

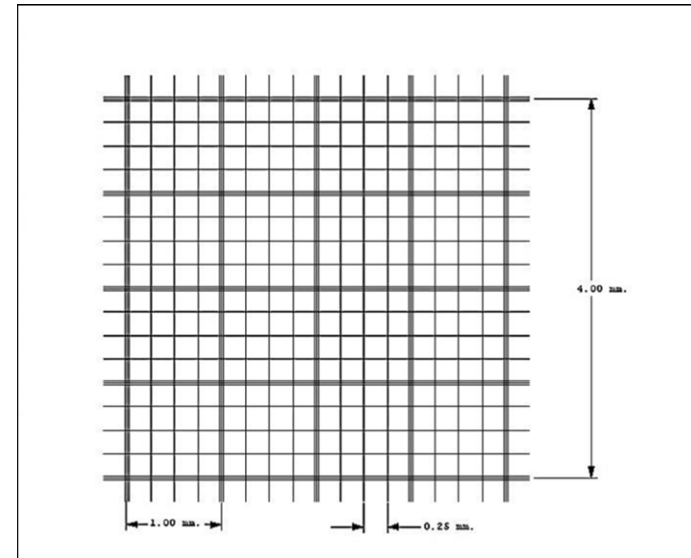
# **Základy cytologie likvoru**

David Zeman

2023

# Kvantitativní cytologické vyšetření likvoru

- Fuchs – Rosenthalova komůrka
- Objem 3,2  $\mu\text{l}$
- Jaderné buňky barvíme (např. roztokem fuchsínu v kyselině octové, popř. roztokem methylvioletu nebo toluidinové modři)
- Ery počítáme v „nativním“ (nebarveném) likvoru
- Orientační diferenciace (nejlépe jen mononukleáry/ polymorfonukleáry)
- Normocytóza  $\leq 4/\mu\text{l}$
- Pleocytóza  $> 4/\mu\text{l}$
- Spotřeba vzorku: 0,12 ml (v nouzi stačí 0,06 ml)



# Korekce na ery

*provádí (si) lékař, nikoliv laboratoř!*

- Klasický vzorec (nutno dosadit ve stejných jednotkách!):

$$CSF - leuko_{korig.} = CSF - leuko_{měř.} - \frac{CSF - ery \times krev - leuko}{krev - ery}$$

- Dětská hematoonkologie (studie) – fyziologicky je

$$\frac{CSF - leuko}{CSF - ery} \leq 2 \times \frac{krev - leuko}{krev - ery}$$

# Kvalitativní cytologické vyšetření

## Příprava preparátu – cytosedimentační metoda

- Různé modifikace Saykovy metody
- *Zde: komůrka podle Němečkové (firma Mikropur, Hradec Králové)*
- Sedimentace buněk a gravitační přítlačná síla
- Dlouhá životnost
- Šetrnost (výtečné zachování morfologie buněk)
- Doba sedimentace cca 20 minut
- Cena cca 8 000 Kč
- Spotřeba vzorku: 0,25-0,35 ml (přes 1 filtrační papír)



# Kvalitativní cytologické vyšetření

## Příprava preparátu – cytocentrifugační metoda

- Cytocentrifuga (zde: *Cytofuge 2* firmy *StatSpin*)
- Volitelná rychlost a čas centrifugace, 3 druhy cytocentrifugačních komůrek
- Používáme nízké otáčky, krátký čas (600/min = 20 × g, 4 minuty) – výtečné zachování morfologie buněk
- Paralelní příprava až 4 preparátů
- Cena cca 50 000 – 80 000 Kč
- Spotřeba vzorku: 0,1-0,2 ml



# Kvalitativní cytologické vyšetření

- **Základní barvení:**
  - May-Grünwald-Giemsa
  - Alternativa (rychlejší): Diff-Quik (*Medion Diagnostics*)
    - Fixační Fast green v methanolu
    - Eosin G ve fosfátovém pufru
    - Thiazin ve fosfátovém pufru
  - RAL Diff-Quik (*RAL Diagnostics*), Hemacolor® (*Merck*)
- **Speciální barvení:**
  - Gramovo barvení (baktérie)
  - Průkaz  $\text{Fe}^{3+}$  (berlínská modř)
  - Průkaz lipidů (olejová červeň, sudanová čern)
  - Průkaz mukopolysacharidů a glykogenu (PAS, PAS/alcián)
  - ... a mnoho jiných
  - Imunocytochemická barvení

# Preanalytika

- Zkumavky bez protisrážlivých činidel, bez akceleratorů srážení !!!  
(obvyklá chyba: zkumavka z krastenem po jeho „vysypání“ ze zkumavky)
- Počítání jaderných buněk a ery: do 2 (max. 3) hodin po odběru
- Příprava preparátu: optimálně do 2 hodin po odběru; zkušenost však ukazuje, že prodleva nepřesahující 4-6 hodin nevede k výraznější alteraci nálezu
- Připravený preparát vydrží i bez použití chemické fixace několik dnů
- V případě pozdního zpracování vzorku je třeba na výsledkový list do poznámky uvést datum a čas odběru, jak je uvedené na žádance
- V případě opožděné přípravy preparátu popisujeme preparáty bez závěru (nejsou-li zachyceny jednoznačně diagnostické změny, např. nádorové buňky, siderofágy apod.)
- ***Nedodržení preanalytických podmínek NEOPRAVŇUJE k odmítnutí vzorku – jde o VZÁCNÝ MATERIÁL, odběr nelze jednoduše opakovat !!!***

# Fyziologický cytologický likvorový nález

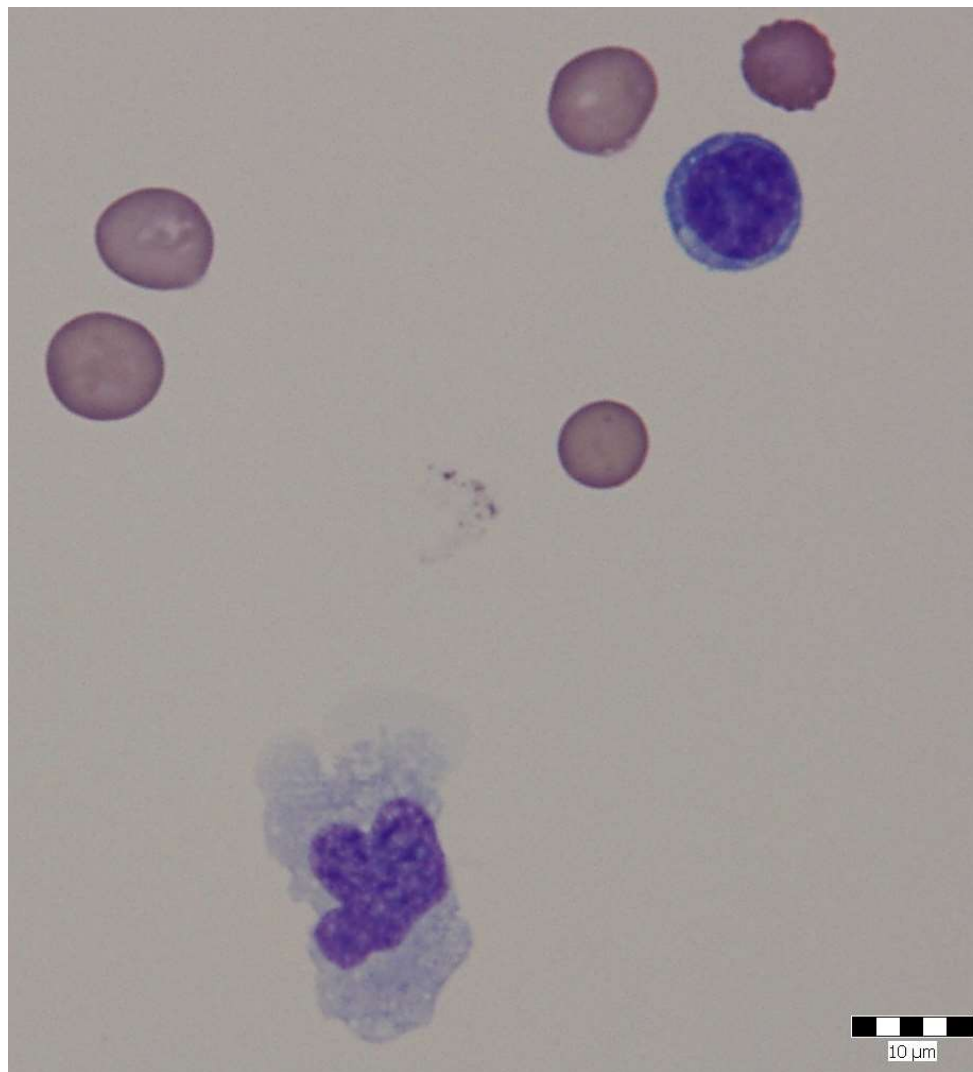
- $\leq 12/3$  ( $\leq 4/\mu\text{l}$ ) buněk ve Fuchs-Rosenthalově komůrce; žádné polymorfonukleáry
- Novorozenci a kojenci do věku 3 měsíců:  $< 10$  buněk/ $\mu\text{l}$ , mohou být ojedinělé polymorfonukleáry
- *Cytologický preparát*: „klidové“ lymfocyty a monocyty (v poměru 1:1 až cca 9:1; jejich vzájemné zastoupení závisí i na způsobu přípravy preparátu, místu odběru a množství vzorku), popř. ojedinělé buňky výstelky
- **POZOR ! I v normálním likvoru lze pozorovat:**
- ojedinělé „aktivované“ formy lymfocytů a monocytů
- ojedinělé erythrocyty
- Zcela ojedinělé (1-3 na preparát) neutrofilní granulocyty



# MONONUKEÁRY

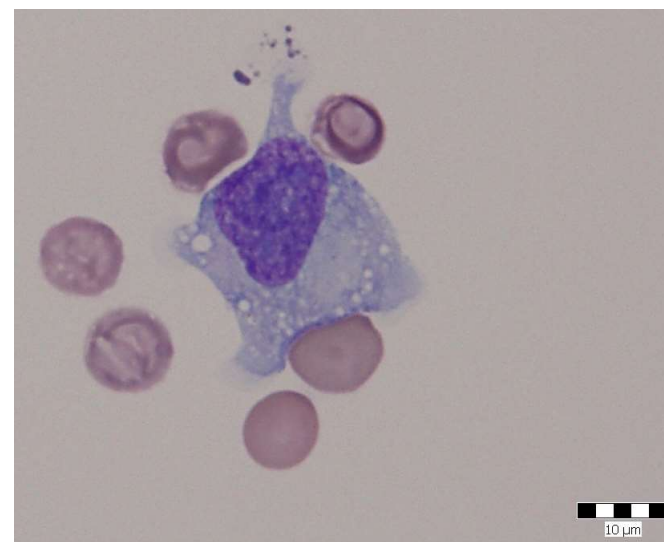
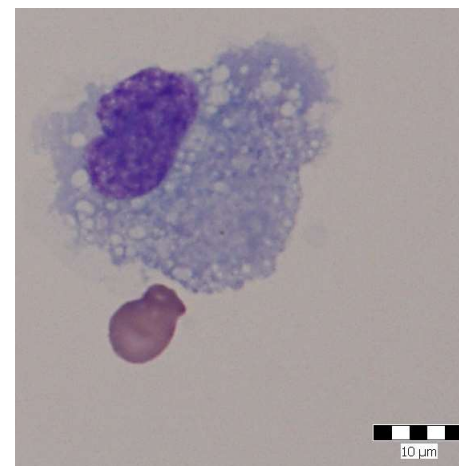
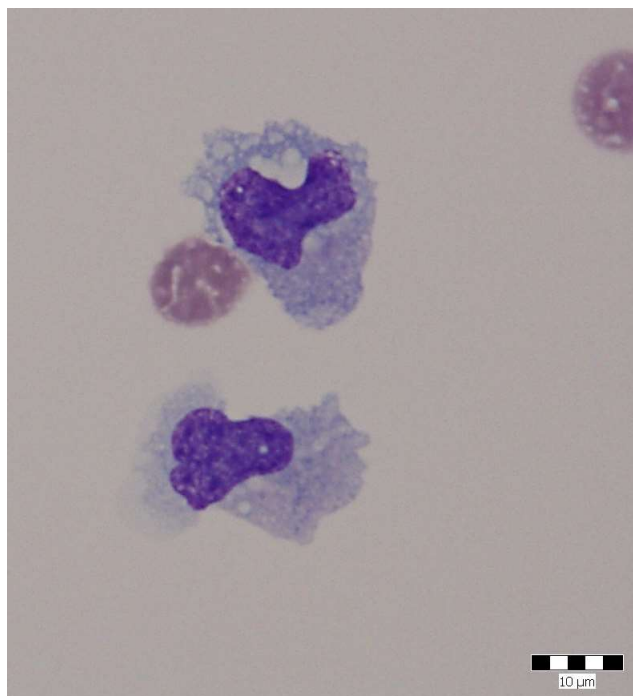
*obr. vlevo:* lymfocyt (šipka), ery

*obr. vpravo:* monocyt (dole vlevo), lymfocyt (nahore vpravo), ery

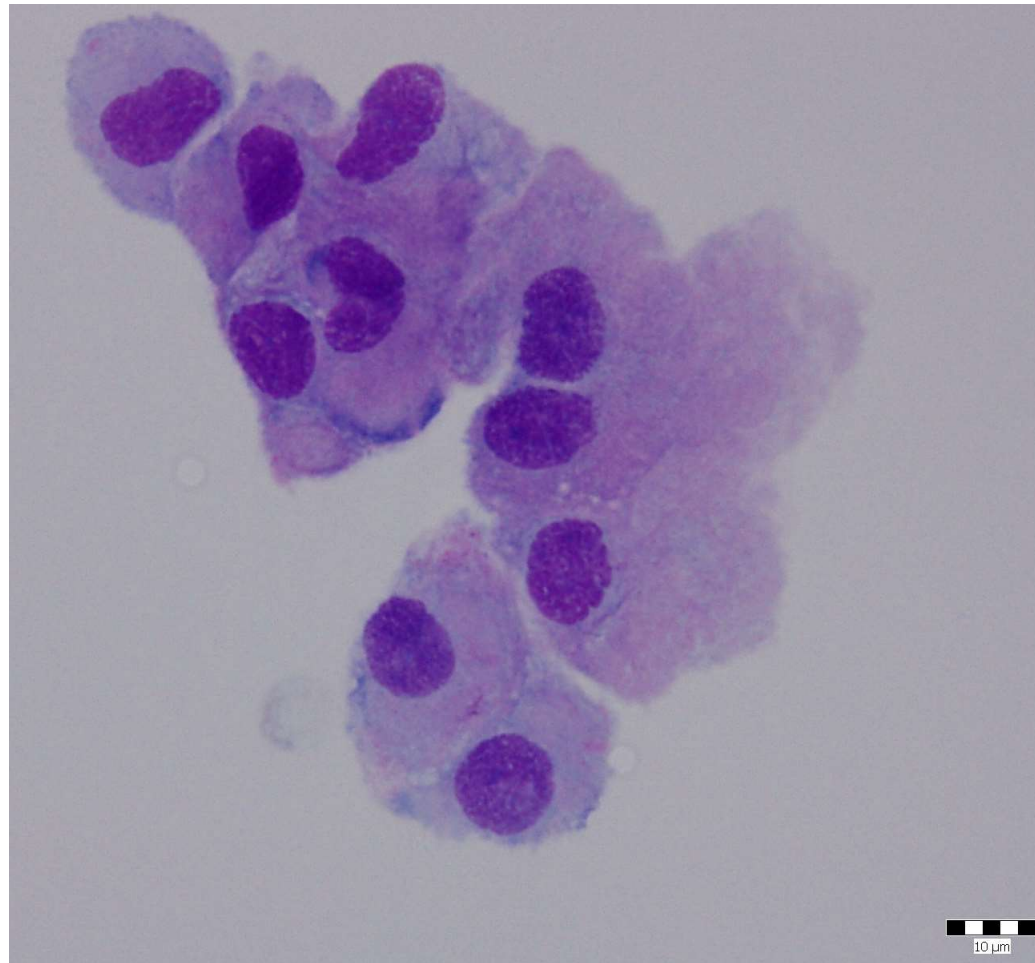
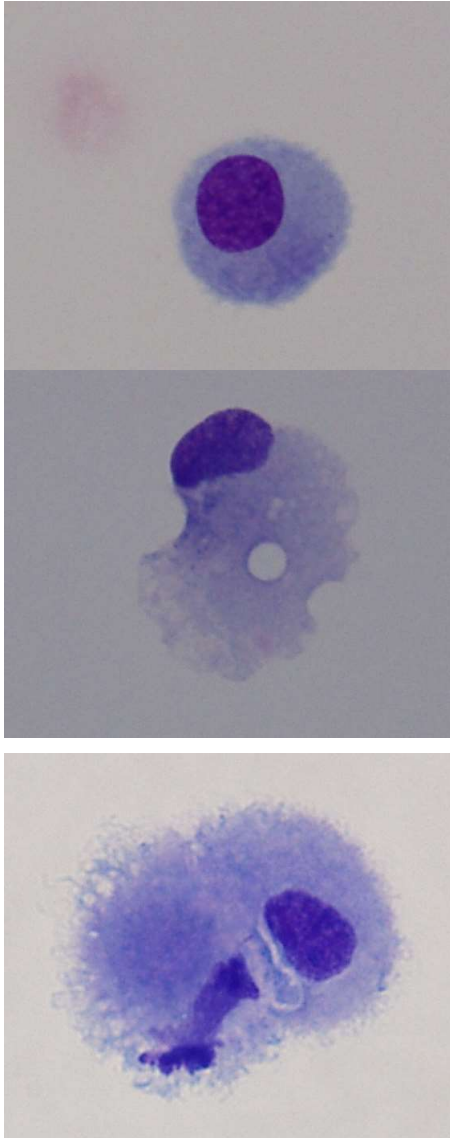


# Monocyty

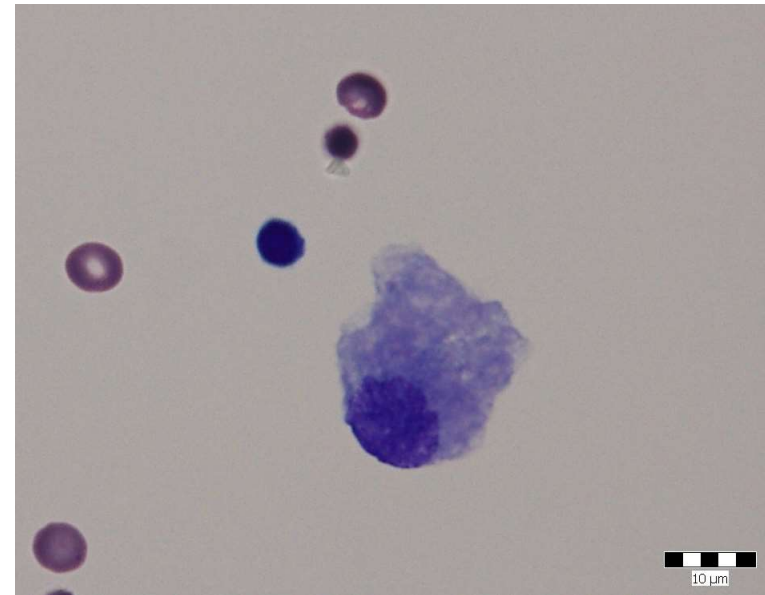
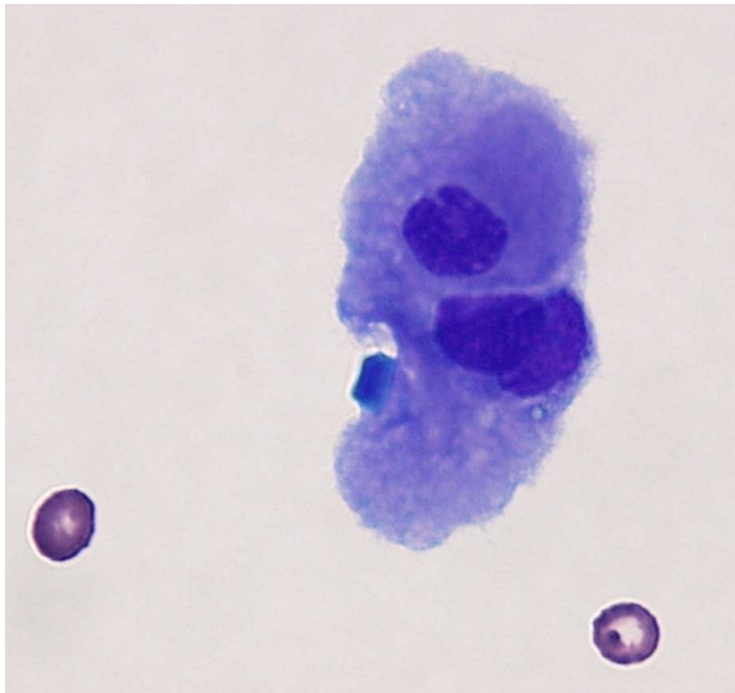
klidové (vlevo); aktivované (vpravo)



# Buňky výstelky likvorových cest



# Buňky výstelky likvorových cest



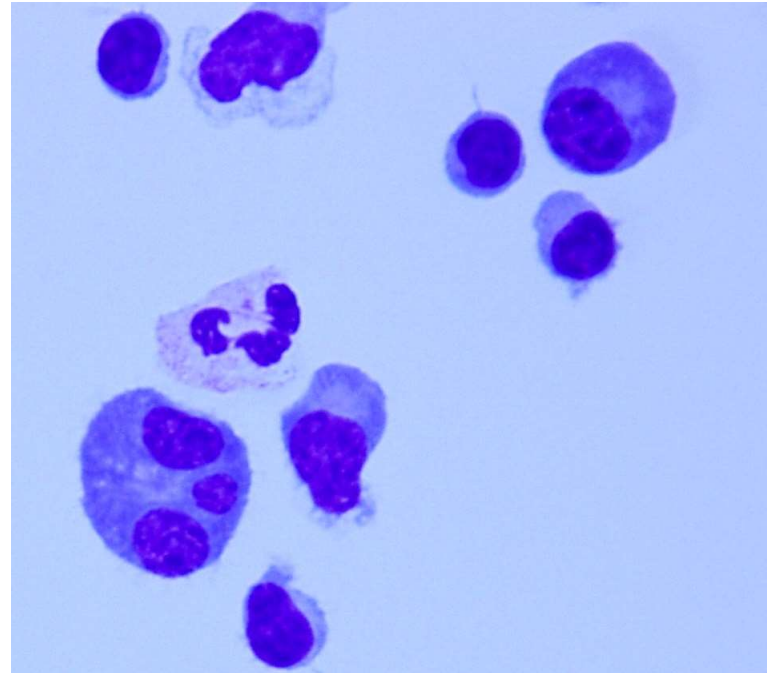
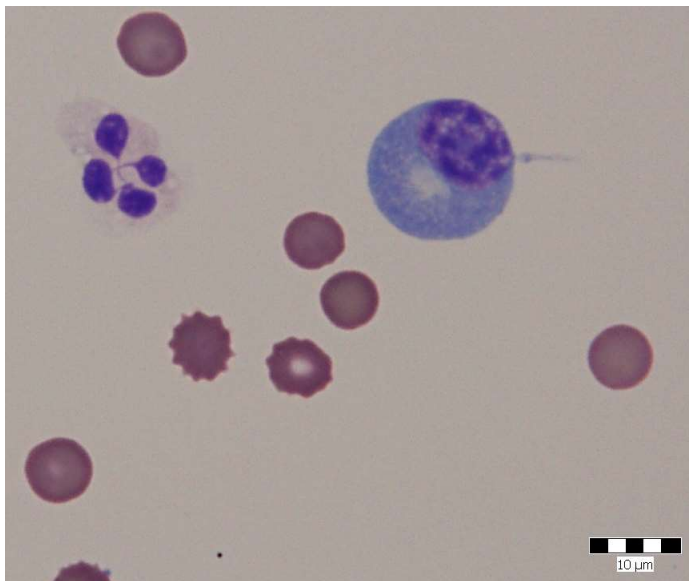
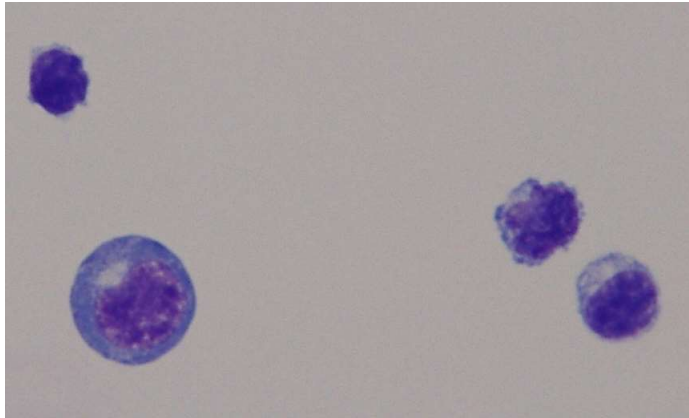
# Patologické likvorové cytologické nálezy

- *Pleocytóza* – zvýšení počtu („koncentrace“) buněk
- *Patologická oligocytóza* (nebo: *normocytóza*): normální počet buněk, abnormní buněčné složení
- *Modifikovaná klasifikace dle Adama:*
  - lymfocytární
  - monocytární
  - smíšená mononukleární (lymfocyty + monocyty)
  - granulocytární
  - smíšená (mononukleáry + polymorfonukleáry)
  - „tumorózní“ (nádorové buňky)

# Obvyklé cytologické likvorové nálezy u skupin onemocnění

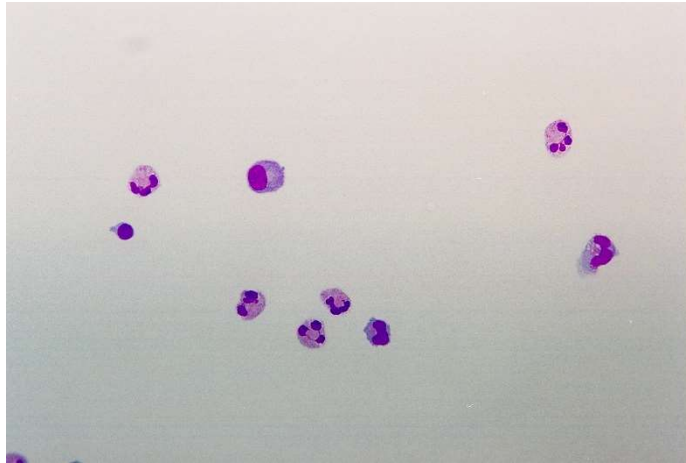
- **Hnisavé neuroinfekce** – granulocytární (neutrofilní) pleocytóza (tisíce až desetitisíce buněk/ $\mu$ l)
- **Nehnisavé neuroinfekce** – zprvu smíšená, od 3.-5. dne lymfocytární pleocytóza (stovky, max. nižší tisíce buněk/ $\mu$ l), často s plazmocytární reakcí
- **Roztroušená skleróza** – lymfocytární normocytóza nebo mírná pleocytóza (do 50 buněk/ $\mu$ l), často s plazmocytární reakcí
- **Polyradikuloneuritis Guillain-Barré** – cytologický likvorový nález bez hrubší patologie (může být mírná mononukleární pleocytóza nejvýše do 20 buněk/ $\mu$ l v 1. týdnu onemocnění) ve spojení s těžkou bariérovou poruchou ( $\uparrow\uparrow$ Q-Alb)
- **Krvácení do likvorových cest** – v úvodu neutrofilní, později smíšená (monocyty/makrofágy + neutrofilny) pleocytóza (stovky až tisíce buněk/ $\mu$ l i po korekci na množství ery), rychle nástup fagocytární reakce: fagocytóza ery (po 4-12 hodinách), hemosiderin (od 3. dne), hematoidin (od druhého týdne)
- **Maligní infiltrace mening:** nádorové buňky v preparátu (počet buněk může být velmi různý, někdy i nezvýšený!)

# Plazmatické buňky



# Nehnisavé neuroinfekce

## *Klíšťová meningoencefalitida*



1. LP (13. 6. 2000): CSF lehce zkal.,  
po centrif. čb

906/3 elem, 80/3 ery, CB 0.91 g/l,  
glukóza 4.25 mmol/l,

laktát 1.95 mmol/l

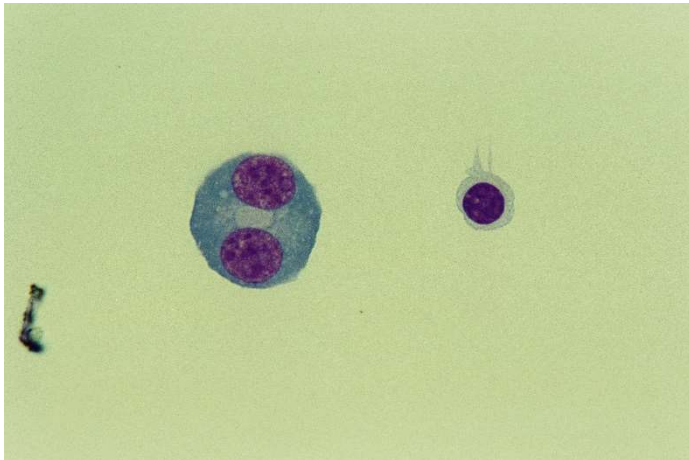
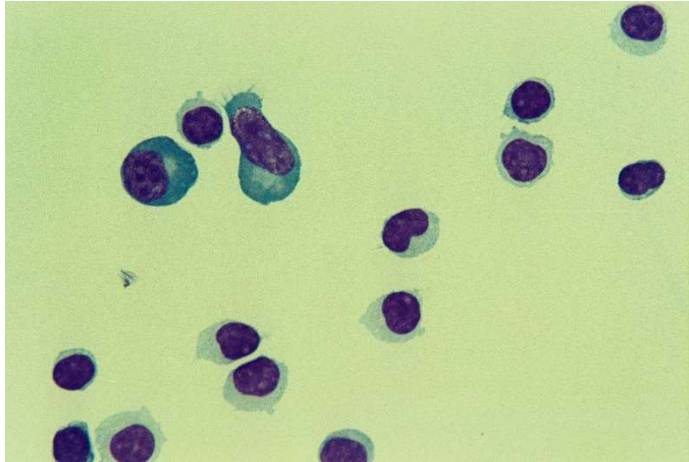
*Kontrolní LP (10. 7. 2000):* CSF čb,  
167/3 elem, 5/3 ery, CB 0.55 g/l,  
glukóza 2.9 mmol/l, Q-Alb 7.2,  
i.th. IgG 43% (38 mg/l), i.th. IgM  
94% (91 mg/l), i.th. IgA 0%





# Nehnisavé neuroinfekce

## *Neuroborrelióza*

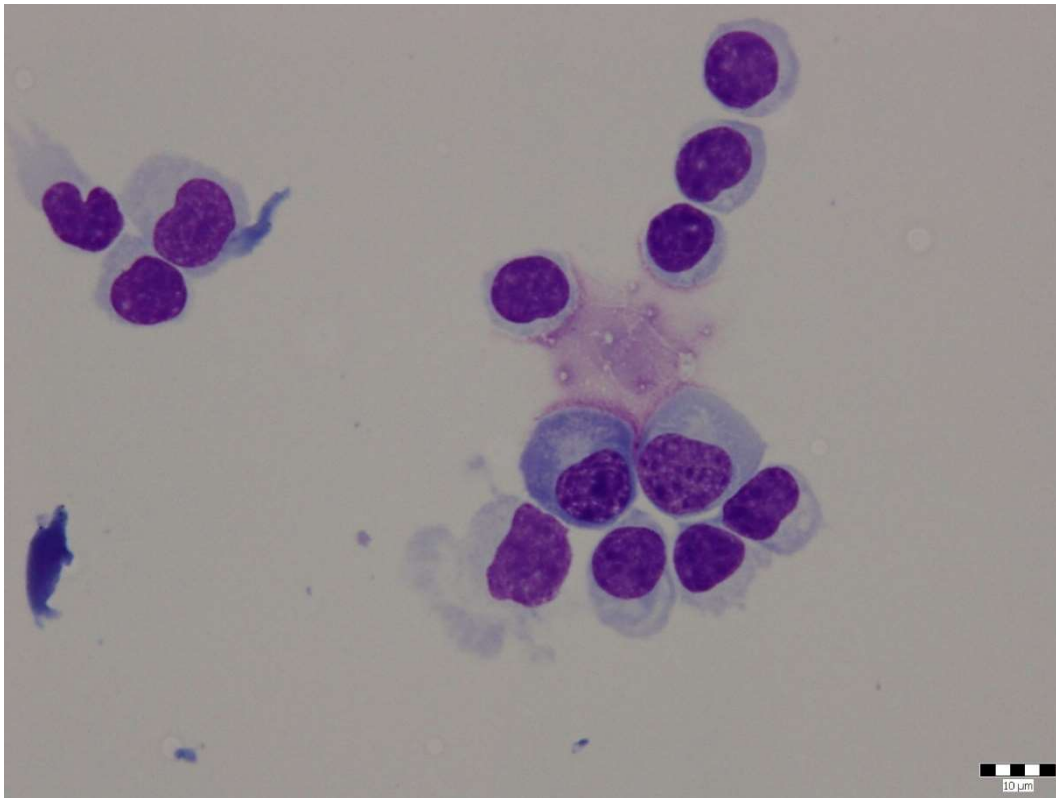


- Muž 64 let, meningo-polyradikuloneuritický sy.
- CSF: čb, 728/3 elem, 2/3 ery, cytologie: lymfo 88%, plazmo 7%, mono 4.5%, neu 0.5%

CB 1.26 g/l, glukóza 4.2 mmol/l, laktát 2.3 mmol/l, Q-Alb 19.2, i.th. IgG 30% (78 mg/l), i.th. IgM 63% (16 mg/l), i.th. IgA 0%, fκLC-index 7, oligo-f κLC pozitivní.

