

Cytologie

v kontextu komplexní likvorové diagnostiky

MUDr. Ondřej Sobek, CSc., MIAC ¹

Prof. MUDr. Jaroslava Dušková, CSc., FIAC ^{1,2}

MUDr. Lenka Ceprová ¹, Ing. Inka Matuchová, PhD ¹

¹ Laboratoř pro likvorologii, neuroimunologii patologii a speciální diagnostiku,
Topelex Praha

² Ústav patologie 1.LF UK a VFN, Praha

Co je likvor?

LIKVOR

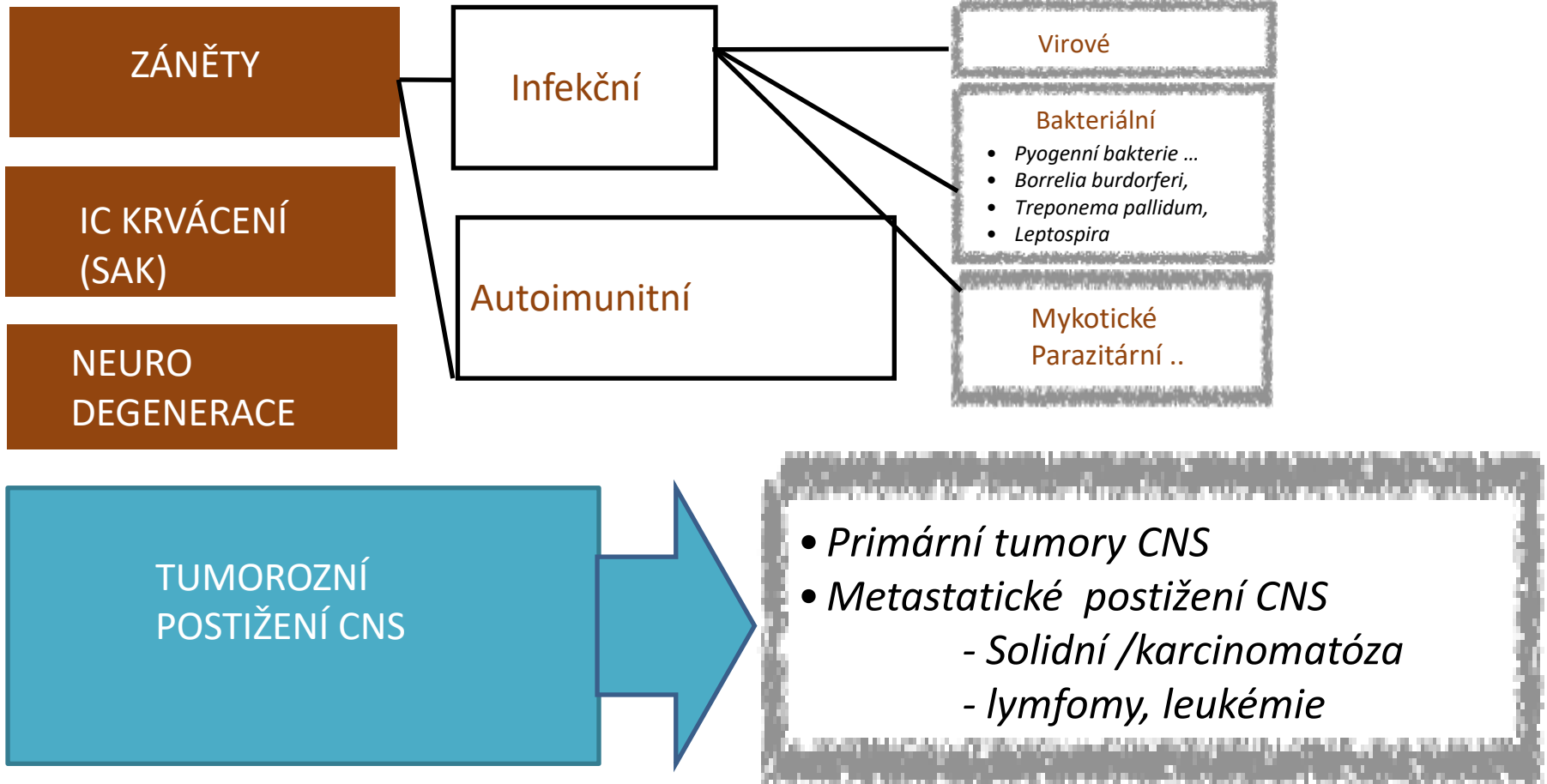
specifická extravaskulární tekutina

- V intimním kontaktu s **CNS**
- Likvorový kompartment odd. systémem funkčních a anatomických „bariér“ od krevního kompartmentu
- Specifické vlastnosti:
 - Malý objem 150ml
 - Hypoosmotický
 - Oligocelulární

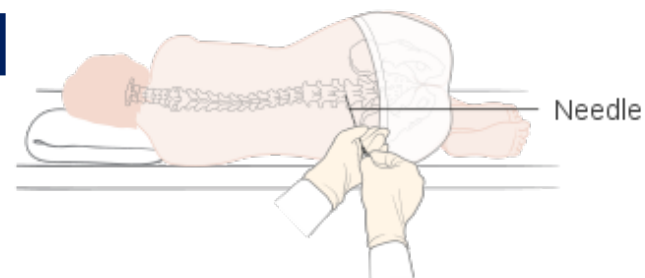
Indikace likvorologického vyšetření



Pre-analytické požadavky : čerstvý vzorek (2-3h), optimálně 5-10ml



Odběr likvoru

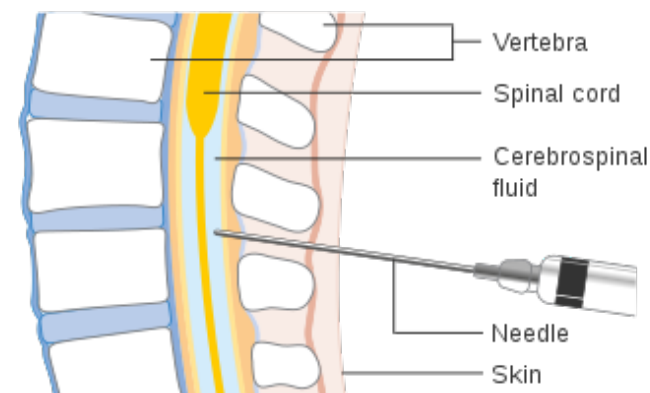


Lumbální punkce (L3/4- L5/S1)

- vleže (tlak <20 cm vodního sloupce/ 15 mm Hg)
- vsedě (tlak <40 cm vodního sloupce/ 30 mm Hg)

Test průchodnosti likvorových cest:

- Queckenstedtův test (komprese jugulárních žil)
- Stookeyho zkouška (zvýšení abdominální tlaku)



©Cancer Research UK

Odběr do 2-3 zkumavek / 10-15ml / paralelně odběr krve

Další způsoby odběru:

- komorová punkce (NCH výkon)
- suboccipitální punkce (historická...)

nutno uvádět způsob odběru na žádance (kraniokaudální gradient proteinorhachie)!

Lumbální punkce



Rizika a KI odběru likvoru

Kontraindikace lumbální punkce:

- nitrolební hypertenze (oční pozadí nebo CT / MRI mozku)
- poruchy krevní srážlivosti

Komplikace během punkce:

- nabodnutí obratle, venozního plexu
- kontakt s nervovým kořenem

Postpunkční obtíže (bolest hlavy, závratě, nauzea)...

Prevence:

- atraumatická jehla (minimalizuje postpunkční únik likvoru)
- horizontální poloha
- hydratace

Likvorologie = multidisciplinární diagnostika

**Cytologie vč.
imunocytologie**

(cytolog / patolog)

Biochemické vyšetření

(klinický biochemik)

Proteinogram:

Q (Alb), Ig (IEF),

specifické – strukturální proteiny
(NSE, S100, Tau, 14-3-3, BTP...)

**MULTIDISCIPLINÁRNÍ
PŘÍSTUP**

Imunologické parametry

(neuro-imunolog)

zánětlivé markery..IL6, CXCL13

neurální autoprotiátky

(AQP 4, NMDAR...)

Průkaz infekčních agens

(mikrobiolog)

ELISA (TBE, Neuroborreliosa...)

PCR (Herpetické, meningokok..)

**KOMPLEXNÍ
SYNTÉZA VÝSLEDKŮ
&
INTERPRETACE
(NEUROLOG)**



Koncepce likvorologické diagnostiky

- Parametry základní likvorologie
 - Akutní dostupnost (STATIM)
 - Základní, rychlá identifikace patologického nálezu
 - Indikace následných specializovaných vyšetření
- Specializovaná likvorologie
 - Detailní identifikace typu patologického procesu
 - Laboratorně- klinická interpretace

Vyšetření v likvorologii

- **Biochemicko- energetické parametry (KEB)**
 - **Cytologické vyšetření (ICC,FCM)**
-
- Stanovení funkce hemato- likvorové bariery (Q Alb)
 - Vyšetření imunoglobulinů (IEF- OCB)
 - Detekce neurálních autoprotilátek (CBA)
 - Stanovení mikrobiálních agens (ELISA, PCR)
 - Stanovení markerů zánětu
 - Vyšetření strukturálních proteinů CNS

Metody likvorové CYTOLOGIE

- **Kvantitativní**- cell count
 - FR / automatizované (FCM)

- **Kvalitativní**
 - Cytocentrifugace
500ul CSF, 5 min. / 1100 rev./min
(Event. cytosedimentace – nižší záchyt)
 - MGG, ORO, PAP, PAS, Gram, Ziehl-Neelsen...

