

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Cytologický a imunologický obraz virové infekce
v mozkomíšním moku.

Bakalářská práce

Eva Hnilová

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Odborný školitel: RNDr. Milada Špendlíková

Hradec Králové, 2008/2009.

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND MEDICAL
SCIENCE

Cytological and immunological picture of viral infection
in the CSF.

Bachelor thesis

Eva Hnilová

Supervisor: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Professional supervision: RNDr. Milada Špendlíková

Hradec Králové, 2008/2009.

Děkuji školiteli PharmDr. Petru Jílkovi CSc. a RNDr. Miladě Špendlíkové za obětavou pomoc a odborné zaštitění této práce.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Ve Zlíně

OBSAH:

1	SOUHRN	5
2	SUMMARY	6
3	ÚVOD	7
4	TEORETICKÁ ČÁST	8
	4.1 Virové onemocnění mozku - virové neuroinfekce	8
	4.1.1 Klíšťová meningoencefalitida	8
	4.1.2 Herpetická encefalitida	9
	4.1.3 Enterovirové meningitidy	10
	4.1.4 Vzteklna – rabies	10
	4.1.5 Encefalitis u AIDS	11
	4.1.6 Pomalé virové encefalitidy	11
	4.1.7 Encefalopatie nejasné etiologie	12
	4.2 Mozkomíšní mok	12
	4.2.1 Úloha mozkomíšního moku v CNS	12
	4.2.2 Vznik mozkomíšního moku	13
	4.2.3 Odběr mozkomíšního moku	13
	4.2.4 Barva a vzhled	13
	4.2.5 Chemické vyšetření mozkomíšního moku	13
	4.2.6 Buněčné spektrum v mozkomíšním moku	15
	4.3 Cytologický obraz virové infekce v mozkomíšním moku	17
	4.4 Imunologický obraz virové infekce v mozkomíšním moku	19
5	PRAKTICKÁ ČÁST	20
	5.1 Biochemické vyšetření	20
	5.1.1 Chemické vyšetření mozkomíšního moku	20
	5.1.2 Cytologické vyšetření mozkomíšního moku	21
	5.1.3 Speciální cytologické vyšetření	21
	5.2 Vyšetření průtokovou cytometrií	22
6	ZÁVĚR	25
7	LITERATURA	26

1 SOUHRN

I přes velký nástup zobrazovacích diagnostických metod je biochemická, cytologická a i imunologická analýza mozkomíšního moku při některých diferenciálně diagnostických úvahách nezastupitelná. K těmto situacím patří podezření na infekční onemocnění CNS. Vzhledem k tomu, že se většinou jedná o urgentní situace, je nezbytné, aby metody užívané v likvorologické diagnostice byly prováděny s dobrou kvalitou erudovanými pracovníky a část z nich byla časově neomezeně dostupná i na pracovištích nejen velkých nemocnic.

Likvorologickou diagnostiku provádí biochemické laboratoře, kde se připravuje a hodnotí i základní cytologický obraz a většinou bývají dostupné i elektroforetické techniky pro hodnocení bílkovinného spektra moku. Likvorologie je tak obor hraničící s cytologií a imunologií a dobrá spolupráce s těmito laboratořemi je vždy přínos. Tato spolupráce v našem případě umožnila i hodnocení buněk imunitního systému na cytometru BC EPICS XL.

V likvorologické diagnostice je velkým omezením dostupnost a množství zpracovávaného moku. Přes velký pokrok v odběrové technice je odběr mozkomíšního moku traumatizující záležitost, množství materiálu omezené a opakování odběru často nemožné. Při opakování je často obraz ovlivněn i předchozím odběrem. Jsem si vědoma, že tato omezení poznamenala i moji práci.

2 SUMMARY

Despite a vast increase of various imaging methods in medical diagnostics and research the biochemical, cytological and immunological analysis of cerebrospinal fluid is still essential; especially in diagnostic cases of potential central nervous system infections. Since described diagnostic cases are usually urgent and critical, it is necessary and important that the applied likvorology diagnostic methods would be run with high quality by qualified biomedical staff and would be present in hospitals on limitless basis.

Currently, the diagnostics is carried out by biochemical laboratories, where a general cytological image is prepared and evaluated. Furthermore, the protein spectrum of cerebrospinal fluid can be diagnosed by the electrophoresis techniques that are generally also available in standard biochemical laboratories. Although an enormous progress has been made in extraction techniques, the extraction and sampling of cerebrospinal fluid is traumatic experience for patients.

Unfortunately, repeat of extraction is not always possible and consequently the sample volume of cerebrospinal fluid is a significant limiting factor in likvorology diagnostics. Likvorology is a multidisciplinary field including both cytological and immunological methods, thus tight cooperation between cytological and immunological laboratories is beneficial and valuable. In my work, such cooperation allowed us to test cells of immune system using cytometer BC EPICS XL.

Moreover, the repetitive is often partially influenced by preceding extractions and this restraint affected also my presented work.

3 ÚVOD

Onemocnění centrální nervové soustavy a mozku jsou závažné, život ohrožující stavy. Nejčastějšími onemocněními centrální nervové soustavy, zvláště v letních měsících, jsou Lymeská borelióza a Klíšťová encefalitida.

V bakalářské práci jsme se zabývali sledováním biochemických, cytologických a imunologických nálezů u některých našich pacientů s podezřením na virové onemocnění centrální nervové soustavy. Při patologických stavech dochází k vystupňování proliferace a k aktivaci elementů imunitního systému, zajímal nás proto cytologický a imunologický obraz těchto onemocnění, i to, nakolik se cytologické nálezy s nálezy průtokové cytometrie shodují.

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Virové onemocnění mozku - virové neuroinfekce

Virové encefalitidy jsou závažná, zánětlivá onemocnění centrální a periferní nervové soustavy. Mezi jejich nejčastější původce patří například: virus klíšťové encefalitidy, enteroviry (echoviry, coxsackieviry), virus průšnic, virus herpes simplex, virus varicelly- zosteru, cytomegalovirus, vir vztekliny – Rhabdovirus.

Jako encefalitis označujeme zánět mozku nezávisle na příčině a morfologické formě. V klinické praxi, ale i v patomorfologii, je však termín encefalitis bez dalšího upřesnění spojován s nehnisavými záněty virového původu.

Klasifikace encefalitid:

- A) primární:** jsou způsobené neurotropními viry. Postihují charakteristicky nervový systém, jsou přenášeny na člověka ze zvířat, morfologicky jsou charakterizované poškozením neuronů, perivaskulární infiltrací lymfocyt, plazmatickými buňkami a reaktivními změnami glie.
- B) sekundární:** mají mozek postižen nekonstantně jako komplikaci celkového základního onemocnění. V etiologii se uplatňují např. enteroviry, herpesviry, virus parotitidy a jiné (Feit, J., 2009, web atlases.muni)

4.1.1 Klíšťová meningoencefalitida

Původcem onemocnění je virus klíšťové encefalitidy z rodu flavivirus. Rezervoárem nákazy jsou drobní savci, vektory klíšťata různého druhu. Inkubační doba onemocnění je 7- 14 dní.

Onemocnění často probíhá ve dvou fázích. V první fázi se projevuje podobně jako chřipkové onemocnění, teplotou, bolestí hlavy a kloubů. Toto období trvá zhruba týden a nemusí být odhaleno. Následuje rozvoj druhé vlny onemocnění, které se projevuje jako meningitida, meningoencefalitida nebo encefalomyelitida.