# Neuroborrelióza

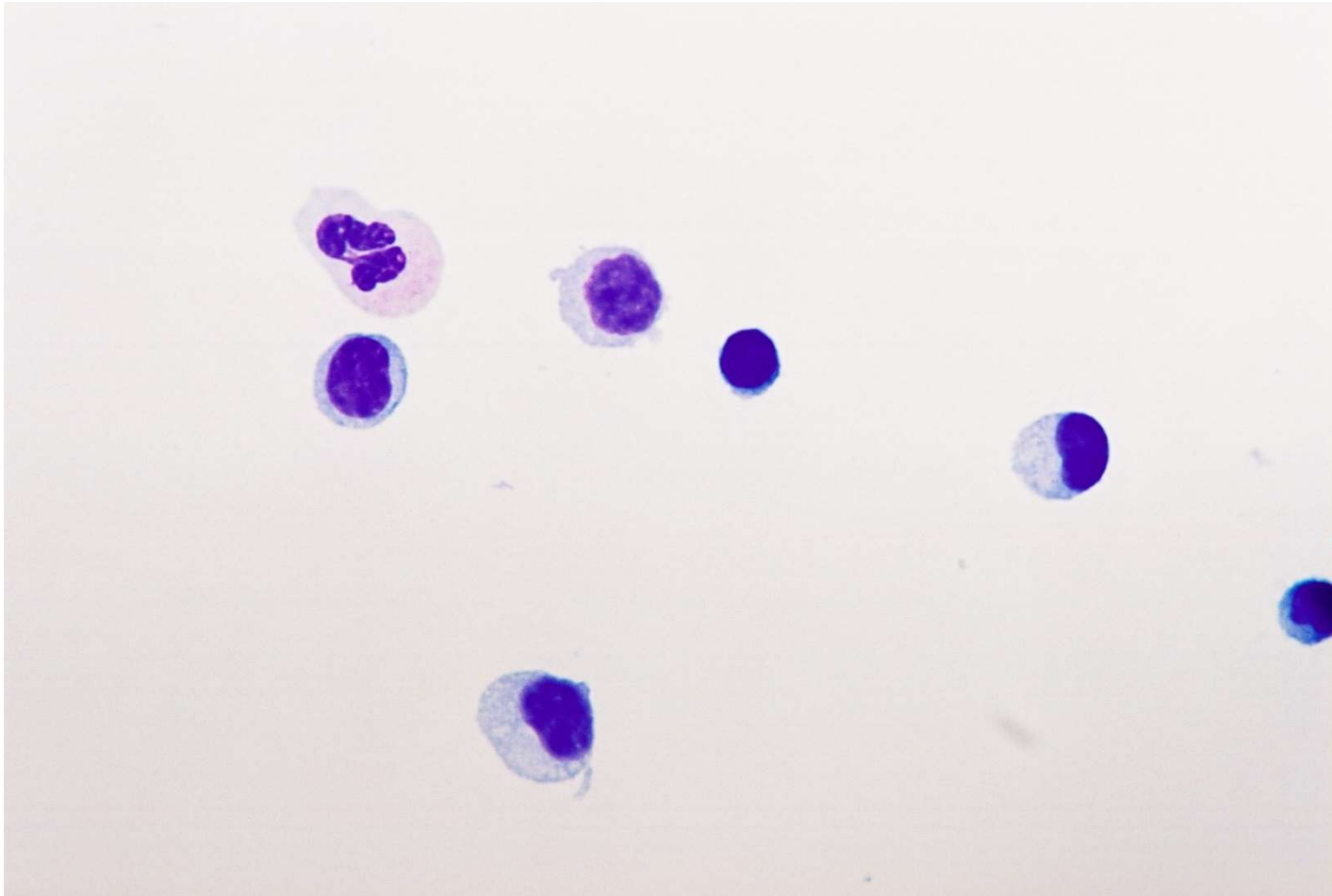
## lymfocytární pleocytóza s plazmocytární reakcí



- Likvor čirý, bezbarvý
- 434/3 elem (324/3 lymfo, 8/3 plazmo, 90/3 mono, 12/3 segm)
- Preparát: lymfo 85 %, plazmo 2 %, mono 11 %, neutrof.segm.2 %
- Pandy 3, krev 0
- CB 1,911 g/l
- Glukosa 3,96 mmol/l
- Laktát 3,36 mmol/l
- Q-Alb  $29,97 \times 10^{-3}$
- ith. syntéza IgG (30 %) a IgM (54 %)
- IgG-OCB: typ3 + typ5 (koincidence MGUS)

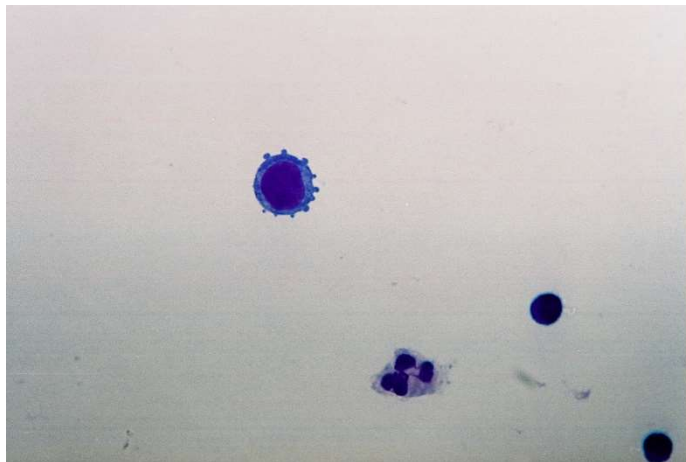
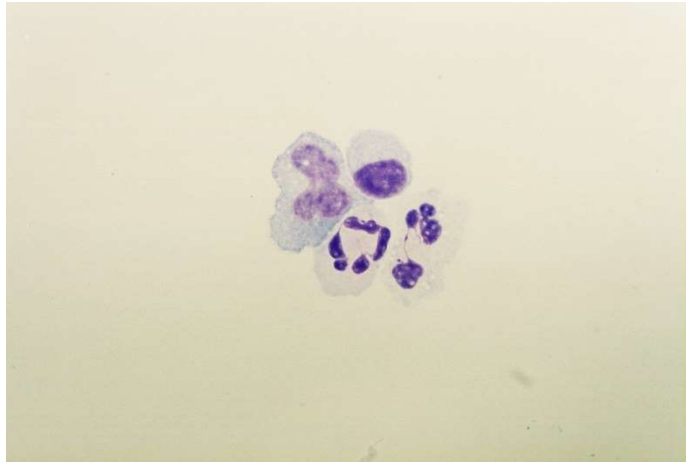
# Diferenciální diagnostika

## Obraz nehnisavého zánětu



# Diferenciální diagnostika

## Obraz nehnisavého zánětu



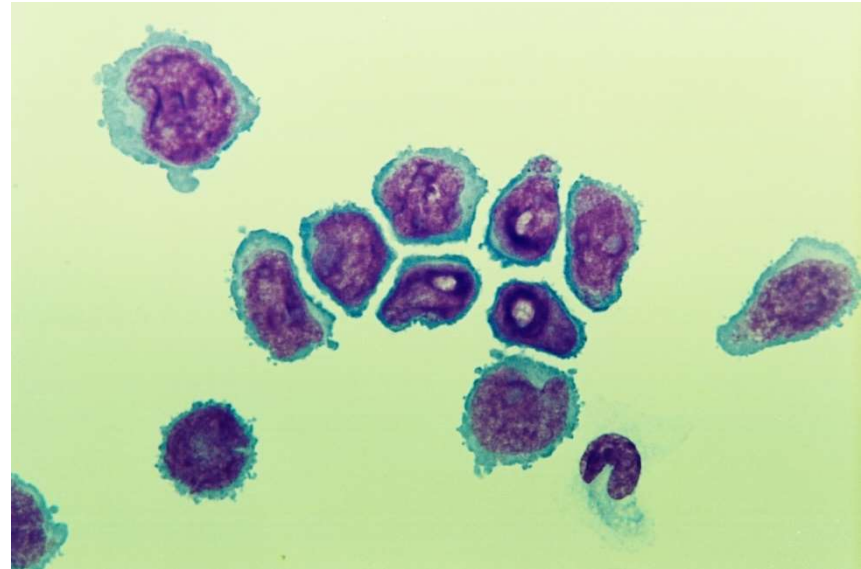
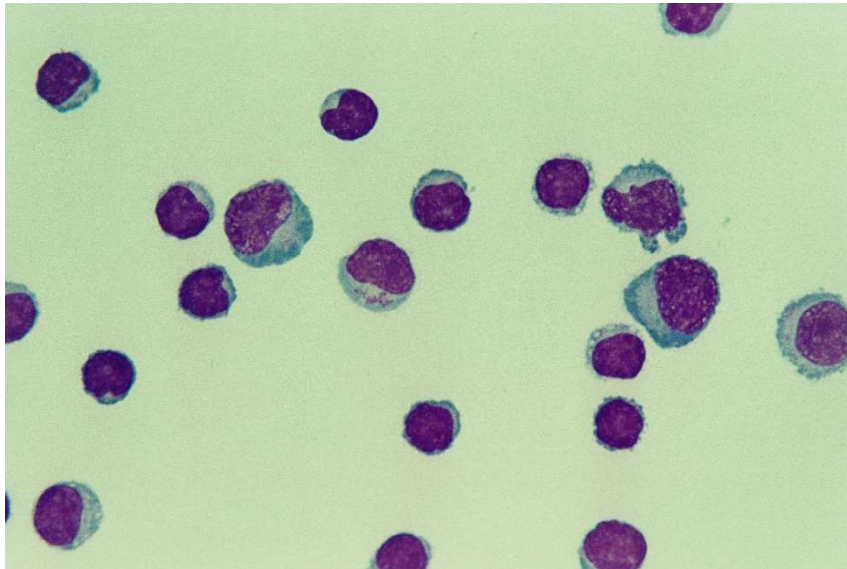
- Muž 45 let, kořenový sy.  
CSF: čb, 63/3 elem, 36/3 ery,  
cytologie: lymfo 36%, plazmo  
4%, mono/makrofágy 45%, neutr.  
14%, eos. <1%, ojed. atypické  
buňky CB 1.98 g/l, glukóza 2.6  
mmol/l, laktát 1.5 mmol/l

### Dg. dle MRI:

*spondylodiscitis s abscesem v  
intervert. prostoru a šířením  
flegmonózního zánětu  
peridurálně*

# Diferenciální diagnostika

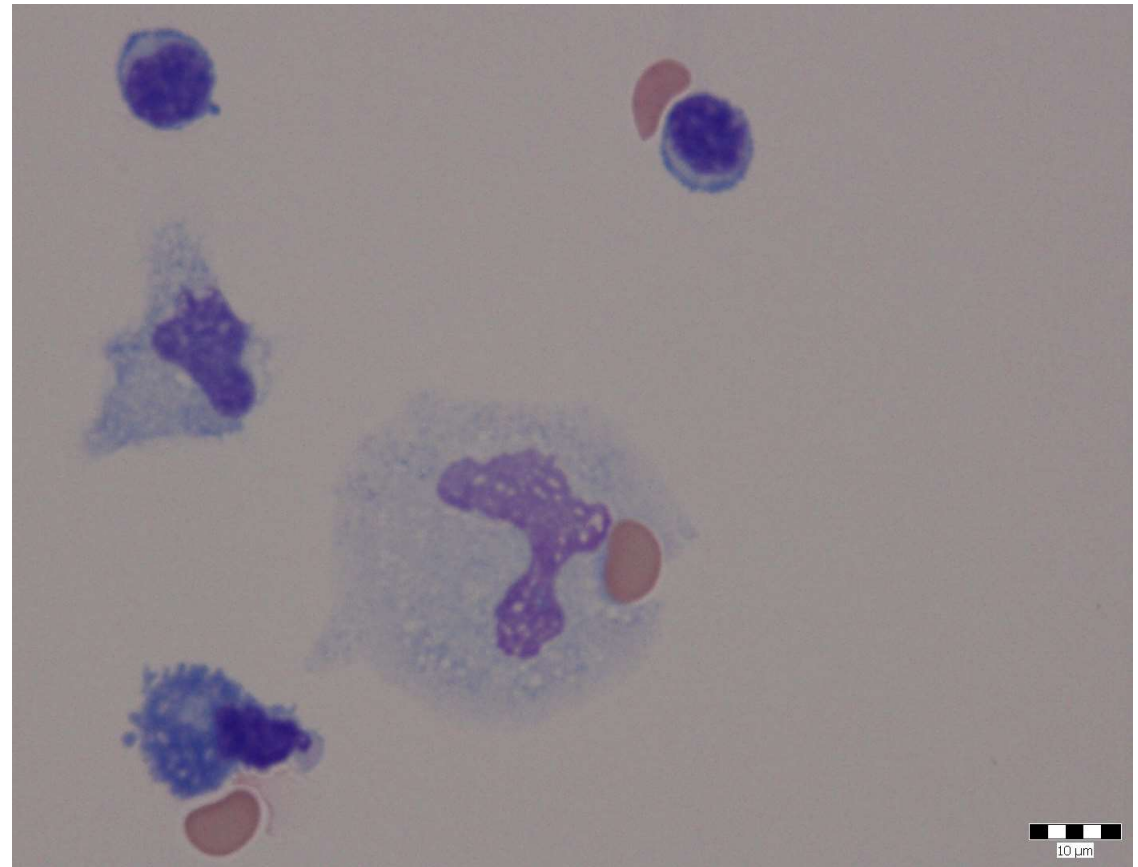
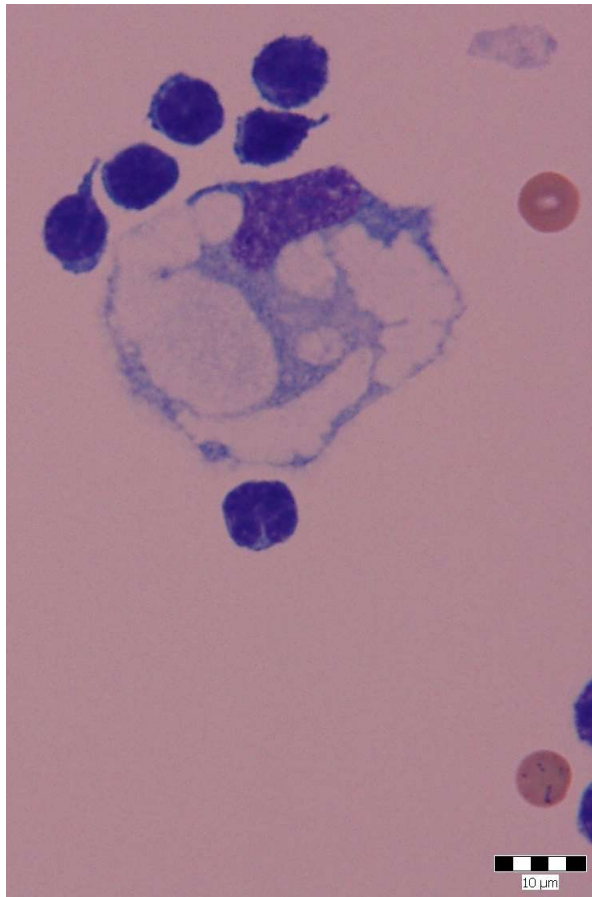
*nehnisavý zánět x meningeosis lymphomatosa/leukaemica*



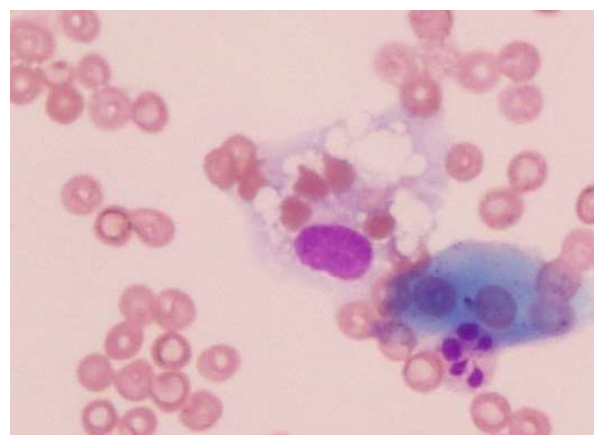
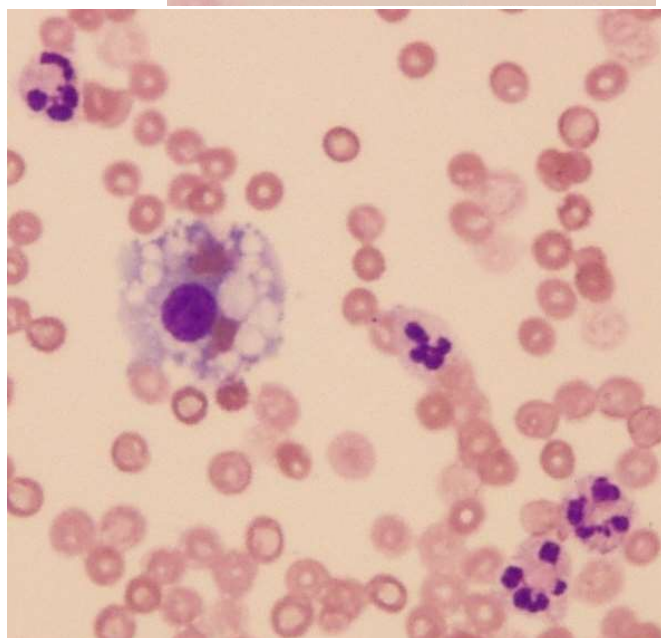
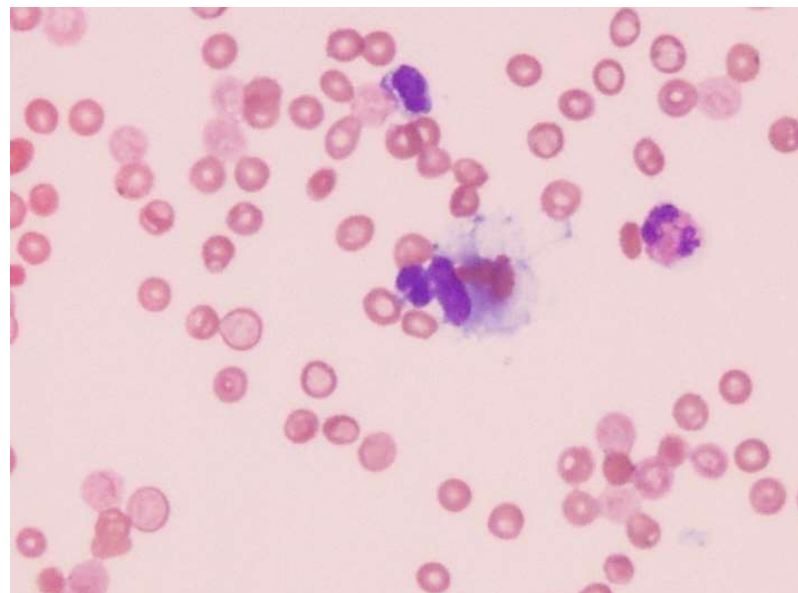
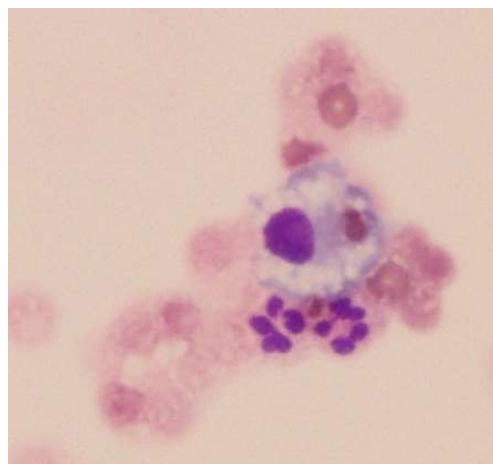
# Fagocyty

*vlevo: fagocyt v základním barvení, lymfocyty*

*vpravo: erythrofág (vlevo dole od něj rozpadající se plazmocyt)*

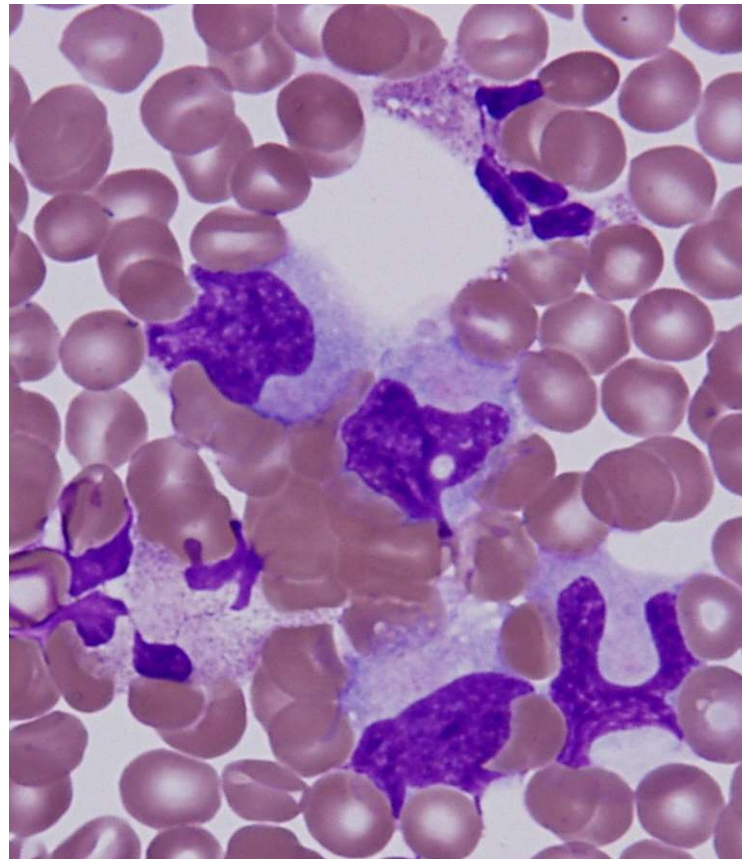
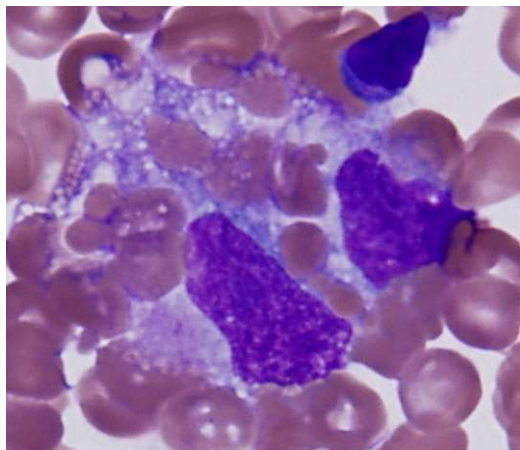
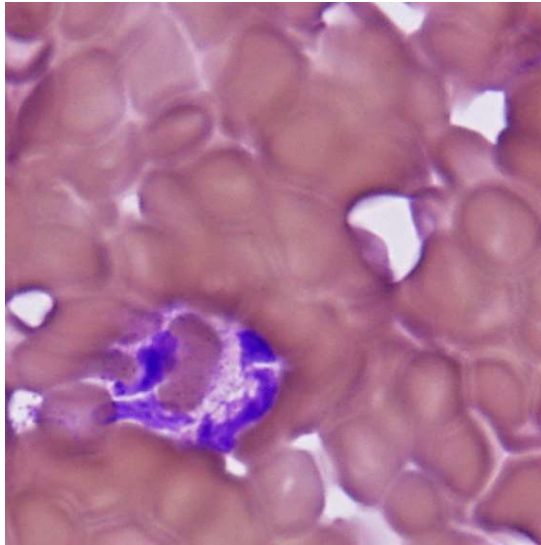


# Erythrofágy u čerstvého krvácení



# Erythrofágy u čerstvého krvácení

*vlevo nahoře „neorthodoxní“ fagocytóza ery neutrofilním granulocytem*

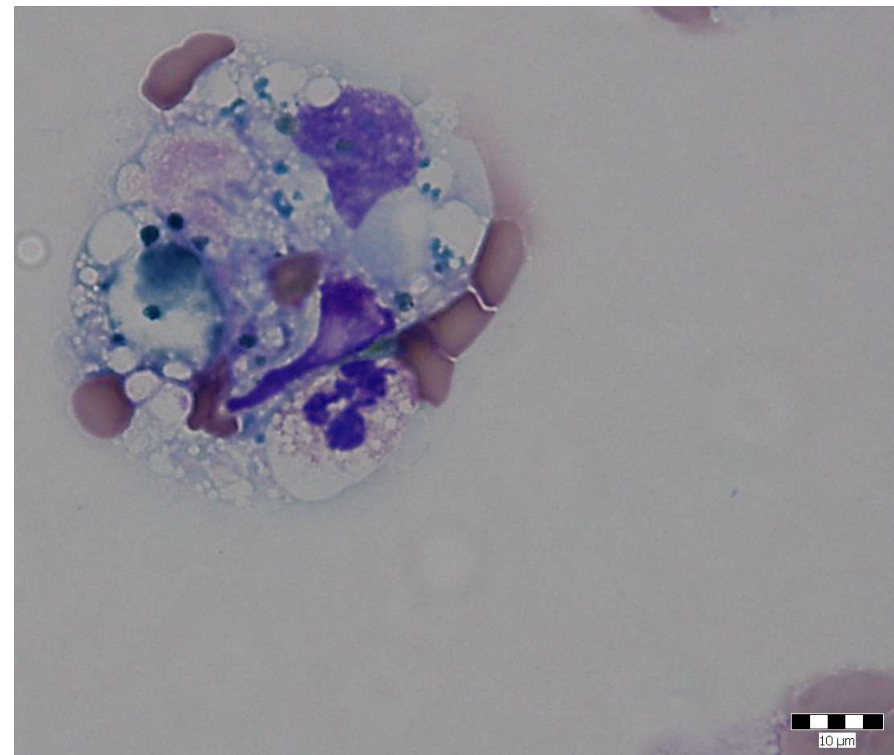
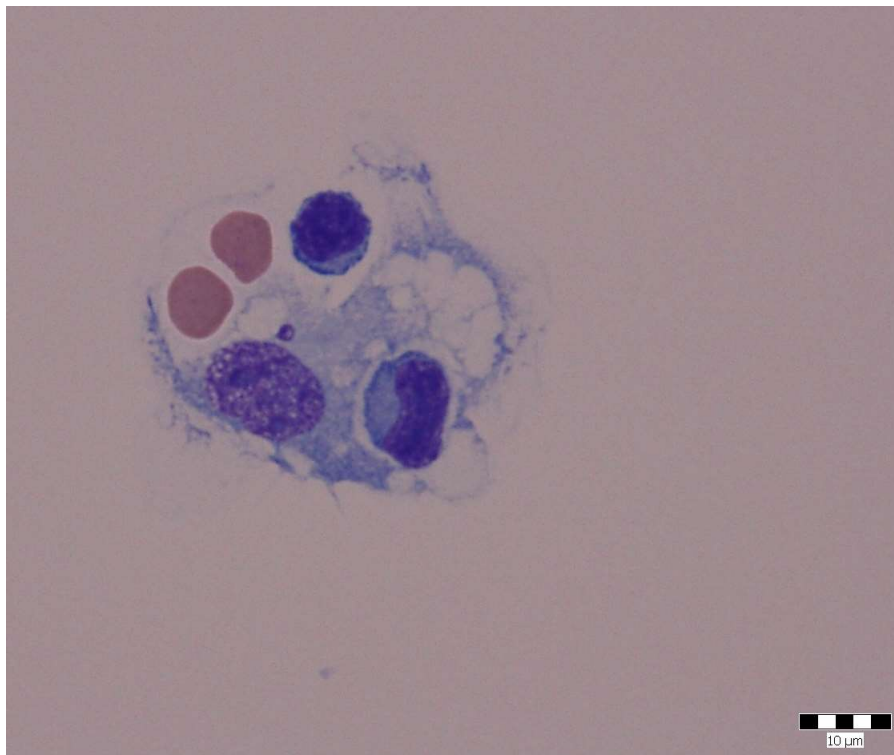




# Fagocyty s vícečetným substrátem fagocytózy

*vlevo: „erythrolymfofág“*

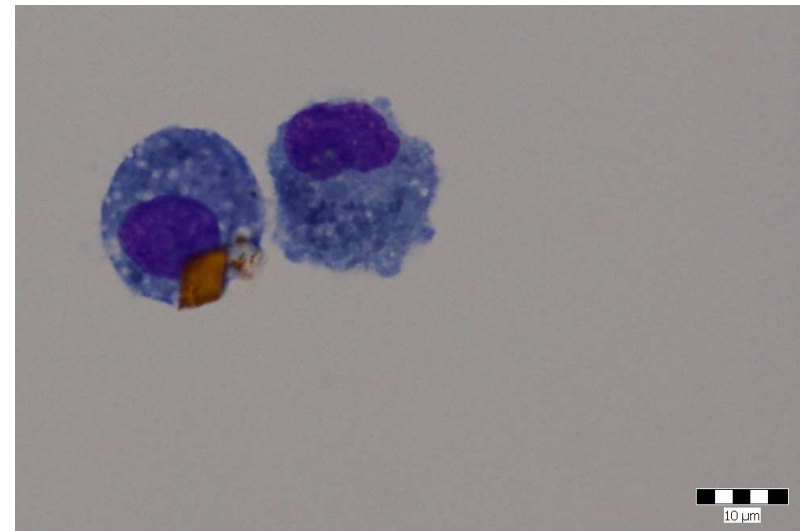
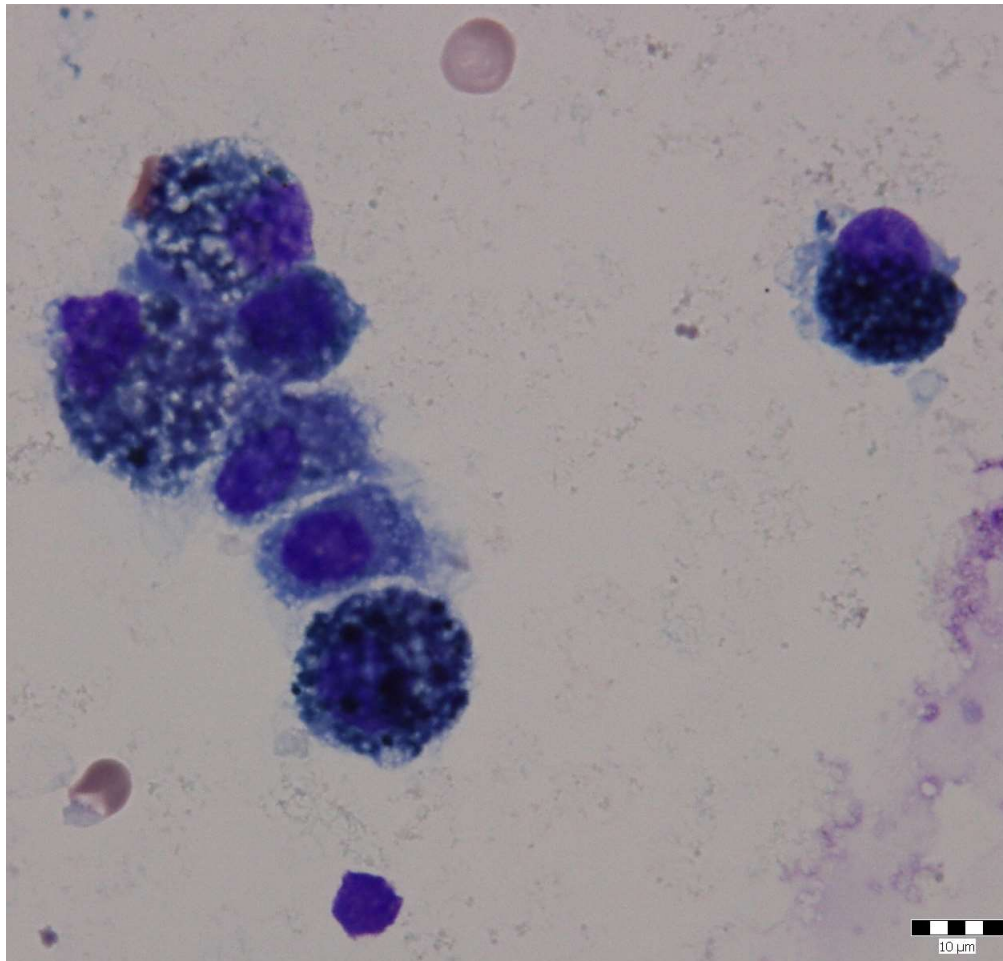
*vpravo: erythrosiderofág*



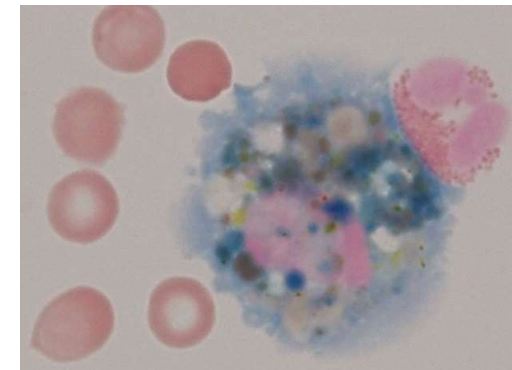
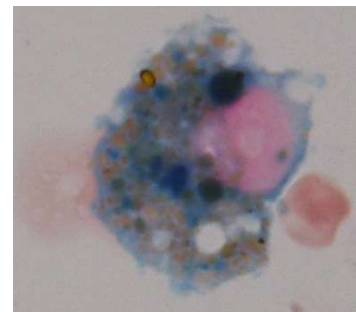
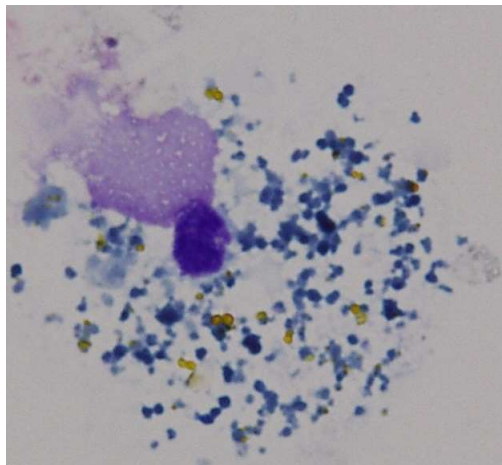
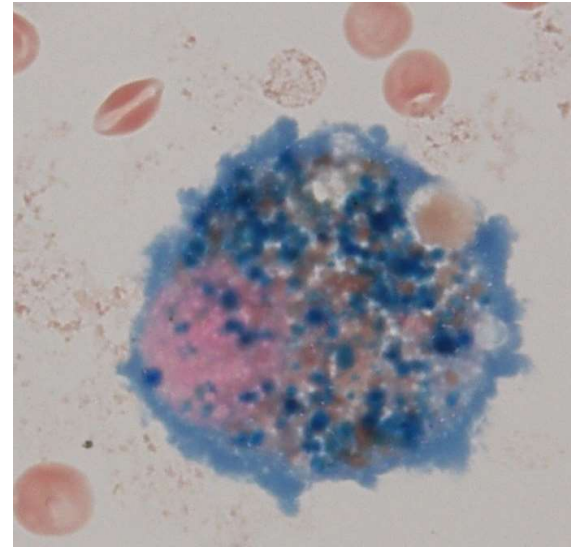
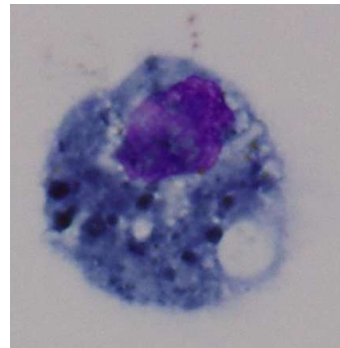
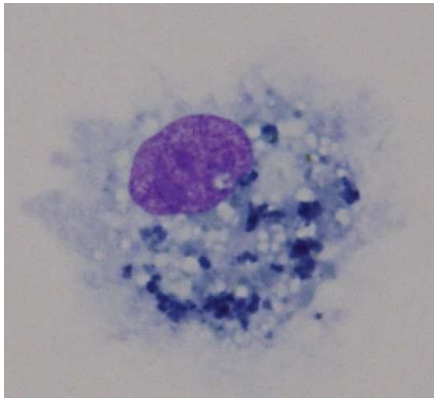
# Fagocyty

*vlevo: siderofágy, nečistoty*

*vpravo: makrofágy s krystaly hematoidinu*

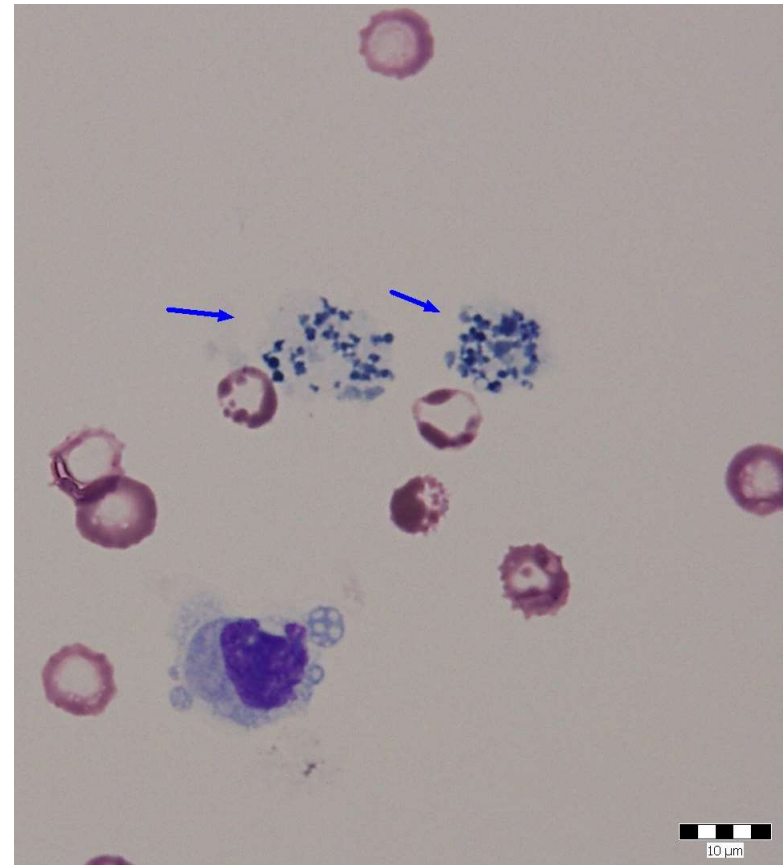
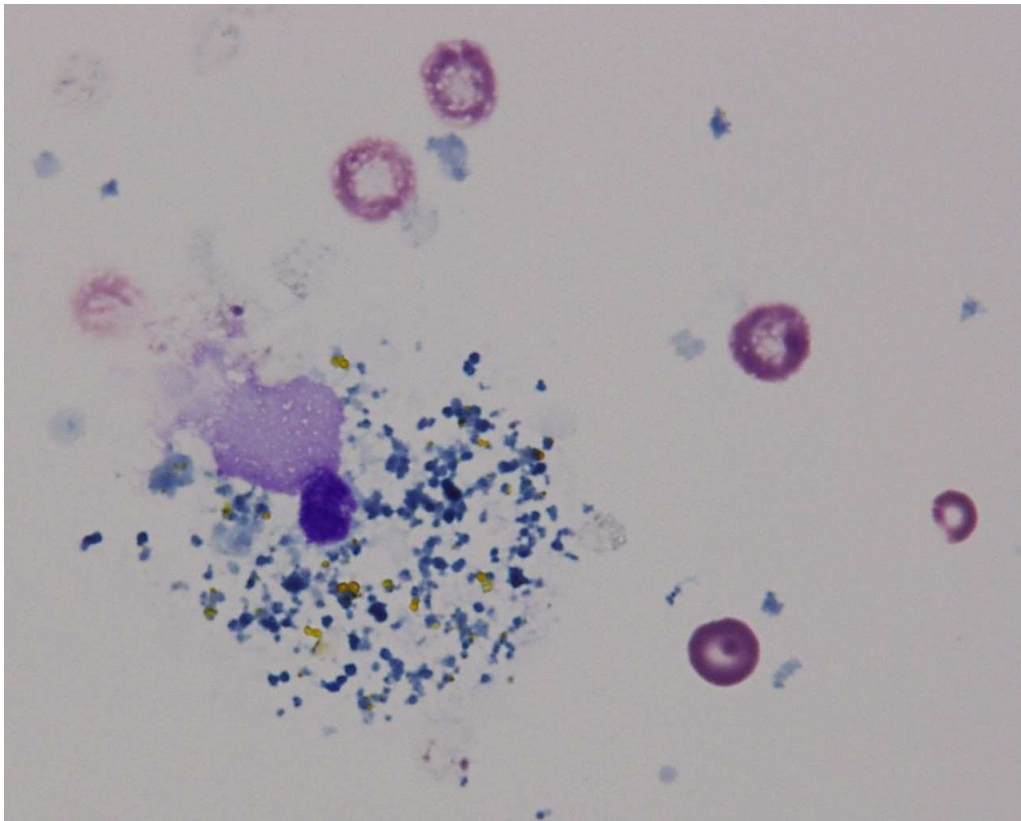