- **Imunocytochemie**
 - Mono Ab – identifikace buněčných subtypů, nádorových elementů

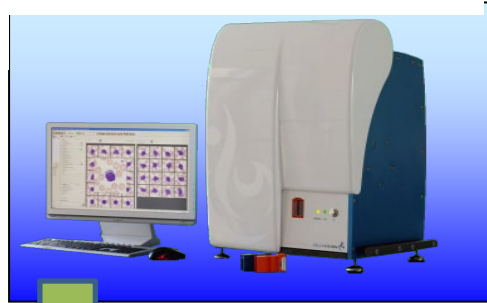
- **Automatizované metody**- flow cytometry
 - identifikace + KVANTIFIKACE buněčných subtypů (lymfocytární apod)
 - dg. leukemické, lymfomové infiltrace CNS

Likvorová cytologie up-to-date

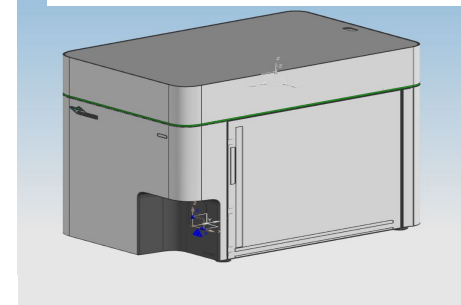
*Automatizovaný
cell- counting*



Digitální morfologie



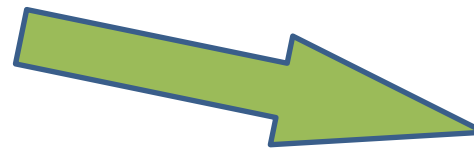
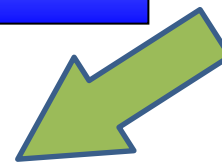
Průtoková cytometrie



Konvenční mikroskopie



Digitální mikroskopie

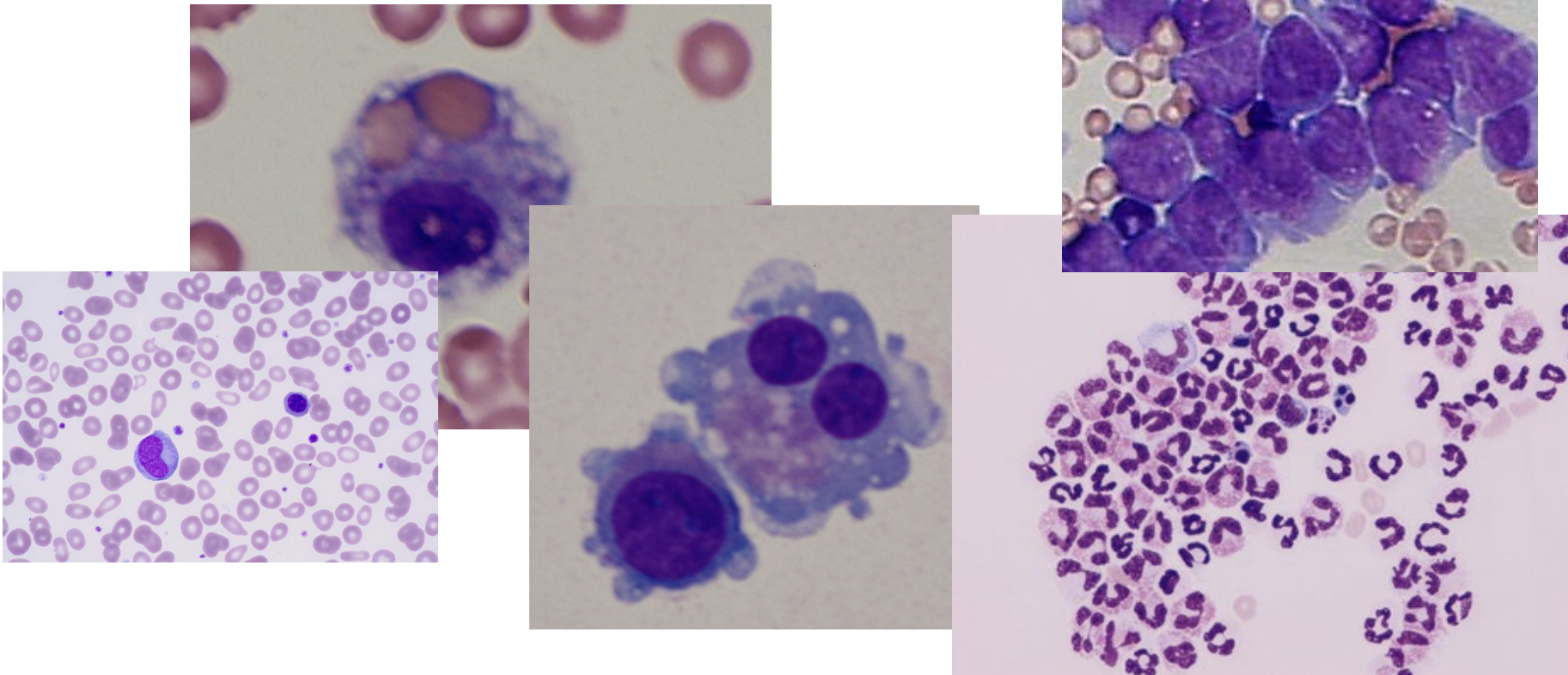


KVALITATIVNÍ CYTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ LIKVORU

- **PREANALYTICKÁ FÁZE!** Čerstvý nativní likvor, do 2(-3) hodin od odběru
- zhotovení trvalého preparátu
(cytocentrifugace likvoru + základní barvení typu MGG)

MORFOLOGIE BUNĚK

diff, aktivační stádia, zánětlivá celulóza, hemoragické složky, nádorové buňky...



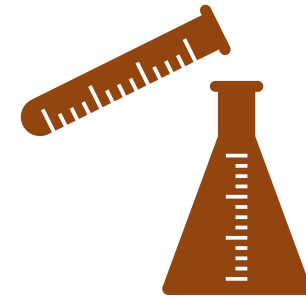
METODY KVALITATIVNÍ CYTOLOGIE

→ Základní barvení:

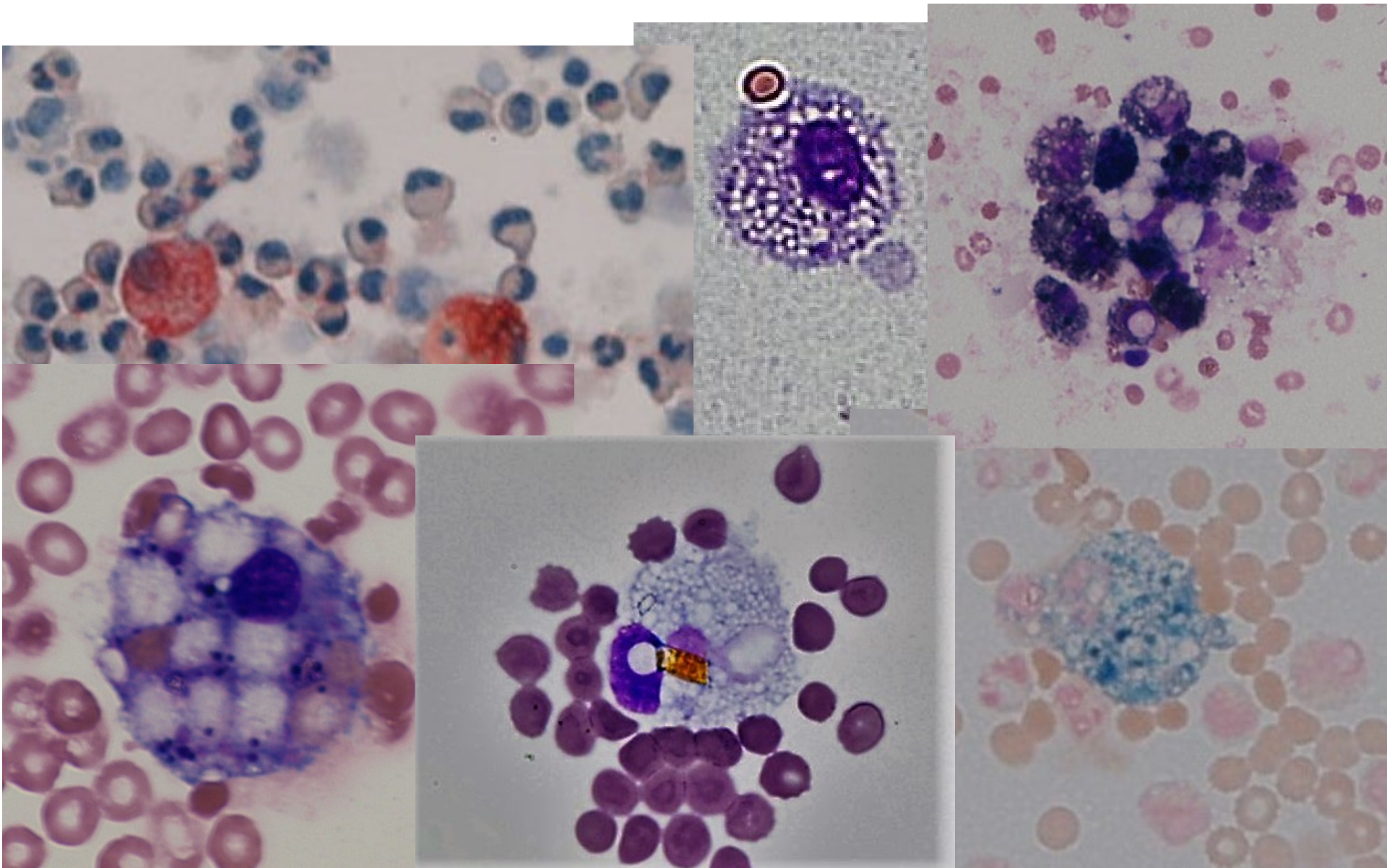
- **May-Grünwald / Giemsa-Romanowski (MGG)**