- A) Meningická forma:** je provázána teplotou, bolestí hlavy, světloplachostí, závratěmi, zvracením a meningeálním drážděním. Po několika dnech dochází k ústupu teplot a postupnému ústupu i dalších potíží.
- B) Encefalitická forma:** závažnější postižení funkcí mozku, poruchy spánku, paměti, třes, poruchy vědomí, zpomalením psychomotorického tempa, spavost až bezvědomí, delirentní stavy, zmatenost. Poruchy hybnosti (obrný) hlavových nervů, n.VII.
- C) Encefalomyelitická forma:** je charakterizována rozvojem chabých obrn, často jde o postižení horních končetin. (Bednář a spol., 1996)

Klíšťové encefalitidy a encefalitidy přenášené členovci se vyskytují po celém světě (e. venezuelská, e. St. Louis, e. kalifornská, e. japonská a další). Virus středoevropské klíšťové encefalitidy je blízký viru skotské ovčí encefalitidy a viru ruské jarně-letní klíšťové encefalitidy.

4.1.2 Herpetická encefalitida

Vyvolavatelem onemocnění jsou viry z čeledi herpesviridae: herpes simplex typ I. a II. (HSV-1, HSV- 2)

- A) Typ I.** vyvolává běžnou kožní afekci na rtech (herpes labialis) a stomatitidy, hlavně u dospělých jedinců.
- B) Typ II.** vyvolává analogické kožní afekce v okolí genitálu (herpes genitalis), vyskytuje se u novorozenců. (Feit, J., 2009, web atlases.muni)

Herpetická encefalitida patří k nejzávažnějším projevům infekce HSV, vede k nekróze nervových buněk v temporální oblasti mozkové kůry. Průkaz původce je často obtížný, cytologický obraz je různý podle stadia, které bylo zachyceno. (Chmelík, V., 2008, web eamos.pf.jcu)

U neléčených případů je mortalita 80%, u léčených 30%. Po vyléčení pacientů zůstává velmi často trvalá změna intelektu i motoriky. (Feit, J., 2009, web atlases.muni)

Také další viry z čeledi herpesviridae bývají původci encefalitid. Virus varicella-zoster, který vyvolává plané neštovice a pásový opar bývá původcem meningoencefalitid, u nemocných se syndromem získané imunitní nedostatečnosti se jako komplikace onemocnění vyskytují encefalitidy způsobené cytomegalovirem. (Bednář a spol., 1996)

4.1.3 Enterovirové meningitidy

Původcem jsou viry z rodu enterovirus: polioviry, echoviry, coxsackie viry.

A) Polioviry: vyvolávají onemocnění dětské obrny-**polyomyelitis anterior acuta**. Epidemické onemocnění s postižením šedé hmoty předních rohů míšních, vede k destrukci motorických neuronů a následným trvalým paralýzám. Proti tomuto onemocnění se od 50. let evropská populace očkuje. V našich podmínkách se v současné době díky očkování již nevyskytuje.

Dnes viry z rodu enterovirus vyvolávají především onemocnění lehčího meningického průběhu– aseptickou meningitis, která u většiny postižených končí uzdravením. Vážnější formy se vyskytují zřídka, ale jsou možné. Onemocnění provází zvýšená teplota, většinou výrazná bolest hlavy, angína, závratě, bolest břicha a nevolnosti. (Bednář a spol., 1996)

4.1.4 Vzteklna – rabies

Původcem onemocnění je virus vztekliny, patřící do rodu lyssavirus. Do organismu se virus dostává po poranění, kousnutí nebo škrábnutí vzteklého zvířete. Vzteklna je rozšířena po celém světě. V našich zeměpisných podmínkách je nejčastějším zdrojem nákazy liška, psovitě šelmy, větší savci, netopýr. Virus se po kousnutí replikuje v příčně žíhaném svalu, vniká do periferního nervu a postupuje do míchy a do spinálních ganglií. Po inkubaci 3-8 týdnů se rozvíjí klinické příznaky. Onemocnění začíná únavou, anorexií, bolestmi hlavy a horečkou. Typické jsou také deprese, podráždění, nespavost. Tyto symptomy jsou později vystřídány vážnými symptomy postižení CNS. Jsou to meningeální příznaky, záchvaty hyperaktivity, poruchy vegetativních funkcí, zvýšená tenze svalů a hyperestezie. Rozvíjí se obrny. (Bednář a spol., 1996)

4.1.5 Encefalitis u AIDS

Se vyskytuje u poloviny nemocných AIDS s klinickými znaky postižení CNS. Je způsobena virem HIV a má několik forem:

- A) Aseptická meningitida:** s klinickými znaky virové meningitidy se vyskytuje u 10% pacientů s HIV infekcí.
- B) Subakutní encefalitis:** postihuje 30% pacientů, kteří zemřeli na AIDS. V postižených oblastech mozku lze prokázat virus. U pacientů s AIDS jsou časté encefalitidy typu oportunní infekce: encefalitida cytomegalická, herpetická, toxoplazmová a jiné. (Feit, J., 2009, web atlases.muni)

4.1.6 Pomalé virové encefalitidy

Způsobené pomalými viry jsou infekce s velmi dlouhým obdobím latence a s klinickým nálezem, který neodpovídá charakteristickému průběhu encefalitidy. Do skupiny lze zařadit: subakutní sklerotizující panencefalitidu, progresivní zarděnkovou panencefalitidu, subakutní spongiformní encefalopatii (morbus Jakob-Creutzfeldt) a progresivní multifokální encefalopatii.

- A) Subakutní sklerotizující panencefalitida** se vyskytuje u dětí a u mladých osob mezi 4.- 20. rokem. Průběh je progresivní, vede ke smrti během několika měsíců až dvou let. Choroba začíná poruchou psychiky, pokračuje přes ztrátu volných pohybů k demenci a decerebrační rigiditě s celkovou kachexií. Onemocnění vzniká, až za několik roků po běžných spalničkách. Jde o reaktivaci viru, který perzistoval v mozku v latentní formě. Patogeneze není zcela jasná. Některé nálezy dokládají, že původcem je defektní spalničkový virus, jiná teorie zdůrazňuje pacientovu abnormální imunologickou odpověď.
- B) Progresivní zarděnková panencefalitis** je vzácná. Vyskytuje se jako pozdní následek vrozené nebo i v pozdějším období života získané zarděnkové infekce.
- C) Subakutní spongiformní encefalopatie Jacob-Creutzfeldt** je vzácné onemocnění vyskytující se u dospělých na celém světě (1–2 případy na milion obyvatel, u 1/5 případů je výskyt familiární). Klinicky dominuje or-

ganický psychosyndrom s progredující demencí a parézami. Pacienti umírají většinou do 1 roku. Onemocnění je přenosné intracerebrální inokulací infikované mozkové tkáně na opice a jiná laboratorní zvířata. Původcem je dosud nepřesně identifikovaný, velmi rezistentní virus.