# Siderofágy v základním barvení (vlevo) a cytochemický průkaz $\text{Fe}^{3+}$ (vpravo)



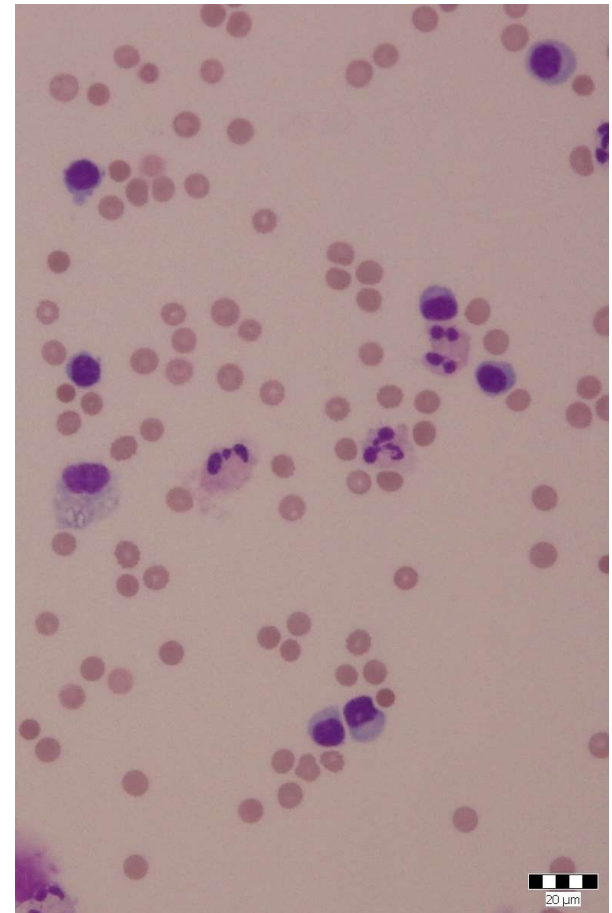
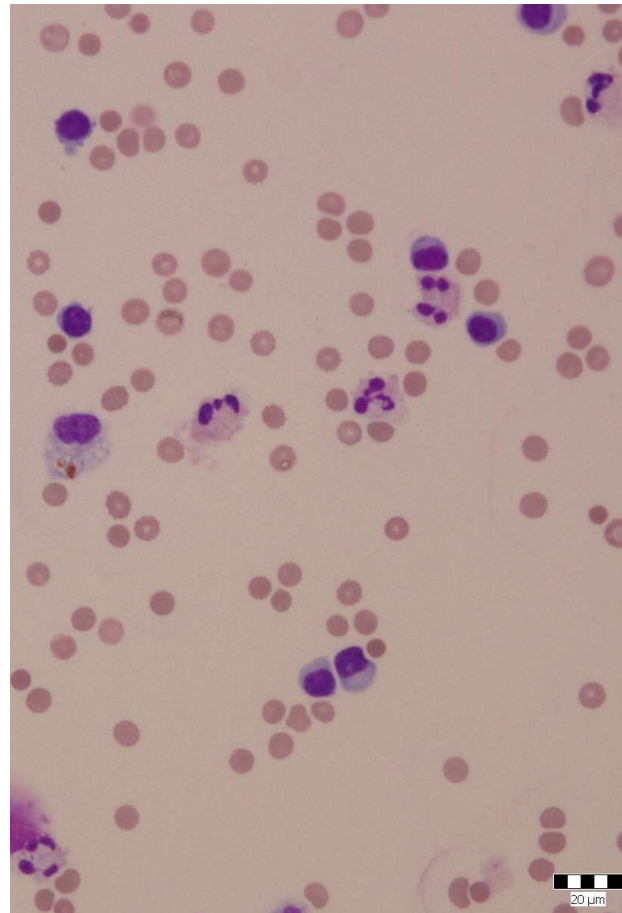
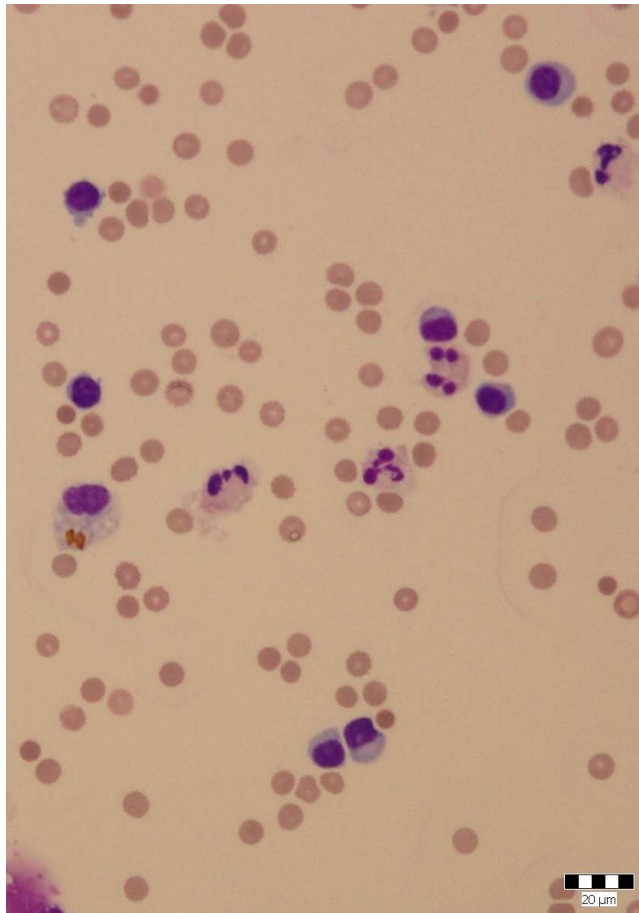
# Hemosiderin

*Granula hemosiderinu extracellulárně (na obr. vpravo označená šipkou), erythrocyty*



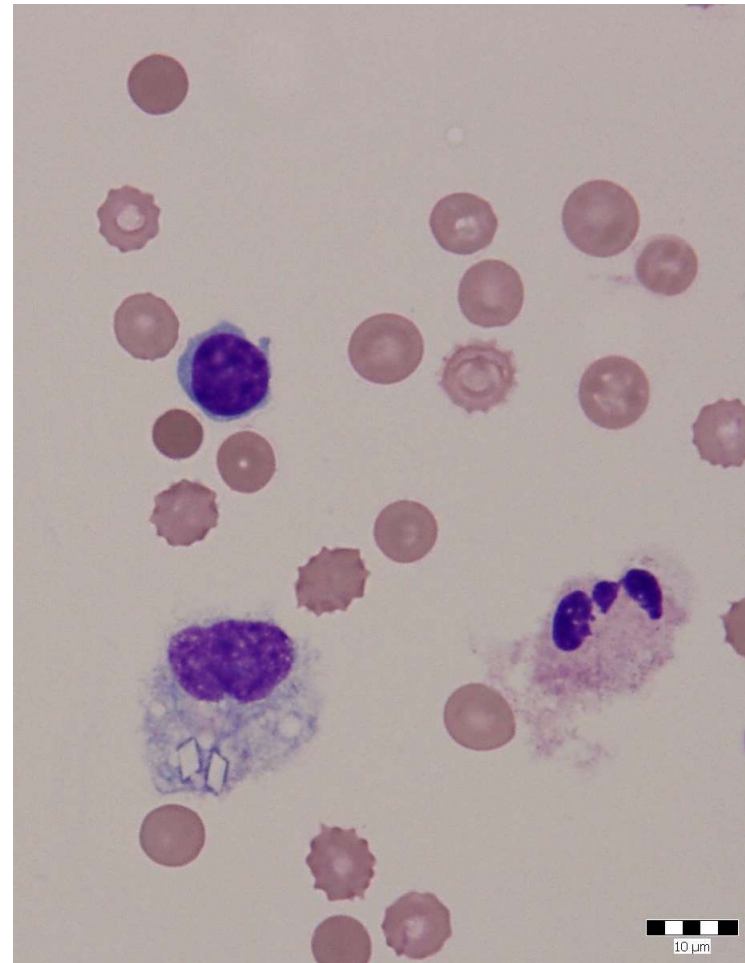
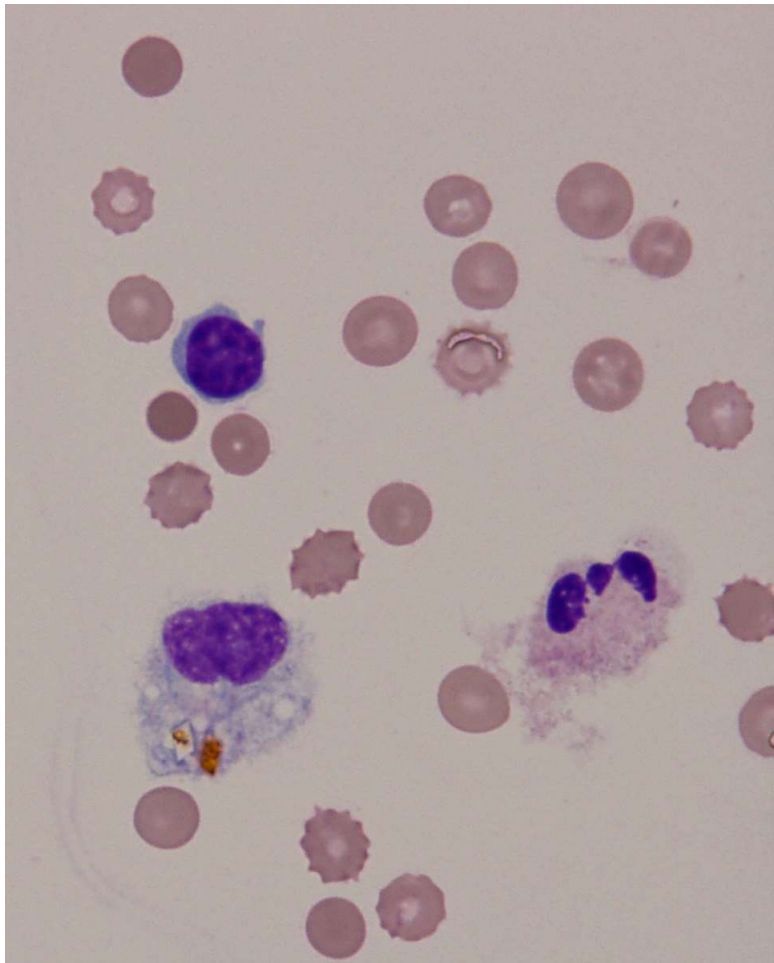
# Hematoidin a jeho degradace v preparátu

*vlevo čerstvý preparát, uprostřed po 5 hodinách, vpravo po 14 dnech*



# Hematoidin a jeho degradace v preparátu

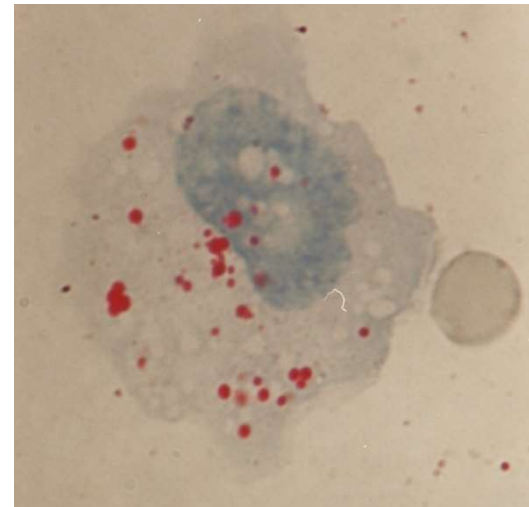
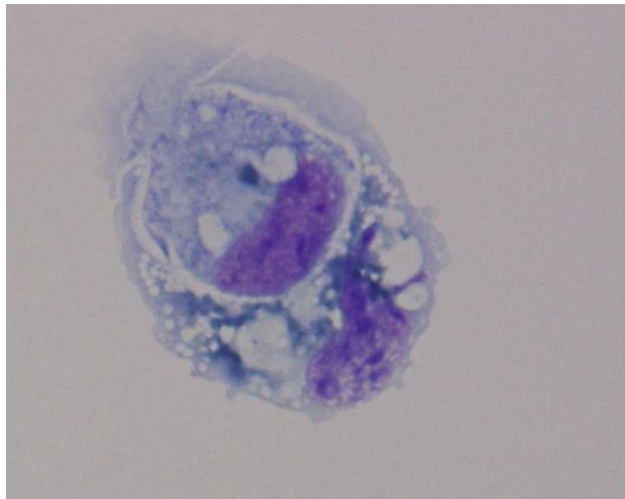
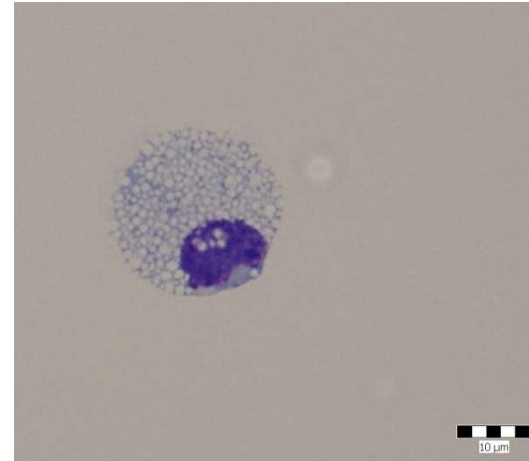
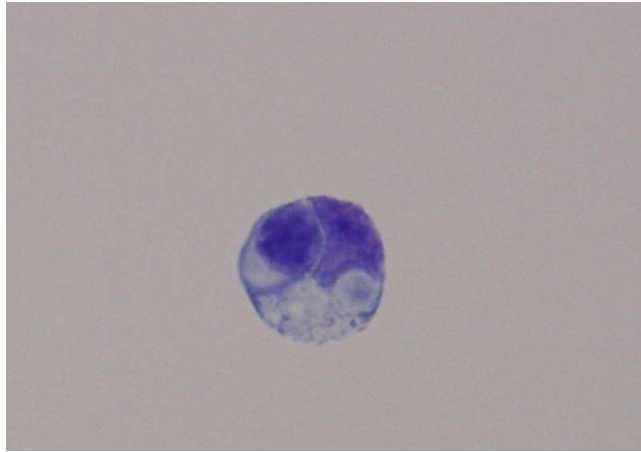
*větší zvětšení (imerze); vlevo po 5 hodinách, vpravo po 14 dnech*



# Fagocyty

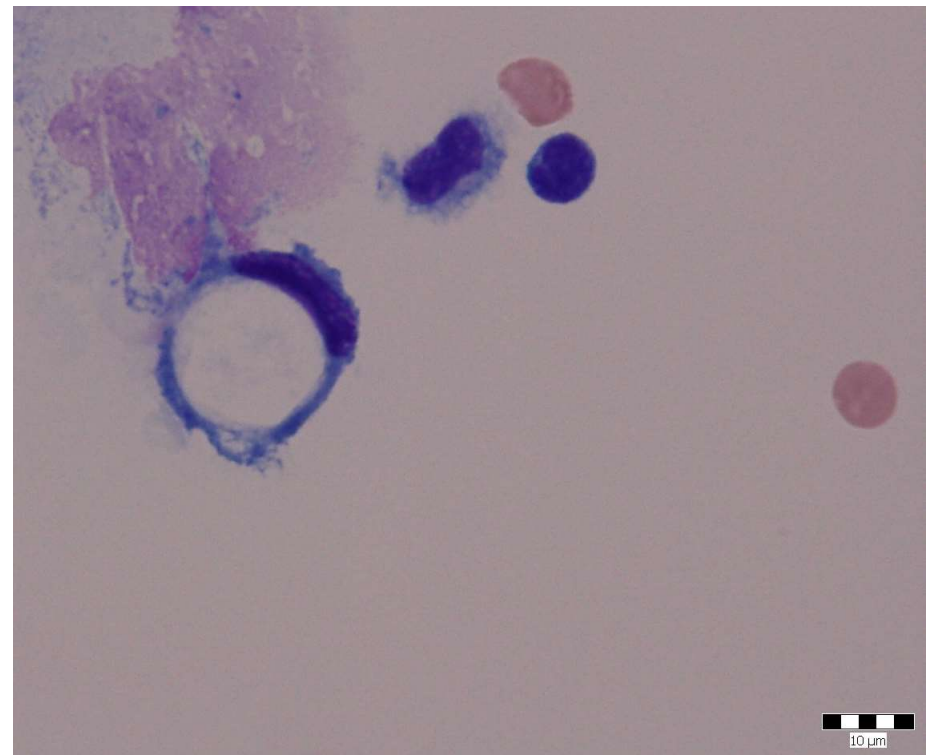
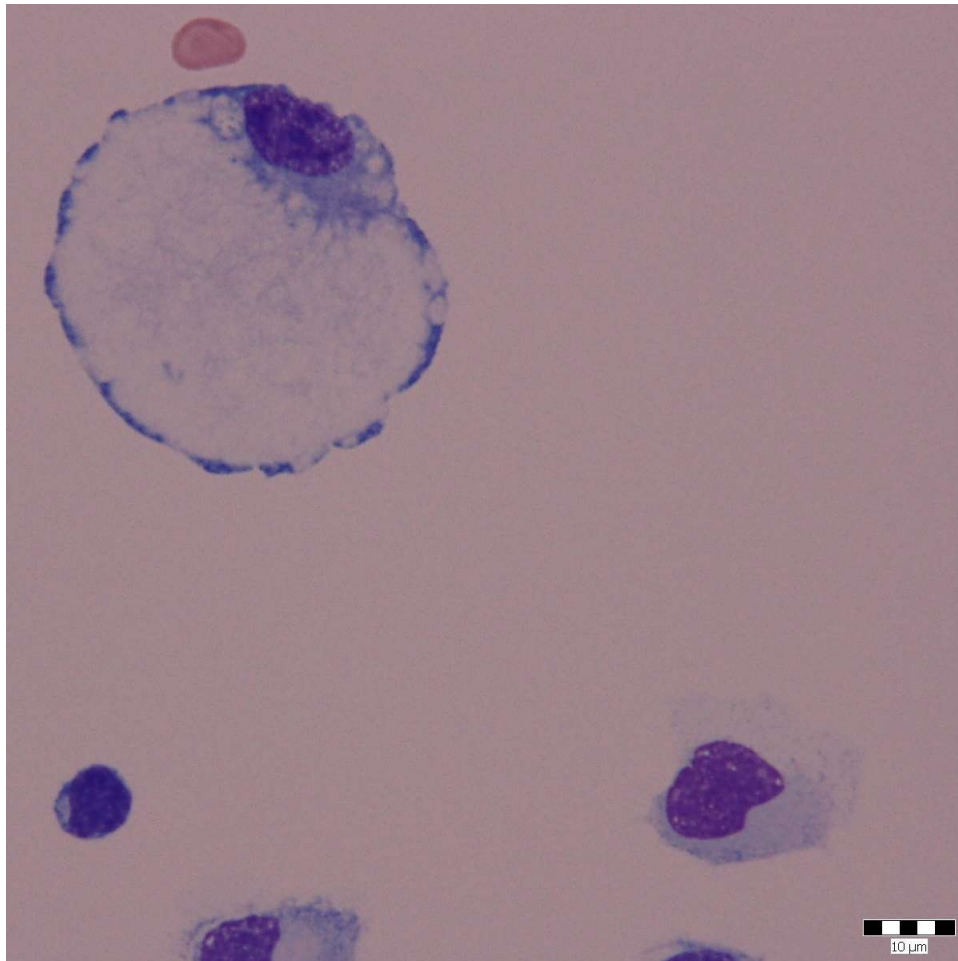
*vlevo: lymfofág; fagocytovaný monocyt*

*vpravo: pěnová buňka (lipofág); průkaz lipidů olejovou červení*



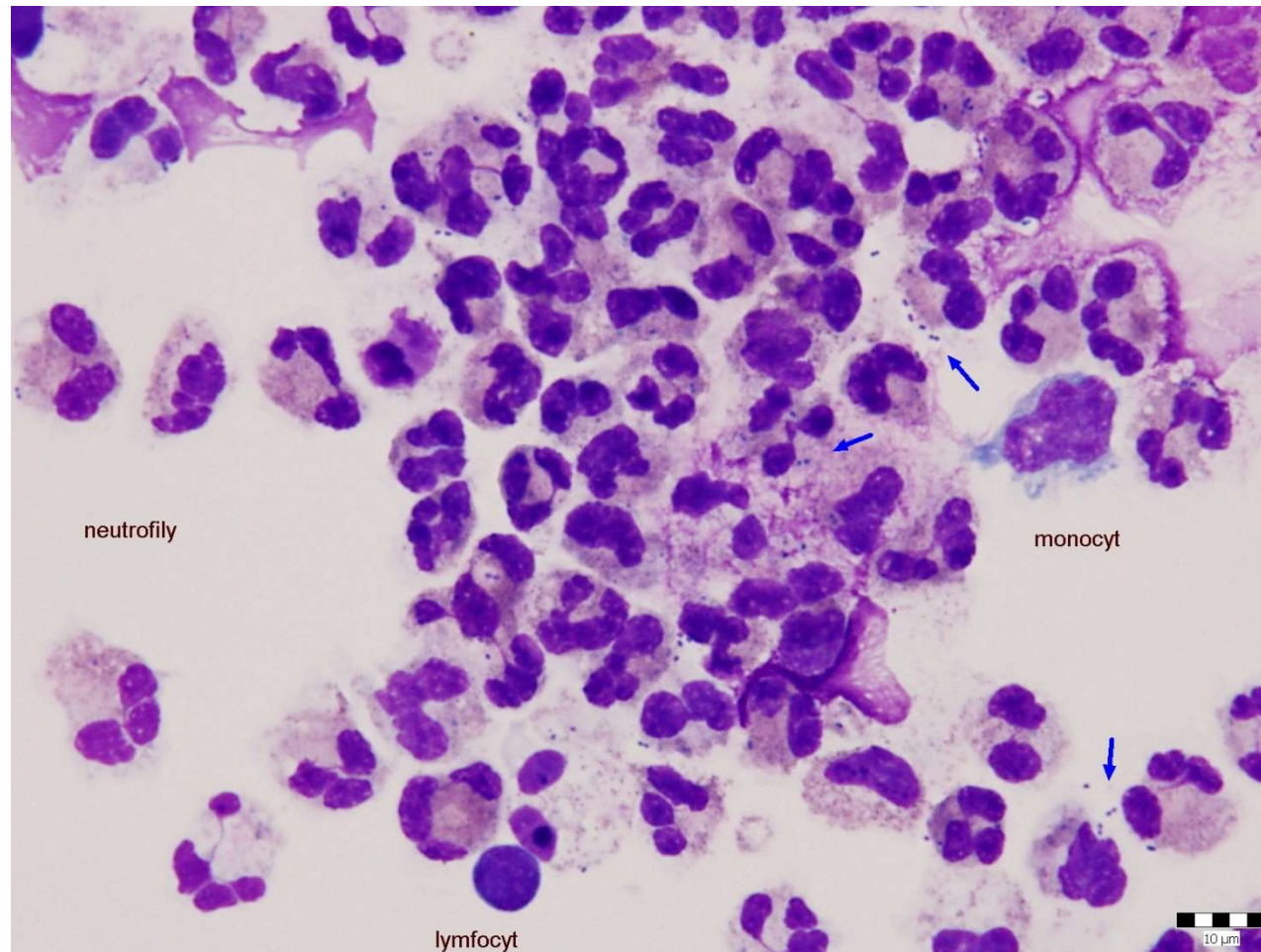
# Fagocyty

*buňky tvaru pečetního prstenu (signet-ring cells)*

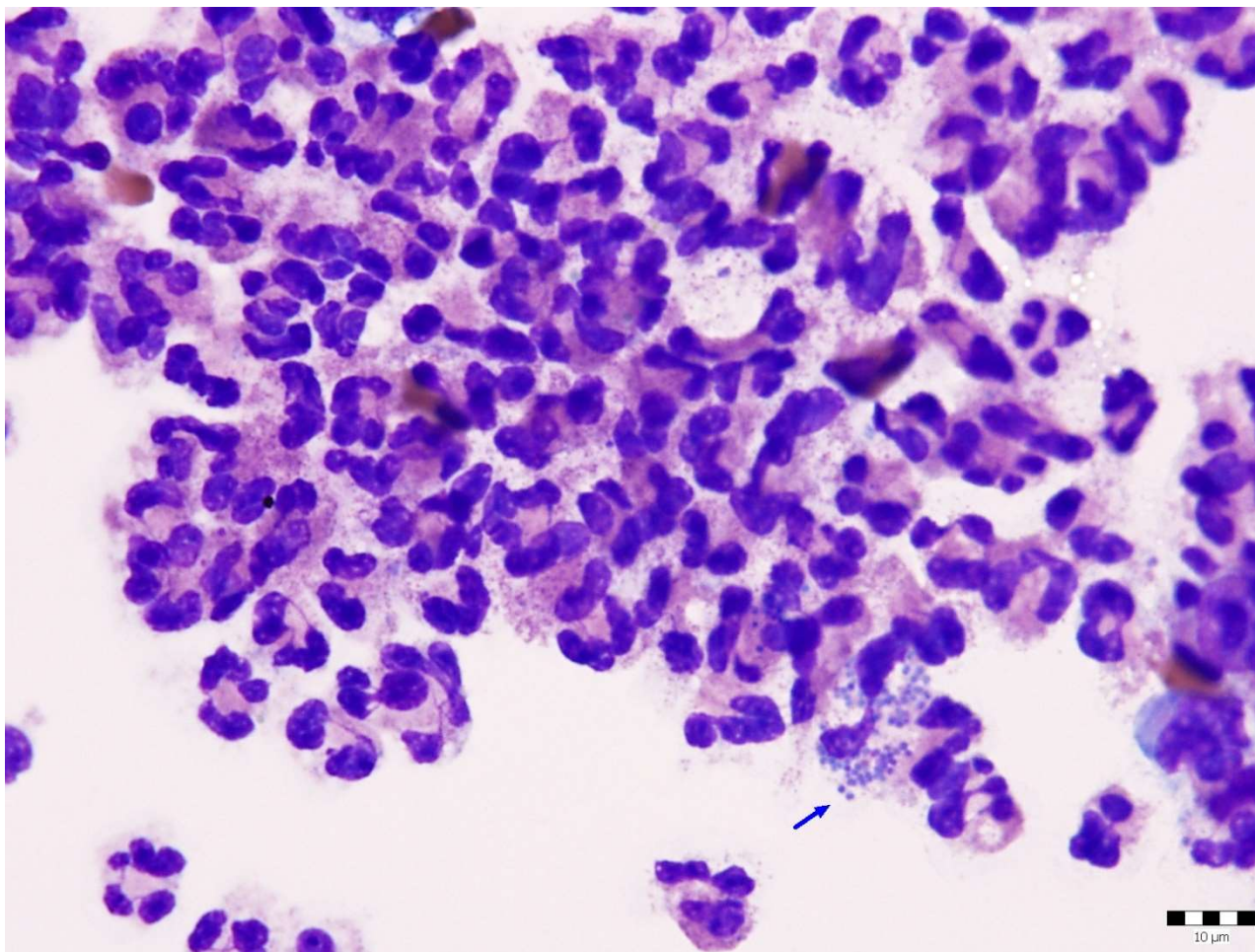




# Neutrofilní granulocyty



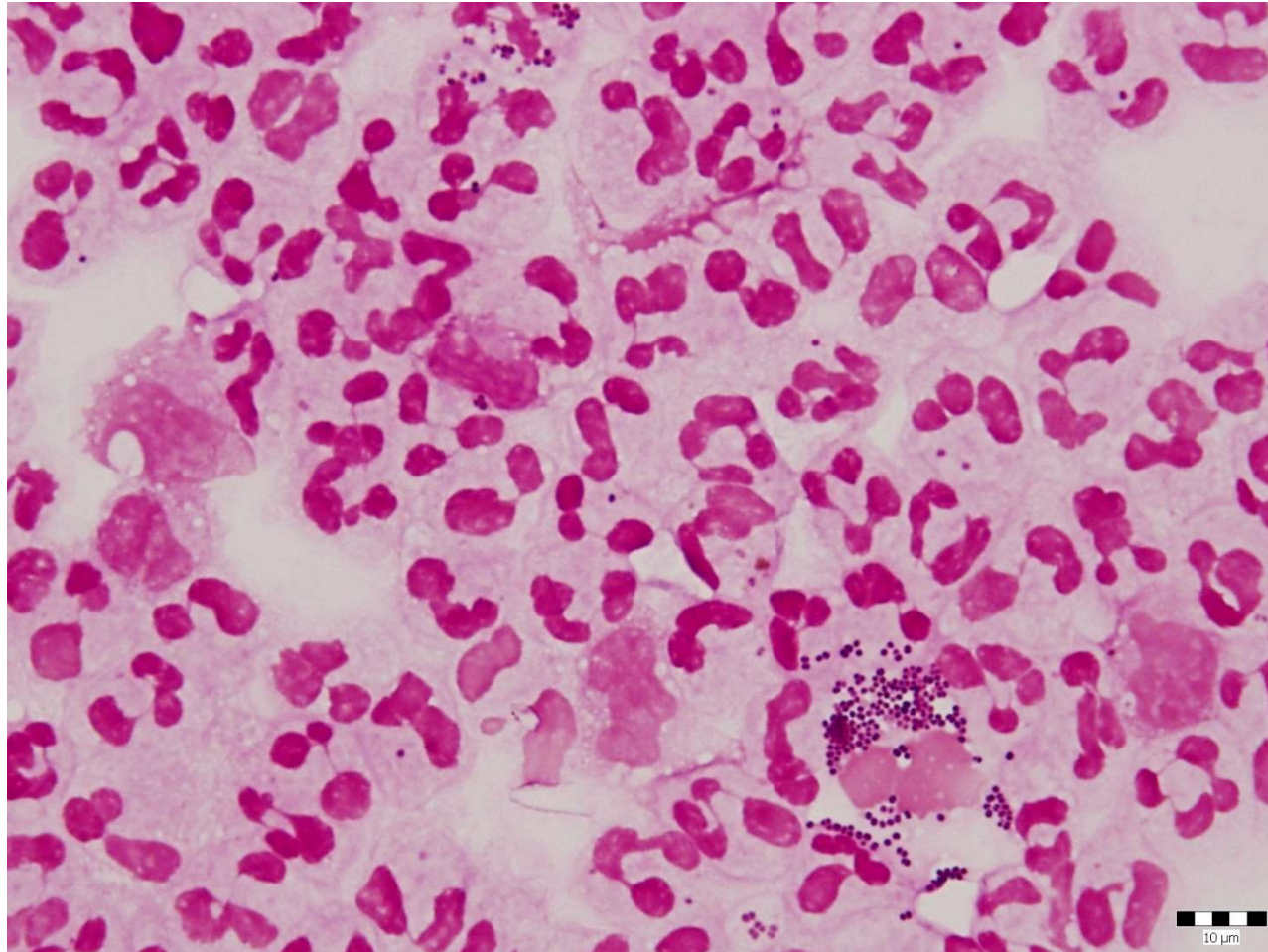
# Neutrofilní granulocyty; kokovité bakterie (šipka) základní barvení



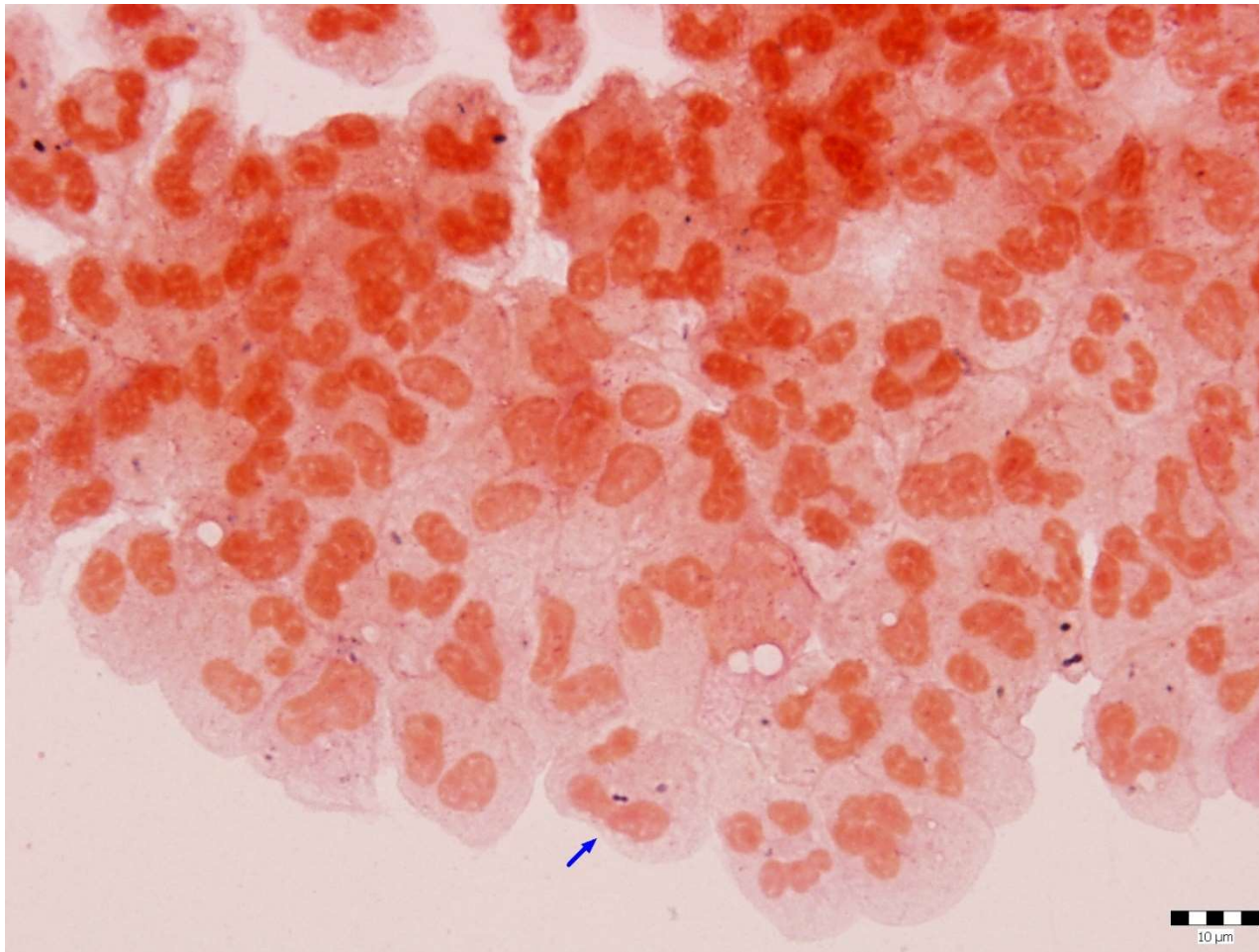
# Neutrofilní granulocyty; grampozitivní koky

Gramovo barvení

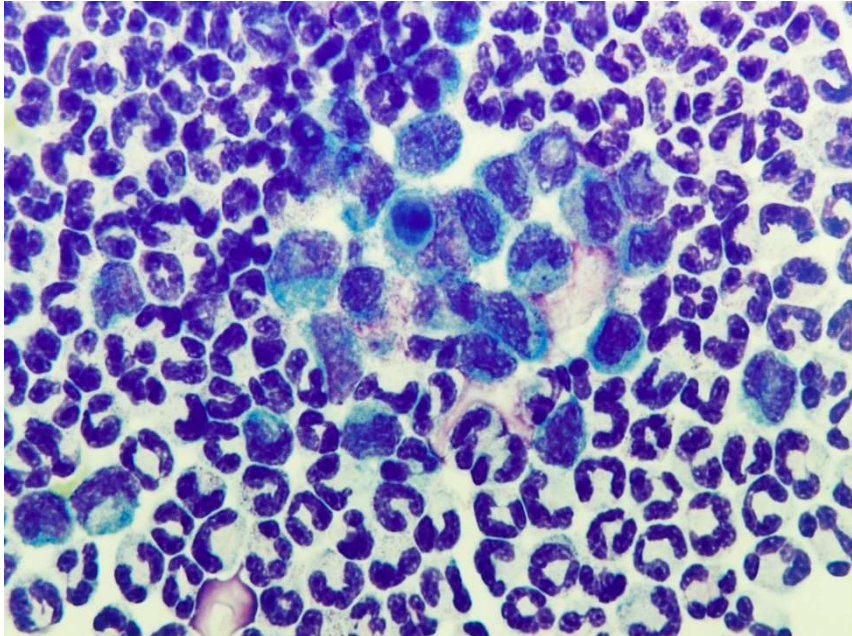
kultivace: *Staphylococcus epidermidis*



**Neutrofily, grampozitivní diplokoky**  
***(Streptococcus pneumoniae)***  
Gramovo barvení (Merck)



# Meningitis purulenta



16-denní novorozenec

**CSF: 36160/3 elem,  
1580/3 ery**

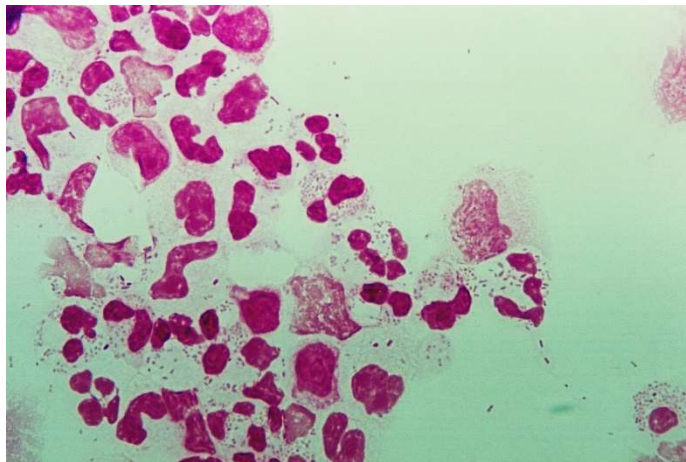
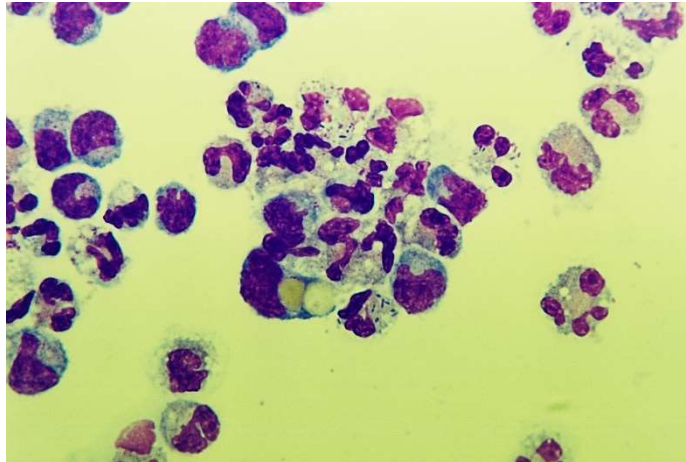
**CB 2.36 g/l**

