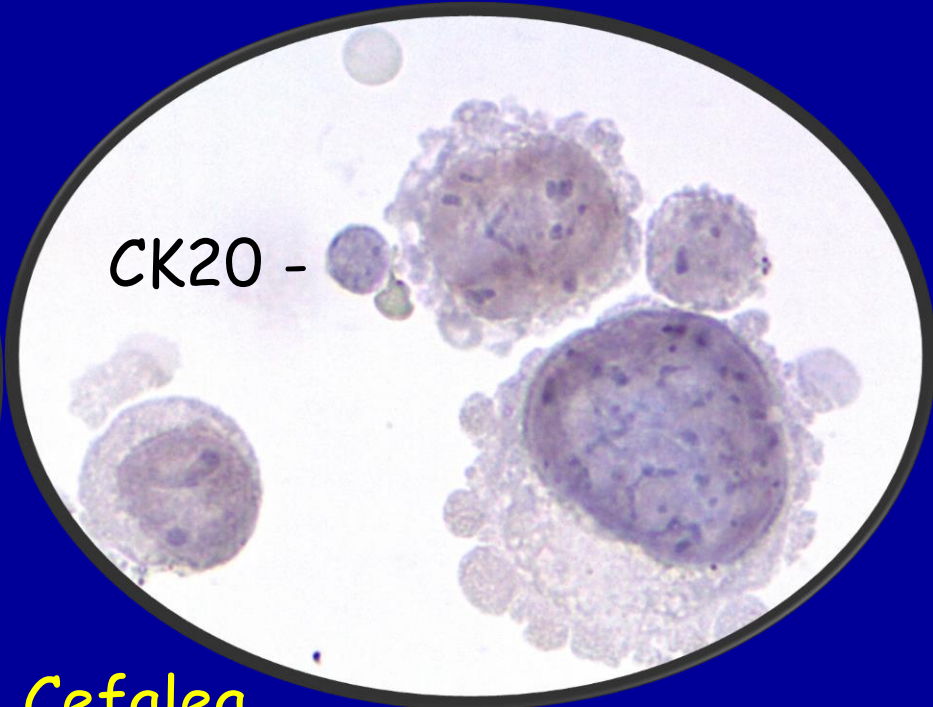
F55. Cefalea.
Negativní anamnéza.