4.1.7 Encefalopatie nejasné etiologie

A) Reyeův syndrom: je akutní encefalopatie sdružená s tukovou dystrofií orgánů, především těžkou steatózou jater. Postihuje děti od 6 týdnů do 16 let. Úmrtnost se pohybuje kolem 20%. U většiny pacientů předchází klinické projevy postižení mozku virový infekcí. V popředí stojí klinické znaky mozkového edému, delirium, stupor i koma. U vyléčených mohou přetrvávat trvalé znaky poškození mozku. Etiologie je nejasná, jde pravděpodobně o interakci infekce nebo toxinů s vrozenou metabolickou poruchou. Z infekcí bylo u Reyeova syndromu prokázáno kolem 20 různých virů, nejčastěji virus chřipky (A i B) a virus planých neštovic. Z toxických vlivů jsou uváděny salicyláty, aflatoxin, insekticida. Na mozku je značný edém bez zánětlivých změn. (Feit, J., 2009, web atlases.muni)

4.2 Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok je pro svůj těsný vztah k centrálnímu nervovému systému (CNS) významný pro diagnostiku některých neurologických onemocnění, protože patologické změny v mozku a míše se velmi často odrážejí ve změněném složení této tekutiny.

4.2.1 Úloha mozkomíšního moku v CNS

Mozkomíšní mok má v centrálním nervovém systému regulační a mechanickou funkci. Vytváří vhodné mezibuněčné prostředí, podílí se na regulaci složení extracelulární tekutiny, ve které se nacházejí nervové a gliové buňky. Zajišťuje mozkovým buňkám přísun živin, deoxynukleosidů, vitamínů, např. kyseliny askorbovou a listovou, odstraňuje produkty katabolismu, jako jsou laktát a CO₂, podílí se na imunologických procesech. Plní také úlohu mechanickou, nadnáší mozkovou tkáň a chrání ji proti nárazům, změnám teplot a tlaku. (Houbová, 2006)

4.2.2 Vznik mozkomíšního moku

Tvorba mozkomíšního moku probíhá intraventrikulárně a subarachnoidálně. Asi polovina vzniká ultrafiltrací plazmy a je tedy dialyzátem krve, druhá polovina vzniká aktivní sekrecí choroidální i extrachoroideální. Likvor vyplňuje intracerebrální-intraventrikulární prostor (20%) a prostor extracerebrální-subarachnoideální (80%). U dospělého jedince činí objem likvoru 150-180 ml, denní produkce dosahuje 500-600 ml. Mozkomíšní mok je resorbován z 80% do žilního systému a z 20% do systému lymfatického. Mezi tvorbou a resorpcí je rovnováha. (Racek, 1999)

4.2.3 Odběr mozkomíšního moku

Likvor získáváme nejčastěji lumbální funkcí, méně často punkcí subokcipitální nebo ventrikulární. (Racek, 1999)

Indikace k odběru mozkomíšního moku (CSF) je v neurologii poměrně častá, ať už k diagnostickým či terapeutickým účelům. Mok se odebírá při ložiskových i difúzních procesech míchy a mozku, zejména při podezření na neuroinfekce, subarachnoideální krvácení, demyelinizací onemocnění a polyradikulo neuritidy. Vedle diagnostických punkcí se provádí i tzv. odlehčující punkce např. u hnisavých meningitid, hemocefalů. (Urbánek, 2002)

4.2.4 Barva a vzhled

Za normálních okolností je mozkomíšní mok čirá a bezbarvá tekutina. Ke změně barvy dochází u hnisavého zánětu, při obstrukci a při krvácení. (Racek, 1999)

4.2.5 Chemické vyšetření mozkomíšního moku

4.2.5.1 Kvantitativní chemické vyšetření

- **Celková bílkovina:** za fyziologického stavu je koncentrace celkové bílkoviny (CB) v mozkomíšním moku-proteinorachie asi 200x nižší než koncentrace sérová. Klinický význam má zvýšení hladiny CB způsobené poruchou hematoencefalické bariéry, intratekální syntézou při aktivaci imunitního systému či zvýšením strukturních proteinů při poškození buněk CNS. Na zvýšení hodnoty CB se může podílet i nádorová bílkovina

nebo artificiální krvácení, výrazně zvýšené hodnoty nacházíme při obstrukci v cirkulaci CSF likvorovými cestami–např. obstrukci nádorové.

- **Glukóza:** je základním energetickým zdrojem nervové tkáně. Hladina glukózy v mozkomíšním moku–glykorachie závisí na glykemii, za normálních okolností tvoří asi 60% sérové hodnoty. Klinický význam má snížená hladina glukózy, u bakteriální meningitidy mohou být hodnoty glykorachie až nulové, glukózu zde konzumují bakterie a leukocyty.
- **Laktát:** malé množství laktátu je za fyziologických okolností produkováno CNS při anaerobní glykolýze. Klinický význam má vyšší hladina laktátu k rozlišení bakteriální a virové meningitidy. Vyšší hladinu laktátu nacházíme i při poruše zásobení mozku kyslíkem, zvýšení intenzity metabolismu oxidativním vzplanutí neutrofilů, které je na začátku všech patologických procesů– bakteriálního i virového zánětu a je taky první reakcí na subarachnoideálním krvácení.
- **Chloridy:** význam má především nález snížené koncentrace chloridů, který ukazuje na velikost poruchy hematoencefalické bariéry např. u tuberkulózní meningitidy, těžší hnisavé meningitidy, mykotické meningitidy, maligní meningeální infiltrace.(Racek, 1999)

Tabulka I. : Referenční rozmezí CSF (Racek, 1999)

Analyt	Referenční rozmezí
Glukóza	2,5-3,9mmol/l (60% S-Glu po 4hod)
Laktát	1,2-2,1mmol/l
Celková bílkovina	0,15-0,40g/l (stoupá s věkem)
Chloridy	120-132mmol/l

4.2.5.2 Kvalitativní chemické vyšetření

- **Pandyho zkouška:** orientační zkouška na zvýšení gamaglobulinů, při níž dochází k vysrážení globulinů roztokem fenolu ve vodě. Hodnotí se intenzita vzniklého zákalu.(Racek, 1999)

4.2.6 Buněčné spektrum v mozkomíšním moku

Rozmanitost buněčných typů, které se mohou vyskytnout v mozkomíšním moku, není velká. Jedná se o lymfocyty, monocyty, neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty a nádorové buňky.

V mozkomíšním moku se za normálních podmínek vyskytují:

- malé lymfocyty
- monocyty
- ojediněle buňky choroidálního plexu, ependymální buňky, buňky arachnoidey a piální buňky.

Za patologických okolností v mozkomíšním moku nacházíme:

- granulocyty neutrofilní
- granulocyty eozinofilní
- granulocyty bazofilní
- aktivované lymfocyty
- plazmocyty
- aktivované monocyty
- makrofágy
- nádorové buňky

Malý lymfocyt: (klidový lymfocyt) je buňka o velikosti 8-10 μ m, jeho velikost je srovnatelná s erytrocytem, má úzký plazmatický lem a kompaktní jádro, které vyplňuje téměř celou buňku. Tyto buňky najdeme v normálním mozkomíšním moku, ale abnormální záchyt malých lymfocytů v kvalitativním cytologickém obrazu při současně normálním počtu elementů v mm^3 bývá často u pacientů s chronickými záněty nervového systému a u demyelinizací. Po setkání s antigenem se lymfoidní buňky transformují a jejich vzhled se značně mění. Většina T-lymfocytů vykazuje fenotyp paměťových buněk CD^{4+} i CD^{8+} subpopulací.

Aktivovaný lymfocyt: (reaktivní, imunocyt, imunoblast, lymfoplazmocyt) - je lymfoidní buňka 11-18 μ m velká, s výraznou bazofilní plazmou a s velkým jádrem. Vyskytuje se především v moku pacientů s akutním neurologickým onemocněním.