**Glukóza 3.0 mmol/l**

**Laktát 4.3 mmol/l**

***Kultivace: E. coli***

# Meningitis purulenta (*Haemophilus*)



Dívka stáří 16 dní

**CSF: žlutý, kalný, po centr.  
sediment hnisu**

**56144/3 elem, 112/3 ery**

**Pandy 3, CB 2.92 g/l, glukóza 0.2  
mmol/l,**

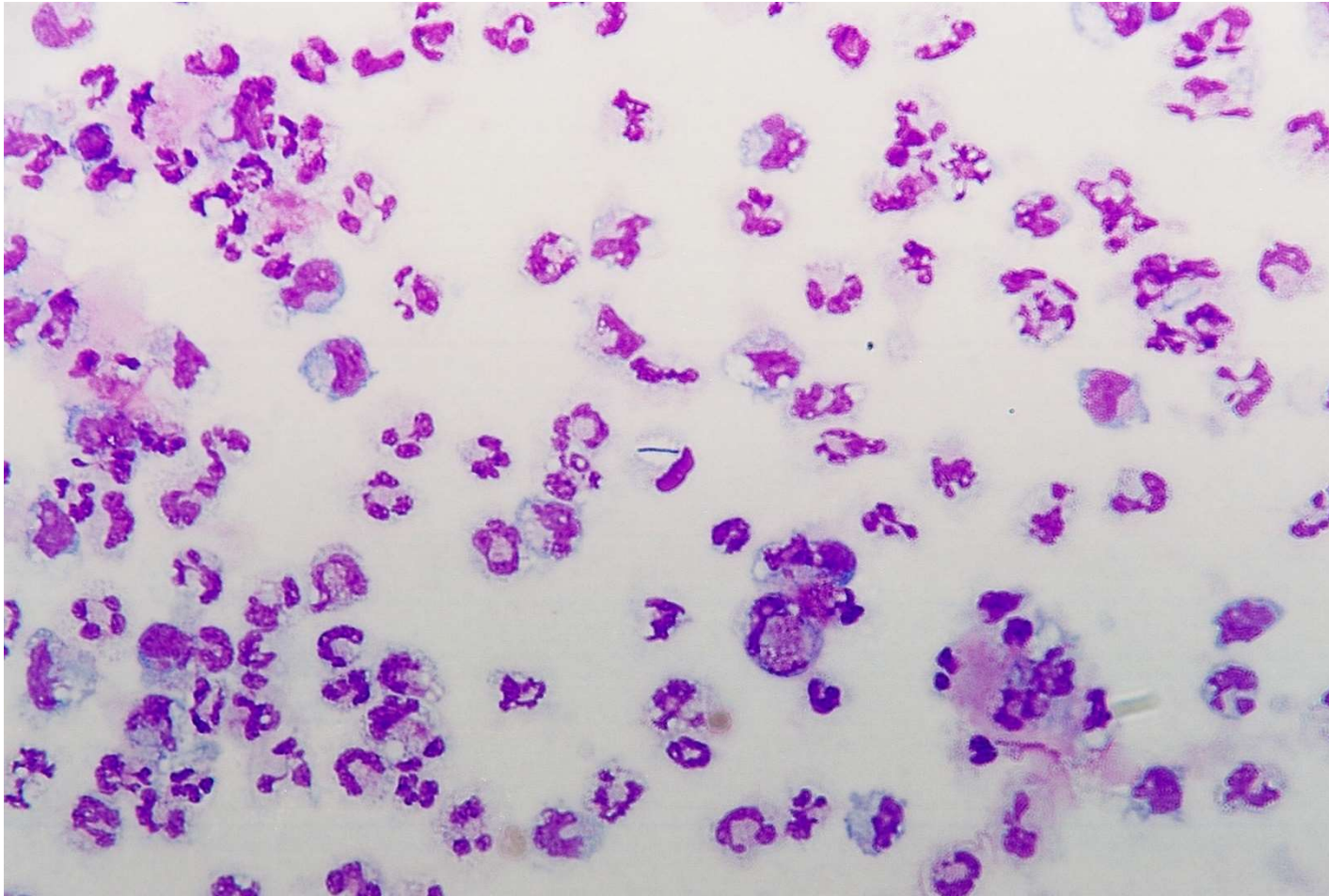
**laktát 10.3 mmol/l**

**S: CRP 112 mg/l**

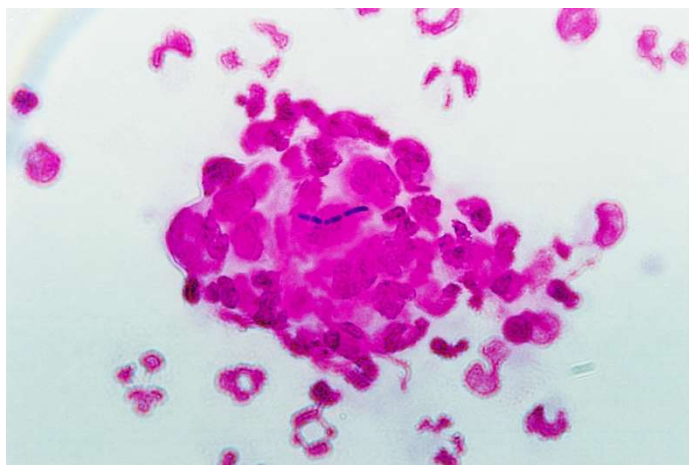
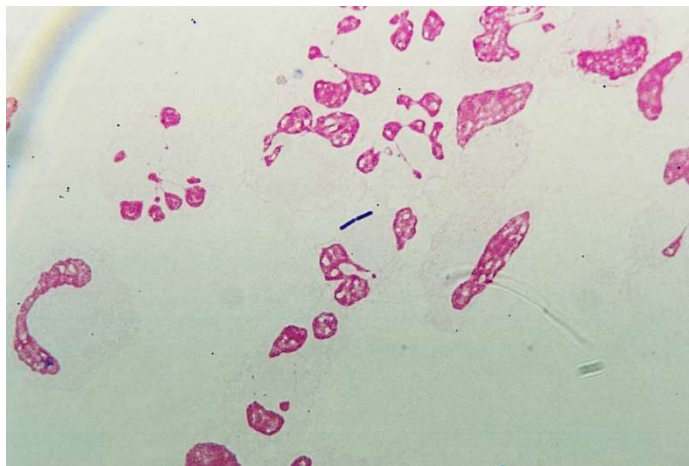
**(KONTROLNÍ LP po 14 dnech:**

**134/3 elem, 1968/3 ery, Pandy 1,  
CB 0.94 g/l, glukóza 1.38 mmol/l,  
laktát 1.81 mmol/l)**

# Hnisavá ventrikulitida (*B. cereus*)



# Hnisavá ventrikulitida (*B. cereus*)

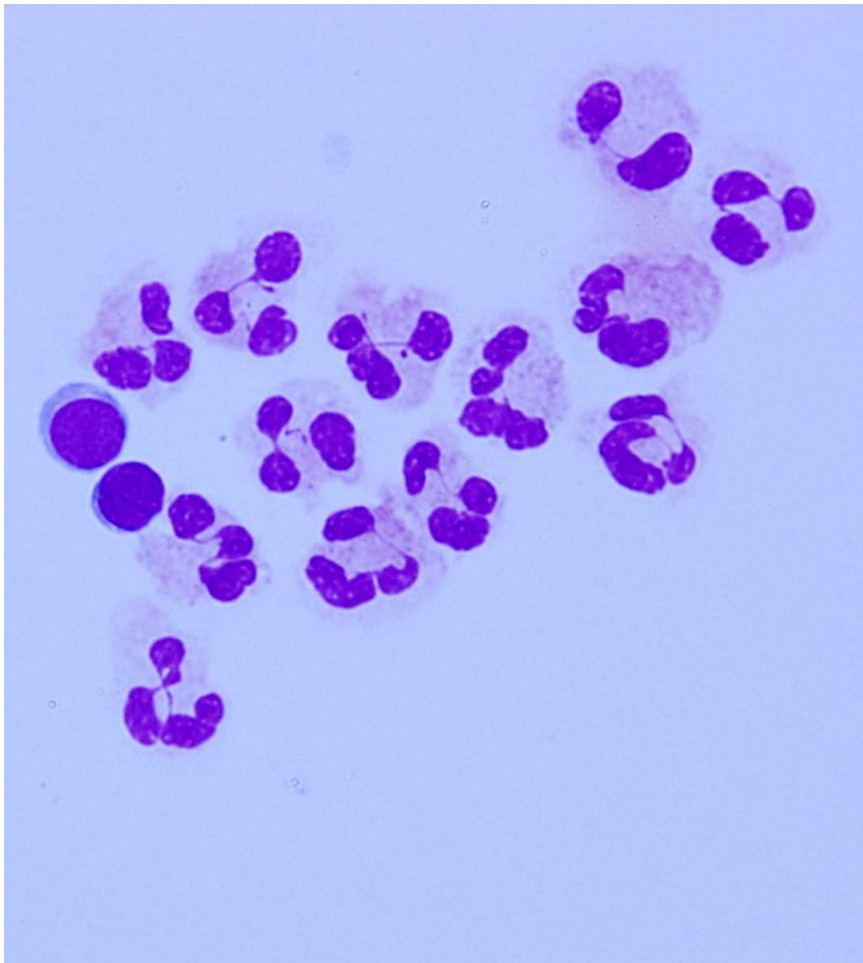


- 1. LP 3. 11. 2000: CSF žlutý, 3584/3 elem, 96/3 ery, CB 1.7g/l, glukóza 5.3 mmol/l, laktát 3.8 mmol/l, závěr: purulentní neuroinfekce
- 2. LP 5. 11. 2000: CSF hnědý, 1488/3 elem, 264/3 ery, záchyt G+ tyčí
- 3. LP 7. 11. 2000: CSF lakový, 5536/3 elem, 2992/3 ery, CB 18.6 g/l, glukóza 0.0 mmol/l, laktát 4.3 mmol/l



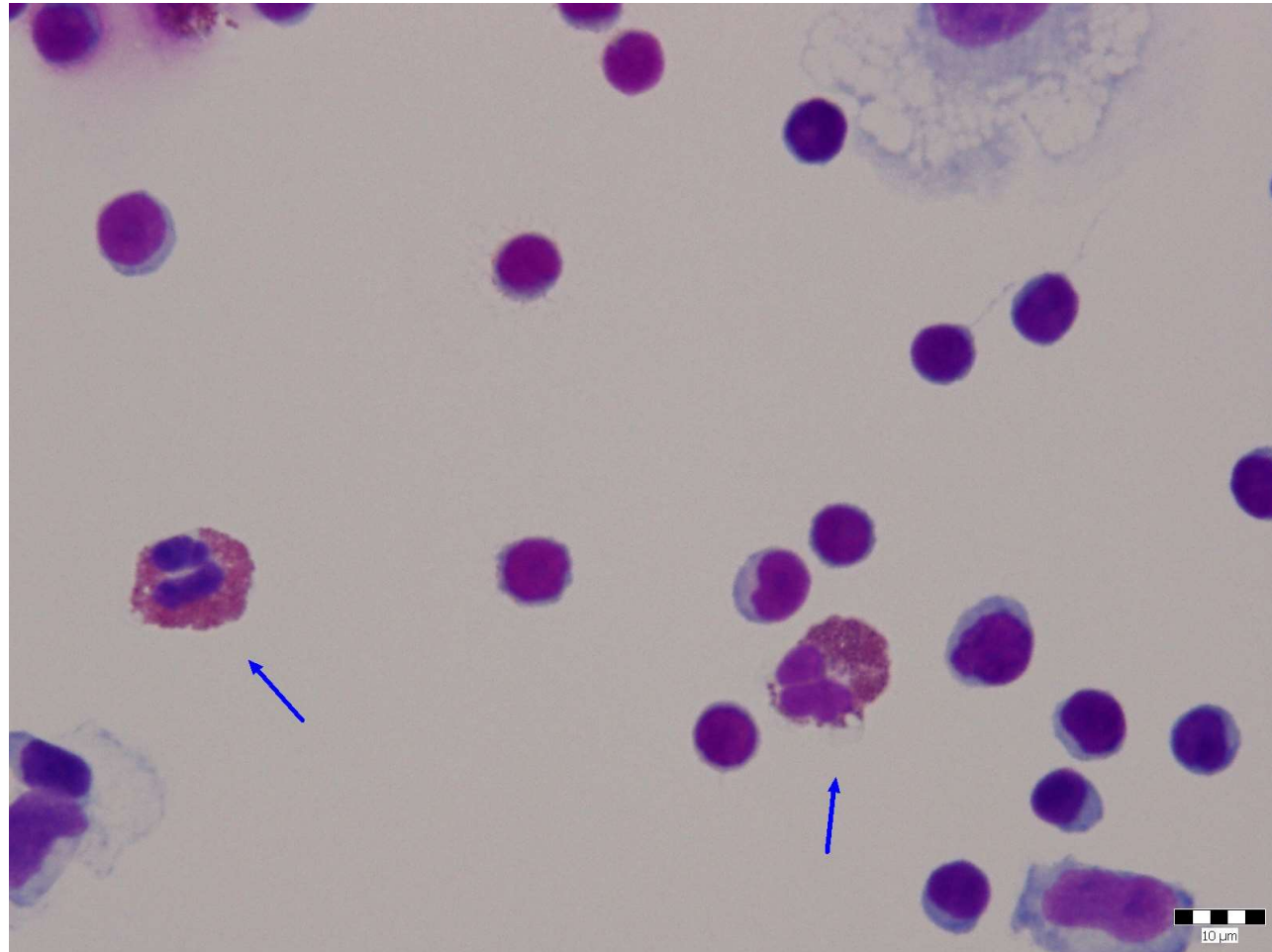
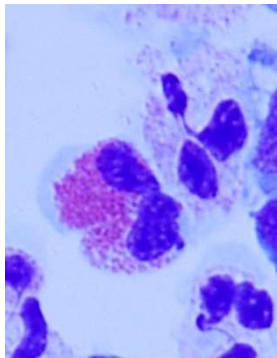
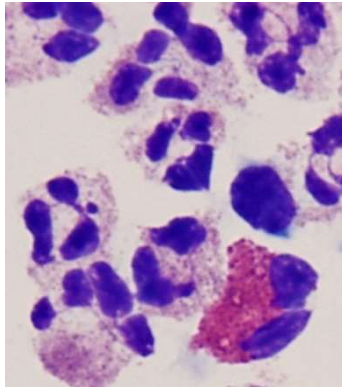
# VZV meningoencefalitis

*smíšená pleocytóza s převahou segmentů*



- Likvor čirý, bezbarvý
- Pandy +, krev stopy
- 504/3 elem (40/3 lymfo, 28/3 plazmo, 52/3 mono, 384/3 segm.)
- Preparát: lymfo 7 %, plazmo 2 %, mono 5 %, neutr. segm. 86 % Ojed. ery.
- CB 0,490 g/l
- Glukosa 3,70 mmol/l
- Laktát 2,37 mmol/l

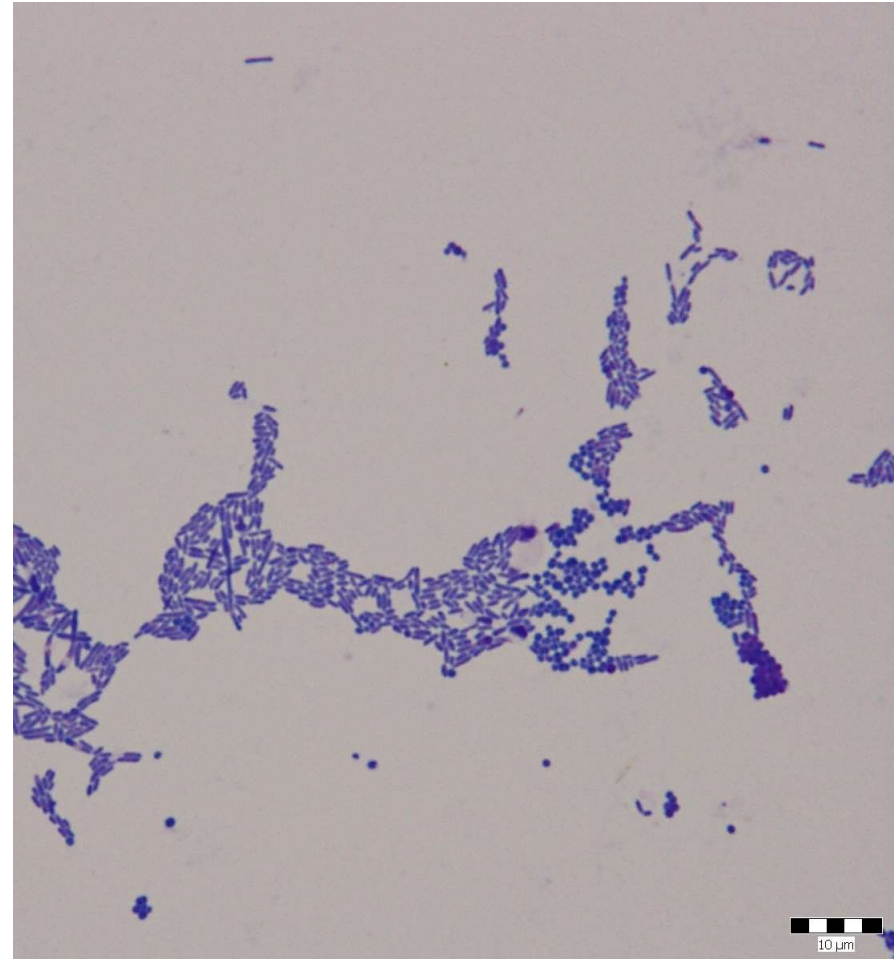
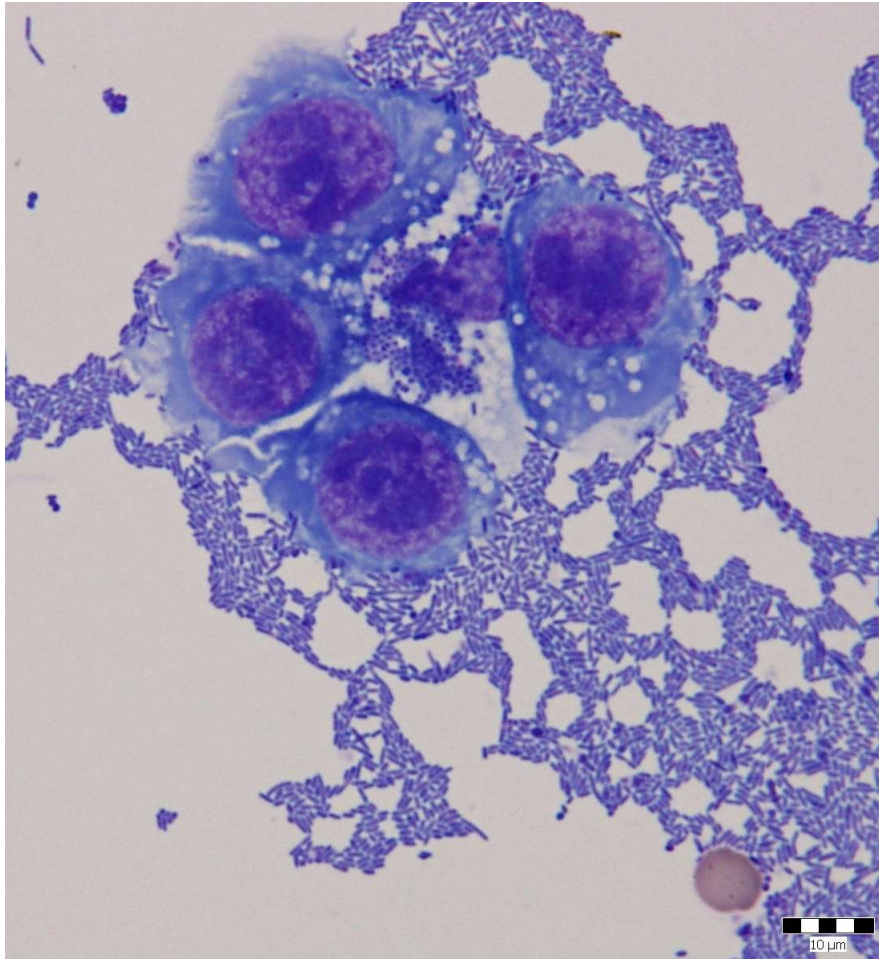
# Eosinofily



# Bakteriální infekce s absencí adekvátní buněčné odpovědi

## Baktérie – tyčky a koky

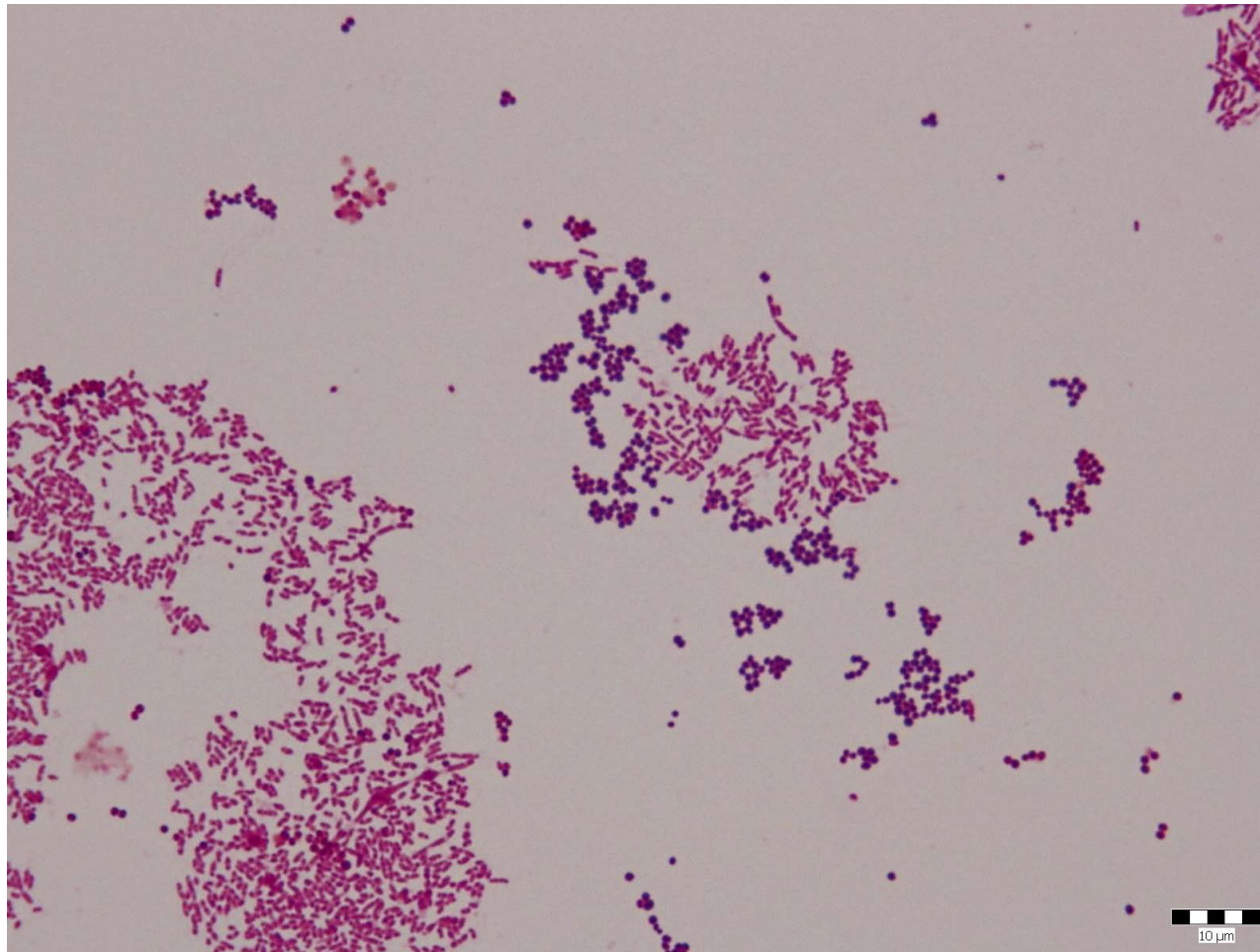
základní barvení; vlevo velké mononukleární buňky (blíže s jistotou neurčené)



# Gramnegativní tyčky a grampozitivní koky

Gramovo barvení

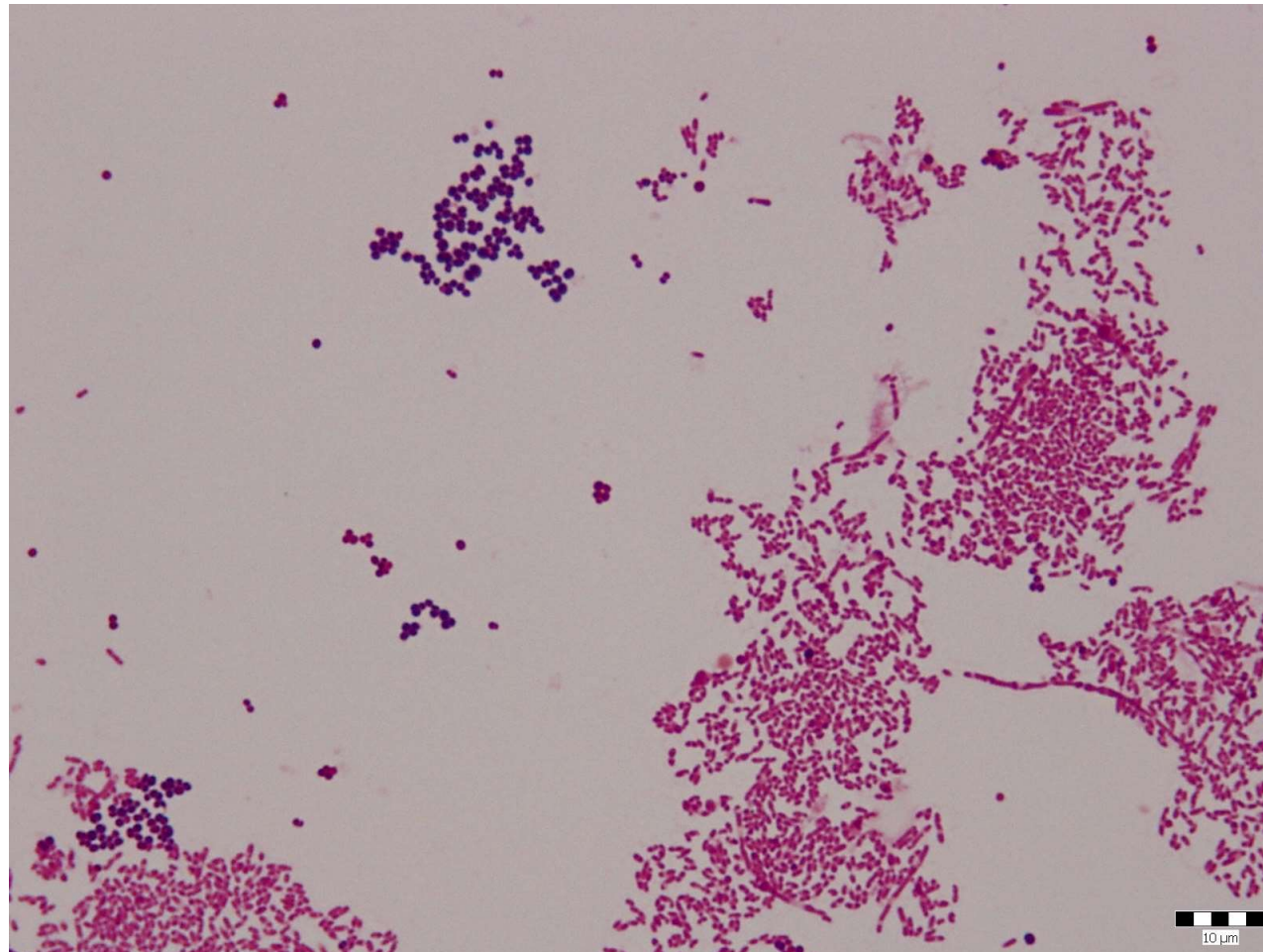
kultivace: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*  
(koky neuvedeny)



# Gramnegativní tyčky a grampozitivní koky

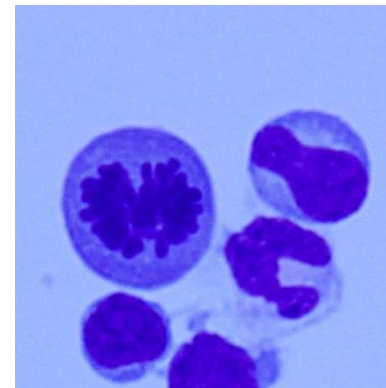
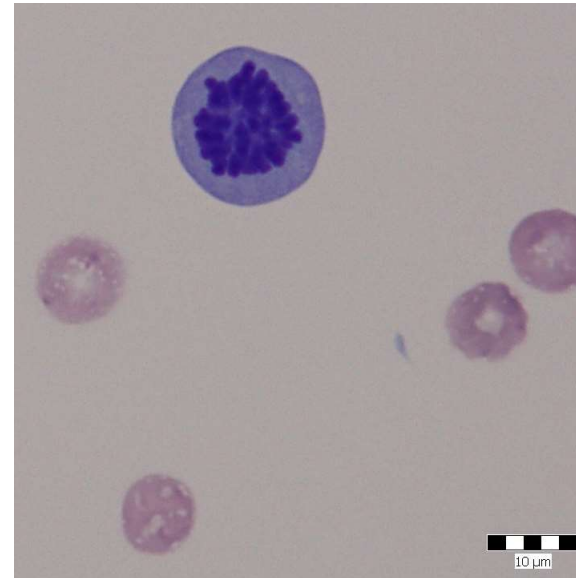
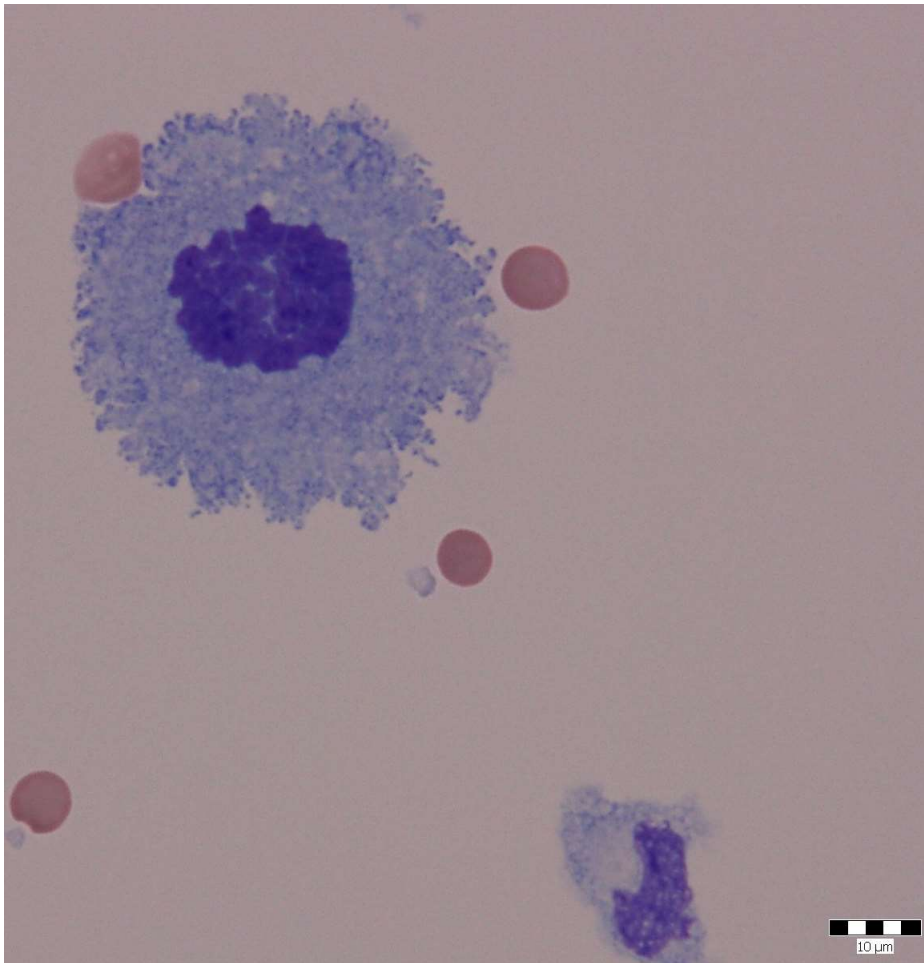
Gramovo barvení

kultivace: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*

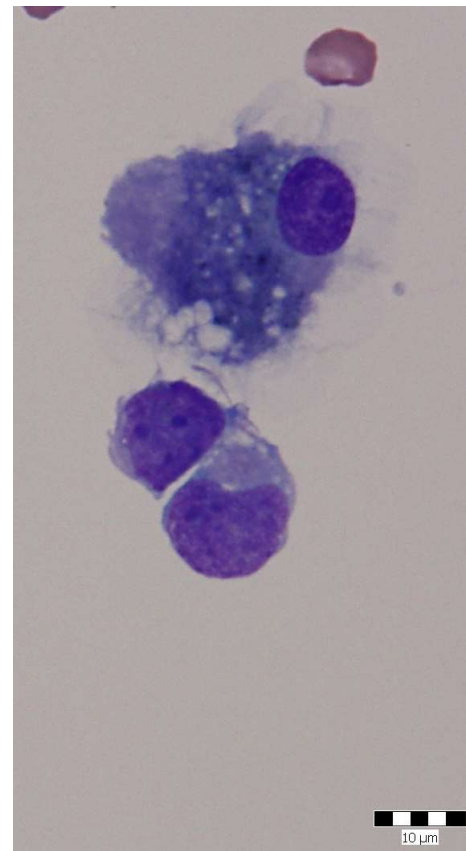
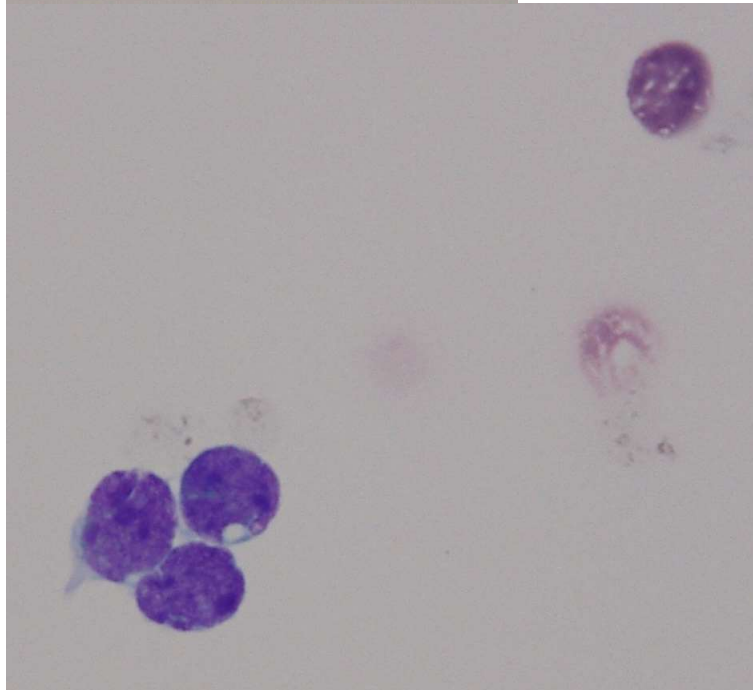
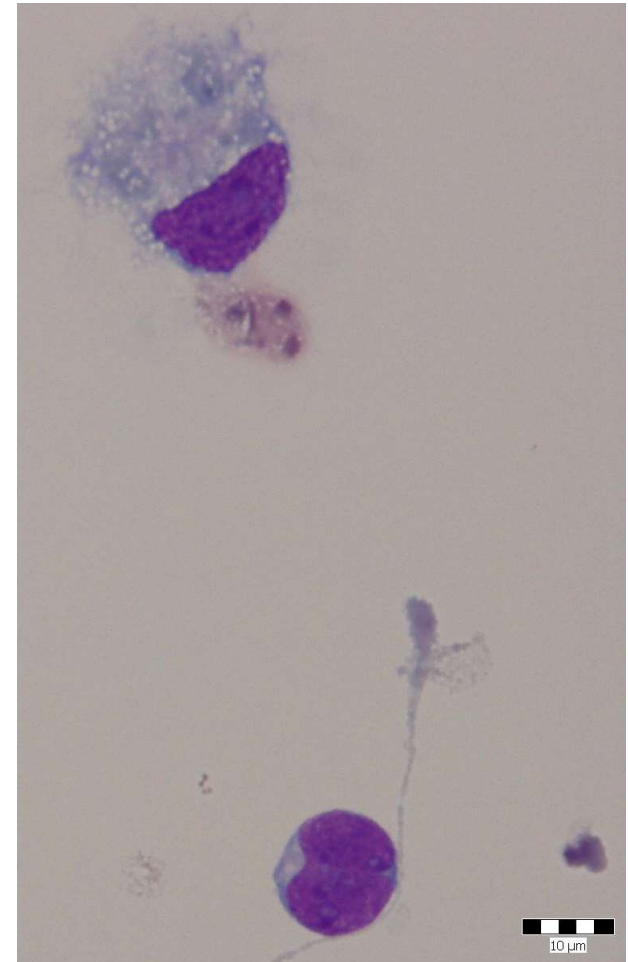
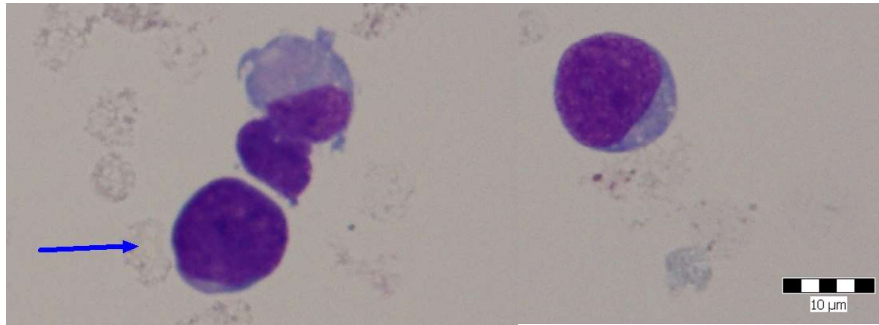