→ Speciální barvicí metody:

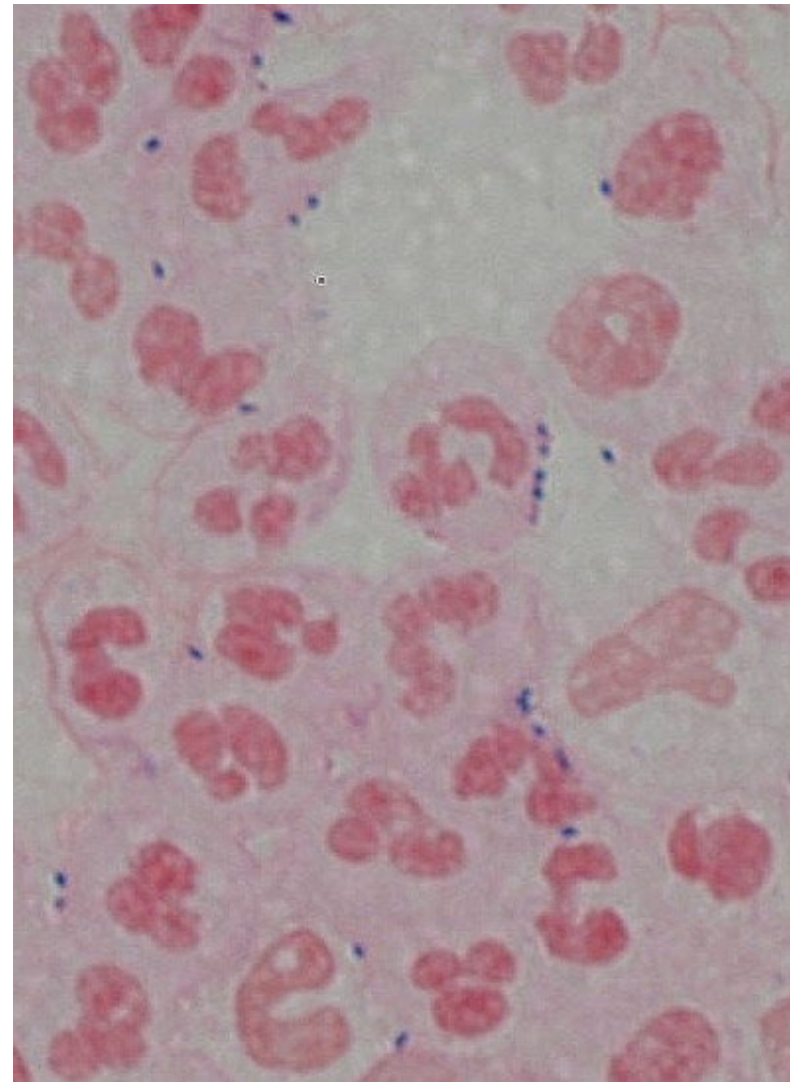
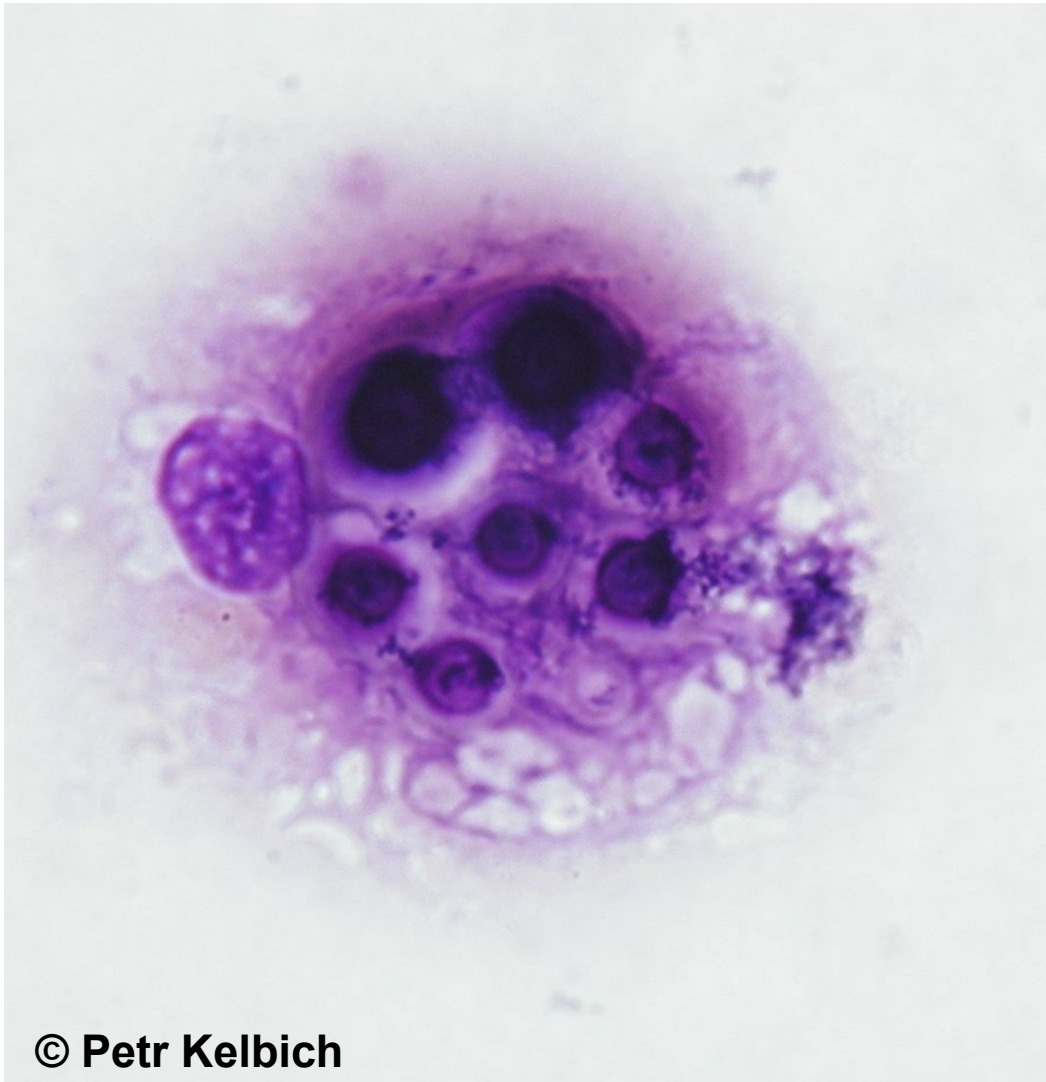
- průkaz lipidů (ORO, Sudanová černě)
- Průkaz železa (Berlínská modř)
- Hematoxylin- Eosin
- barvení dle Papanicolaoua
- PAS reakce
- Barvení na jádérka (Toluidinová modř)
- barvení dle Grama
- Barvení dle Ziehl-Neelsena (mykobaktérie)