Plazmocyty: jsou největší lymfoidní buňky o velikosti až 21 μ m s bazofilní plazmou. Kulaté nebo oválné jádro někdy i s patrnými jadérky bývá uloženo excentricky. Typické je perinukleární projasnění plazmy. Plazmocyty jsou konečným stádiem B-lymfocytů po imunologické stimulaci a produkují imunoglobuliny. Vyskytují se jen v patologickém mozkomíšním moku a jsou popisovány u pacientů se záněty nejčastěji virového původu, ale také u syfilitidy, tuberkulózy, sarkoidózy, roztroušené sklerózy.

Monocyty: jsou buňky velké 15-30 μ m. Jádro mívá nepravidelný tvar, nejčastěji podkovy nebo fazole. Plazma se barví světleji než u lymfocytů. Jsou to buňky morfoloogicky velmi proměnlivé

Aktivované monocyty: se odlišují od monocytů především větší velikostí, vakuolizovanou plazmou a tendencí ke shlukování buněk. Kromě antigenního podnětu může aktivaci monocytů stimulovat např. kontuze mozku, operační zásah do nervové soustavy, krvácení do mozku, opakované odběry mozkomíšního moku, léková terapie, krvácení do mozku, porodní trauma u novorozenců atd. Jsou schopny fagocytózy jiných buněk nebo nebuněčných partikulí. Aktivované monocyty s fagocytovaným materiálem se nazývají makrofágy. Podle fagocytovaného materiálu lze rozlišit různé typy, např. erytrofágy při krvácivých

stavech, lipofágy, které vznikají fagocytosou lipoidních substancí pocházejících z odumřelých buněk CNS apod. Monocyty jsou součástí normálního buněčného obrazu, aktivované monocyty nebo makrofágy svědčí o aktivaci nervového systému v oblasti likvorových cest.

Neutrofilní granulocyty: jsou buňky o průměrné velikosti 35 μ m. Za normálních okolností se vyskytují v mozkomíšním moku velmi sporadicky a pouze ve zralé, segmentované podobě. V mozkomíšním moku jsou z granulocytární řady nejčastější a provázejí akutní záněty nervového systému, zejména záněty bakteriální a objevují se jako první obranné buňky v počátečním stadiu serózního zánětu i jako reakce na krvácení. Granulocyty mají schopnost fagocytovat bakterie, nejsou ale schopny fagocytovat jiné leukocyty nebo erythrocyty.

Eozinofilní granulocyty: jsou o něco větší než neutrofilny. Jádro bývá nejčastěji rozděleno na dvě části a v plazmě je po barvení množství načervenalých granulí. V mozkomíšním moku jsou dosti vzácným nálezem. Nejčastěji se uvádějí u parazitárních onemocnění nervového systému, neurosarkoidózy a jako následek alergické reakce na cizí těleso v nervovém systému.

Bazofilní granulocyty: s tmavými granuly v plazmě o velikosti 10 μ m se také někdy uvádějí v mozkomíšním moku. Jejich výskyt je velmi vzácný a význam pro diagnostiku neurologických onemocnění není znám. (Glosová, 1998)

4.3 Cytologický obraz virové infekce v mozkomíšním moku

V akutním stádiu zánětu centrální nervové soustavy jsou nejčastějším nálezem v mozkomíšním moku neutrofilní granulocyty. Granulocytární fáze bývá velmi krátká, odběr mozkomíšního moku se často provádí až v době, kdy se granulocyty nezachytí vůbec nebo jen v malém procentu. Bývá provázena lehkým zvýšením laktátu, které je reakcí na jejich vysokou metabolickou aktivaci. (Glosová, 1998)

Granulocytární obraz rychle přechází v lymfocytární pleiocytózu. Aktivované lymfocytární elementy se stávají početně převažující buněčnou populací, při déle trvajícím onemocnění se dále objevují lymfoplazmocyty a plazmocyty. Nález plazmatických buněk je u chronických virových infekcí obvyklým jevem.

Neutrofilní granulocyty v počátečních stádiích hojně až převažující, postupně ubývají, běžně však dosahují až jedné třetiny všech elementů i u plně rozvinutého onemocnění, v malém počtu až zcela ojediněle mohou být přítomny i v průběhu chronickém. Při přechodu do chronicity lze také ojediněle pozorovat granulocyty eozinofilní. Znamky aktivace monocytární řady lze pozorovat již u iniciálních stádií virových neuroinfekcí. Po proběhlé aktivaci pak lze pozorovat i známky fagocytární aktivity, jedná se o úklidovou reakci monocyto-makrofágového systému. Objevují se lymfocyty, makrofágy fagocytující elementy lymfocytární řady, často v různém stupni aktivace. Jejich nález je ve vysokém počtu příznivým jevem, svědčí o tendenci ke snížení počtu přítomných elementů úklidovou fází., a tak i k ústupu zánětlivého obrazu v likvoru. Dalšími makrofágyckými elementy mohou být lipofágy. Jejich nález svědčí pro přítomnost destrukce nervové tkáně, bývá obvykle v souladu s nálezem klinickým. U nekrotických encefalitid může být počáteční zastoupení lipofágů velmi vysoké, což odpovídá i rozsahu poškození mozkové tkáně.

U virových zánětů lze také pozorovat přítomnost hemoragické komponenty zánětu, ta se projeví jak přítomností volných erytrocytů, tak i jejich fagocytózou aktivovanými monocytárními elementy, objevují se erytrofágy, v pozdějším průběhu i siderofágy. V terminálních stádiích bývá přítomna monocytární pleiocytóza nebo monocytární oligocytóza s přítomností aktivovaných elementů lymfocytární řady. (Adam, 1995)

Tabulka II. : Cytologická stádia u virové neuroinfekce (Adam, 1995)

1.	Smíšená pleiocytóza s převahou segmentů	Obraz časného stádia onemocnění. Nepříliš často zachycený.
2.	Lymfocytární pleiocytóza	Různého stupně, počet buněk kolísá od několika desítek až do tisíců na mikrolitr.
3.	Monocytární pleiocytóza	Přítomnost fagocytujících elementů. Vždy lymfocyty, při destrukci nervové tkáně lipofágy, při přítomnosti hemoragické složky zánětu i erytrofágy.
4.	Reziduální monocytová fáze	Již bez fagocytární aktivity.
5.	Normalizace cytologického nálezu	

4.4 Imunologický obraz virové infekce v mozkomíšním moku

U zdravého člověka není centrální nervový systém dostupný pro antigeny ani buňky imunitního systému.

Z tohoto důvodu je CNS považován za imunologicky privilegované místo. Dnes ale není pochyb o tom, že imunokompetentní buňky mohou za určitých okolností vstoupit do CNS a zahájit imunitní reakci.

Většina monocytů a T lymfocytů, které lze v mozku identifikovat za normálních okolností a které reprezentují normální obrát hematogenních buněk v kompartmentu CNS, se nalézají v prostorech pojivové tkáně měkkých mozkových plen a choroidálního plexu a v perivaskulárních prostorech. Uvnitř CNS je normálně minimum lymfocytů. Podle studií jsou schopné překonat intaktní hematoencefalickou bariéru pouze aktivované T lymfocyty a to nezávisle na své antigenní specifitě, fenotypu a MHC kompatibilitě. Nedojde-li během jednoho až dvou dnů k rozpoznání specifického antigenu, dochází k eliminaci T buněk. (Houbová, 2006)

5 PRAKTICKÁ ČÁST

5.1 Biochemické vyšetření

Protože je mozkomíšní mok tekutina dostupná obtížně a navíc obvykle jen ve velmi malém množství, jeho odběr je pro pacienta zátěží a není možné jej libovolně opakovat, použila jsem ke své práci mozkomíšní moky zasílané k vyšetření do naší laboratoře, u nichž bylo nejprve potřeba provést vyšetření požadovaná lékařem.