# Mitotické figury v likvoru

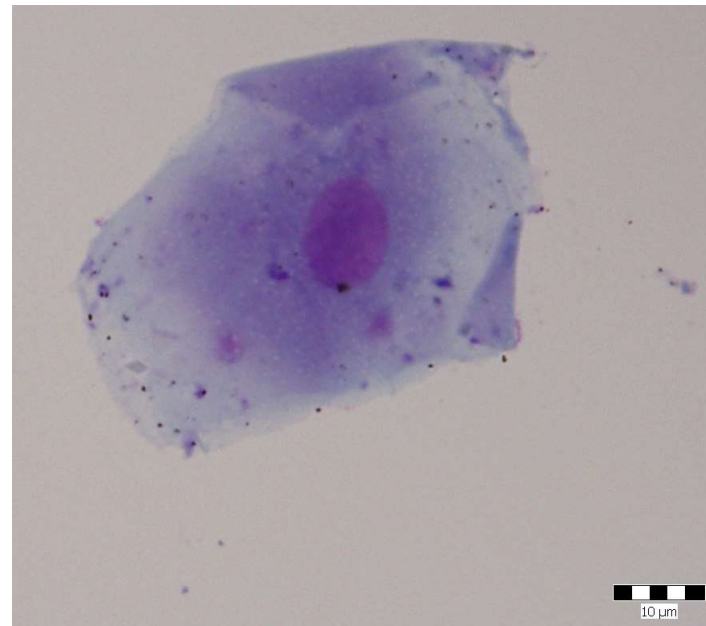
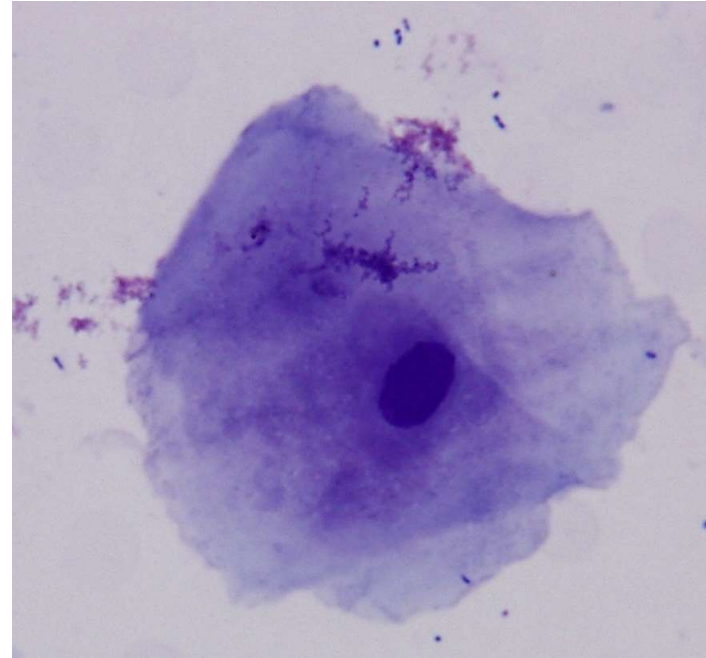
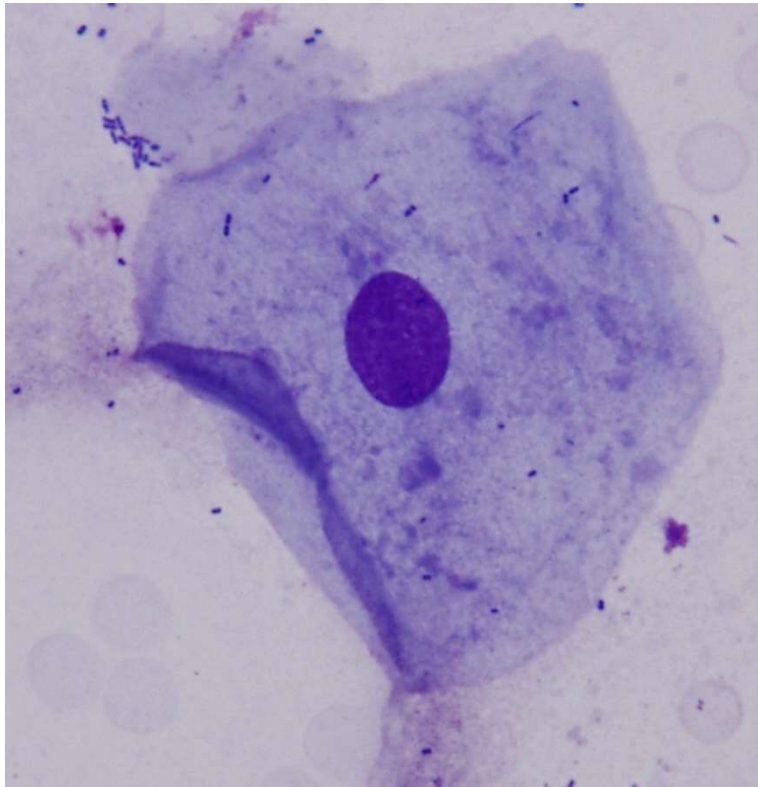
*vlevo monocytoidní, uprostřed a vpravo lymfoidní buňky  
uprostřed: mitózy v zánětlivých likvorech  
vpravo dole: mitóza u pacientky s infiltrací mening NHL*



# Nediferencované mononukleární buňky

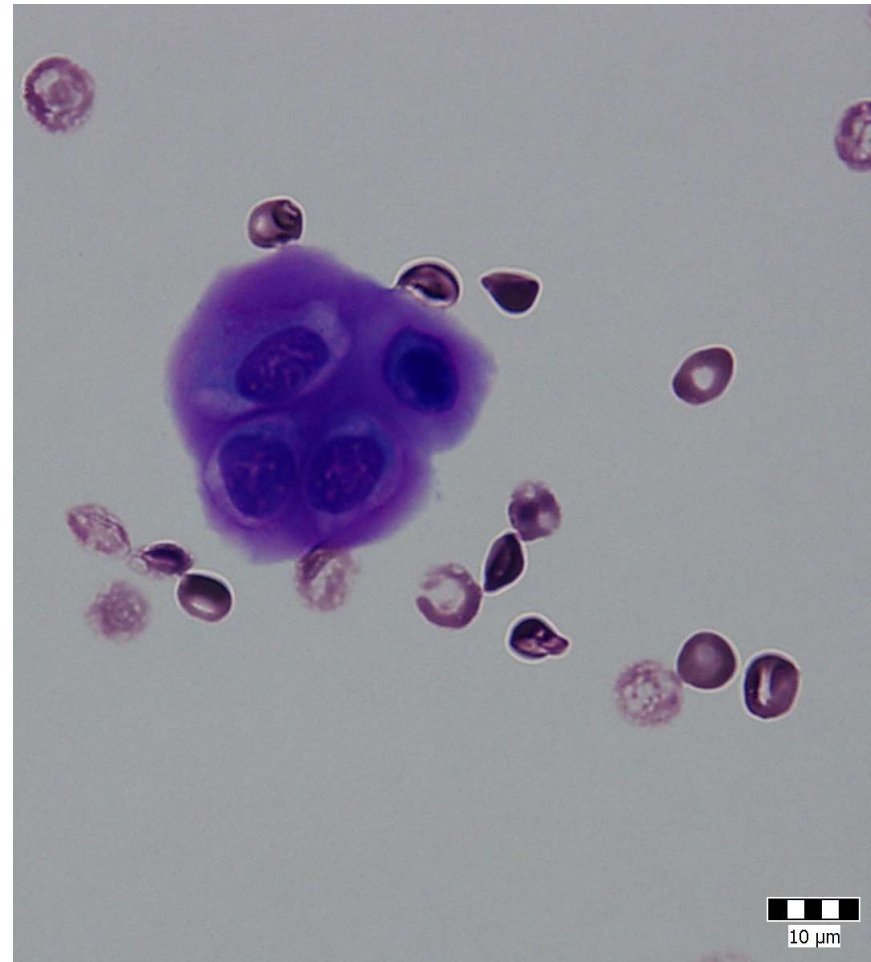
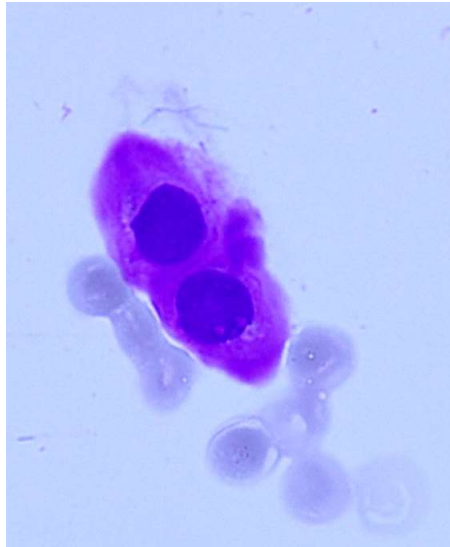


# Kontaminace I. Epithelie





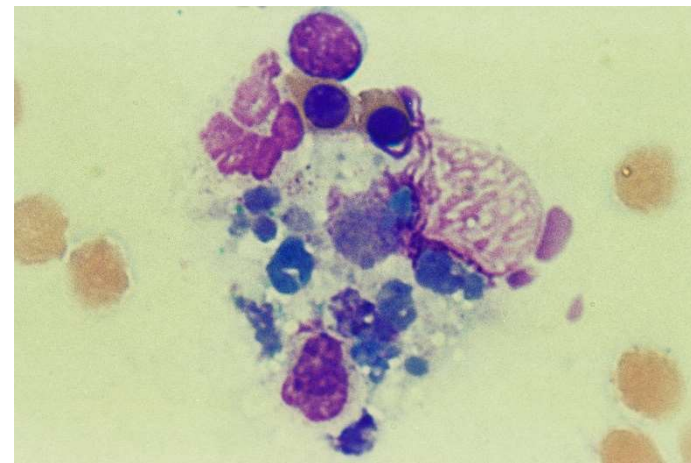
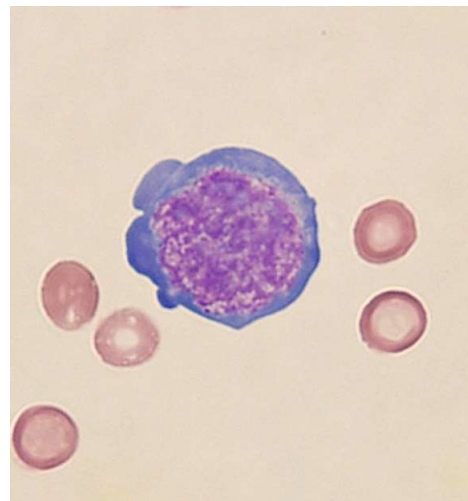
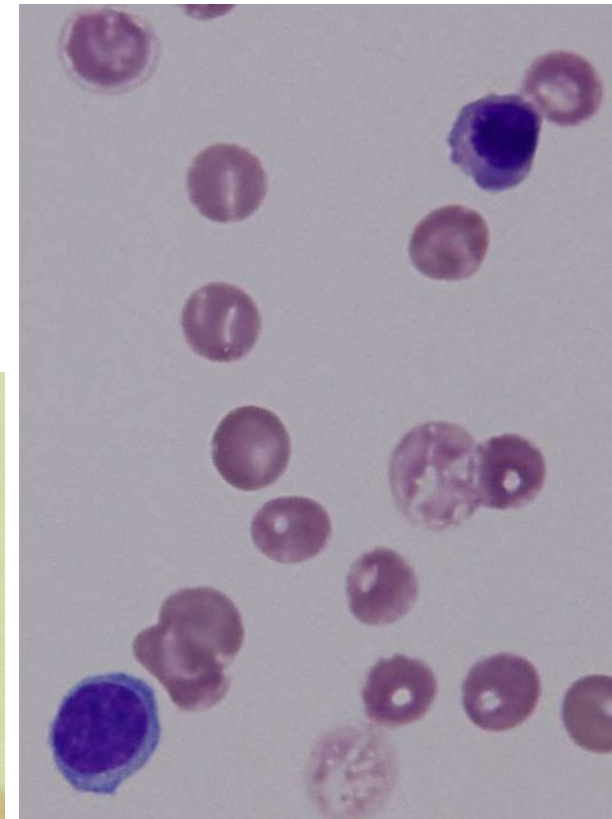
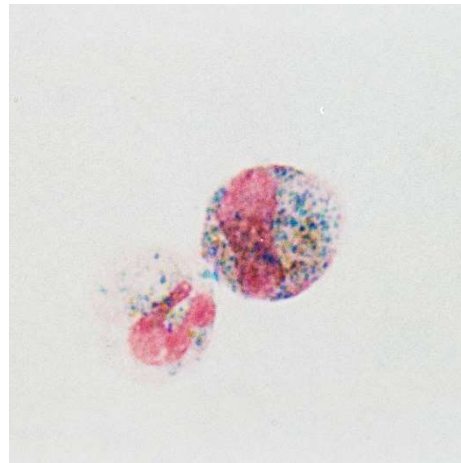
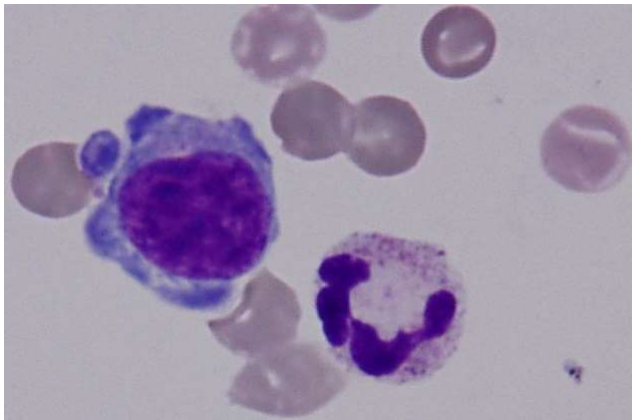
# Kontaminace II. Chondrocyty



# Kontaminace III.

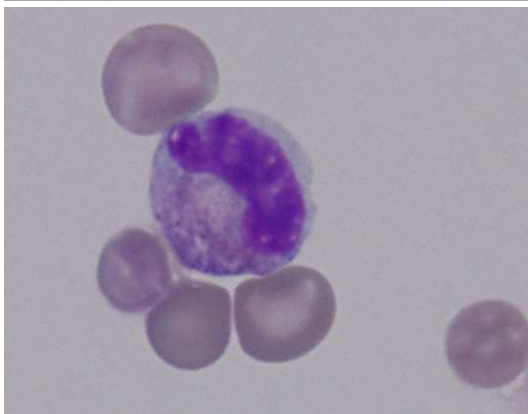
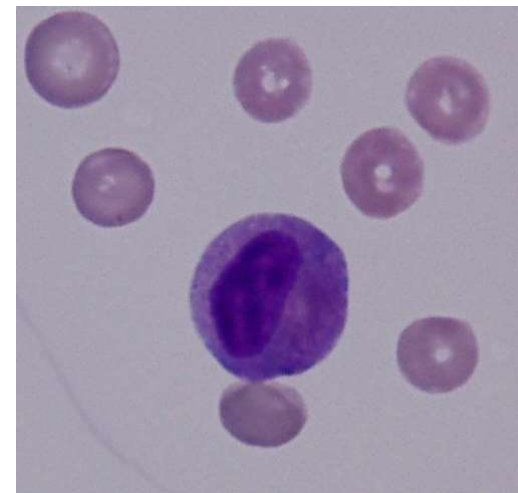
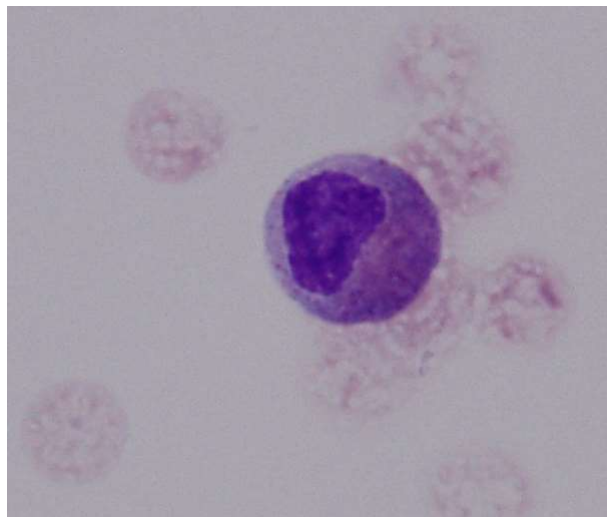
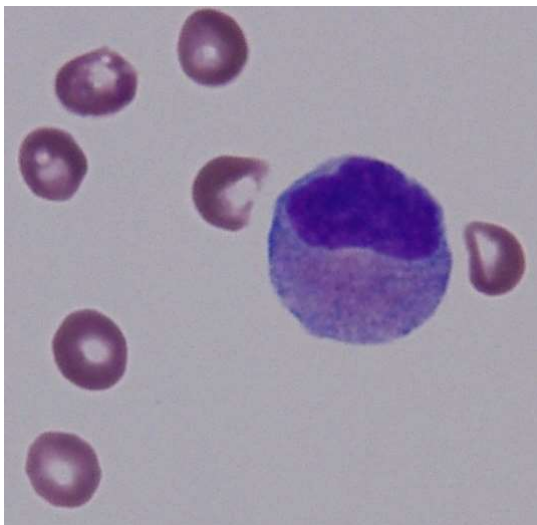
## Kostní dřeň

*nezralé buňky všech (!) řad hematopoezy*



# Kontaminace III. Kostní dřeň

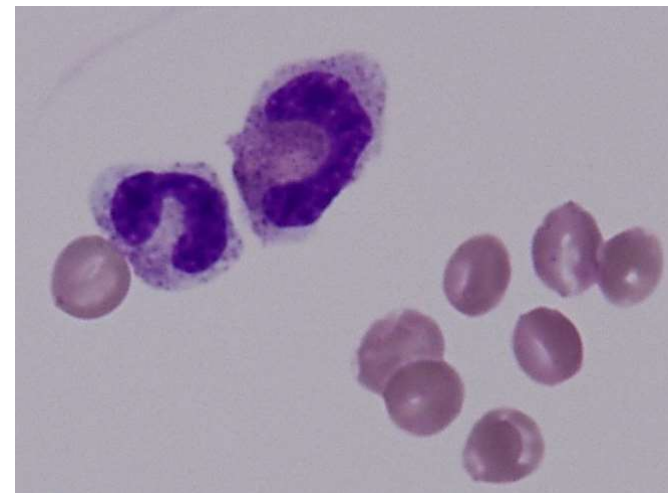
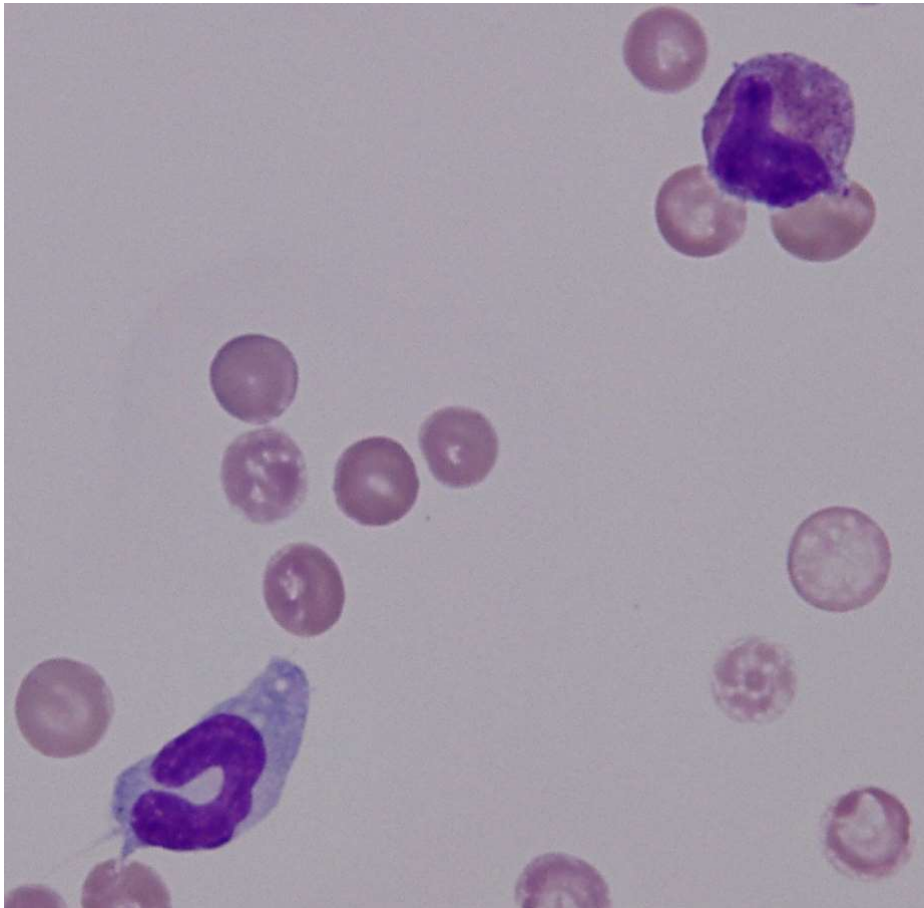
nezralé formy myelopoezy



# Kontaminace III. Kostní dřeň

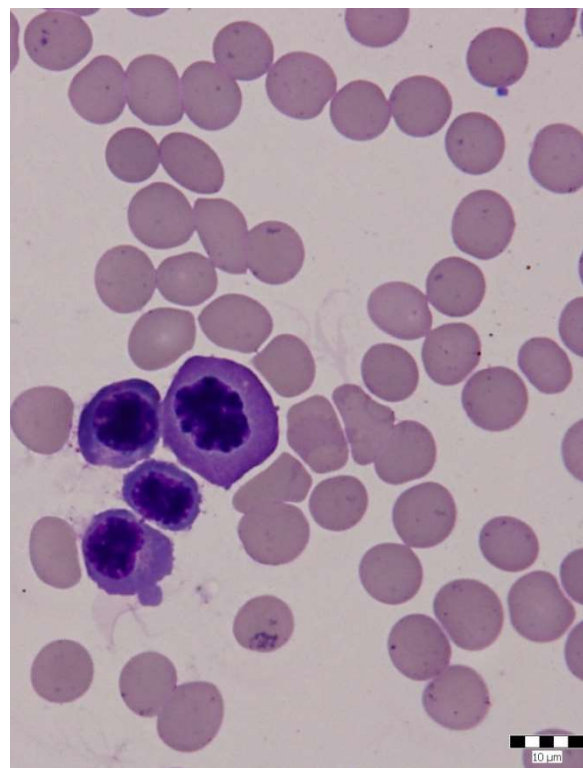
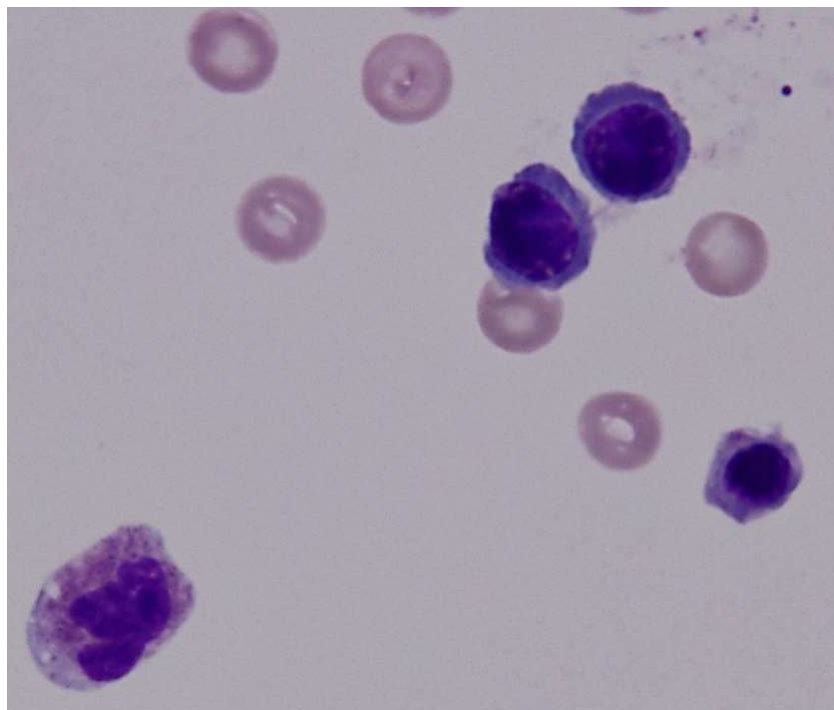
**(NEBO: periferní krev abnormního složení)**

*vlevo: monocyty, metamyelocyty; vpravo: neutrofilní tyčky*

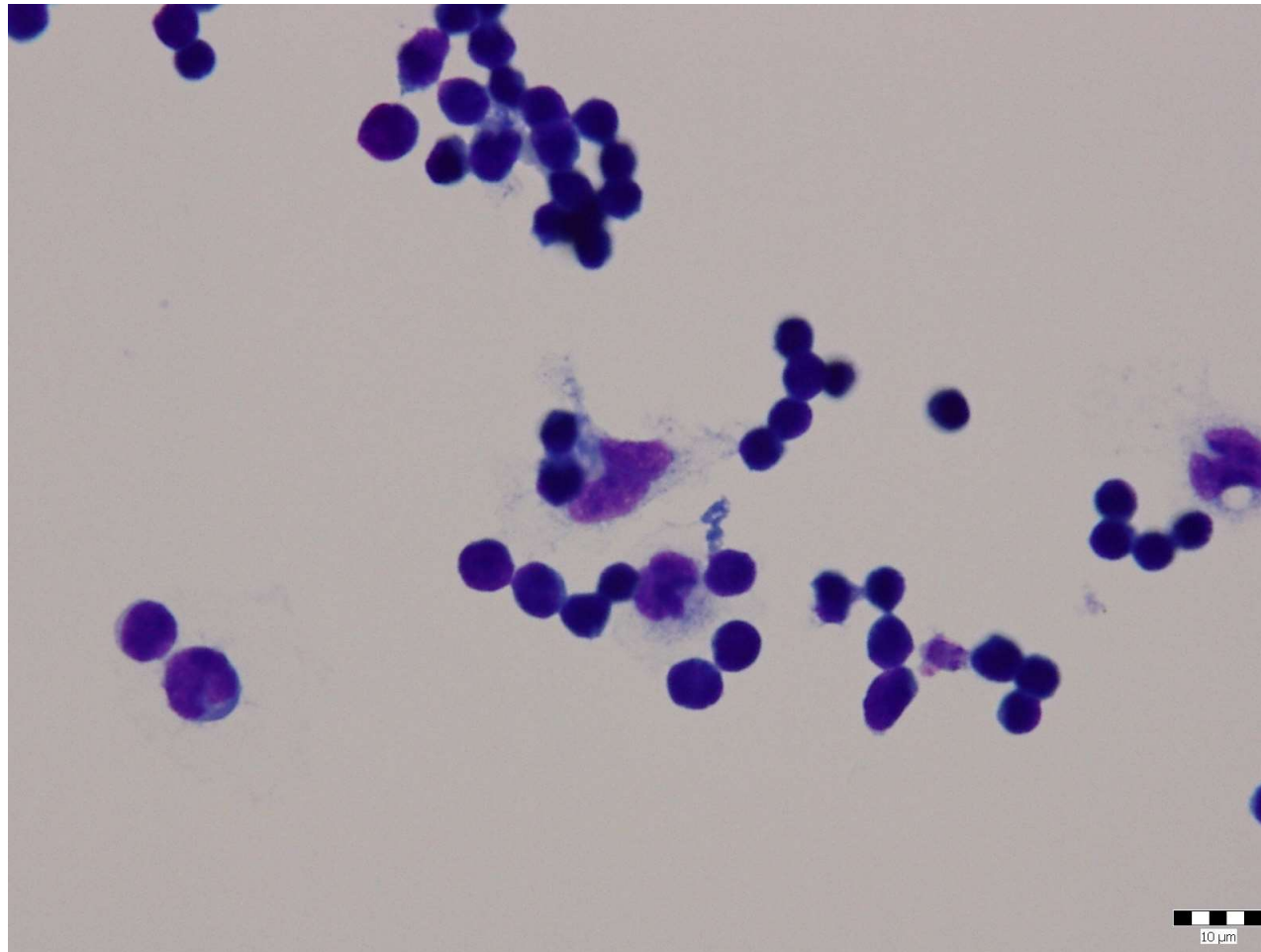


# Kontaminace III. Kostní dřeň

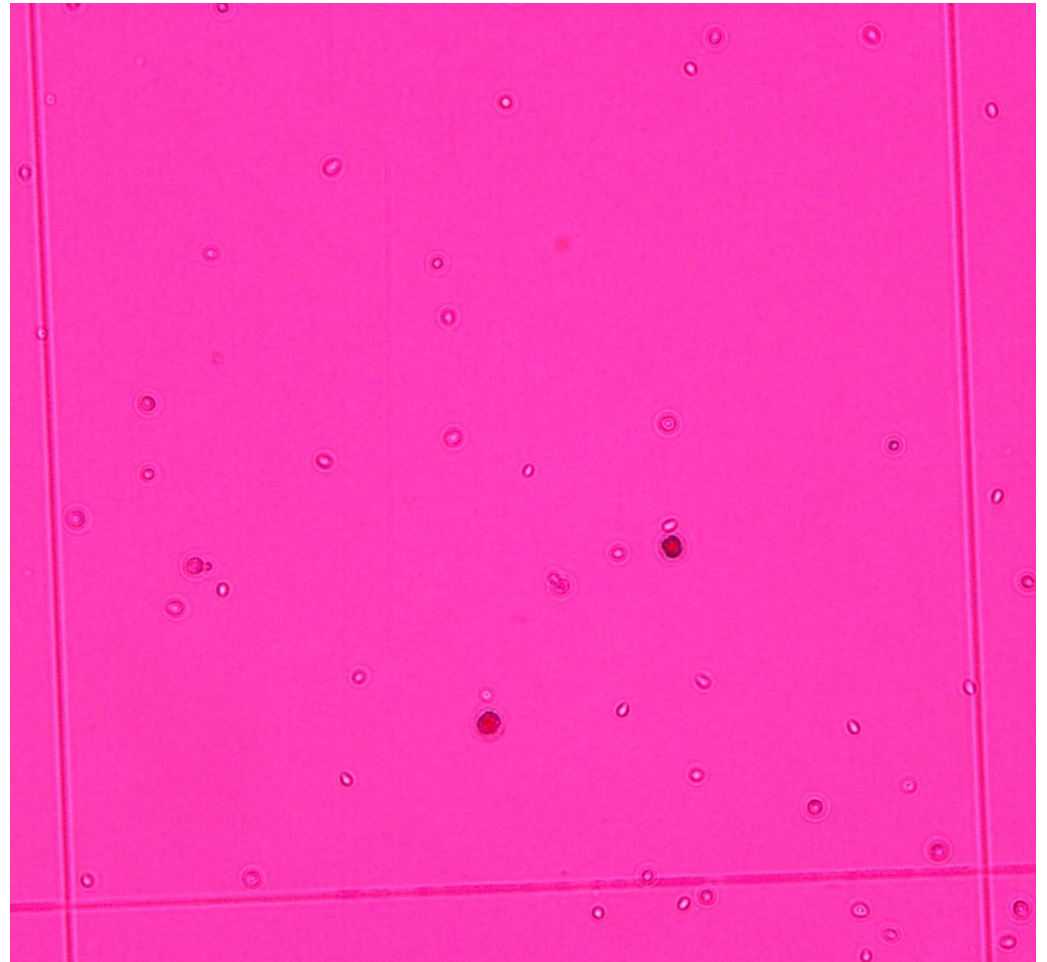
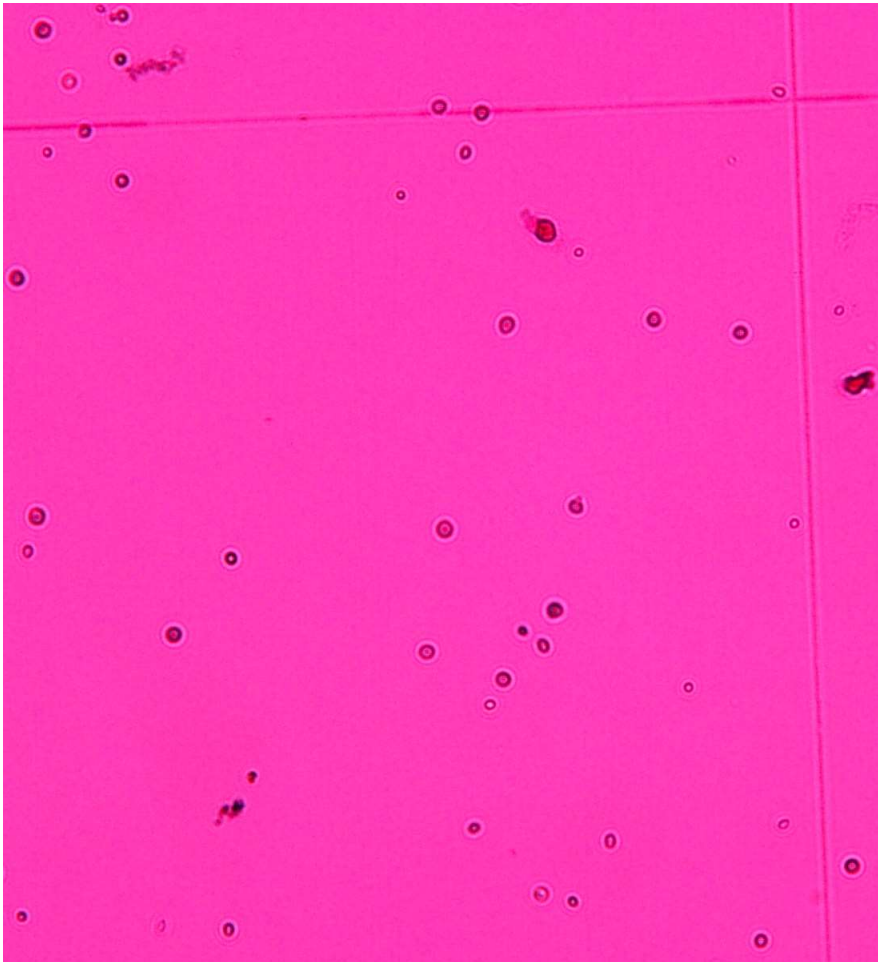
bazofilní (vlevo), orthochromní (uprostřed) a acidofilní (vpravo)  
normoblasty