MGG

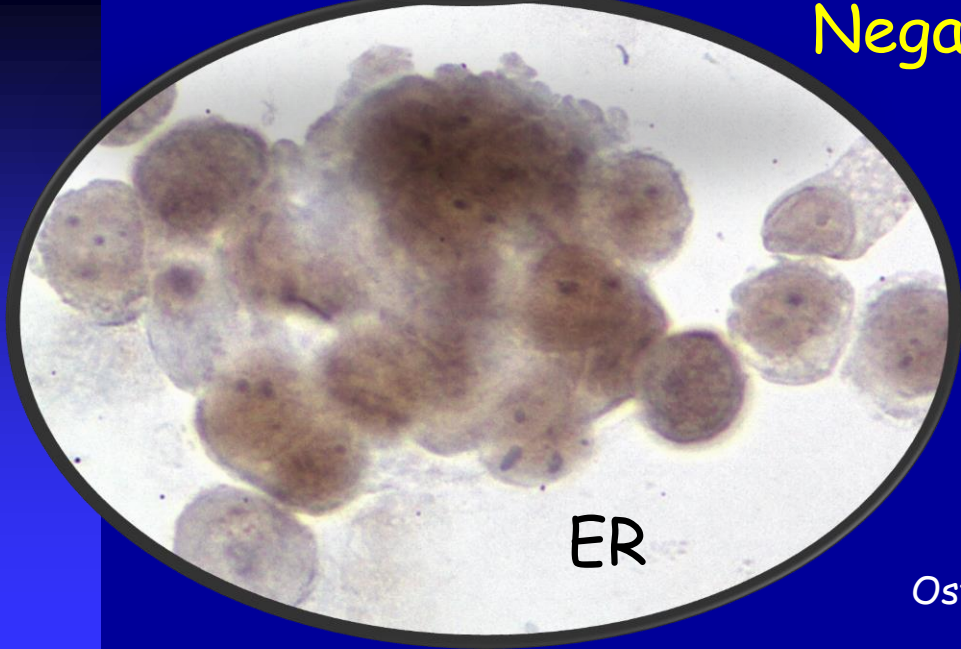


CK20 -

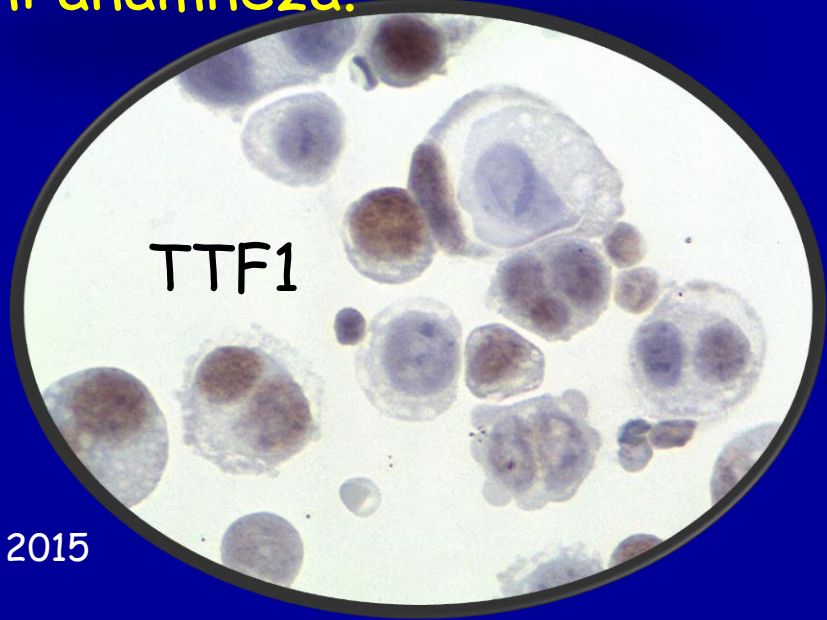


F55. Cefalea.
Negativní anamnéza.

ER



TTF1



Doporučené panely existují,
volba je na zkušenosti patologa,
dostupnosti materiálu a protilátek

Např. ML versus jiná malignita

Předpokládané origo	CK	LCA	S100	HMB 45	Vim	Chromo	TTF1
ML	-	+	-	-	-	-	-
SCC	+	-	-	-	±	±	+
SRCS	-	-	-/+	-	+	-	+
Mel	-	-	+	+	+	-	-
AdCa	+	-	-	-	-	-	+/-

Zastoupení nádorových buněk v mozkomíšním moku

1. 10% primární tumory mozku - většinou hluboko a likvor negativní
2. 30% hematologické malignity
3. 60% meta solidních tumorů

R. M. de May: The Art and Science of Cytopathology, ASC Press, Chicago, 1996

Immunohistochemistry as a surrogate for molecular testing: a review.

Swanson PE: Department of Pathology, Cumming School of Medicine, Calgary, AB, Canada.

■ Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2015 Feb;23(2):81-96.

- Protilátky proti proteinům exprimovaným jako důsledek translokací, fúzí a amplifikací genů představují ekonomicky výhodný postup minimálně screeningový a někdy i alternativní
- uplatní se v diagnostice i predikci terapeutické odezvy

Co lze zjistit v Dabbsově
monografii?

Immunocytology

Chapter 19 in: D.J. Dabbs.
Diagnostic immunohistochemistry.
Churchill Livingstone, 2002