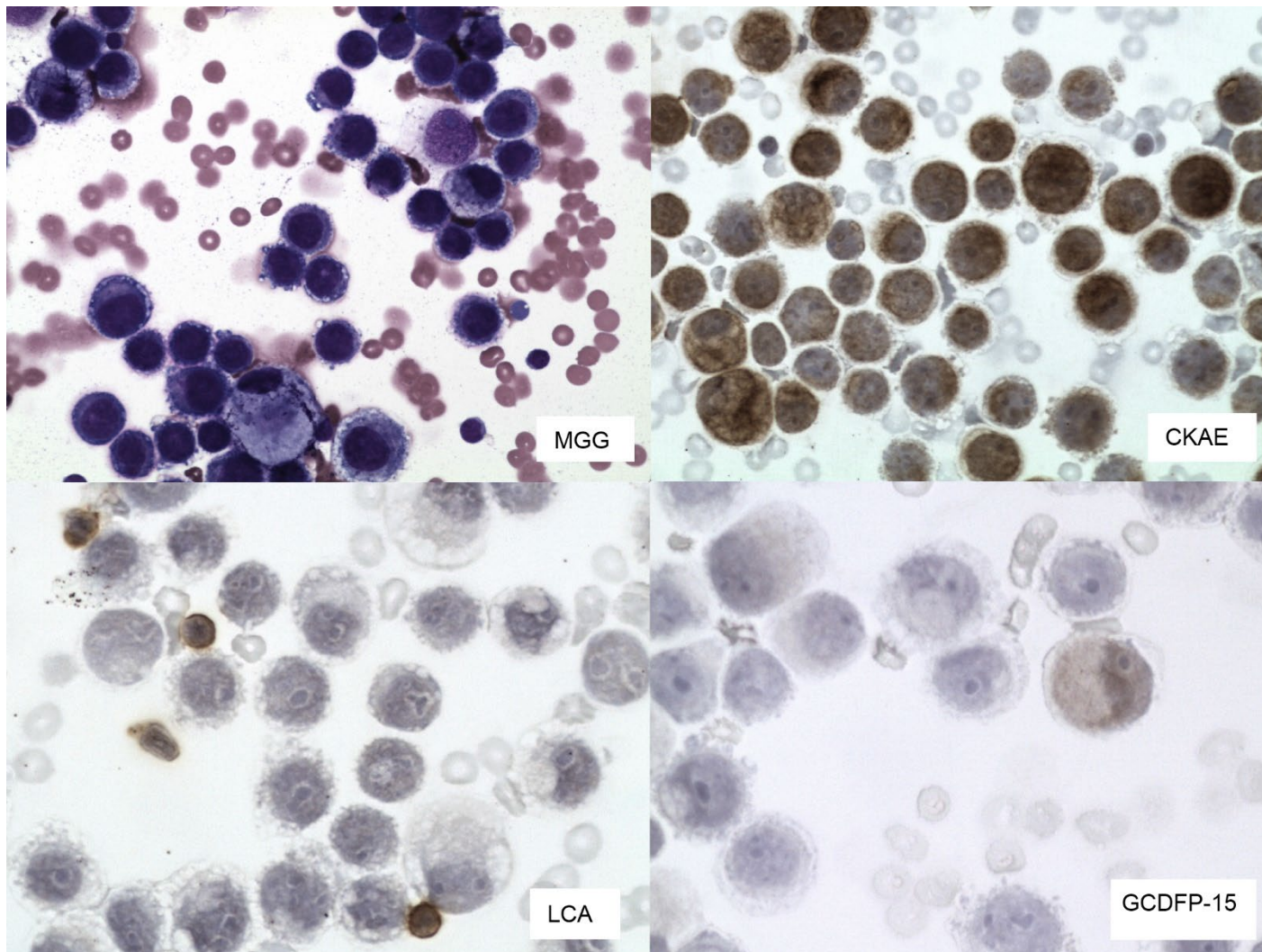
Monocyty & makrofágy v likvoru



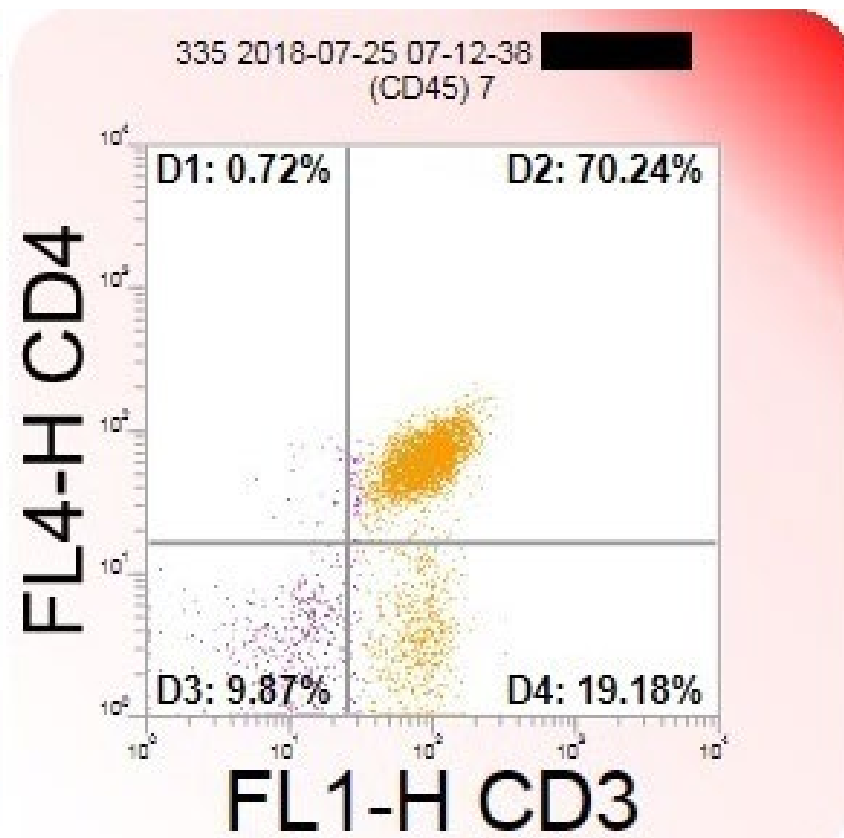
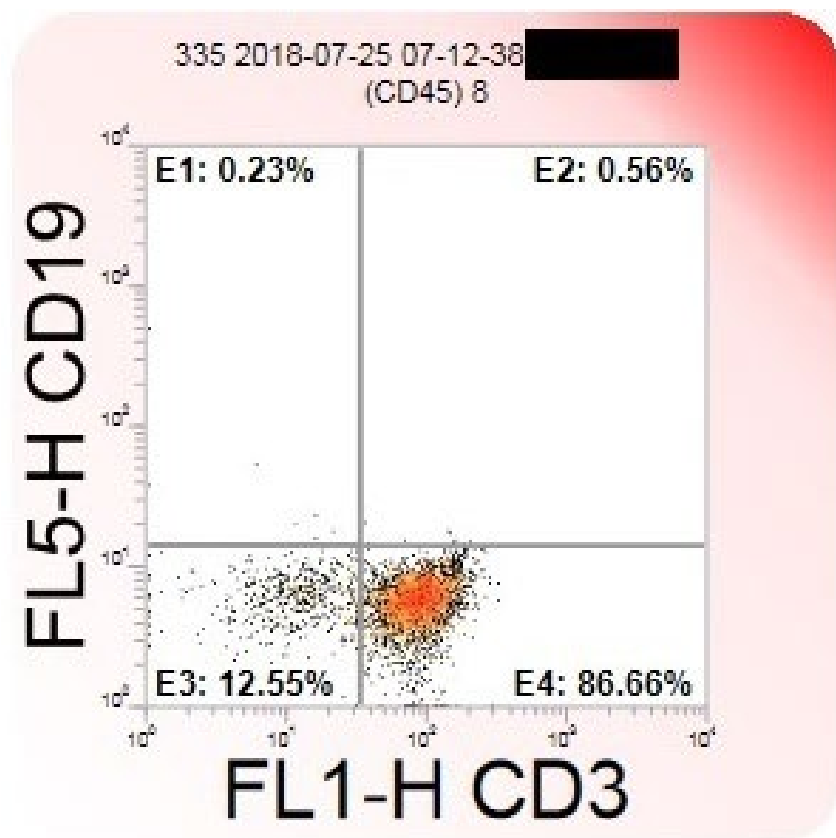
Přímá mikroskopická identifikace mikrobiálních agens



Imunocytochemická identifikace nádorových buněk v likvoru



Využití průtokové cytometrie v likvoru



Úskalí FCM v likvoru

Úskalí průtokové cytometrie likvoru

- Malý objem primárního vzorku
- Přísná preanalytická fáze (2h od odběru)
- Problém s oligocelulárními vzorky
- Množství debris
- Obtížná interpretace
- Optimalizace laboratorního protokolu

Specifický protokol

- Jasně ohraničené populace i při oligocelularitě likvoru!