**Artefakty: narušené lymfocyty v silně buněčných preparátech (nezaměňovat za kvasinky !!!)**

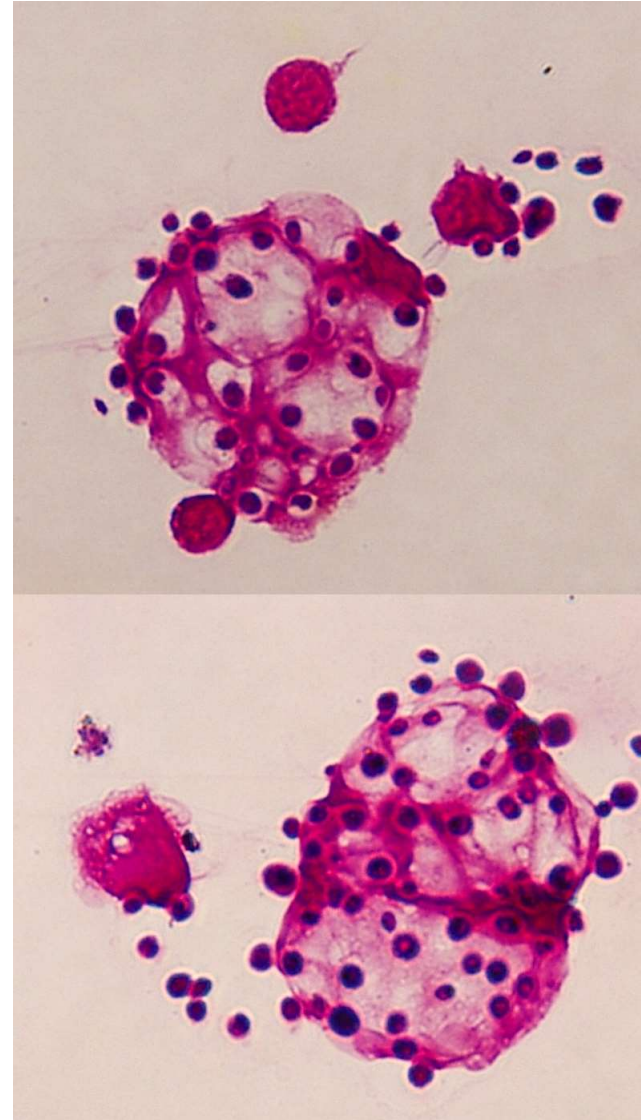
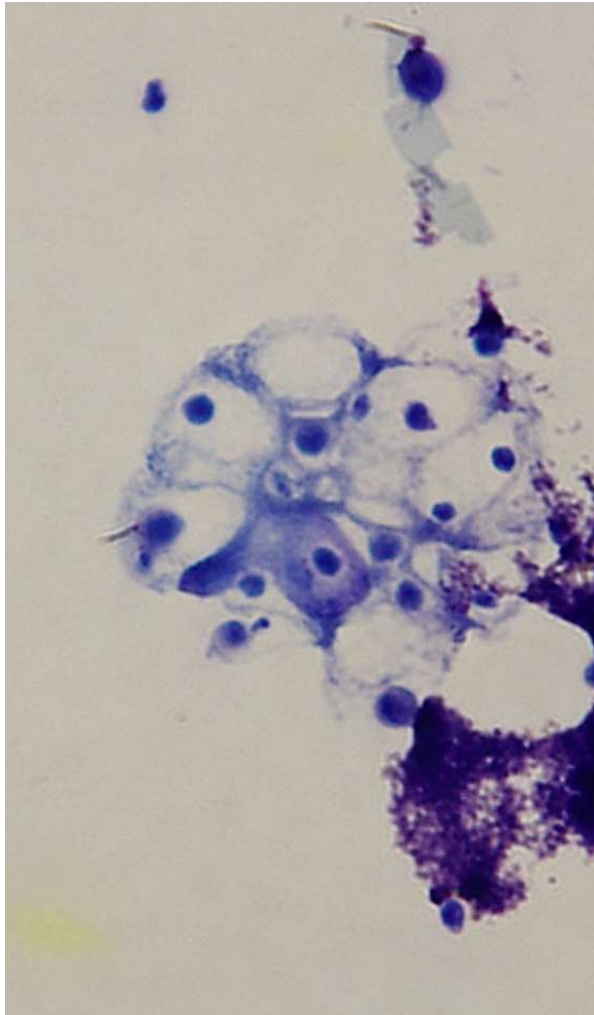


# Kryptokoky ve F.-R. komürce



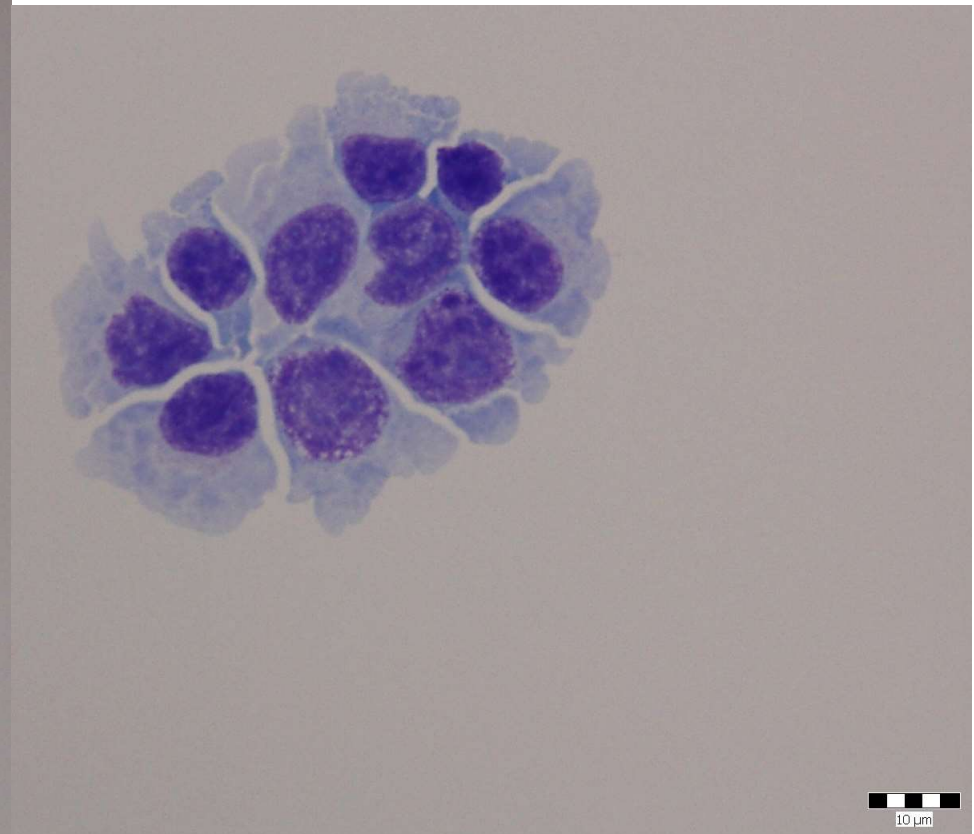
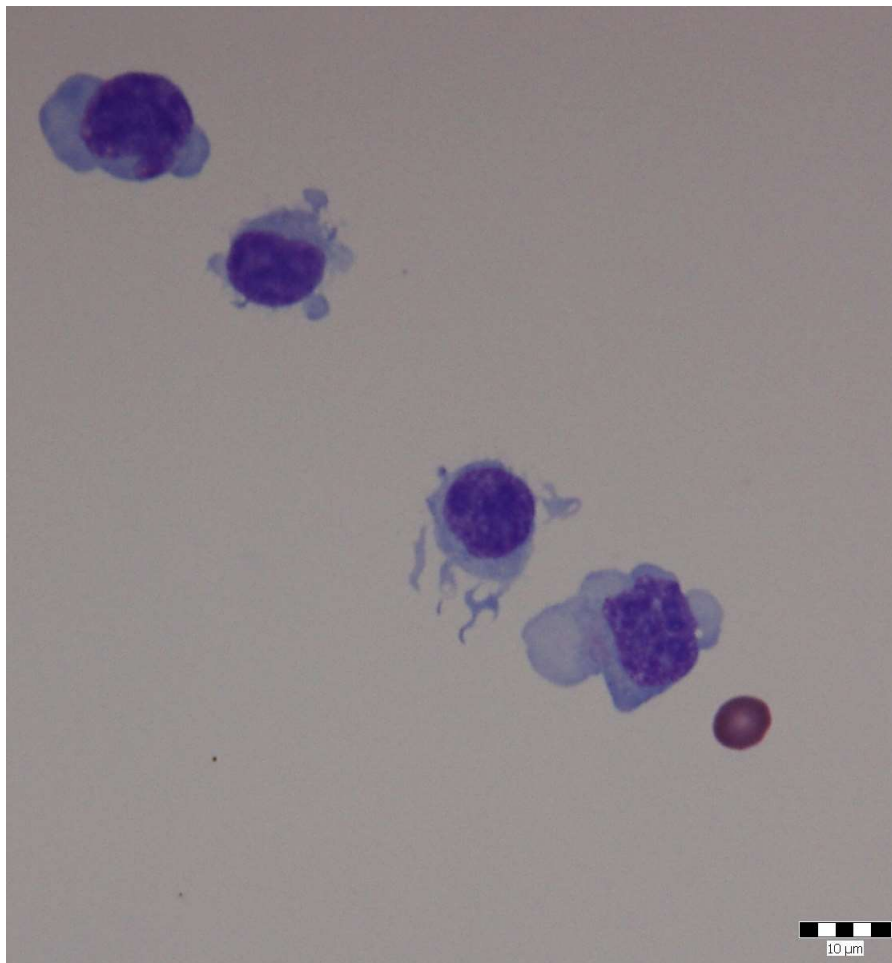
# Kryptokoky

*základní (vlevo) a Gramovo (vpravo) barvení*



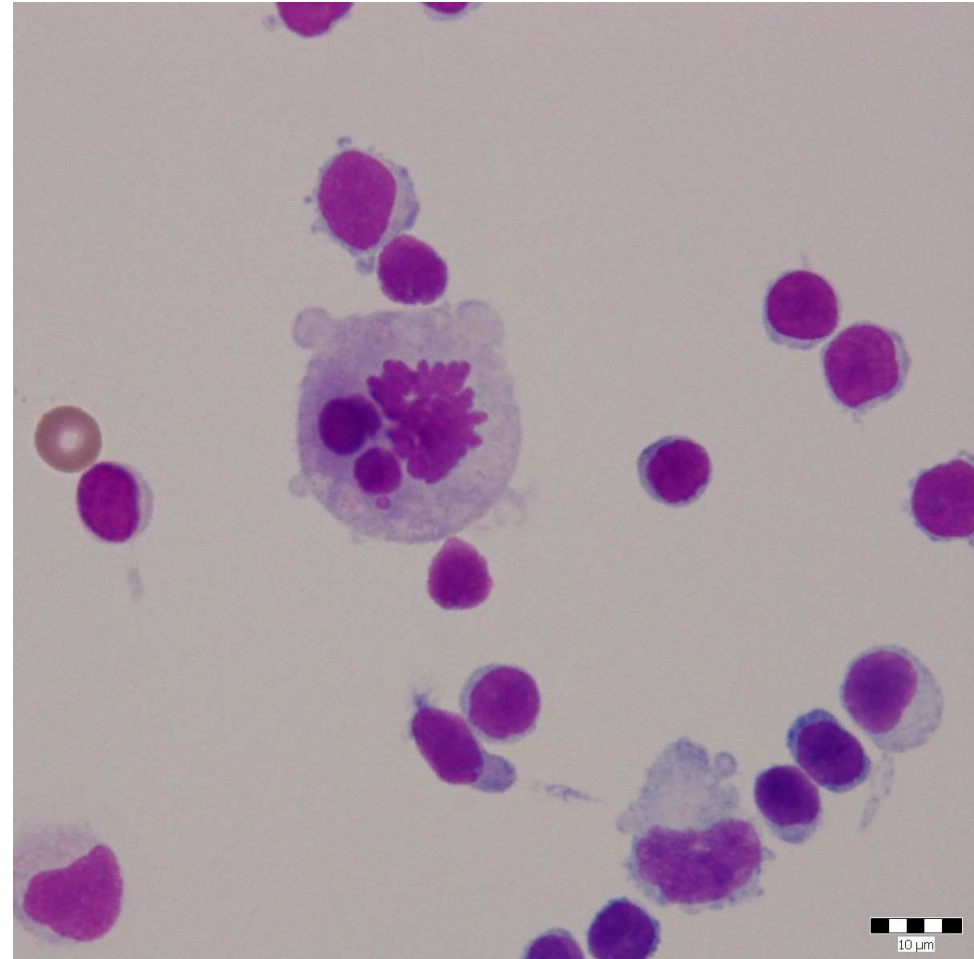
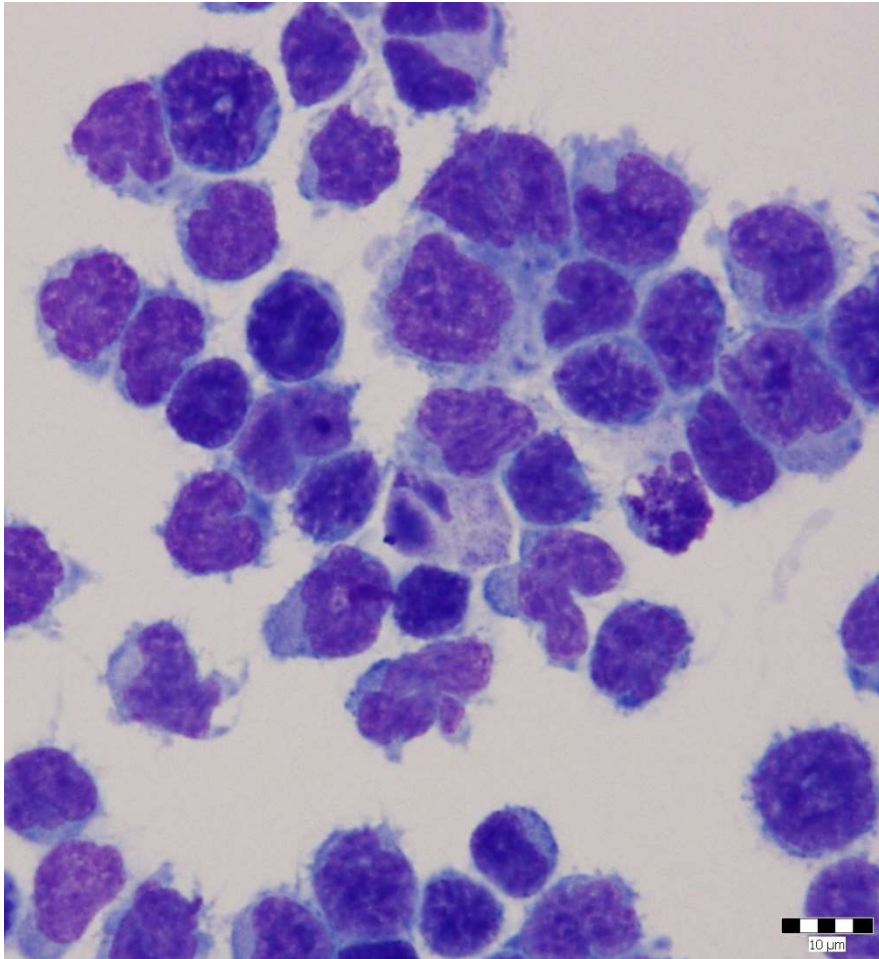


# Nádorová infiltrace mening *NHL (non-hodgkinský lymfom)*

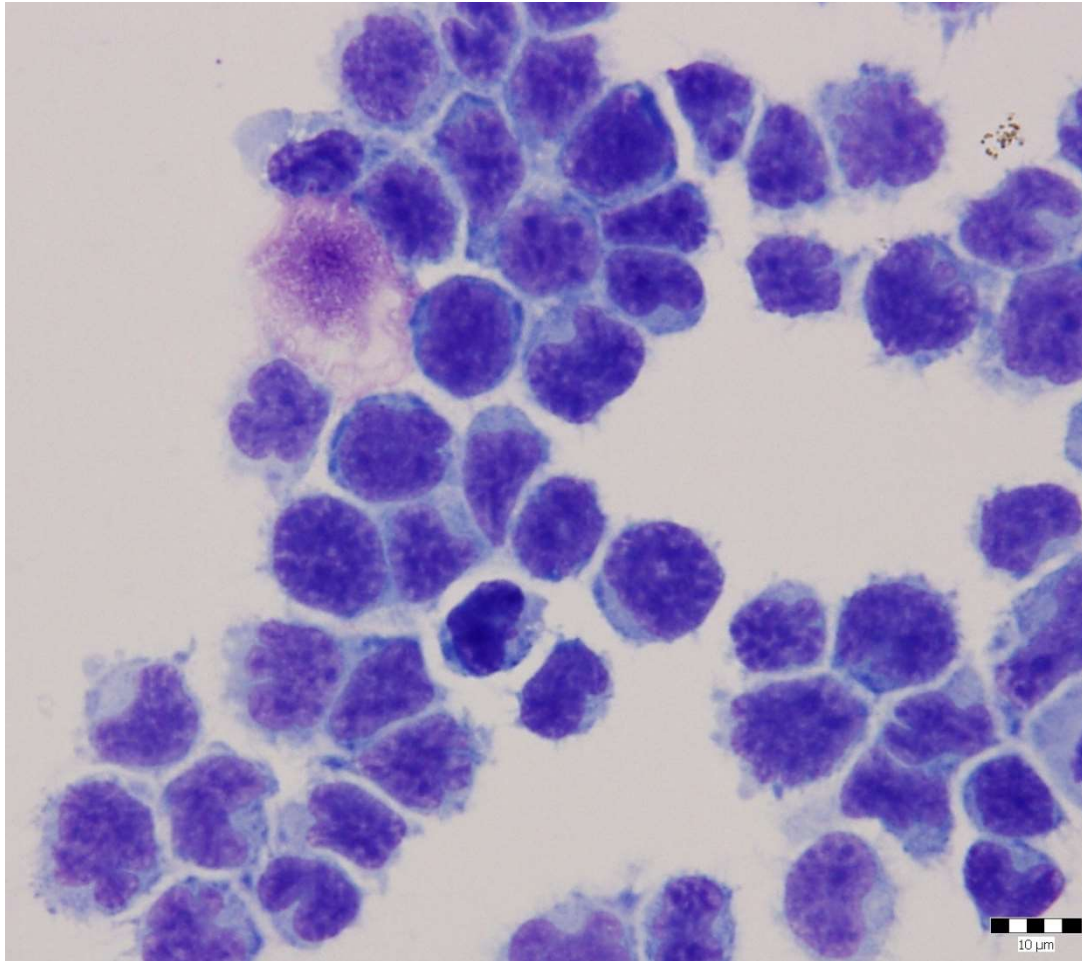


**Nádorová infiltrace mening – NHL (jiný případ) vs.  
lymfocytární pleocytóza u nehnisavého zánětu**

Kvíz: který snímek patří ke které diagnóze ?



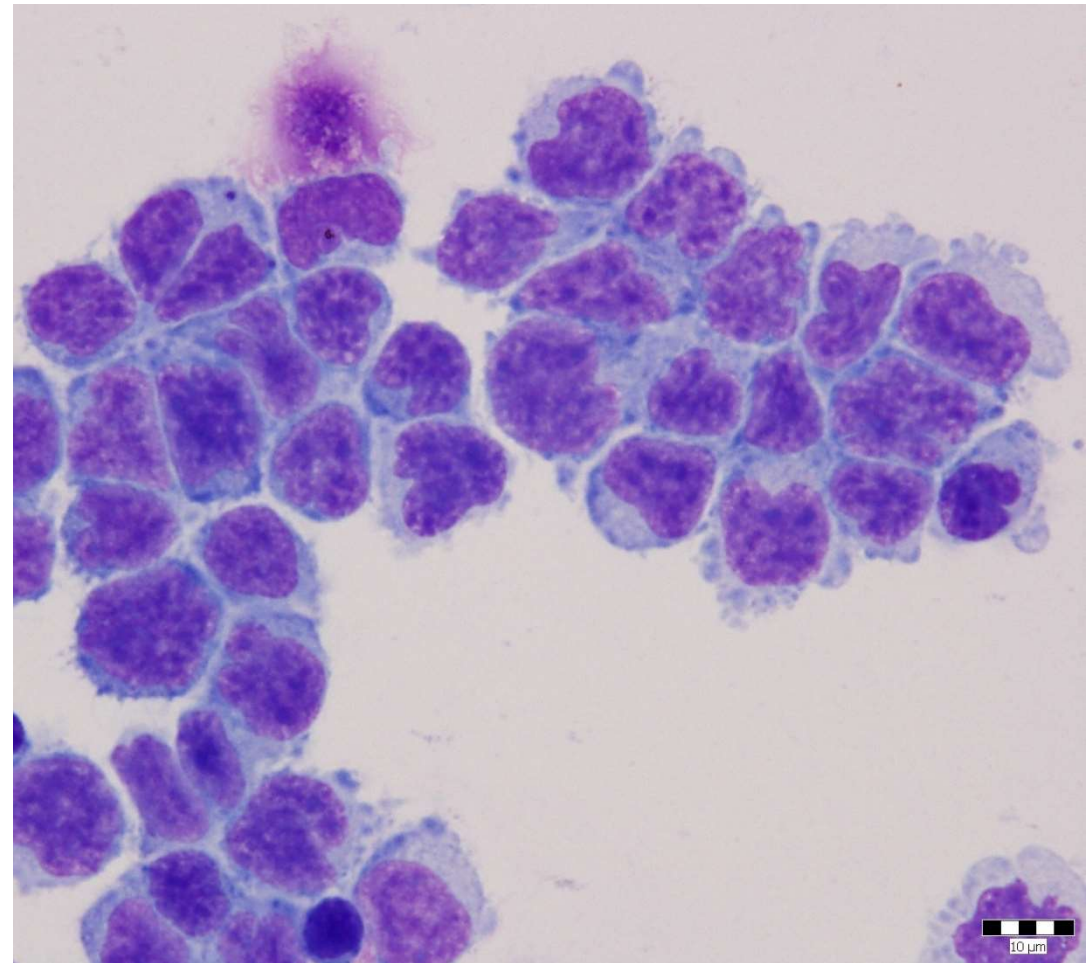
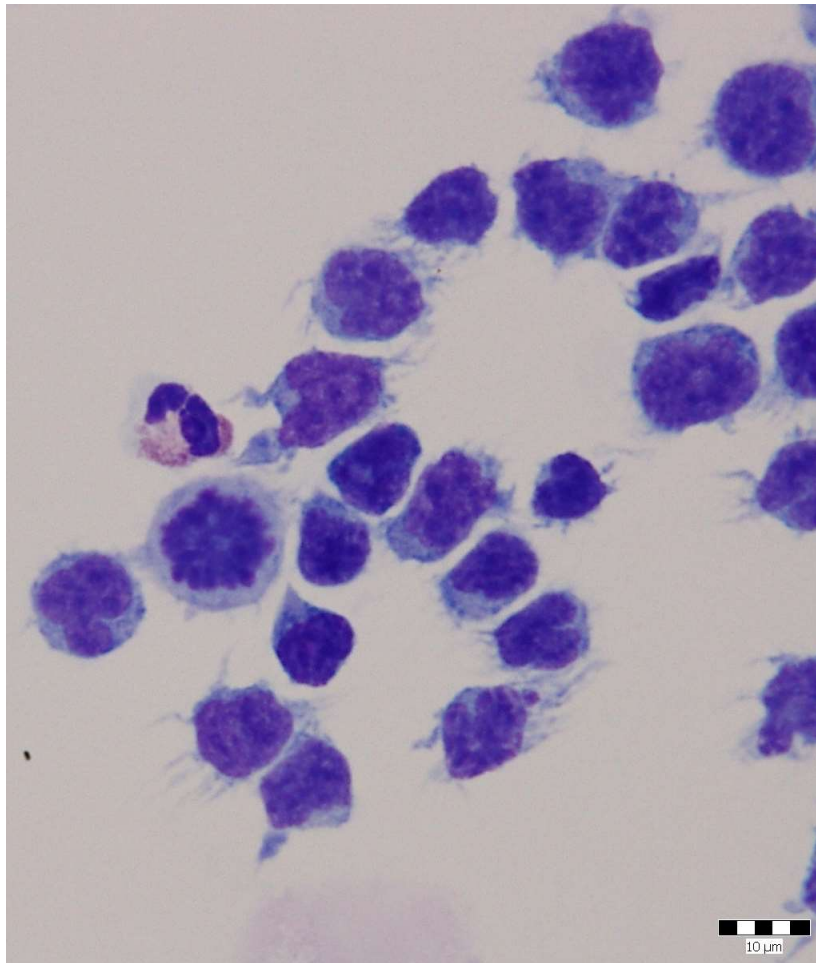
# Nádorová infiltrace mening



- čb, 4032/3 atypických bb., Pandy ++, krev 0
- CB 1,478 g/l,
- glukosa 0,09 mmol/l
- laktát 12,15 mmol/l
- cytologie: min. 78 % atypických bb. lymfoidního vzhledu, 15 % lymfo (některé též atyp), 6 % mono, 2 % neutr. - obraz v.s. maligní infiltrace plen
- **Dg.: B-NHL**

# Nádorová infiltrace mening (B-NHL)

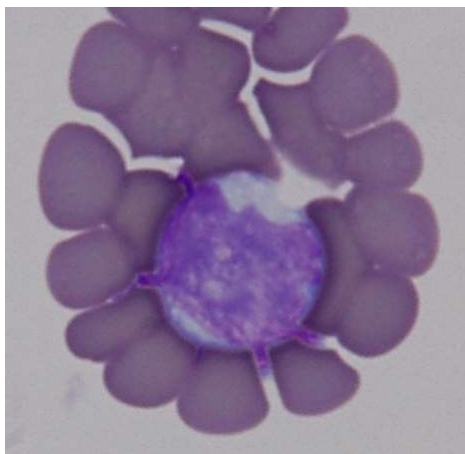
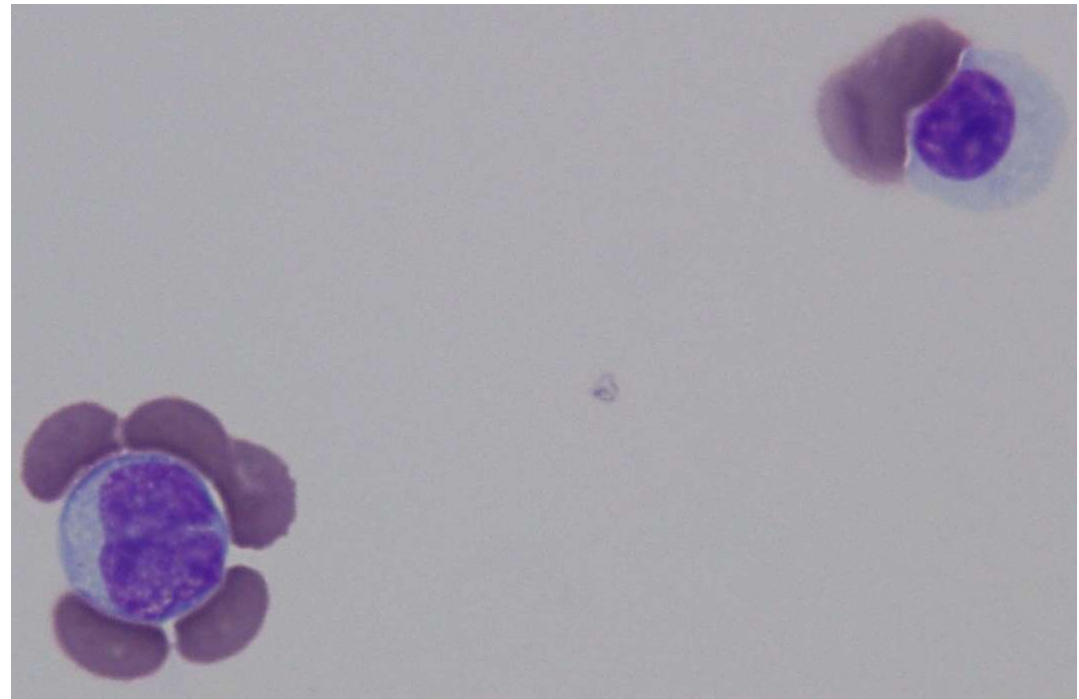
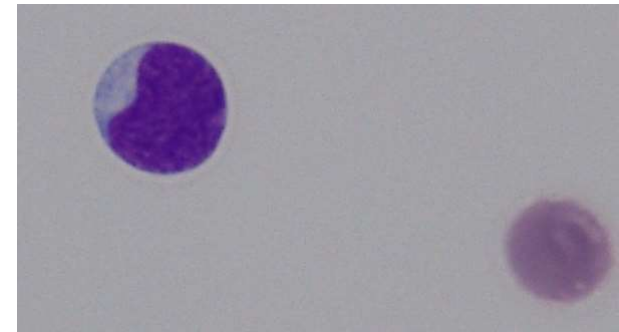
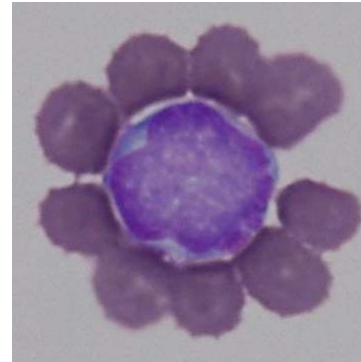
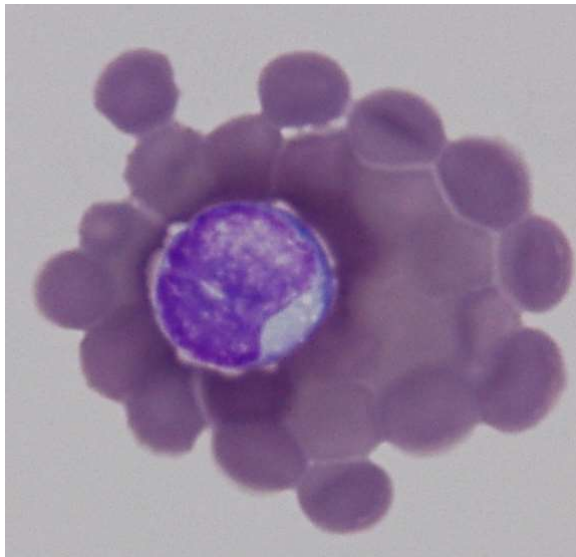
vlevo mitotická figura



# Děti s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL):

## „Neurostatus“

záchyt blastů většinou na vrub krevní kontaminace



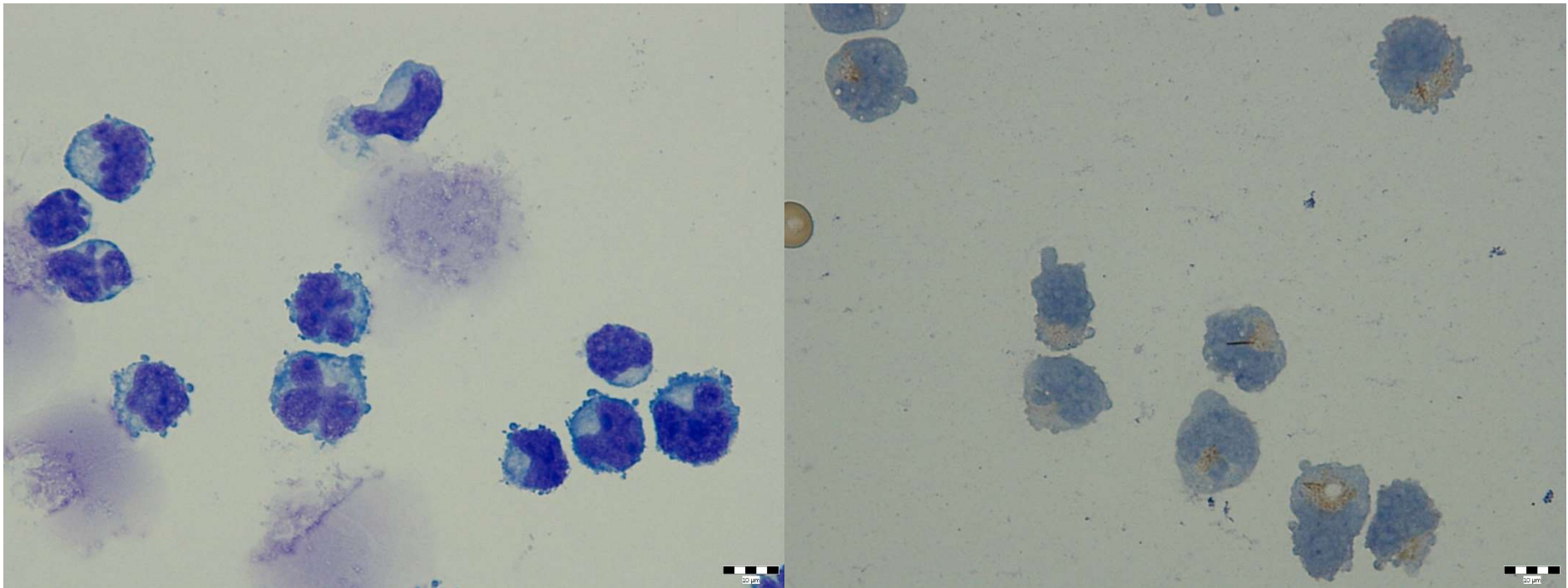
# ALL – CNS status

definice dle studie AIEOP-BFM ALL 2008

- **CNS 1:** nejsou klinické známky CNS onemocnění, nejsou známky CNS onemocnění na zobrazovacích metodách, **absence blastů v likvoru (cytopspinový preparát) bez ohledu na počet leukocytů**
- **CNS 2:** nejsou přítomny klinické známky CNS onemocnění, nejsou známky CNS onemocnění na zobrazovacích metodách,
  - **CNS 2a:**  **$<10/\mu\text{L ERY}$ ,  $\leq 5/\mu\text{L LEUKO}$ , pozitivní nález blastů**
  - **CNS 2b:** **makroskopická kontaminace krví a/nebo  $\geq 10/\mu\text{L ERY}$ ;  $\leq 5/\mu\text{L LEUKO}$ , pozitivní nález blastů**
  - **CNS 2c:** **makroskopická kontaminace krví a/nebo  $\geq 10/\mu\text{L ERY}$ ,  $> 5/\mu\text{L LEUKO}$ , pozitivní nález blastů, ale negativní algoritmus** pro vyhodnocení traumatické kontaminace iniciální LP
- **CNS 3:**
  - **CNS 3a:**  **$\text{ERY} < 10/\mu\text{L}$ ,  $\text{LEUKO} > 5/\mu\text{L}$ , pozitivní nález blastů**
  - **CNS 3b:**  **$\text{ERY} \geq 10/\mu\text{L}$ ,  $\text{LEUKO} > 5/\mu\text{L}$ , pozitivní algoritmus** pro vyhodnocení traumatické kontaminace iniciální LP
  - **CNS 3c:** klinické příznaky CNS onemocnění nebo příznaky CNS onemocnění na zobrazovacích metodách

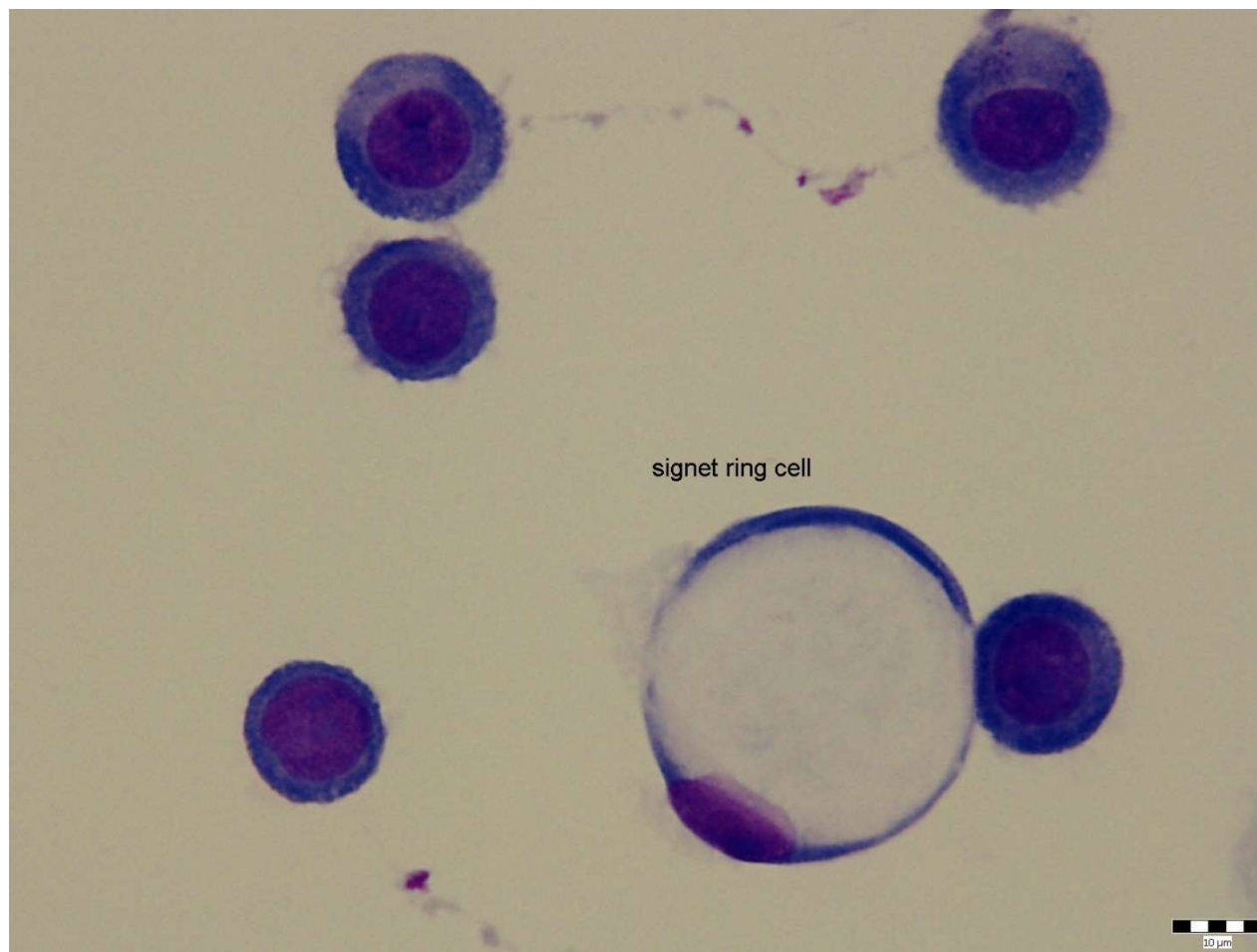
## Infiltrace CNS u AML

(*vlevo*: Diff-Quik; *vpravo*: průkaz myeloperoxidasy, Auerovy tyče)