Z tohoto důvodu se spousta z dodaných vzorků k mé práci nehodila, málokdy bylo mozkomíšního moku dostatečné množství ještě i na, pro mou práci potřebné, vyšetření na průtokovém cytometru, nebo výsledný cytologický nález z barveného preparátu neodpovídal virové infekci.

Z výše uvedených skutečností jsem tedy postupovala klasickým způsobem, jako při vyšetření běžných odběrů.

5.1.1 Chemické vyšetření mozkomíšního moku

Zahrnuje posouzení barvy a zákalu, Pandyho zkoušku, stanovení koncentrace celkové bílkoviny, glukózy, laktátu a chloridů. Kvantitativní stanovení provádíme na analyzátoru ACHITEKT c8000.

- **Pandyho zkouška:** v čiré skleněné zkumavce hodnotíme zákal vzniklý přidáním kapky asi 50 μ l moku do 1ml Pandyho činidla (nasycený roztok fenolu ve vodě). Tato zkouška je pouze orientační, slouží ke kvalitativnímu průkazu globulinů.
- **Celková bílkovina:** principem je turbidimetrická metoda využívající denaturaci proteinů benzethoniumchloridem. Proteiny přítomné v moči nebo v mozkomíšním moku jsou denaturovány benzethoniumchloridem za vzniku jemné suspenze, která je kvantifikována turbidimetricky při vlnové délce 404nm. Analyzátor: ACHITEKT c8000.
- **Glukóza:** je založena na reakci fosforylována hexokinázou za přítomnosti adenosin trifosfátu a iontů hořčíku za vzniku Glukóza-6-fosfátu a adenosin difosfátu. Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza specificky oxiduje G-6-P na glukonát-6-fosfát za souběžné redukce NAD na NADH. Na každý mikromol spotřebované glukózy je produkován jeden mikromol NADH.

Vzniklý NADH absorbuje světlo při vlnové délce 340nm a je detekován spektrofotomericky jako nárůst absorbance. Analyzátor: ACHITEKT c8000

- **Laktát:** reaguje s kyselinou mléčnou a působením laktát oxidázy přemění na pyruvát a peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku za přítomnosti peroxidázy oxiduje prekurzor chromogenu za vzniku barevné látky. Nárůst absorbance při vlnové délce 548nm je přímo úměrný koncentraci kyseliny mléčné ve vzorku. Analyzátor: ACHITEKT c8000
- **Chloridové anionty:** jsou založeny na principu iontově selektivních elektrod. Analyzátor: ACHITEKT c8000

5.1.2 Cytologické vyšetření mozkomíšního moku

- **Základní cytologické vyšetření:** mozkomíšní mok je tekutina s nízkým obsahem bílkoviny, není buňkám vlastní a buňky v něm urychleně stárnou. Proto je cytologické vyšetření nutné provést nejpozději do 1 hodiny po odběru, v opačném případě dochází k rozpadu buněčných elementů. Při základním cytologickém vyšetření hodnotíme počet buněčných elementů ve Fuchs-Rosenthalově komůrce. Stanovení počtu erytrocytů provádíme v nebarveném, nativním preparátu. Počet leukocytů hodnotíme v preparátu barveném kyselým fuchsinem. Barvíme v poměru 10 μ l barvicího roztoku: 100 μ l mozkomíšního moku. Barvicí roztok způsobí lýzu membrán erytrocytů a zvýrazní jaderné struktury leukocytů. Leukocyty rozlišujeme na mononukleáry (lymfocyty, monocyty) a polynukleáry (segmenty). Získaná hodnota představuje počet buněk na 3 μ l likvoru. Proto jsou výsledné hodnoty jednotlivých elementů udávány ve zlomku / μ l.

5.1.3 Speciální cytologické vyšetření.

K přesnějšímu hodnocení buněčných forem a jejich aktivity slouží trvalý preparát. K přípravě cytologických preparátů používáme v naší laboratoři cytosedimentační metodu, při níž se mozkomíšní mok ve speciální komůrce zahuští. Preparát určený k barvení Giemsou fixujeme roztokem metanolu, preparát určený k barvení na průkaz tuků roztokem formaldehydu.

K barvení trvalých preparátů mozkomíšního moku používáme barvení podle Pappenheima, které doplňujeme barvením sudanovou černí určeným k průkazu lipidů.

Tento preparát je určen pro kvalitativní hodnocení, které provádí jen lékař-biochemik se zkouškou z cytologie mozkomíšního moku.

Z vybraných vzorků, které splňovaly kriteria nálezu při virové infekci - počet buněk byl dostatečně vysoký a byl dostatek moku, jsme provedly stanovení na průtokovém cytometru.

5.2 Vyšetření průtokovou cytometrií

Je technika založená na měření jednotlivých částic nebo buněk procházejících snímacím místem, které zaznamenává odraz laserového paprsku v podélném a kolmém směru a taky záblesky emitovaného světla značených protilátek navázaných na buněčném povrchu. Důležitou vlastností cytometrické analýzy je skutečnost, že je prováděno měření každé částice nebo buňky. Nejde tedy jen o průměrné hodnoty měřené suspenze, ale je možné identifikovat i velmi malou populaci buněk v materiálu. Průtokový cytometr je běžně vybaven argonovým laserem, který umožňuje analýzu mnoha buněčných parametrů na základě odklonu laserového paprsku. Úroveň tohoto odklonu odpovídá velikosti a granularitě procházejících částic nebo buněk (např. lymfocyty jsou malé buňky s nízkou granularitou, naopak granulocyty jsou buňky větší s vyšší granularitou).

Metodika průtokové cytometrie umožňuje určit přítomnost charakteristických bílkovinných epitopů, které buňku řadí do jednotlivých vývojových linií a stádií zralosti. Na buňku navážeme protilátku s navázaným fluorescenčním barvivem, které emituje charakteristické světlo po excitaci budícím laserem. Emitované světlo je snímáno detekčním zařízením. Podle složitosti přístroje může obsahovat několik (v našem případě 4) detekčních zařízení a tak lze analyzovat několik protilátek navázaných na buňce, a přesně ji tak zařadit do klasifikačního systému.