Immunocytology

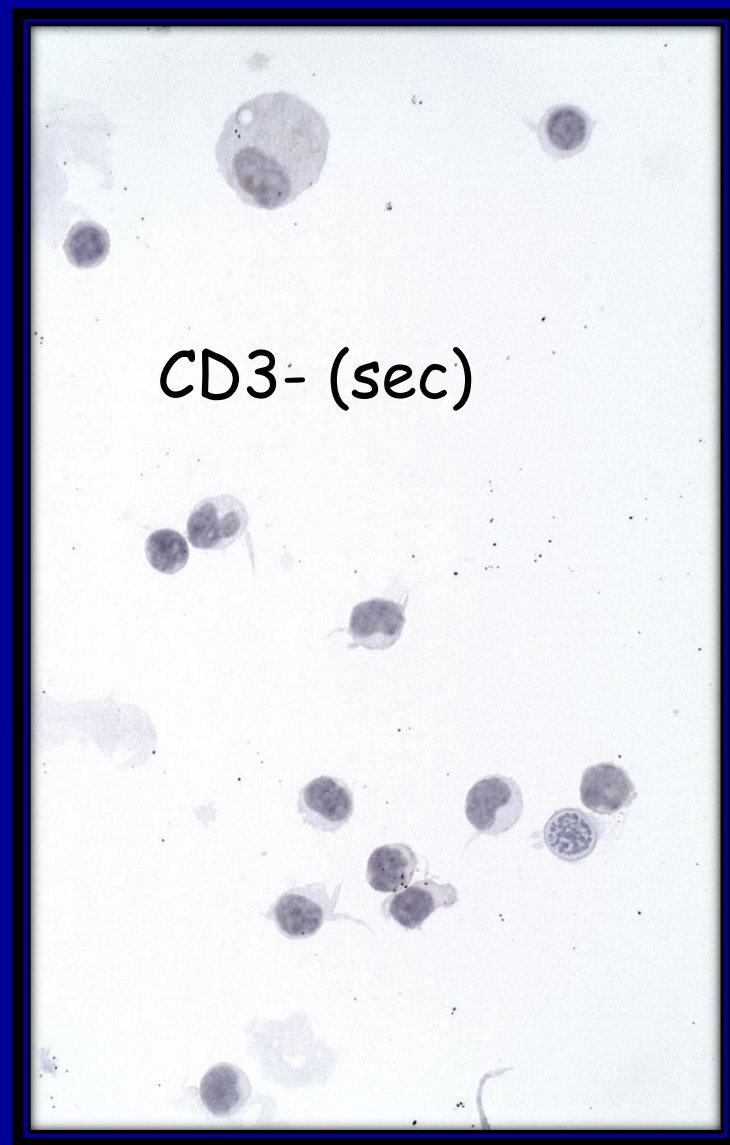
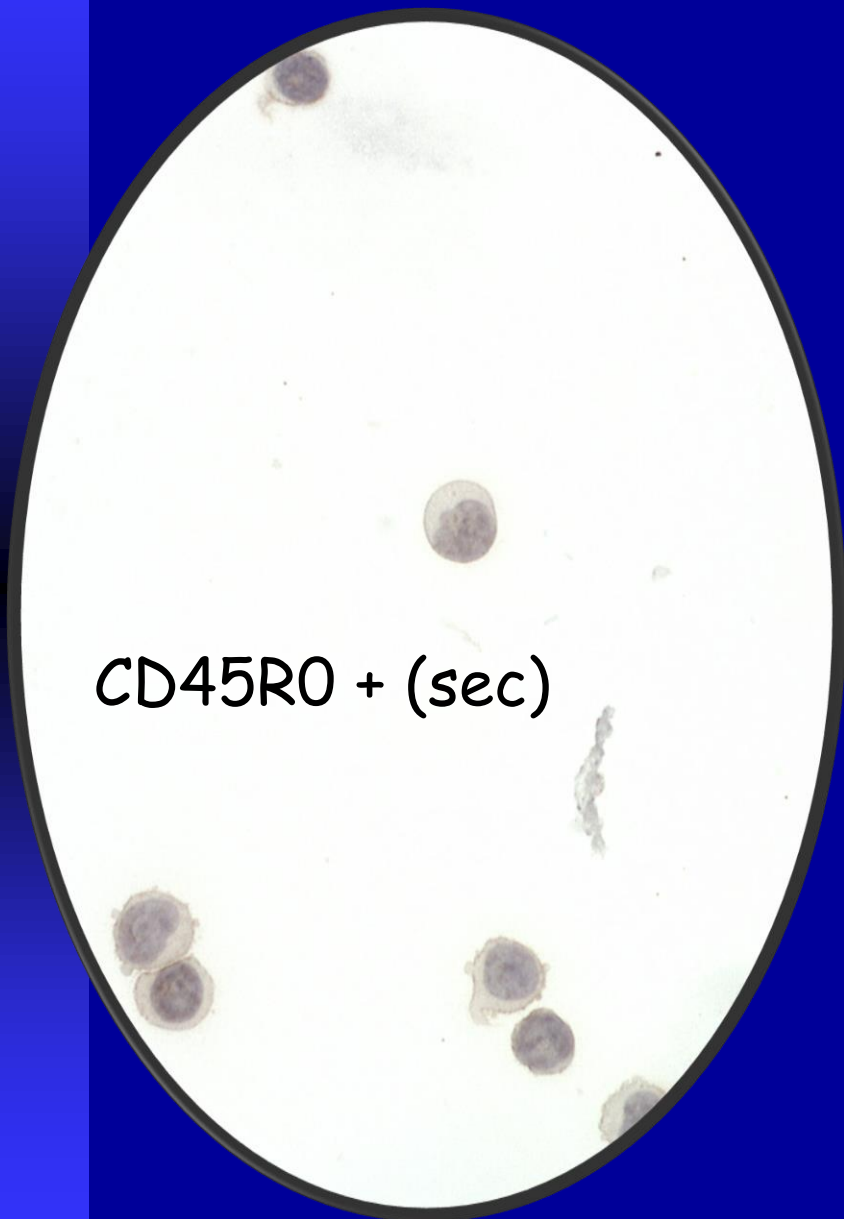
- předbarvit na přítomnost atypických buněk
- alkoholová fixativa oslabují až ruší reaktivitu některých protilátek - S100, ER, PR
- rezervy lépe air-dried a před vlastním imunoprůkazem fixace formolovými parami
- cell blocks are a luxury to have...
- cytologické kontroly z bio imprintů
- další imuno průkazy po negativním výsledku na tomtéž preparátu jsou možné