# Karcinóza mening (*Ca plic*)

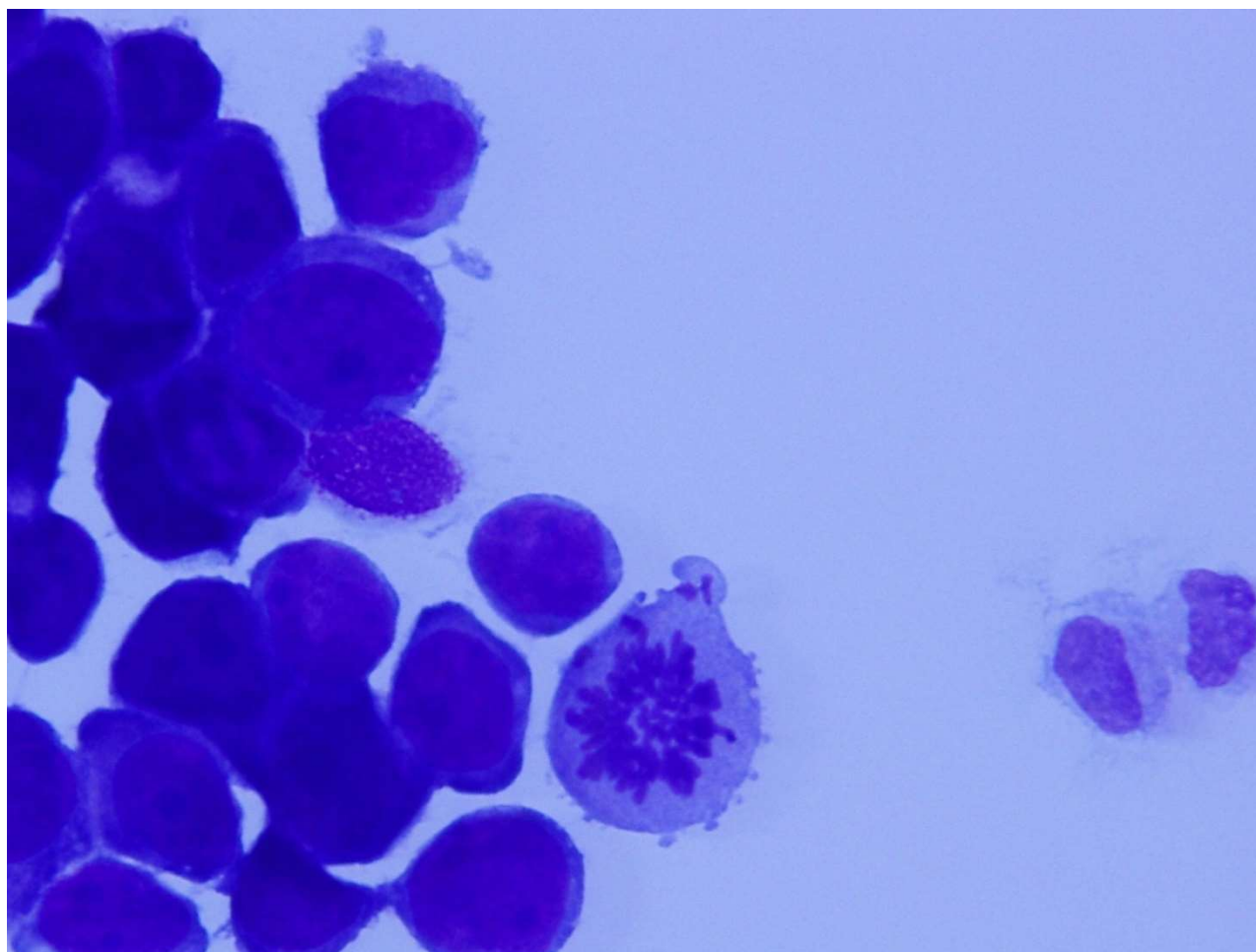
buňka tvaru pečetního prstenu  
(signet ring cell, Siegelringzelle) – *srv. snímek 32!*





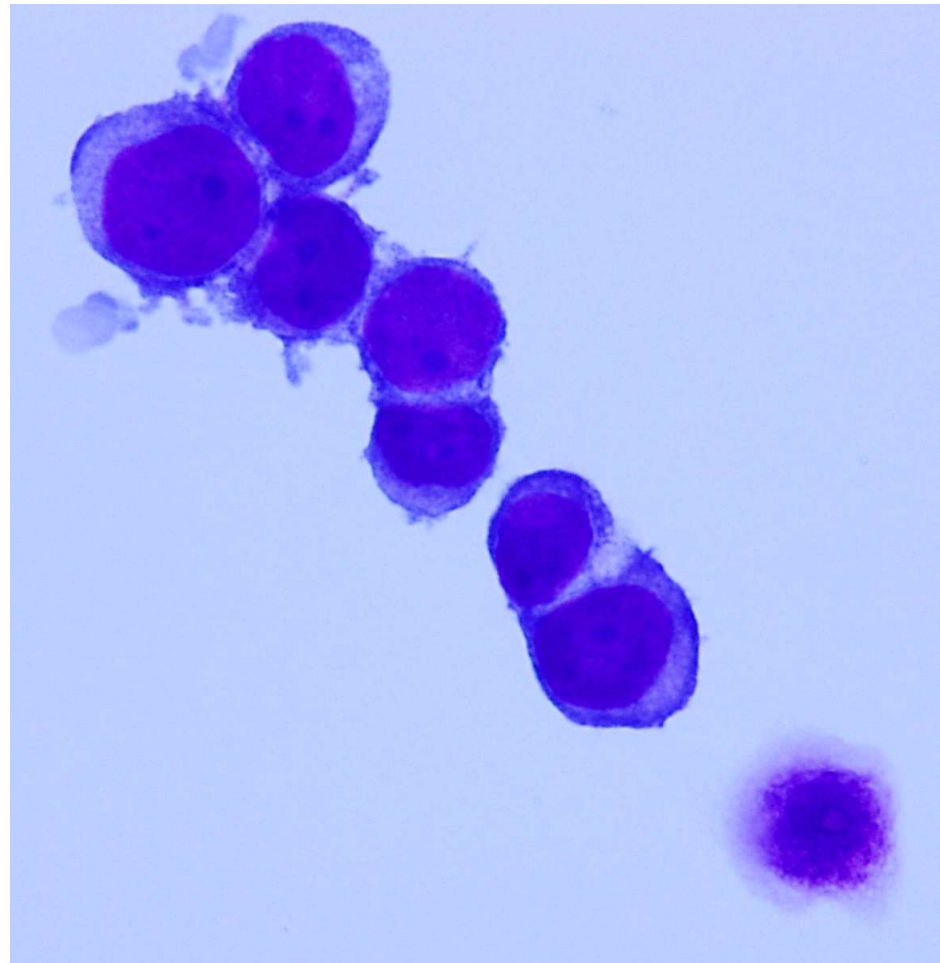
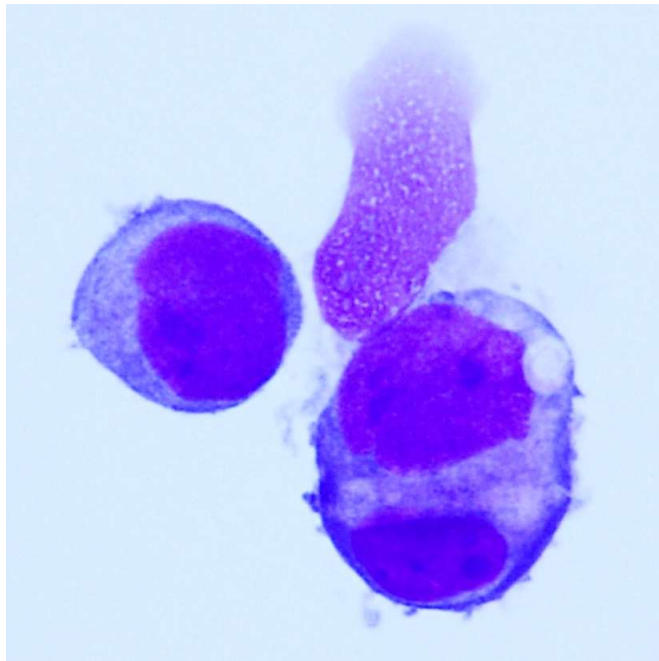
# Nádorová infiltrace mening (*Ca mammae*)

vlevo nádorové buňky, mitotická figura; vpravo dva monocyty

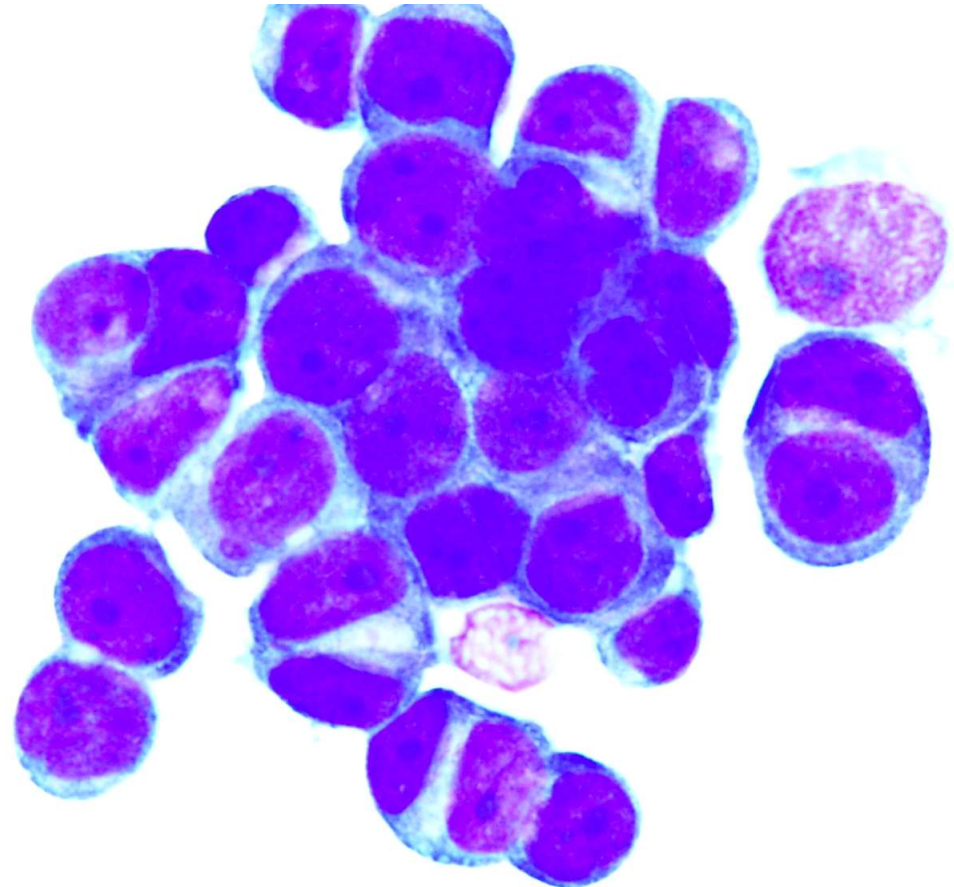
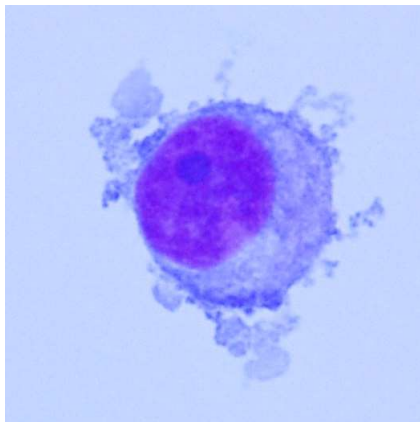
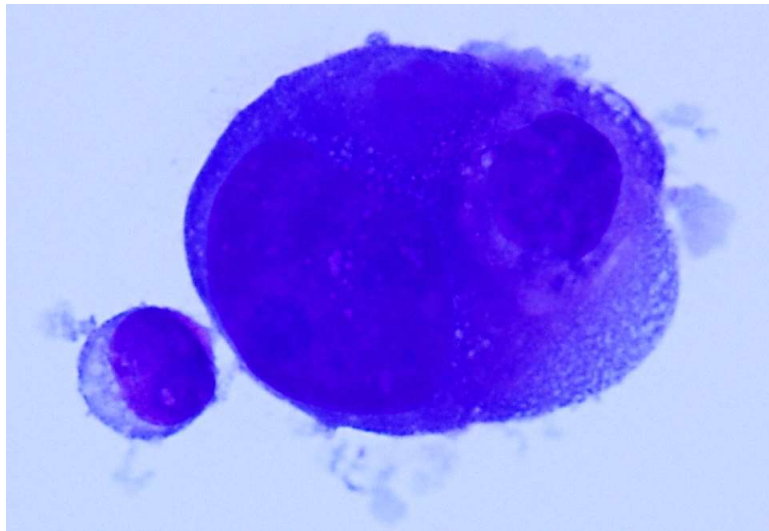


# Nádorová infiltrace mening

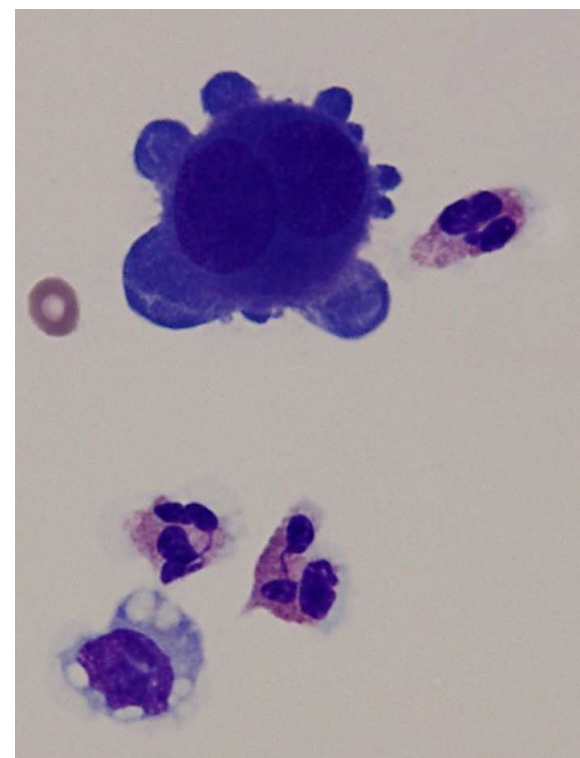
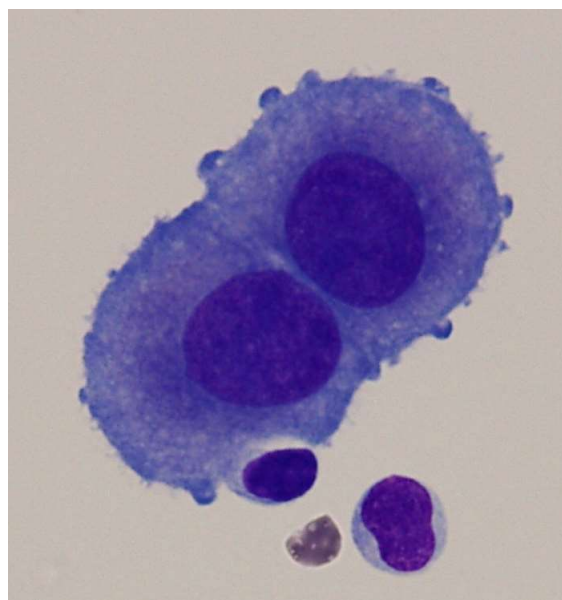
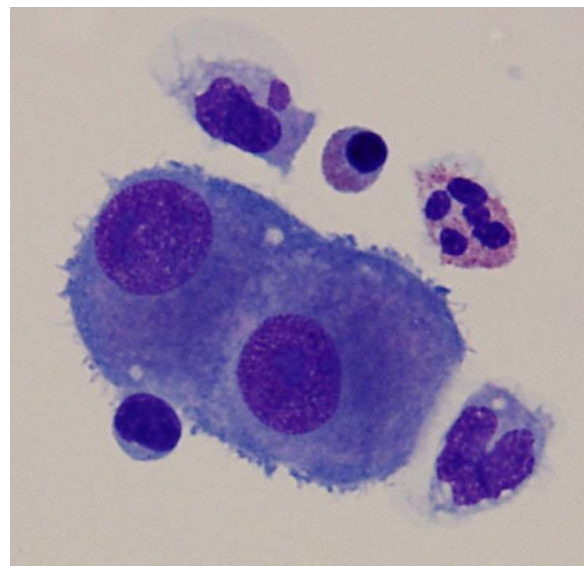
## *Ca mammae*



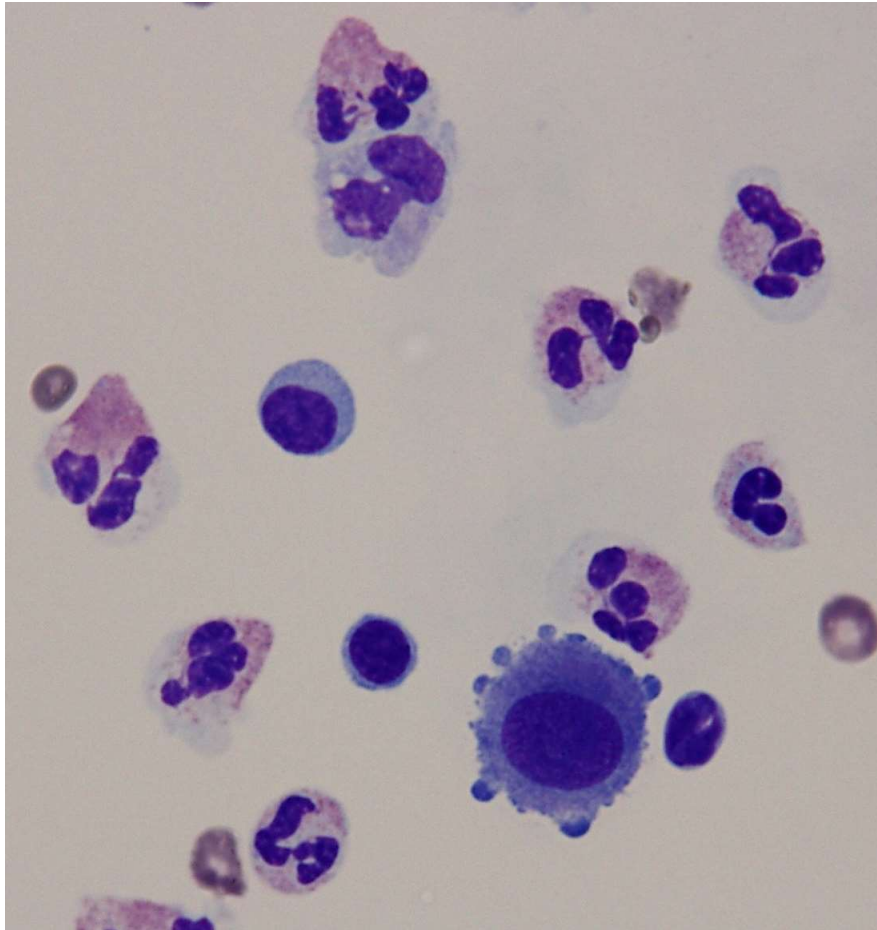
# Nádorová infiltrace mening *Ca mammae*



**Proč cytologický preparát u pozdě dodaných vzorků ?  
(problematická preanalytika)**

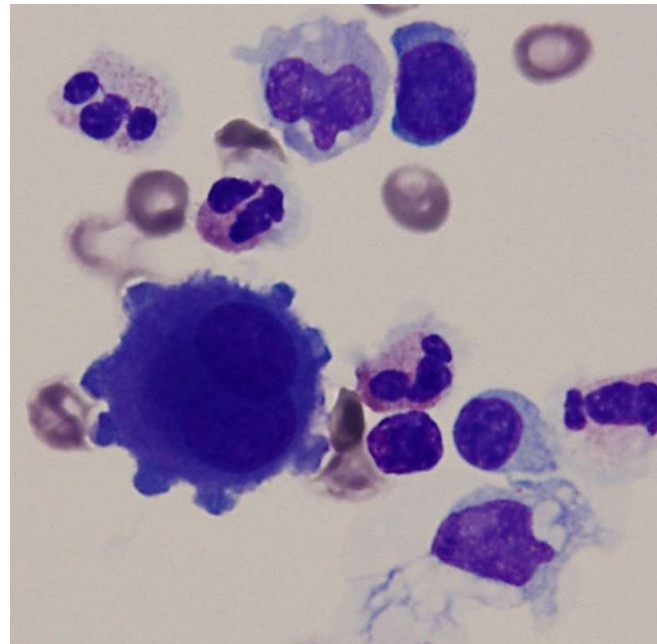
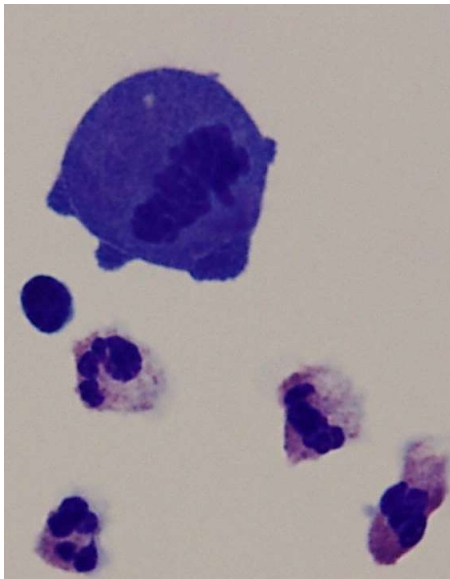


## Proč cytologický preparát u pozdě dodaných vzorků?



- Q-Alb  $290,9 \cdot 10^{-3}$ , intrathek. syntéza IgG, IgA ani IgM výpočtem neprokázána, IgG-OCB 2/2 typ 4
- Cytologický preparát: lymfo 12 %, mono 21 %, neutr. 64 %, eos. <1 %, atypické bb. 3% - vysoce atypické velké bb. susp. maligní, v některých stopy pigmentu. Dosti četné volné ery. Zá: záchyt atypických, susp. maligních buněk! Přev. granulocytární reakce nasvědčuje navíc zánětlivé komplikaci.

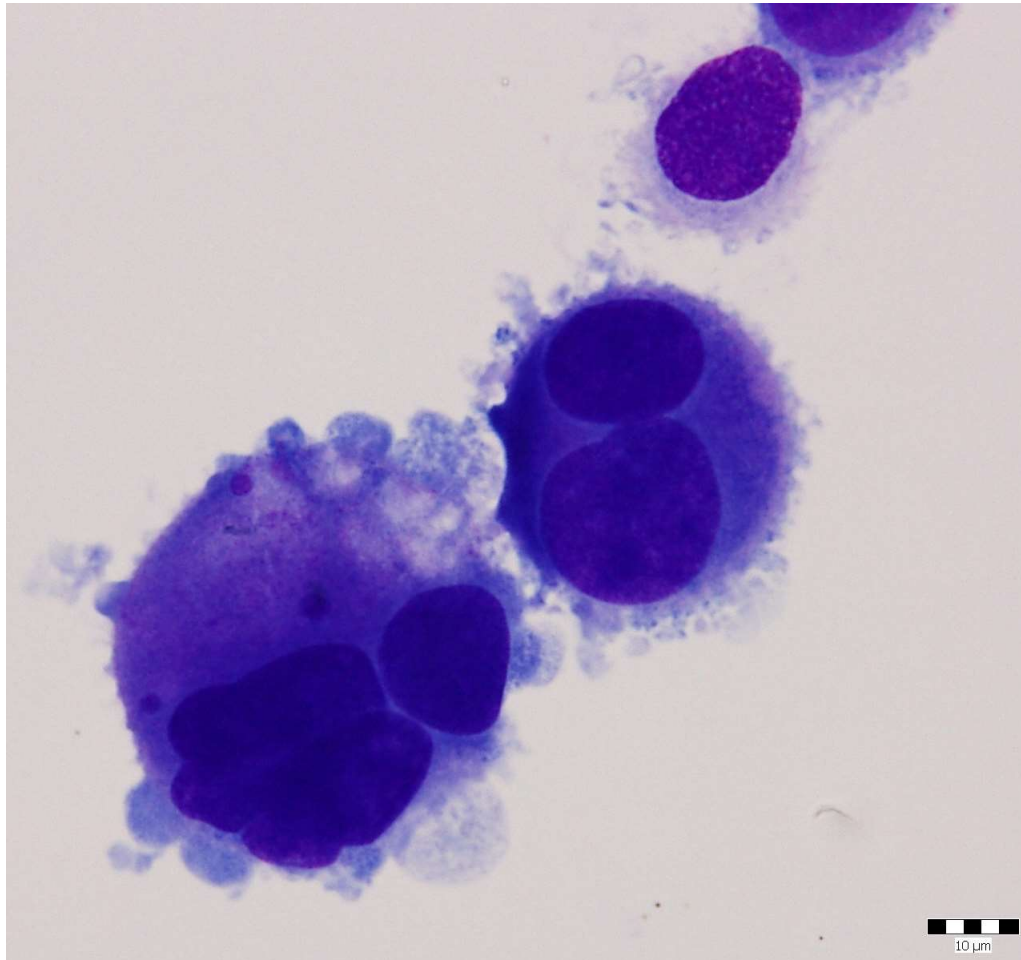
# Proč cytologický preparát u pozdě dodaných vzorků?



- Pacient hospitalizován na ARO
- Záchyt vysoce atypických, v.s. maligních buněk v preparátu hlášen telefonicky 2 dny po dodání vzorku; přesto kvitováno s povděkem – na tuto možnost nebylo v diferenciální diagnóze pomýšleno
- Konfirmováno druhým čtením na Ústavu patologie

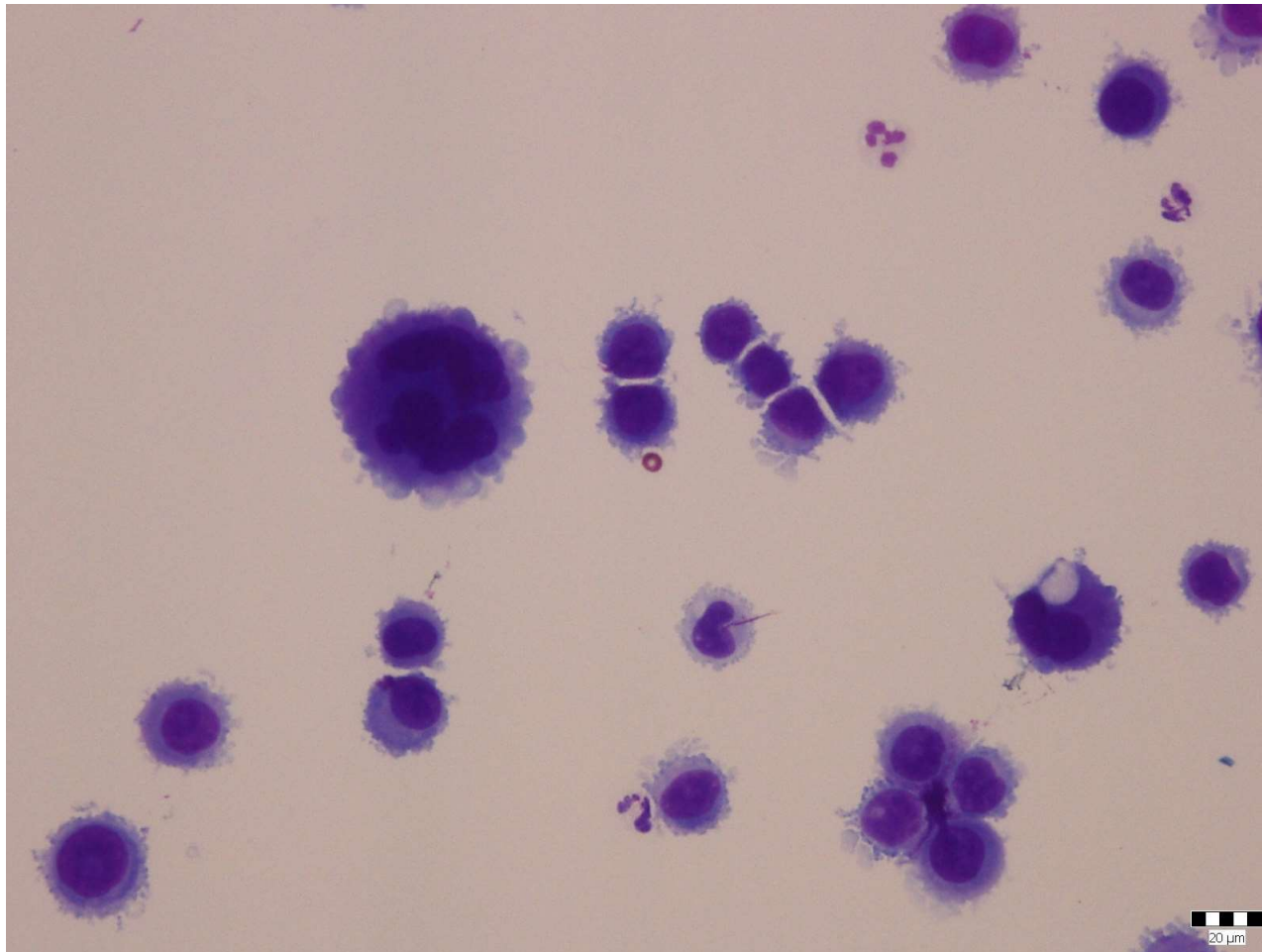
# Kazuistika:

## Meningeosis neoplastica (plus ???...)



- Ž 64 r., mozečková symptomatika od ledna 2013
- MR mozku (jen nativně) bez podstatné patologie
- **Likvor** čirý, xanthochromní; 21/3 elem., Pandy +++ , krev stopy
- cytologie: 80 % nádorových buněk, 2 % lymfo, 6 % mono, 12 % neutr.
- Celková bílkovina 4,244 g/l, glukosa 0,56 mmol/l, laktát 7,49 mmol/l
- Q-Alb  $59,8 \cdot 10^{-3}$
- Intrathekální syntéza Ig výpočtem: IgG IF 60 %, IgM a IgA IF negat.
- Free kappa – CSF 80,48 mg/l, sérum 14,50 mg/l
- Free lambda – CSF 32,23 mg/l, sérum 12,08 mg/l
- MRZ-reakce negativní

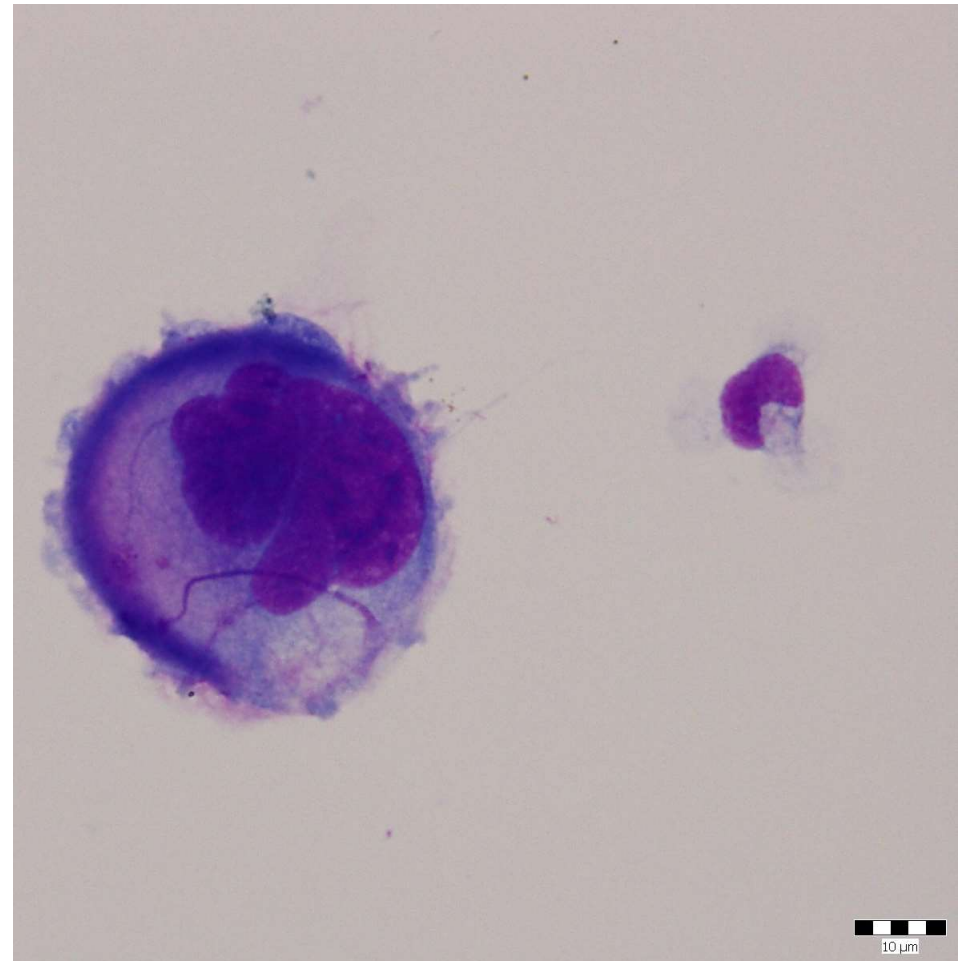
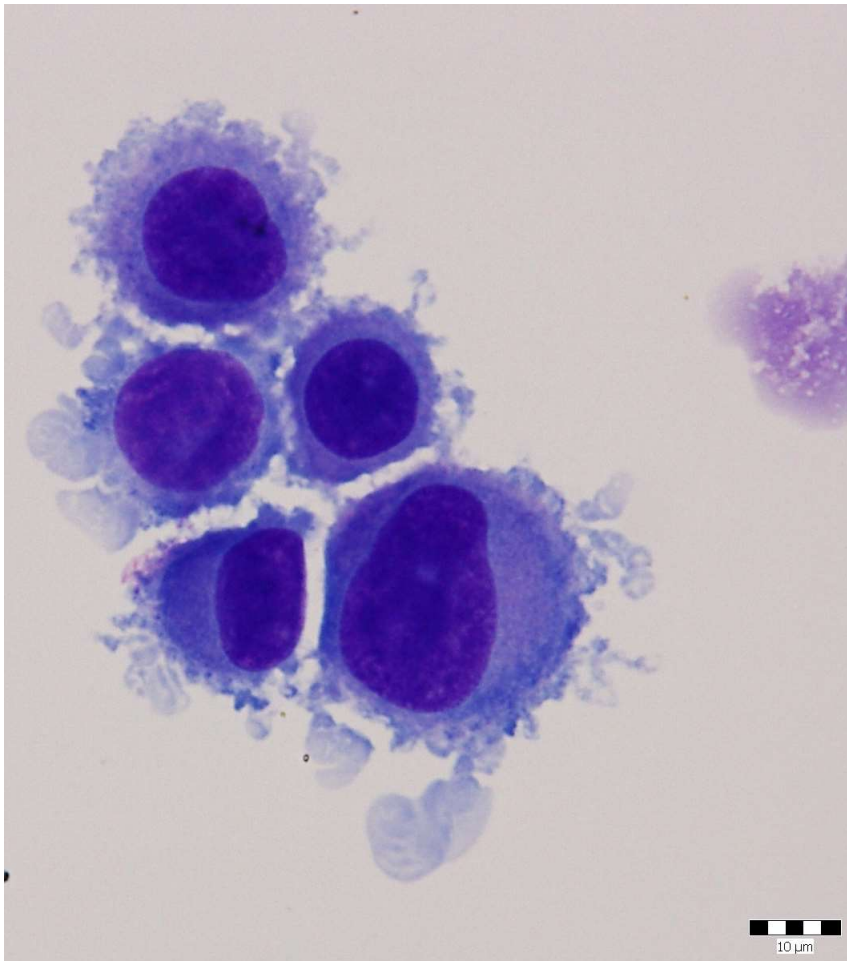
# **Maligní buňky v likvoru** *(přehledné zvětšení)*





# **Maligní buňky v likvoru**

*(pro srv.: buňka úplně vpravo je monocyt)*



# Překvapivě výrazná intrathekální syntéza IgG a fLC

## *o-IgG*

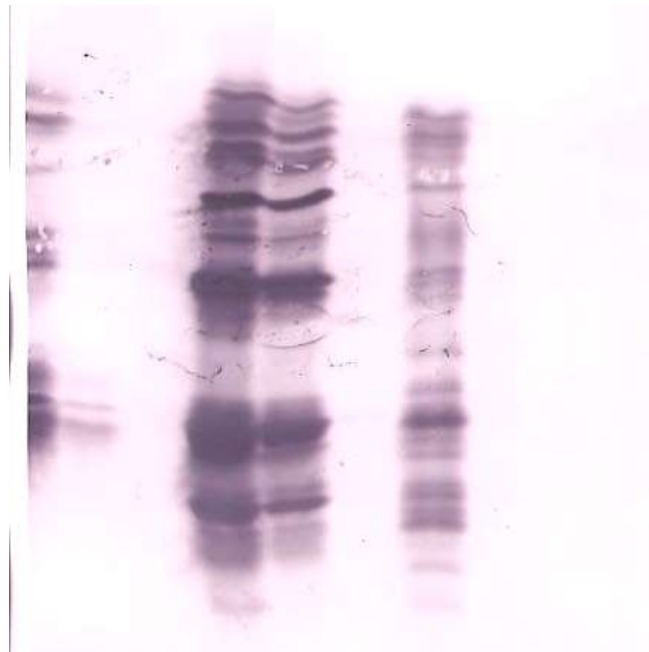
L S  
(ředěno na 20 mg/l)

5 5' 1



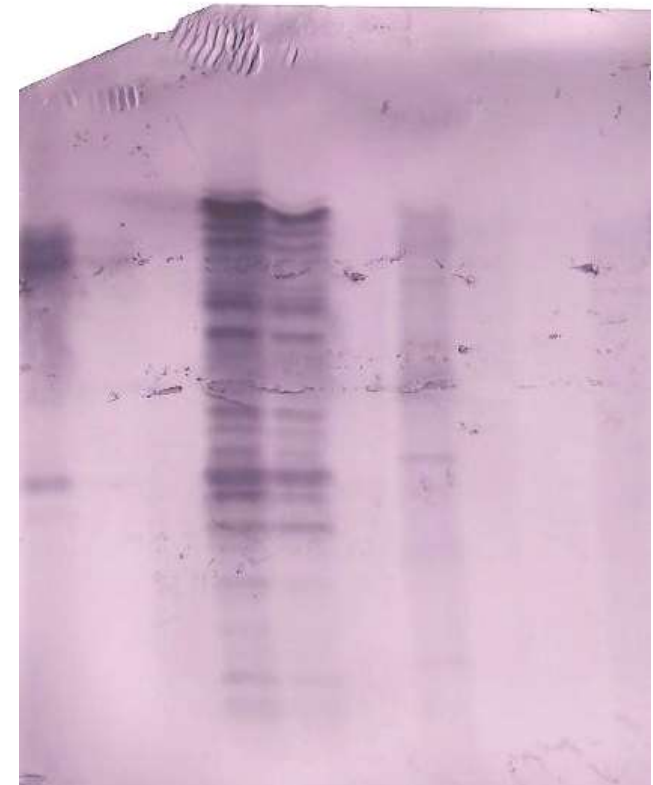
## *free kappa*

Std F L S L2 S2 L3 S3  
2 0,2 250mg/l 4× 100× 100× 100×



## *free lambda*

Std F L S L2 S2 L3 S3  
2 0,2 250mg/l 4× 100× 100× 100×

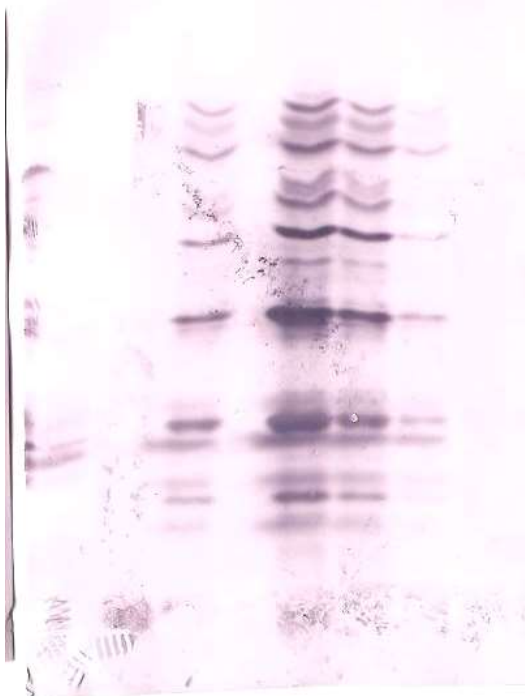


## Experimenty s různým ředěním vzorků likvoru a séra (viz likvor a sérum ve stejném ředění 1/20!)

Koncentrace standardu (std) a IVIG (Flebogamma-F-v mg/l) // ředění likvoru (L) a séra (S) (20 = 1/20 atd.)