Vyšetření **IMUNOGLOBULINŮ** v likvoru

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Stanovení hmotnostní koncentrace

+ výpočtové vztahy i.t. frakce (likvor a sérum):

- Alb, IgG, IgM, IgA
- **up-to-date** FLC κ , λ (Index)

KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Stanovení OCB metodou IEF (likvor a sérum)

Vyšetření **IMUNOGLOBULINŮ** v likvoru

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Stanovení hmotnostní koncentrace

+ výpočtové vztahy i.t. frakce (Reiber)

$$\textit{Antibody_index} = \frac{Q(IgX)_{SPEC}}{Q(IgX)_{TOTAL}}$$

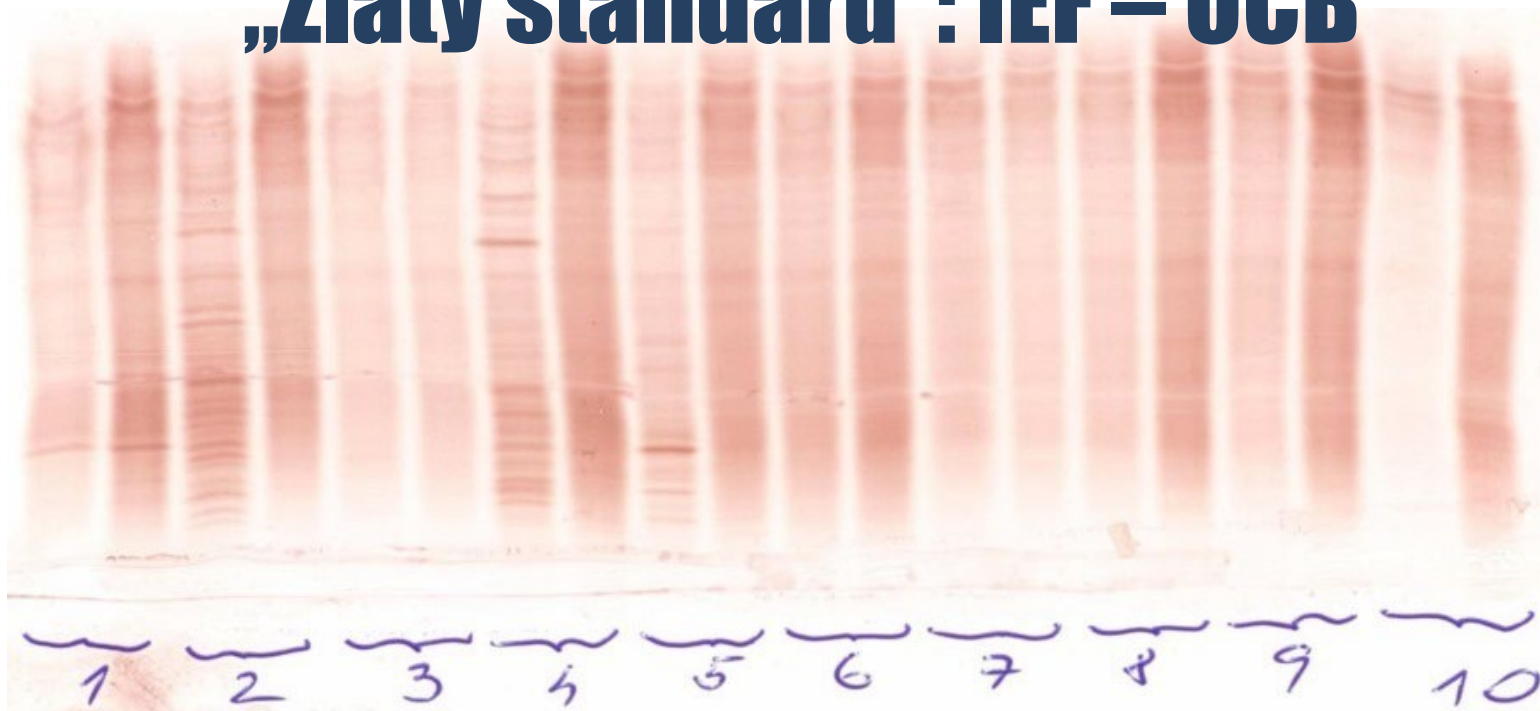
- $Q(IgX)_{TOTAL} > Q_{lim(IgX)}$, dosadíme Q_{lim}

$$Q_{lim(IgG)} = 0,93 * \sqrt{(Q_{alb})^2 + 6 * 10^{-6}} - 1,7 * 10^{-3}$$

$$Q_{lim(IgM)} = 0,67 * \sqrt{(Q_{alb})^2 + 120 * 10^{-6}} - 7,1 * 10^{-3}$$

Vyšetření IMUNOGLOBULINŮ v likvoru

„Zlatý standard“: IEF – OCB



IEF v souboru 25.402 vzorků/ 0 OCB IgG v CSF:

IgM OCB CSF **17,88%**

IgA OCB CSF **17,79%**

FLC K OCB CSF **4,97%**

FLC L OCB CSF **7,16%**

Konfirmace protilátek WB: S-CSF

Pacient. ID: 6161
Vytvořit: 21.12.2017
Výsledky z: 17.04.2018

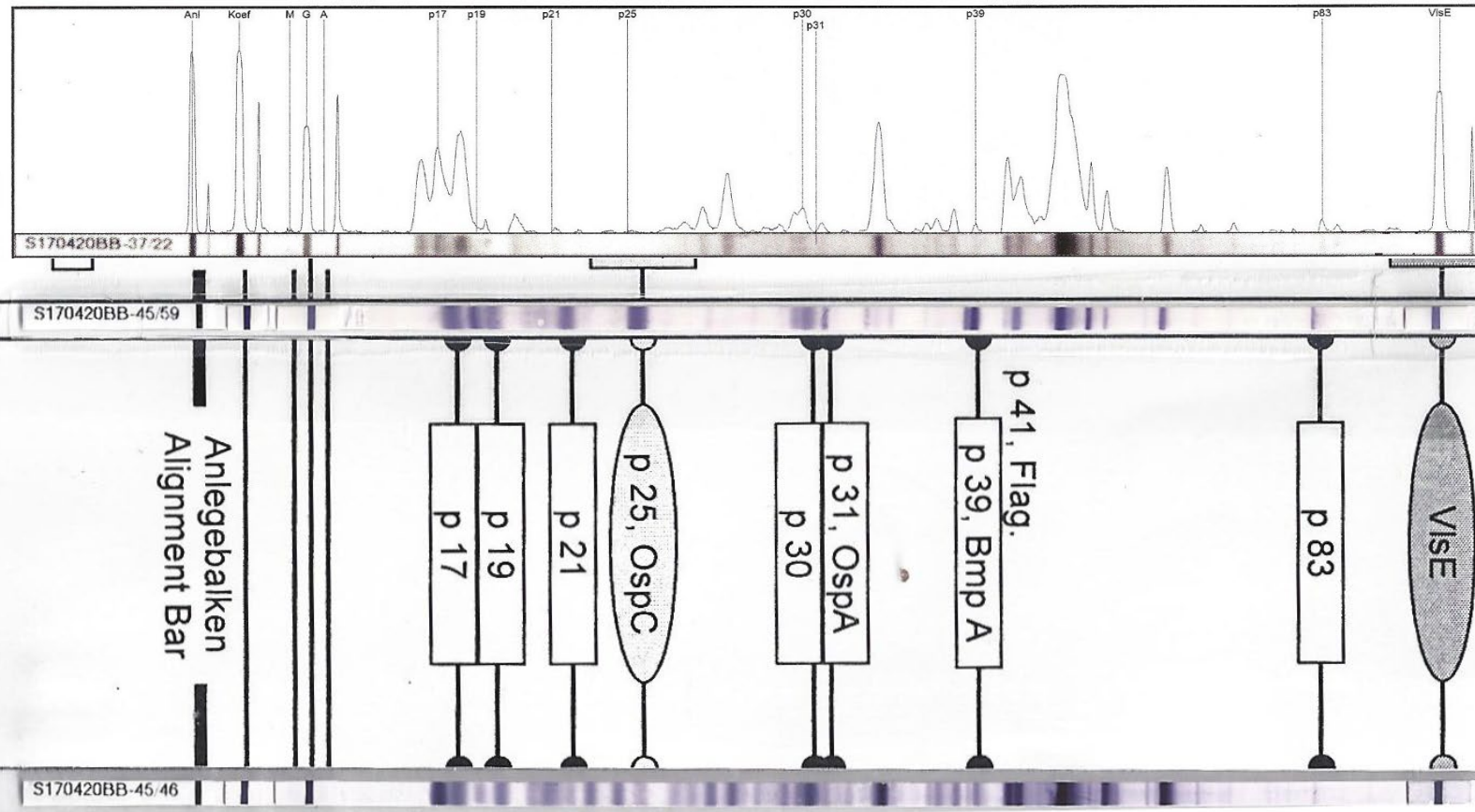
Test:
jamka:

Borrelia EUROLINE-WB IgG
1

Sérum

Template

CSF



Neuroimmunologické parametry - autoprotilátky

- **NMOSD / MOGAD**

AQP 4

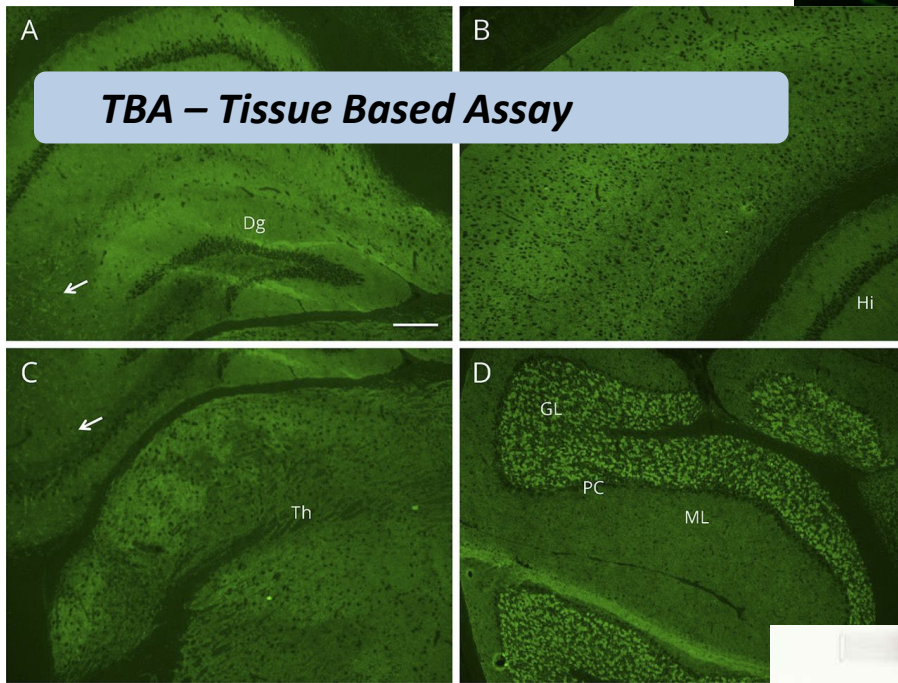
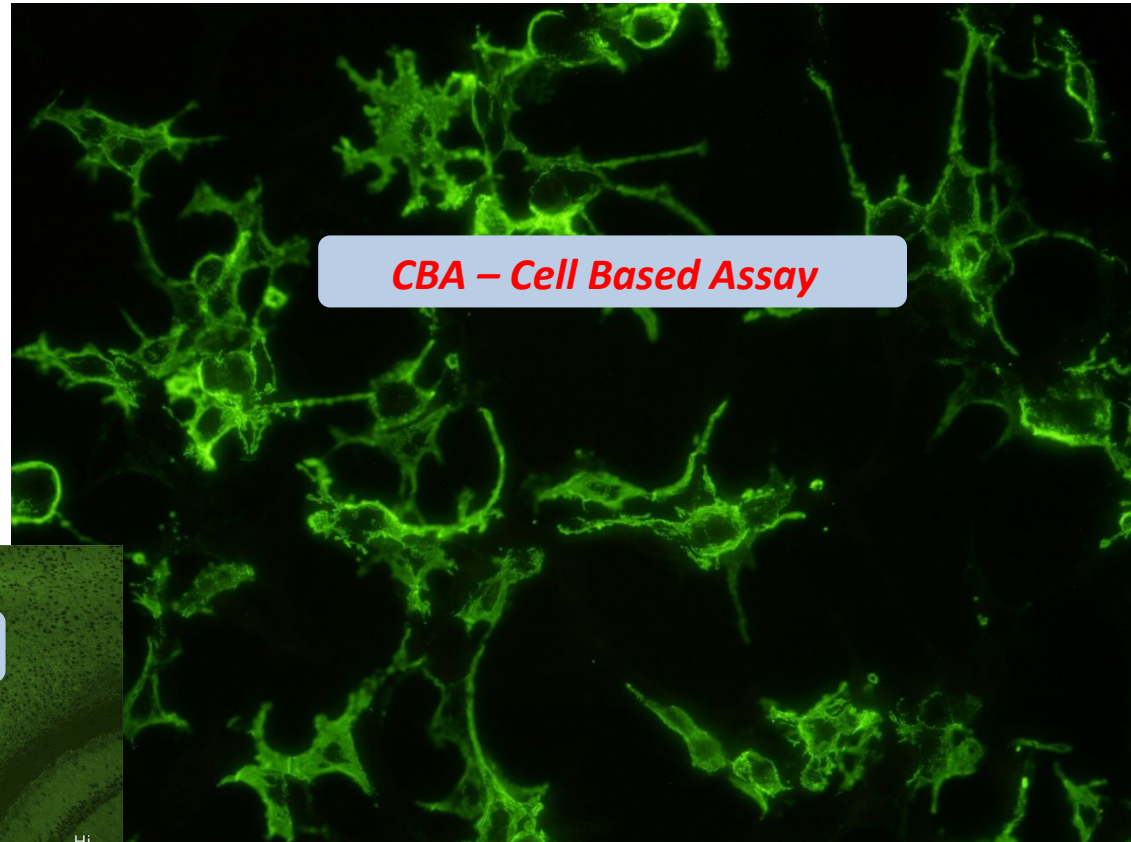
MOG

- **autoimunitní encefalitidy**

NMDAR, VGKC, AMPAR, GABAR...

- **onkoneurální autoprotilátky**

Yo, Hu, Ri, PNMA2...



Gangliosidové protilátky

GM1,GM2,GM3,GM4

GD1a,GD1b,GD2,GD3

GT1a,GT1b,GQ1b...

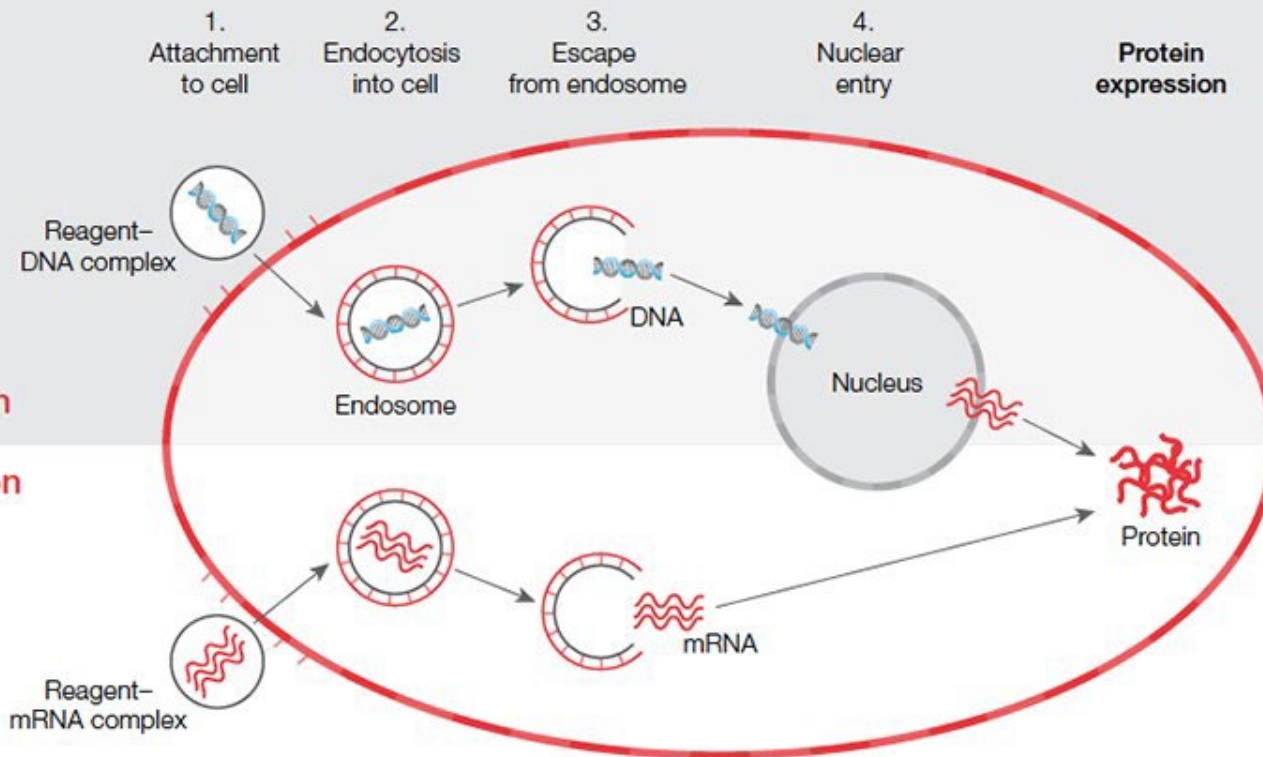
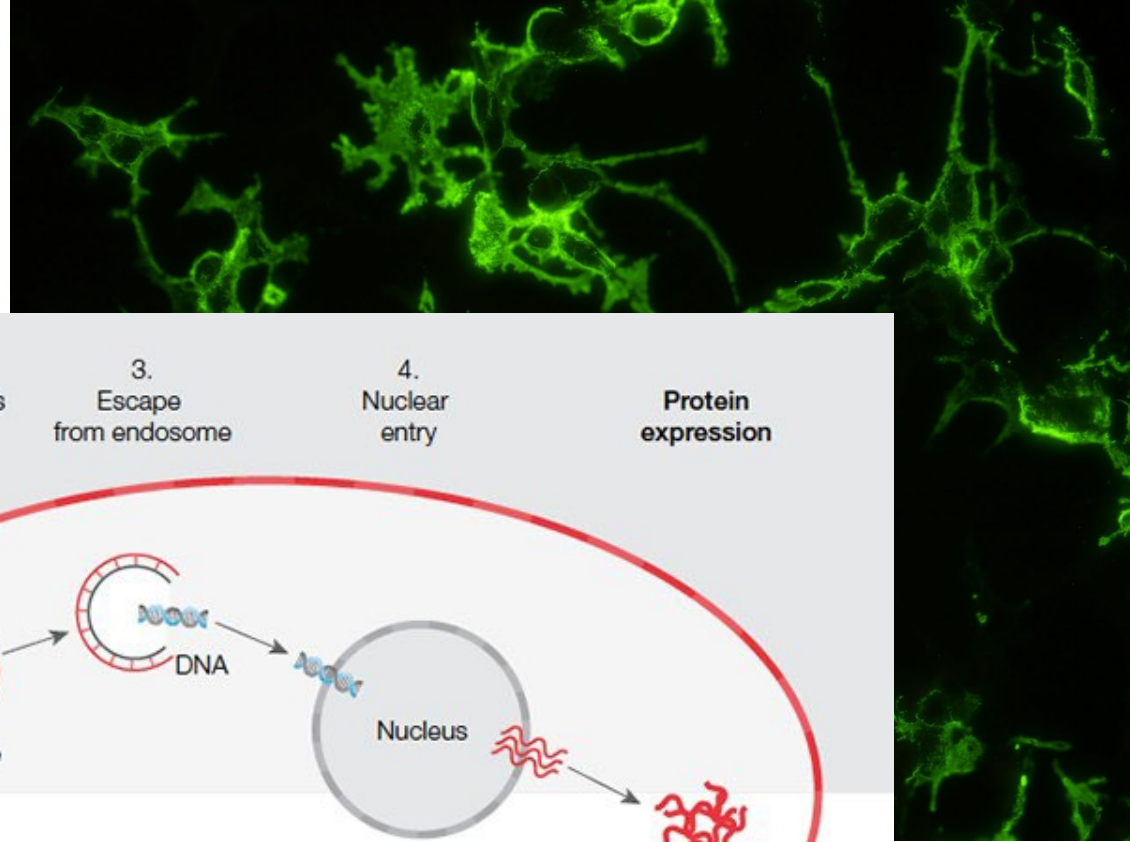
CBA – metoda buněčné transfekce