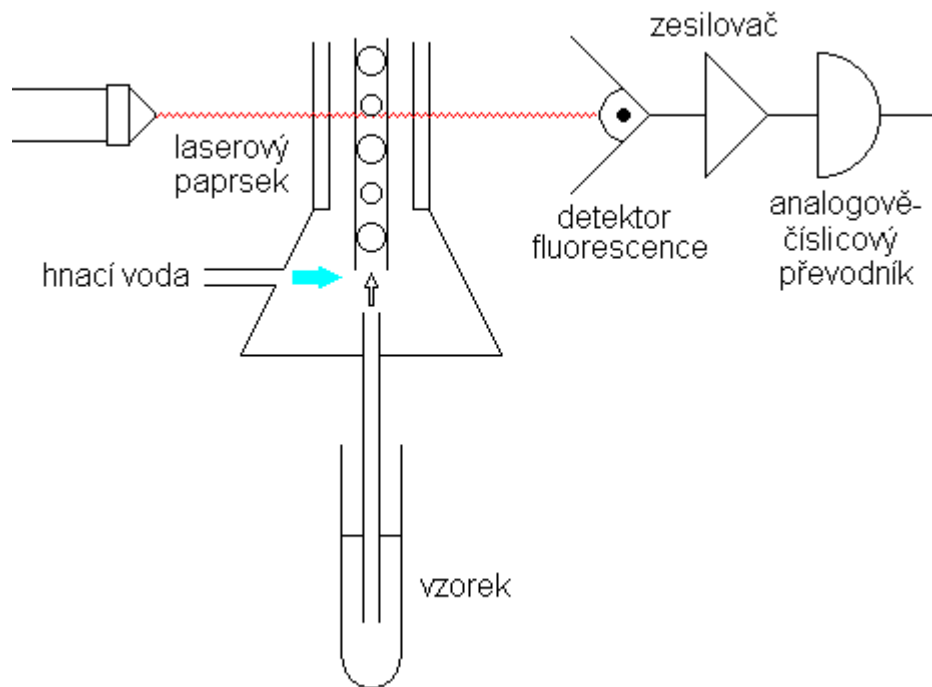
Tyto charakteristické bílkovinné znaky tzv. diferenciační znaky (Clusters of Differentiation-CD) umožňují určovat specifické buněčné subpopulace. (například CD³⁺ je znakem T-lymfocytů)

Měření jsme prováděly na průtokovém cytometru BECKMAN COULTER, EPICS XL. MCL

Tabulka III. : Clusters of Differentiation (CD)

Celkové T lymfocyty	CD ³⁺
Pomocné / induktorové T lymfocyty	CD ³⁺ /CD ⁴⁺
Tlumivé / cytotoxické T lymfocyty	CD ³⁺ /CD ⁸⁺
Aktivované T lymfocyty	CD ³⁺ /HLA-DR ⁺
Aktivované lymfocyty	HLA-DR ⁺
B lymfocyty	CD ¹⁹⁺
Aktivované B lymfocyty	CD ¹⁹⁺ /CD ²³⁺
Monocyty / makrofágy	CD ¹⁴⁺
Neutrofilní granulocyty	CD ¹⁶⁺

Obrázek I. : Průtokový cytometr (web lf1.cuni)



6 ZÁVĚR

Vyšetření mozkomíšního moku je velmi komplexní záležitost, která je často prováděna v časové tísní pro život ohrožující stav pacienta.

Navíc je často k dispozici velmi omezené množství materiálu, což je velkou nevýhodou zvláště u průtokové cytometrie, kdy je nutné izolovat dostatečné množství buněk pro analýzu.

To se přitom ukázalo v našich třech případech jako velmi užitečné. Nevýhodou průtokové cytometrie je ale i malá dostupnost metody mimo pracovní dobu a nutná vysoká erudice pracovníka.

7 LITERATURA

Literární zdroje

1. ADAM P., Cytologie likvoru, Stapro, 1995, str. 22
2. GLOSOVÁ L., Cytologický atlas mozkomíšního moku, Galén, 1998, první vydání, str. 17-20
3. RACEK J. et al., Klinická biochemie, Galén, 1999, první vydání, str. 253-256
4. URBÁNEK K. a kol., Vyšetřovací metody v neurologii, Univerzita Palackého v Olomouci Lékařská fakulta, 2002, druhé vydání, str. 93
5. HOLOUBKOVÁ A., Výběr atestačních prací z alergologie a klinické imunologie, 2006, ročník X, č. 1,
6. BEDNÁŘ M., FRAŇKOVÁ V., SCHINDLER J., SOUČEK A., VÁVRA J., Lékařská Mikrobiologie, Marvil, 1996, první vydání, str. 403, 404, 410

Internetové zdroje

1. CHMELÍK V.: Odkaz jako publikace, 16.9.2008
eamos.pf.jcu.cz/amos/kpk/externi/kpk_0813/06neuroinfekce.ppt
2. FEIT J.: Odkaz jako publikace, 2009
http://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+cnspatol+inf CNS.html#encephalitis
3. web lf1.cuni, <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/flowcyt1.htm> , 2009

8 ZKRATKY

CB-CELKOVÁ BÍLKOVINA

CD- CLUSTERS OF DIFFERENTIATION

CNS-CENTRÁLNÍ NERVOVÁ SOUSTAVA

CSF-MOZKOMÍŠNÍ MOK

CMV-CYTOMEGALOVIRUS

HSV-VIRUS HERPES SIMPLEX

RS-ROZTROUŠENÁ SKLERÓZA

VZV-VIRUS VARICELLA-ZOSTER

9 PŘÍLOHA

1) Pacient 1992

22. 8. 2007

Tabulka IV. : Biochemické vyšetření mozkomíšního moku

Popis mozkomíšního moku	čirý		
Csf-Pandy	1-2	arbj.	
Csf-Glukóza	2,6	mmol/l	2,7- 4,4
Csf-Laktát	3,01	mmol/l	1,20- 2,10
Csf-Chloridy	124	mmol/l	120- 130
Csf-Celková bílkovina	1,03	g/l	0,20- 0,45
Erythrocyty	805	elem/ul	
Lymfocyty	685	elem/ul	
Velké mononukl. buňky	34	elem/ul	
Segmenty	31	elem/ul	

Hodnocení cytologického preparátu:

Záplava aktivovaných lymfocytů, ojediněle plazmocyty. Méně četné monocyty, spíše klidové. Velmi ojediněle lymfoblasty. Ojedinělé neutrofile. Ojedinělé eozinofily. Ojediněle volné erythrocyty.

Mohutný serózní zánět v chronickém stádiu.

Tabulka V. : Vyšetření mozkomíšního moku průtokovou cytometrií

Zastoupení leukocytů CD ⁴⁵⁺ (čistota)	98,8%
Lymfocyty	85,5%
CD ¹⁴⁺ monocyty	2,5%
Granulocyty	12,0%

CD ³⁺ T-lymfo	85,0%
<u>Z CD³⁺T-lymfocytů</u>	
CD ⁴⁺ helper. T-ly	59,5%
CD ⁸⁺ supr. /cyt.T-ly	23,4%
Poměr CD ⁴⁺ /CD ⁸⁺	2,5

Hodnocení průtokové cytometrie: Mok z 22.8., analyzovaný 23.8. Částečně jsou buňky cytolyzované. V leukocytární populaci je výrazná převaha lymfocytů (85,5%), méně četné jsou granulocyty, ojedinělé monocyty/makrofágy. V lymfocytární populaci převládají CD³⁺T-lymfo se spíše normálním poměrem CD⁴⁺/CD⁸⁺.

Závěr hodnocení vyšetření průtokovým cytometrem:

Buněčný i fenotypový nálezn v moku nejvíce odpovídá lokální imunitní odpovědi na záněť nejspíše neviróvé etiologie (intracelulární mikroorg.?).

Virologický nálezn: Virus klíšťové encefalidity-negativní

Anti Borrelie IgG-positivní

Anti Borrelie IgM-negativní

Konfirmace Western blot IgG-positivní

Western blot IgM-negativní

Závěr: Pro stanovení diagnózy byl cytologický preparát pomocí. Jeho interpretace–mohutný serózní záněť orientovala k virové infekci, ale stejný obraz je i u neuroboreliózy, která byla potvrzena konfirmačními testy. Průtoková cytometrie správně na virovou infekci neukazovala.