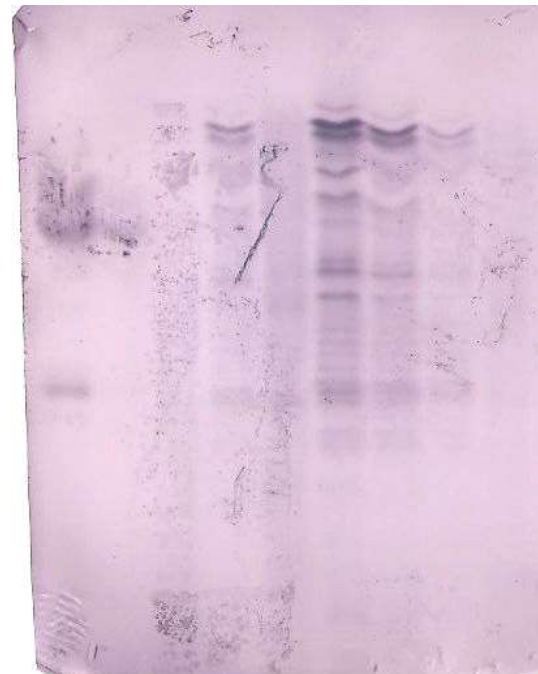
### *free kappa*

std	F	L	S	L	L	L	S
2	0,2	250//20	20	4	10	40	100



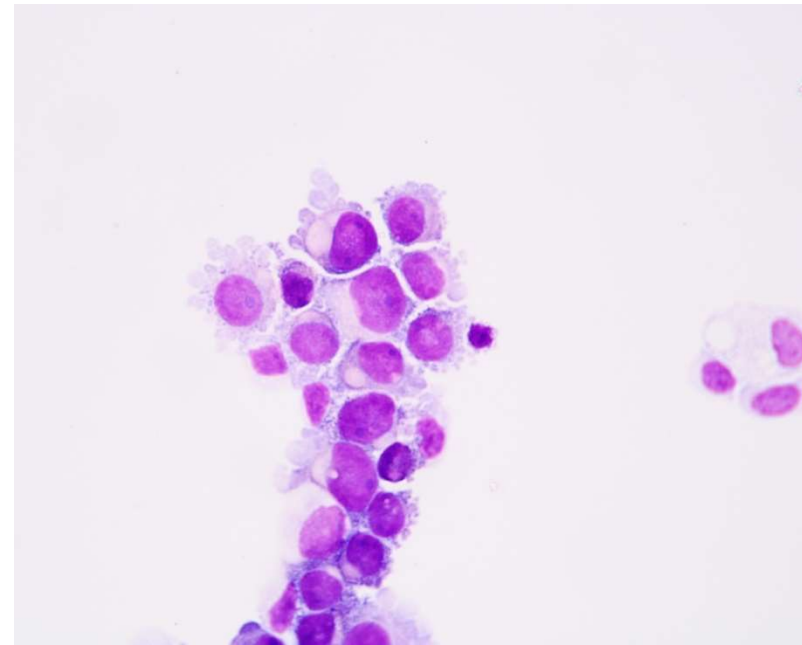
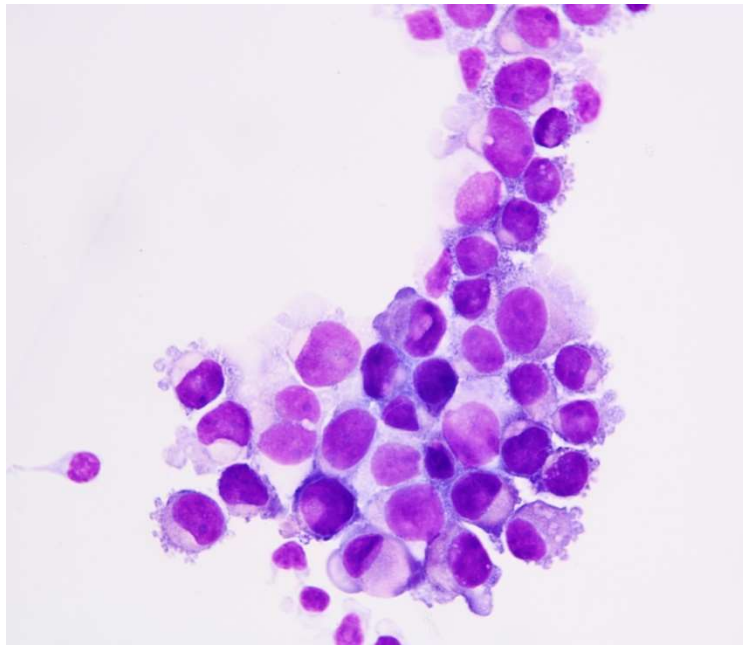
### *free lambda*

std	F	L	S	L	L	L	S
2	0,2	250//20	20	4	10	40	100



## **Kvíz: Popište buňky, které vidíte v preparátu**

Anamnéza a klinický obraz: Radikulitis nejasné etiologie, susp. neuroborrelióza – před měsícem  
erythema migrans, přeléčena doxycyklinem  
dif. dg. paraneoplastický projev, Ca mammae v anamnéze

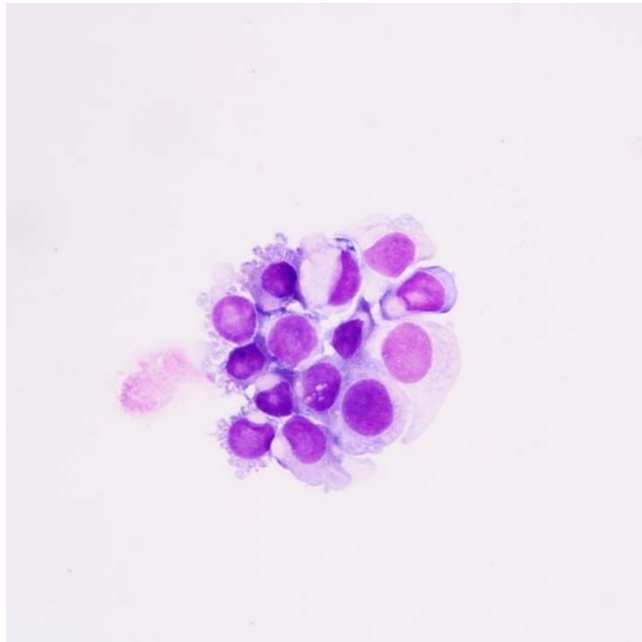


## Kvíz: Základní vyšetření likvoru



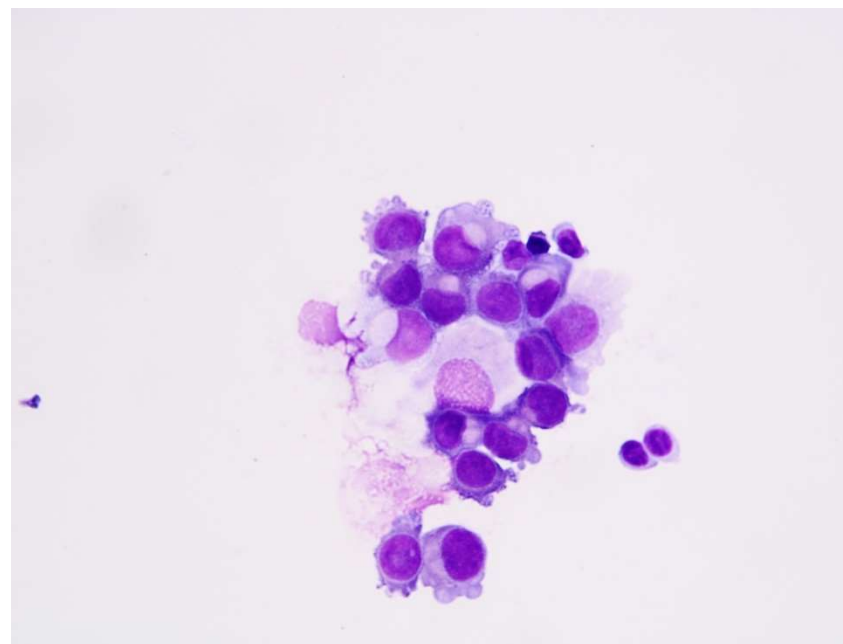
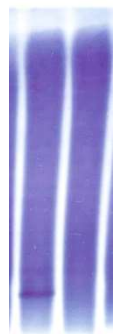
Parametr	Výsledek
Vzhled	čirý bezbarvý
Hemoglobin	negativní
Mononukleáry/ $\mu\text{L}$	42
Polymorfonukleáry/ $\mu\text{L}$	0
Počet erythrocytů/ $\mu\text{L}$	0,3
CB (g/L)	1,24
Glukosa (mmol/L)	3,5
Laktát (mmol/L)	2,3
KEB	26,2
KEB modif.	29,1

## Kvíz: Imunochemické vyšetření likvoru



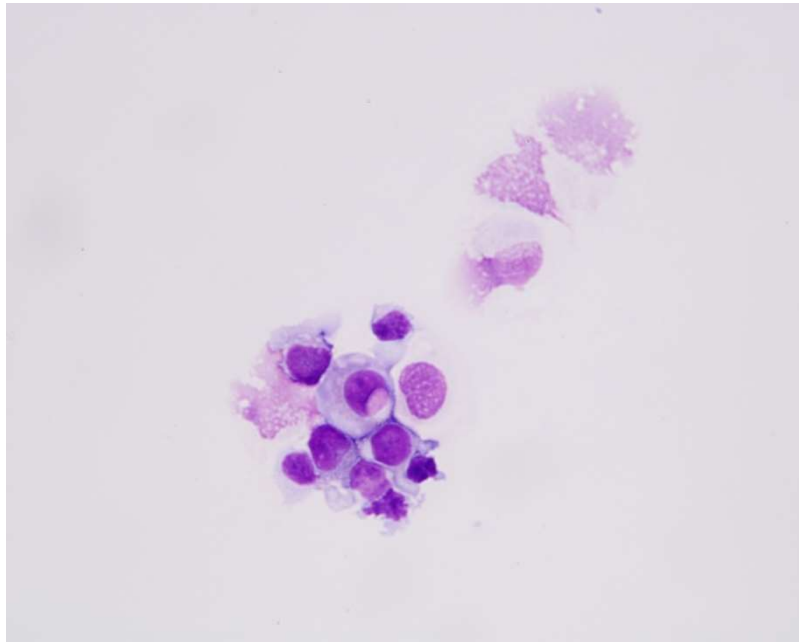
Parametr	Výsledek
Q Alb ( $\cdot 10^3$ )	21,0
Ith. IgG, IgA, IgM výpočet (Reiber)	negativní
IgG OCB (CSF/S)	4/2 typ 3
CSF free kappa (mg/L)	0,98
S free kappa (mg/L)	27,26
Free kappa index	1,7

**Kvíz: oligoklonální IgG** (vlevo likvor, vpravo sérum)



## Kvíz - Závěr: Kvalitativní cytologie

LLAP (Laboratoř likvorologie a analýzy proteinů OKB ÚLM FN Brno)



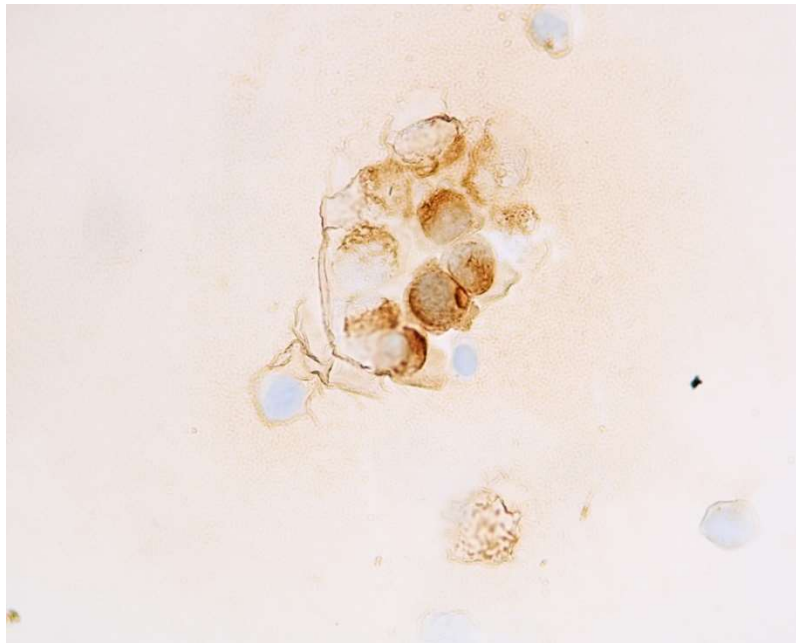
Parametr	Výsledek
Popis LLAP	lymfocyty 42% monocyty 13% nádorové buňky 45% - Nádorová infiltrace přítomna - Lymfocytární zánět - Vhodná kontrola
Popis LLAP – volný komentář	Velké bazofilní elementy jednotlivě i ve shlucích, vysoce suspektní z nádorového původu; doprovodná lymfocytární reakce



# Kvíz - závěr: 2. čtení na Ústavu patologie + imunocytochemie

*preparát zhotoven na Ústavu patologie FN Brno a LF MU*

*laskavostí MUDr. Kataríny Múčkové*



Parametr	Výsledek
Popis Ústav patologie – 2. čtení + imunocytochemie	Přítomny maligní buňky, pozitivní <b>cytokeratin</b>

## Cytomorfologická kritéria malignity

- Větší velikost buněk
- Vyšší jádroplazmový (nukleocytoplazmatický) poměr
- Bazofilie cytoplazmy
- Nepravidelný tvar cytoplazmy
- Nepravidelný tvar jádra
- Jadérka
- Mitotické figury
- ...

# Imunocytochemická likvorová diagnostika

- Nádorové buňky v likvoru + známý primární zdroj: většinou stačí základní barvení, popř. klasické cytochemické metody. ***Na průvodce k cytologickému vyšetření je nutné uvést pozitivní onkologickou anamnézu !***
  - Nádorové buňky v likvoru, neznámý primární zdroj: indikováno **imunocytochemické vyšetření** k rámcovému zjištění druhu nádoru:
    - CYTOKERATINY: karcinomy
    - GFAP: gliální nádory
    - CD45: hematologické malignity
    - HMB45, MELAN A, S100: melanom
- (podrobněji viz Dušková J, Sobek O. *Brain and Behavior* 2017;7:e00805)

V diagnostice hematologických malignit vycházejících z lymfocytární řady se uplatní **průkaz klonální populace lymfocytů** pomocí **průtokové cytometrie**, event. PCR (analýza CDR3 oblasti genů pro Ig v B lymfocytech). *Vyšetření je nutné domluvit předem a provést do 3 hodin po odběru likvoru !*

## Diferenciální diagnostika lymfocytárních pleocytóz

- Pravděpodobně nejobtížnější úkol likvorové cytologické diagnostiky – odlišení reaktivních lymfocytů a maligních lymfoidních buněk
- *Zkušenosti z praxe (neplatí absolutně):*
  - U zánětlivých lymfocytárních pleocytóz vždy převažují morfologicky „klidové“ lymfocyty a minoritně (byť absolutně hojně) jsou zastoupeny aktivované formy (velké lymfocyty světlé i bazofilní, lymfoplazmocytoidní buňky, ojediněle mohou být i atypické)
  - U lymfomatózních/leukemických infiltrací vykazuje určité atypie (různě výrazné) většina lymfocytů v preparátu a typické „klidové“ lymfocyty jsou ve výrazné menšině nebo chybí
  - Přítomnost typických plazmatických buněk výrazně favorizuje možnost zánětlivé etiologie (ale pozor – vzácné případy lymfomatózních infiltrací s výraznou doprovodnou zánětlivou reakcí)
  - Ojedinělé mírně atypické reaktivní lymfoidní buňky u jasně zánětlivého obrazu není třeba v závěru alibisticky zmiňovat; pokud cítí hodnotící jen malou nejistotu, může v závěru uvést „vhodná kontrola v případě trvajících dif. dg. nejasností a/nebo nepříznivého vývoje klinického obrazu“
- Metodou volby pro diagnostiku hematologických malignit je průtoková cytometrie
- Cytologické vyšetření by ani zde nemělo být opominuto

# Rozlišení maligních vs. zánětlivých (reaktivních) lymfocytů

Perske C et al. *Diagn Cytopathol* 2011; 39: 621-6

*tučně: rozlišovací kritéria doporučená autory pro praxi*

## Užitečné znaky (P<0,01)

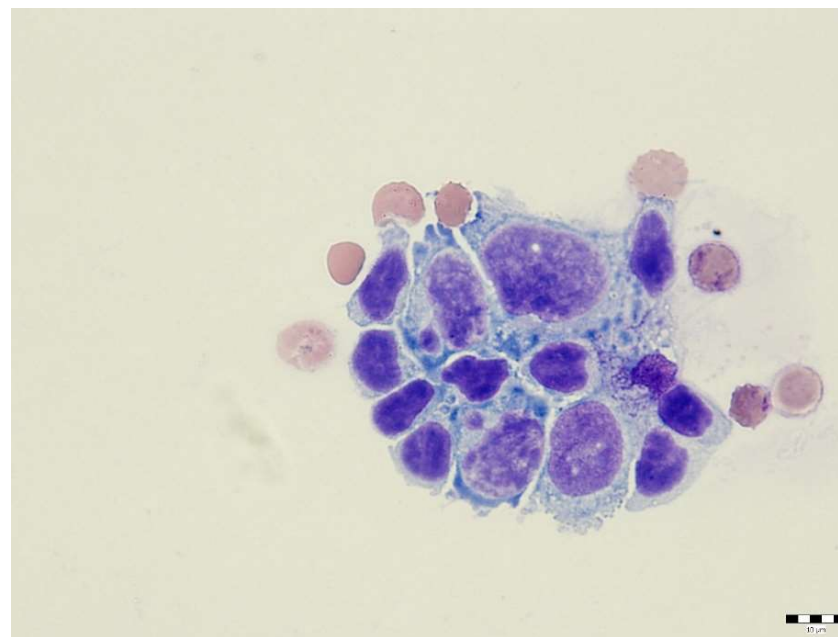
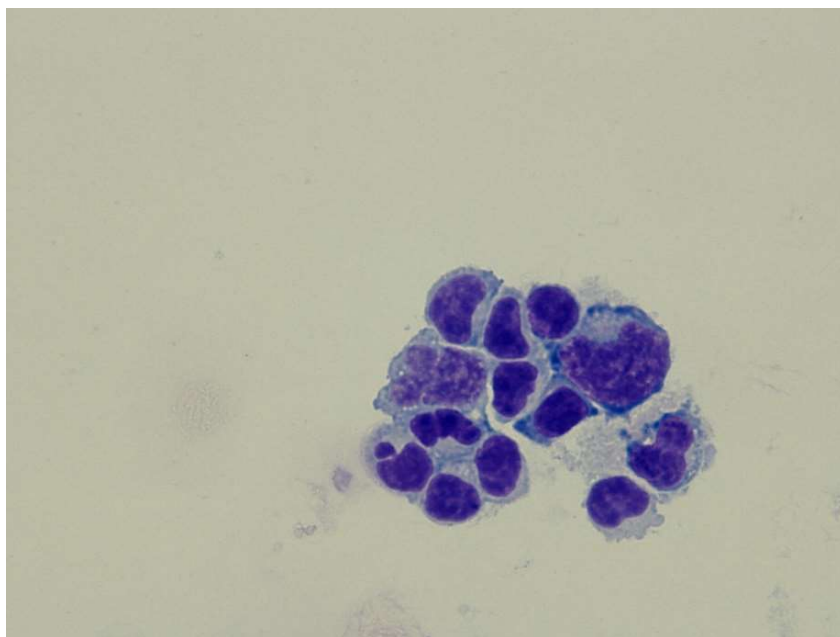
Znak	Malignity	Záněty
Oválný tvar buněk	46%	96%
<b>Nepravidelné okraje cytoplazmy</b>	82%	17%
<b>Velikost buněk v poměru k normálním lymfocytům (průměr)</b>	3,0 ± 0,13	1,8 ± 0,04
<b>Hluboké zářezy v jádře (≥ 1/3 poloměru jádra)</b>	41%	0%
Indentace v jádře	82%	48%
Jadérka	64%	36%

## Nepřínosné znaky (P>0,01)

znak	Malignity	Záněty
Vakuoly v cytoplazmě	64%	71%
Bazofilní cytoplazma	100%	100%
Mitózy	53%	32%
Jádroplazmový poměr	0,72	0,79
Jádro tvaru jetelového lístku	29%	32%

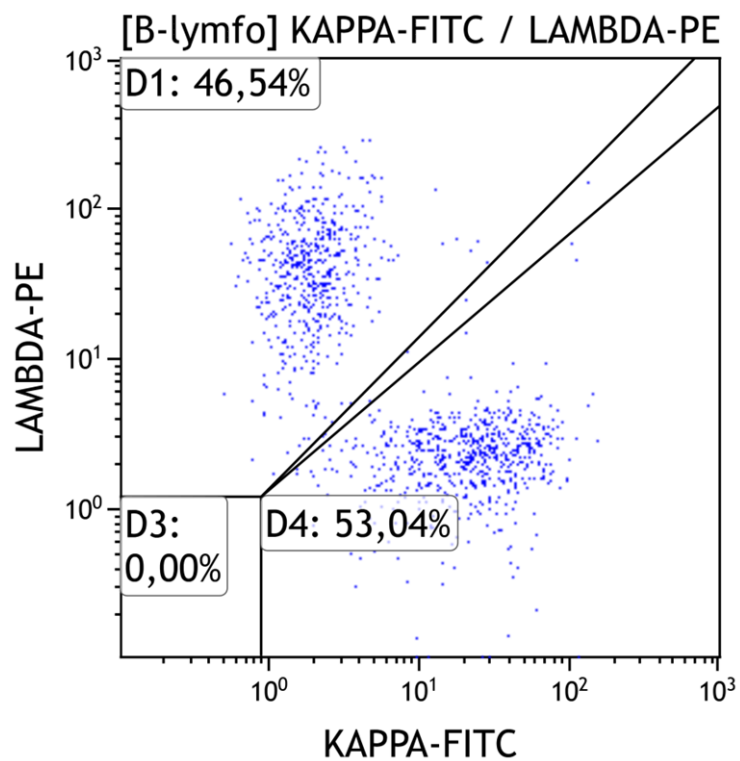
# Význam průtokové cytometrie v diferenciální diagnostice nejasných cytologických nálezů

recidivující hydrocefalus nejasné etiologie, 3 elementy/ $\mu\text{L}$   
preparát ze sedimentu po předcentrifugaci

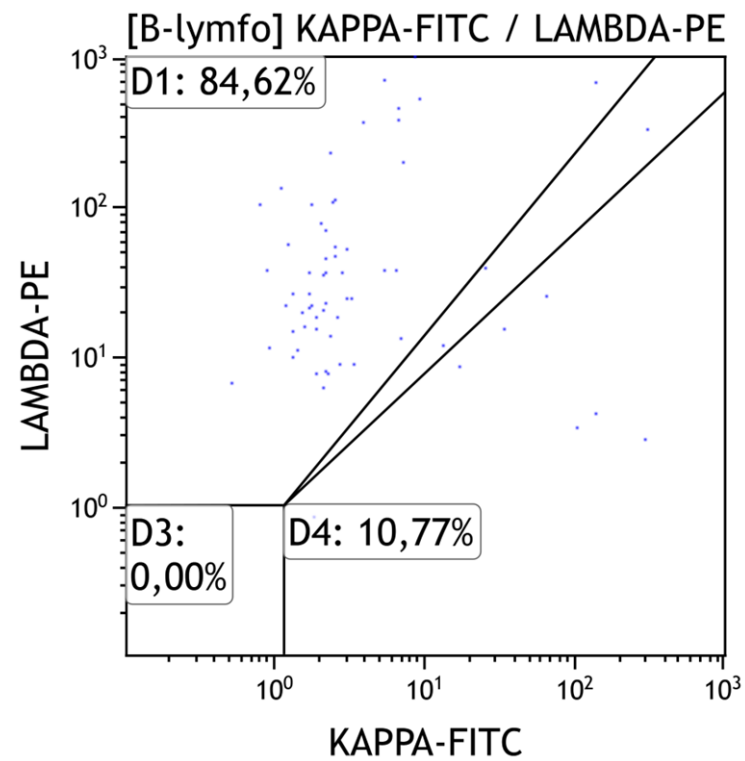


# Význam průtokové cytometrie v diferenciální diagnostice nejasných cytologických nálezů

## Neuroborrelióza (myelitis)



## Susp. primární lymfom CNS



# Imunologické charakteristiky lymfomových buněk

zčásti podle Tumani H, Petereit HF (Eds): Lumbalpunktion und Liquordiagnostik. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 2019. [www.dgn.org](http://www.dgn.org)

B-NHL	T-NHL (vzácný)
Převaha B lymfocytů ( <i>v normálních likvorech 0-3%; u RS &lt;10%; u neuroborreliózy &lt;25%</i> )	Výrazně abnormní poměr CD4/CD8 („IRI“) Vysoký podíl CD4+ CD8+ lymfocytů
Restrikce na jeden typ lehkého řetězce (monoklonalita), popř. chybění lehkých řetězců někdy intrathekální syntéza IgM	Ztráta normálně exprimovaných antigenů (např. CD7, CD5)
Koexprese nezralých nebo aberantních antigenů na/v B lymfocytech (např. CD34, CD10, CD30, TdT, CD5)	Koexprese nezralých nebo aberantních antigenů na/v T lymfocytech (např. CD34, CD10, CD30, CD1a)

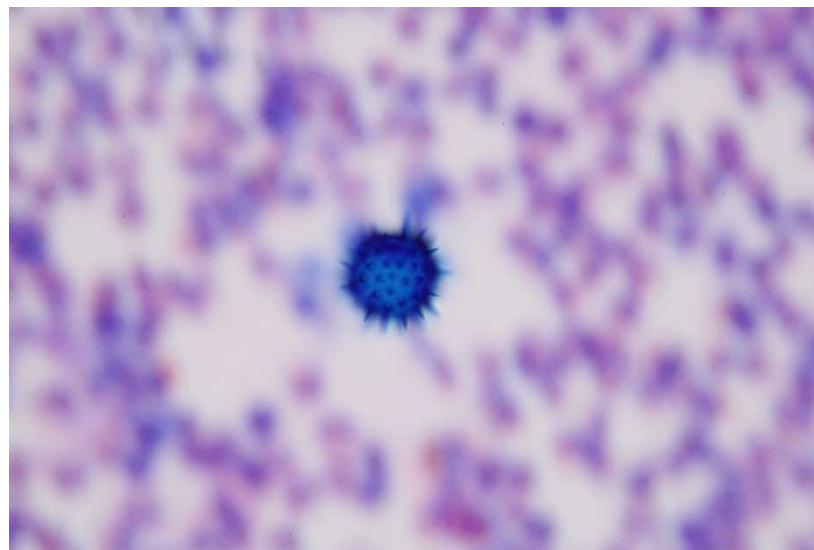
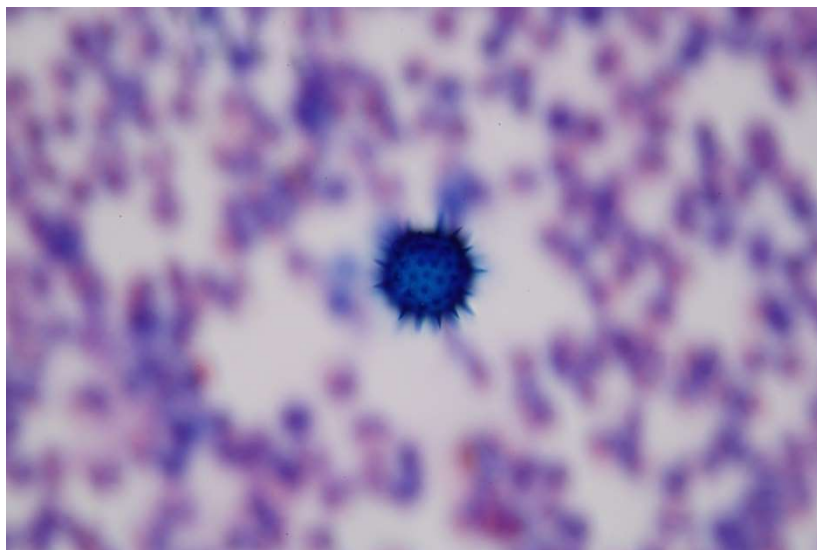


# Klasifikace cytologických nálezů vzhledem k diagnostice nádorové infiltrace CNS

(Ballester et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018; 77: 628-35)

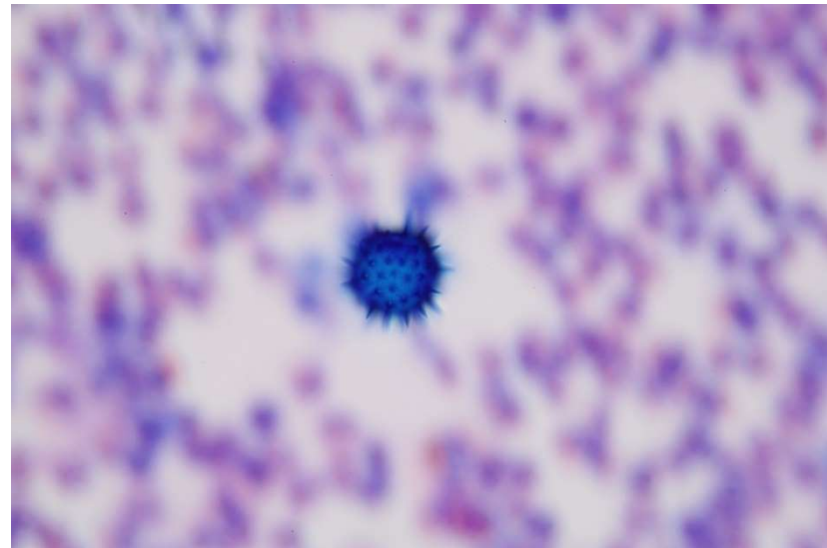
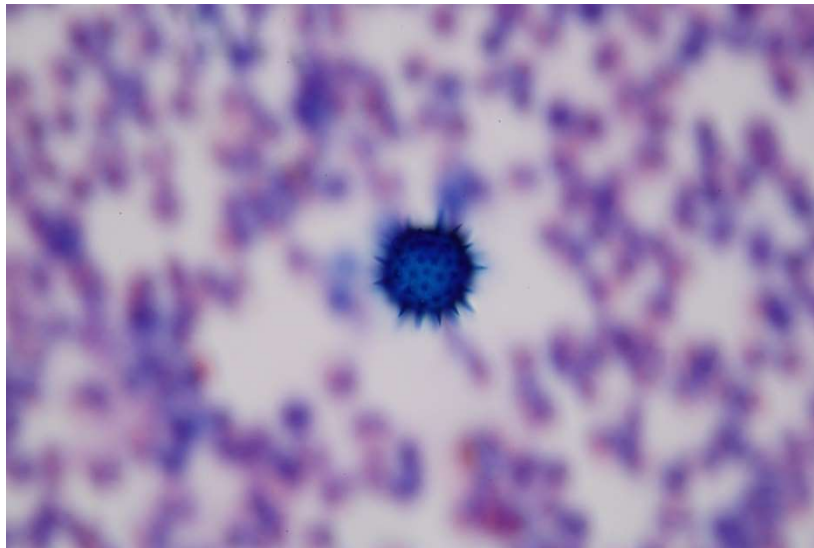
- **Negativní**
- **Atypické** buňky – abnormální morfologie, ale nevzbuzuje podezření na malignitu (*ve studii hodnoceno jako negativní*)
- **Suspektní** – buňky s atypickými cytomorfoloogicky suspektními z malignity, ale kvantitativně nebo kvalitativně nedostačujícími pro hodnocení jako pozitivní (*ve studii hodnoceno jako pozitivní*)
- **Pozitivní**
- **CAVE! Termíny „atypické“ a „suspektní“ používají různí cytologové (likvoru) v různém významu**
- **Některá klinická doporučení shrnují „atypické“ a „suspektní“ nálezy do kategorie „nejednoznačné“ či „nekonkluzivní“ („equivocal“) s konsekvencemi pro stupeň pravděpodobnosti diagnózy i hodnocení odpovědi na léčbu!** (Le Rhun et al. *Ann Oncol* 2017; 28, Suppl 4: iv84-99)
- **U atypických a suspektních nálezů je třeba usilovat o imunocytologické vyšetření (Dušková a Sobek, *Brain Behav* 2017; 7: e00805) k upřesnění klasifikace**

## Kvíz na závěr: Neznámý útvar v preparátu



**Pylové zrno v preparátu**  
**čeleď *Asteraceae* (sedmikrásky), rod *Bidens* (dvouzubec)**

určeno v Botanickém ústavu AV ČR v Průhonicích  
laskavostí doc. Dr. O. Rybníčka a dr. E. Krause



***Děkuji za pozornost.***

Preparát s pylovým zrnem – zaostřeno na buňky