Buněčná line **HEK 293**

(**H**uman **E**mbrionic **K**idney)

- prof. van der Eb, Uni Leiden v r. 1973

- transfekce embryonálních lidských buněk adenovirem



Přímá detekce mikrobiálních agens - PCR

! Prioritní při akutním průběhu !

Metoda volby pro rychlou diagnostiku infekčních agens

!!! Herpetické viry

!!! STATIM dg. bakteriální meningitidy

!!! PML - JC virus u imunosuprimovaných pacientů

Borelie v časném stádiu

Enteroviry

M. tuberculosis

Chlamydia, Mycoplasma, HHV6, HHV7 ...

Cytokiny - humorální markery zánětu

IL- 6 (IL-1) – neuroinfekce, zejm. bakteriální, obecně

IL- 8 – zánět, tkáňové poškození

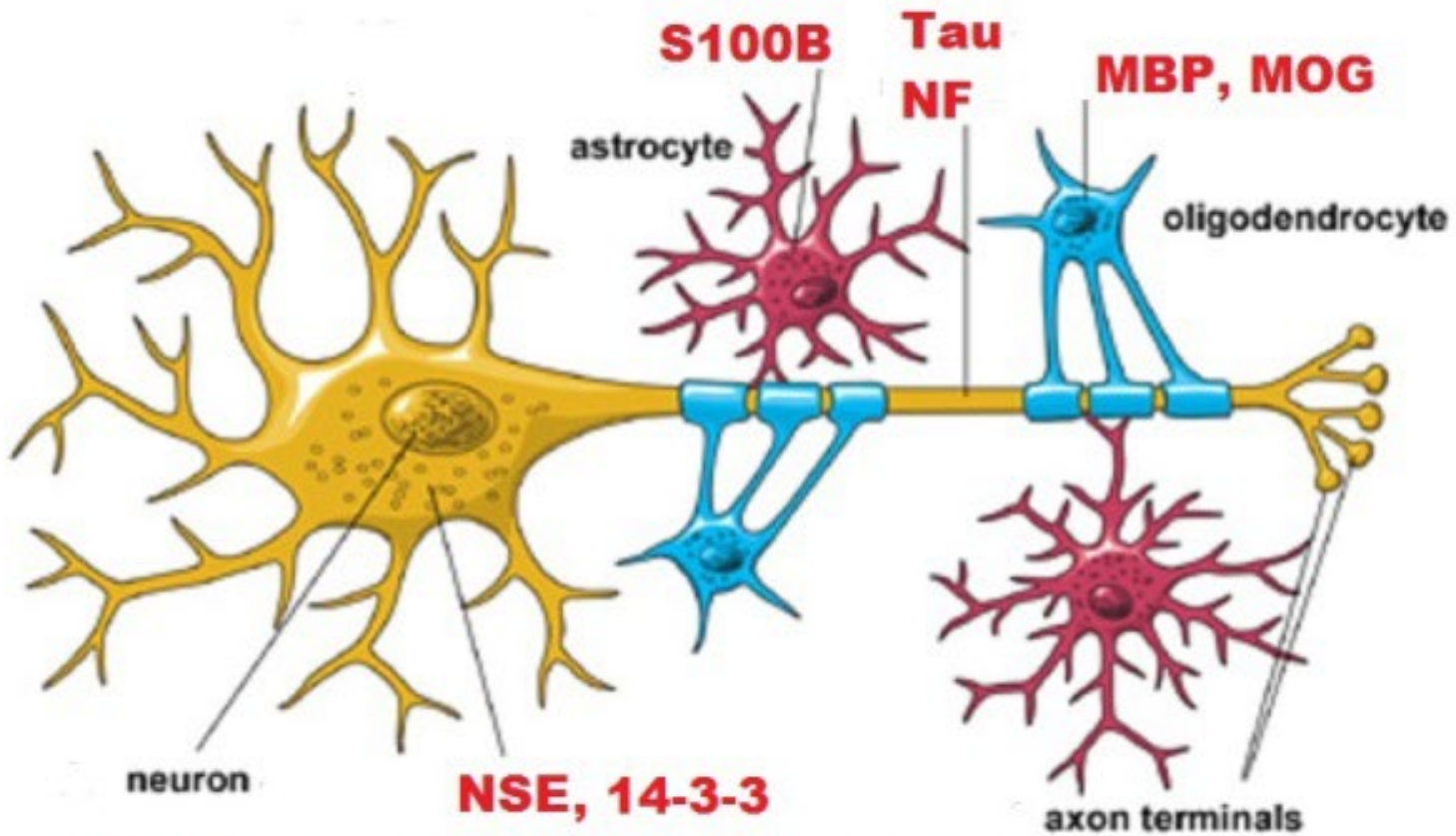
IL- 10- Inhibuje Th1 lymfocytární odpověď

CXCL 13 - neuroborelioza ... RS

(CAVE- není výlučně specifický!)

Cytokin	Likvor pg/ml	Sérum pg/ml
IL-1	<5.4	<5
IL-6	<7.9	<5.9
IL-8	<91	<62
IL-10	<5.4	<9.1
CXCL-13	<20	-

Strukturální proteiny CNS: identifikace tkáňové léze



Distribuce strukturálních proteinů CNS

<http://www.ninds.nih.gov/>

Strukturální proteiny CNS: markery tkáňové léze

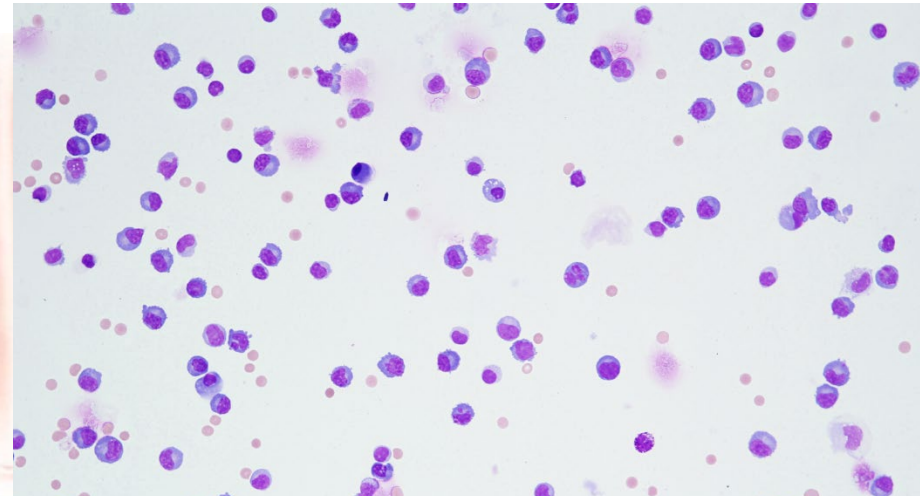
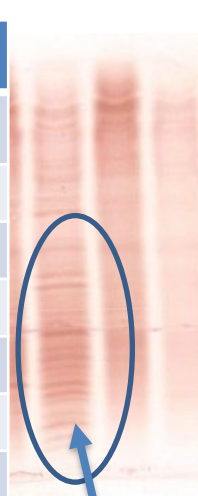
Typ „destrukčního“ markeru - strukturálního proteinu CNS	Zdrojový buněčný typ / subcelulární struktura
S100B (calcium-binding protein B)	Astrocyty / celulární regulační protein
NSE (neuron-specific enolase)	Neurony / intracelulární enzym
14-3-3 („14th fraction on positions 3.3“)	Neurony, glie / celulární regulační protein
Tau (tubulin-associated unit)	Neurony/ soma, axon (mikrotubulární protein)
NF (neurofilamenta)	Neurony / axon (součást cytoskeletu)
MBP (myelin basic protein)	Oligodendrocyty / myelin
MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein)	Oligodendrocyty / myelin
GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Astrocyty

Komplexní diff.dg. v likvoru

Kazuistika- žena, 55 let, rozvoj spastické paraparezy...