M 71. Recentně DLBCL - k vyloučení infiltrace mening

MGG

CD20 a CD79a negativní

M 71. Recentně DLBCL - k vyloučení infiltrace mening



Standardizace imunocytochemických postupů je oproti imunohistochemickým opožděna, ale postupuje...

Chandra A. et al: **The BSCC code of practice-exfoliative cytopathology (excluding gynaecological cytopathology).**

Cytopathology. **2009** Aug;20(4):211-23.

Chandra A. et al: **The BSCC code of practice-exfoliative cytopathology (excluding gynaecological cytopathology).**

Cytopathology. 2009 20:211-23.

Vyšetření CSF:

Indikace:

dg. infekce zejm. u
imunokompromitovaných
rozlišení reaktivní
lymfocytózy a lymfomu
diagnóza metastatického
postižení mening
staging primárních
mozkových nádorů

Doručení na ledu, pokud není
zpracován ihned, skladovat
max.24 hod ve 4°C

Základní cytologie 2ml,
*(akceptovat a zpracovat i
méně, popsat makro vzhled)*

Preparáty a barvení:

alespoň jeden zaschlý - MGG;
další

další preparáty: dle indikace
ZN (AFB), D-PAS, Grocott,
mucikarmín

IMUNOCYTOCHEMIE

průtoková cytometrie u
podezření na lymfom

Shrnutí

Imunocytologické vyšetření mozkomíšního moku:

Vyžaduje:

- ◆ přítomnost testovaných buněk v analyzovatelném množství - počet neudán, ojedinělé výsledky jsou však neinterpretovatelné
- ◆ krokový postup (jednorázový panel je náročný na množstvím limitovaný vzorek)
- ◆ kritickou interpretaci v kontextu ostatních nálezů

Může být diagnosticky přínosné...

Závěr

- Imunocytochemie likvoru má svá specifika a limity (jako každá metoda)
- Konstantně přítomný kvantitativní limit nutí více než u jiných typů cytologických vzorků k předvídaté strategii vyšetřování
- Stojí za to se o ni u definované dif. dg. situace pokusit a
- **KRITICKY INTERPRETOVAT**

Děkuji za pozornost



Schlossalm