2) Pacientka 1984

14. 2. 2006

Tabulka VI. : Biochemické vyšetření mozkomíšního moku

Popis mozkomíšního moku	čirý		
Csf-Pandy	0-1	arbj.	
Csf-Glukóza	2,6	mmol/l	2,7- 4,4
Csf-Laktát	20,40	mmol/l	1,20- 2,10
Csf-Chloridy	130	mmol/l	120- 130
Csf-Celková bílkovina	0,67	g/l	0,20- 0,45
Erytrocyty	530	elem/ul	
Lymfocyty	350	elem/ul	
Velké mononukl. buňky	50	elem/ul	
Segmenty	0	elem/ul	

Hodnocení cytologického preparátu:

Záplava lymfoidních buněk, většinou vysoce aktivovaných až k plazmocytům. Méně četné lymfocyty klidové i aktivované, buněčné fágy a lipofágy nenalezeny. Ojedinele neutrofilů, velmi ojedinele eozinofilů.
Mohutný serózní zánět.

Tabulka VII. : Vyšetření mozkomíšního moku průtokovou cytometrií

Zastoupení leukocytů CD ⁴⁵⁺ (čistota)	99,5%
Zastoupení lymfocytů	90,2%
CD ¹⁴⁺ monocyty	1,5%

<u>Z lymfocytů:</u>	
CD1 ⁹⁺ B-lymfo	1,0%
CD ³⁺ T-lymfo	86,9%
<u>Z CD3+ T lymfocytů:</u>	
CD ⁴⁺ helper. T-ly	50,4%
CD ⁸⁺ supr. /cyt. T-ly	43,0%
Poměr CD ⁴⁺ /CD ⁸⁺	1,2
<u>Aktivace T lymfocytů:</u>	
CD ³⁺ HLA-DR akt. T-ly	41,7%
CD ⁸⁺ CD ³⁸⁺ akt. T-ly	93,6%
CD ³⁴⁺ (blasty)	nenalezeny

Hodnocení průtokové cytometrie:

Mok s vysokým počtem buněk, v populaci leukocytů téměř zcela převládají lymfocyty. Jedná se o CD³⁺ T-lymfocyty s výraznou expresí aktivačních markerů HLA-DR a CD³⁸⁺ na povrchu CD⁸⁺ cytotox. T-lymfo. Blasty CD³⁴⁺ nenalezeny.

Závěr hodnocení vyšetření průtokovým cytometrem:

Nález odpovídá lokální imunitní odpovědi na akutní infekci virovým agens.

Virologický nález: Anti Borrelie IgG-negativní

Anti Borrelie IgM-negativní

Virolog. Kultivace-negativní

Kultivace opakovaně-negativní

Závěr: V biochemickém vyšetření svědčí vysoká hodnota laktátu pro vysoký metabolický obrat buněk, hodnota glukosy je v normě, nález nnesvědčí pro bakteriální infekci, spíše pro virovou infekci. Cytologický preparát ukazuje na serózní zánět s velkou aktivací buněk, stejně jako průtoková cytometrie, kde

vysoká exprese HLA-DR a CD³⁸⁺ na T-lymfocytech svědčí pro virový zánět. Kul-
tivačně se infekční agens nepodařilo opakovaně prokázat.

3) Pacient 1935

28. 11. 2006

Tabulka VIII. : Biochemické vyšetření mozkomíšního moku:

Popis mozkomíšního moku	zakalený		
Csf-Pandy	4	arbj.	
Csf-Glukóza	3,5	mmol/l	2,7- 4,4
Csf-Laktát	13,68	mmol/l	1,20- 2,10
Csf- Chloridy	115,0	mmol/l	120- 130
Csf-Celková bílkovina	3,45	g/l	0,20- 0,45
Erytrocyty	330	elem/ul	
Lymfocyty	160	elem/ul	
Velké mononukl. buňky	208	elem/ul	
Segmenty	315	elem/ul	

Hodnocení cytologického preparátu:

Převaha neutrofilů, často rozpadlých, četné lymfocytární buňky v různém stádiu aktivace až po lymfoplazmocyty, ojedinělé lymfocytární buňky s jadernými inkluzemi-virocyty? Četné monocyty, často aktivované, ojediněle rozpadlé buněčné fágy, lipofagická aktivita neprokázána. Poměrně četné eozinofily, ojedinělé volné i fagocytované erytrocyty. Počáteční stádium serozního zánětu /vysoký laktát jako reakce na oxidační vzplanutí neutrofilů v počáteční neutrofilní fázi/. Přítomná hemoragická složka.

Tabulka IX. : Vyšetření mozkomíšního moku průtokovou cytometrií

Zastoupení leukocytů CD ⁴⁵⁺ (čistota)	92,9%
Lymfocyty	30,0%
CD ¹⁴⁺ Monocyty	19,0%
Neutrofilly	51,0%

Z lymfocytů:	
CD ³⁺ T-lymfo.	88,0%
Z CD3 ⁺ T-lymfocytů	
CD ⁴⁺ helper. T-lymfo.	74,2%
CD ⁸⁺ supr. /cyt. T-lymfo.	26,1%
Poměr CD ⁴⁺ /CD ⁸⁺	2,8
Aktivace T-lymfocytů	
CD ³⁺ HLA-DR akt. T-lymfo.	32,4%

Hodnocení průtokové cytometrie:

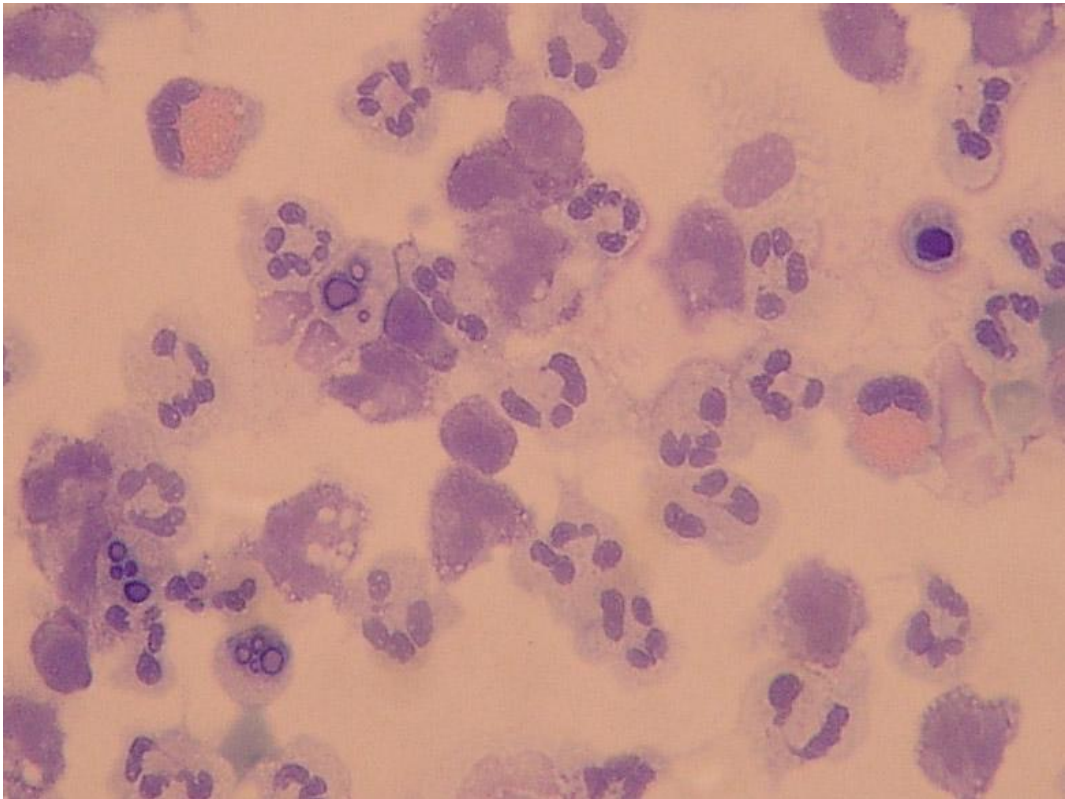
V populaci leukocytů převládají neutrofilové, méně četné jsou monocyty, lymfocyty tvoří 30%. Fenotypově se jedná o CD³⁺T-lymfocyty se spíše normálním poměrem CD⁴⁺/CD⁸⁺, se zvýšenou expresí aktivačního markru HLA-DR na povrchu.