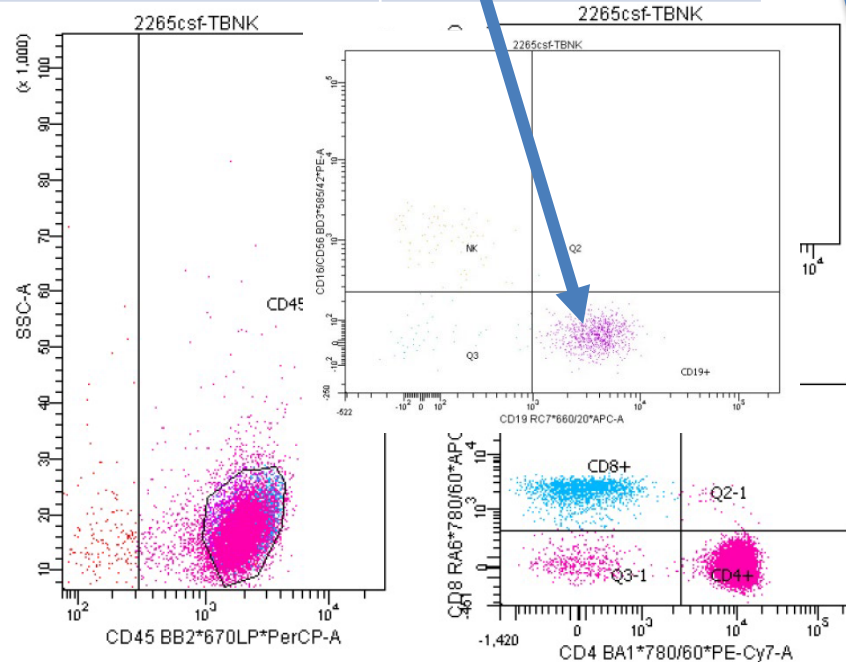
VÝSLEDKY PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

CD45+ lymfocyty (%)	93,4
CD4+ Th-lymfocyty (%)	67,6
CD8+ Tc-lymfocyty (%)	16,8
IRI (CD4/CD8)	4,02
CD19+ B-lymfocyty (%)	11
NK-buňky (%)	0,7
Klonalita CD19+ B-lymfocytů	Polyklonální



LABORATORNÍ LIKVOROVÉ VÝSLEDKY

JE/ μ	149	(<5)
CB (g/l)	1,99	(0,18-0,43)
KEB	7,81	(>28)
CXCL 13 (pg/ml)	302,67	(< 20)
IL-6 (pg/ml)	7,72	(<7,9)
IL-8 (pg/ml)	95,6	(<91)
S100 (ug/l)	1,28	(0,304-1,60)
Anti-Boreliové protilátky ve třídě IgG v CSF	Pozitivní AI	



Komplexní a rychlá diagnostika

Pac. 19 let, během 12h rozvoj horečky, nauzea, zvracení, porucha vědomí... LP

15:30h

- granulocytární pleocytoza v cytologickém obraze CSF

16:21h

Elementy: 9130 /ul , Erytrocyty: 1109 /ul

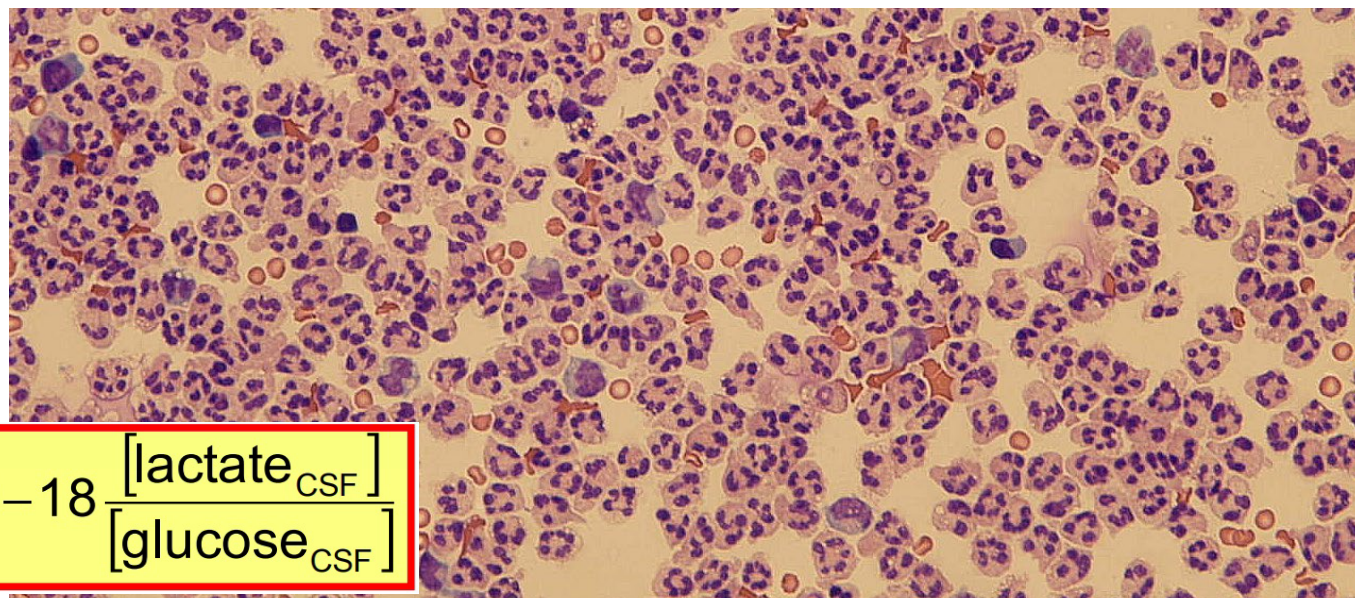
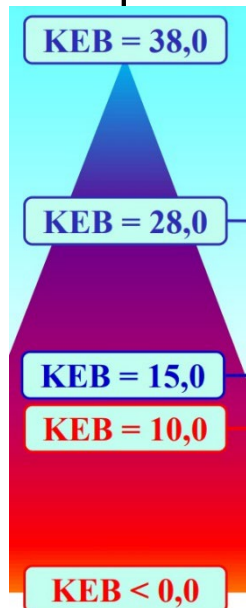
- výrazně zvýšená permeabilita hematolikvorové bariery (CB CSF 6,9 g/l)

- anaerobní metabolismus v likvorovém kompartmentu (KEB -21004)



19:47h

- PCR potvrzená přítomnost **Neisseria meningitidis** v CSF.



$$\text{KEB} = 38 - 18 \frac{[\text{lactate}_{\text{CSF}}]}{[\text{glucose}_{\text{CSF}}]}$$

Kelbich P, Hejčl A, Selke Krulichová I, Procházka J, Hanuljaková E, Peruthová J, Koudelková M, Sameš M, Krejsek J: Coefficient of energy balance, a new parameter for basic investigation of the cerebrospinal fluid.

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2014; 52: p. 1009-1017.

Cytologie v komplexní diagnostice LIKVORU

▶ Likvorová cytologická diagnostika zahrnuje:

- *Kvantitativní cytologii*
- *Kvalitativní cytologii*
- **ICC**
- **FCM**

Automatizované / imuno metody jako nadstavba klasické cytologie

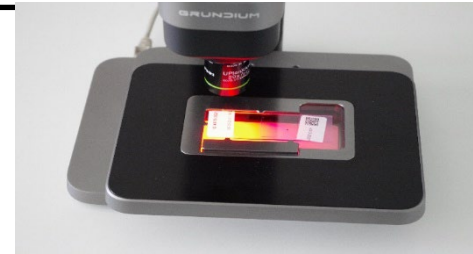
- ***Nutno hodnotit vždy v kontextu základního mikroskopického nálezu***
- ***podávají další komplementární informace...***

▶ Přísná preanalytická kritéria pro likvor:

- *čerstvý vzorek (2-3h max)*
- *dostatečný objem (5-10ml)*

▶ **Cytologie součástí komplexní laboratorní diagnostiky !**

- *Biochemické parametry*
- *Imunologické parametry*
- *Mikrobiologické parametry*



Likvorologická diagnostika up-to-date...

- ▶ Spolupráce se specializovanou likvorologickou laboratoří
 - komplexní „**up-to-date**“ spektrum vyšetření
 - multidisciplinární team
- ▶ Intenzivní komunikace klinik ↔ laboratoř
- ▶ Vhodně indikované spektrum likvorových parametrů
- ▶ komplexní interpretace likvorového nálezu