Závěr hodnocení vyšetření průtokovým cytometrem:

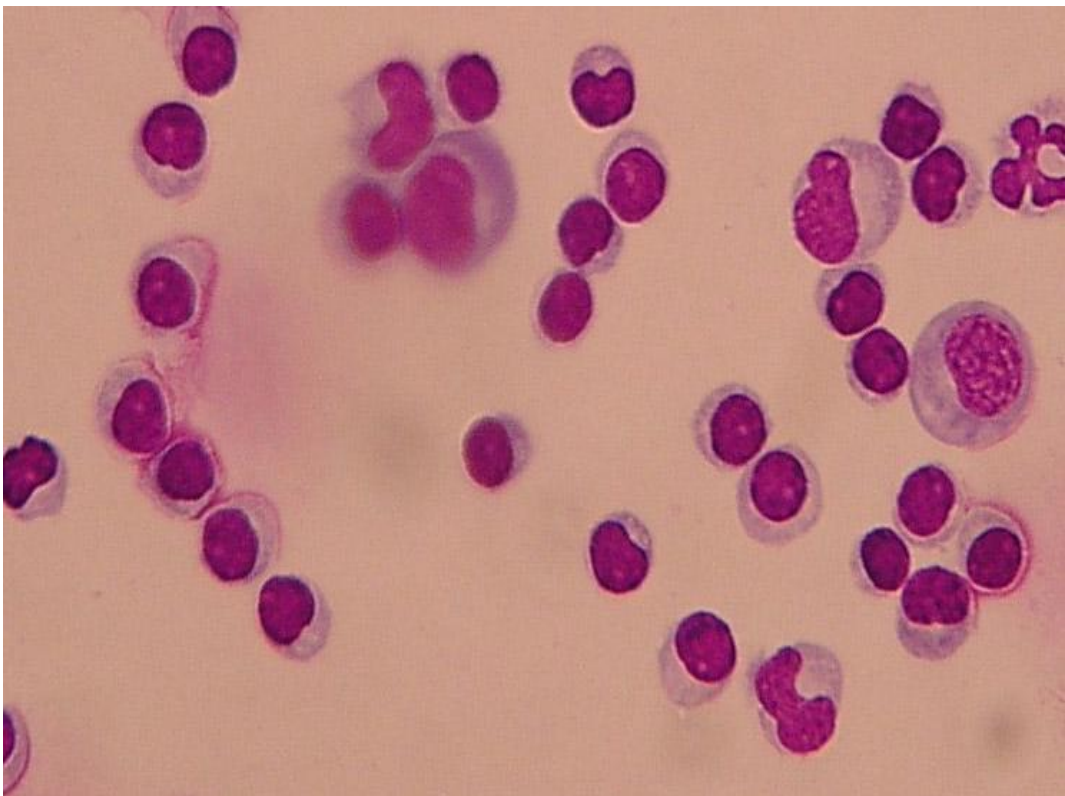
Nález je poměrně nespecifický, může odpovídat lokální imunitní odpovědi na nespecifickou infekci jiné etiologie než virovým agens. V úvahu může přicházet i jiná příčina (ischemie, útlak.?)

Virologický nález: Aerobní kultivací prokázána *Listeria monocytogenes*.

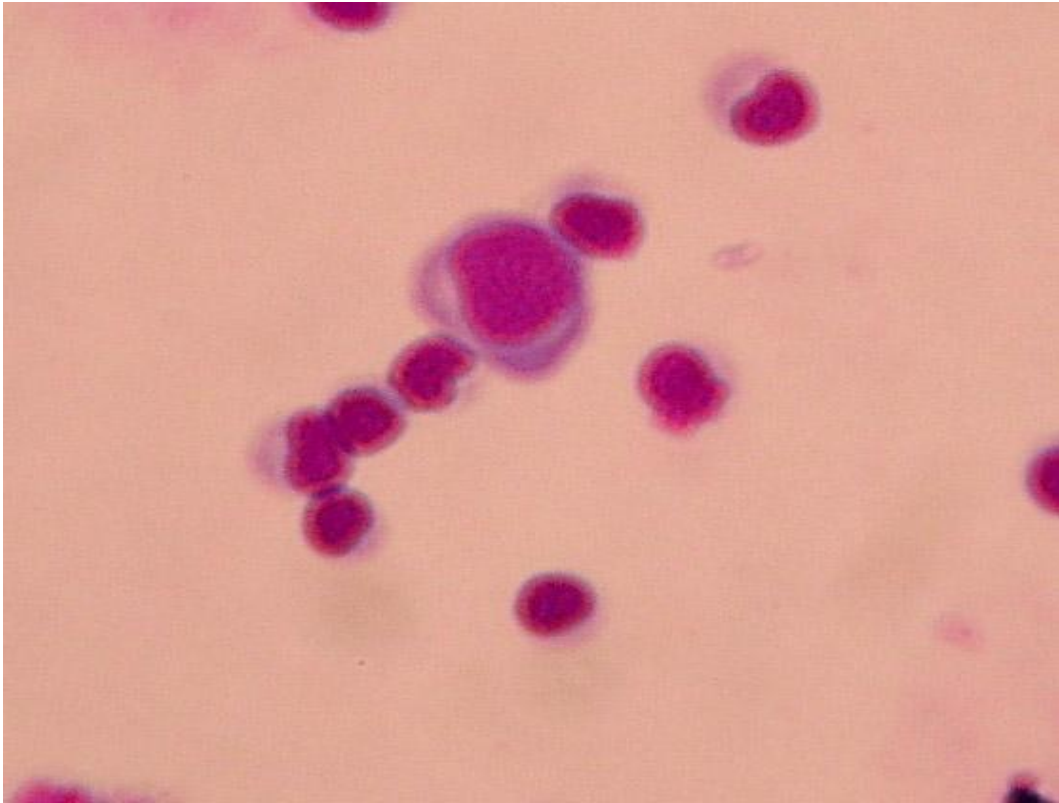
Závěr: Atypická, vzácná infekce. V biochemickém obraze dominuje vysoká bílkovina, vysoká hodnota laktátu, ale normální glukosa. Cytologický obraz byl popsán jako možný počáteční serózní zánět – počty buněk i buněčné spektrum je jiné než je charakteristické pro bakteriální infekci. Vyšetření průtokovým cytometrem neukazuje jednoznačně na virovou infekci. Rozhodující se stalo kulturační vyšetření, které prokázalo přítomnost *Listerie monocytogenes*.



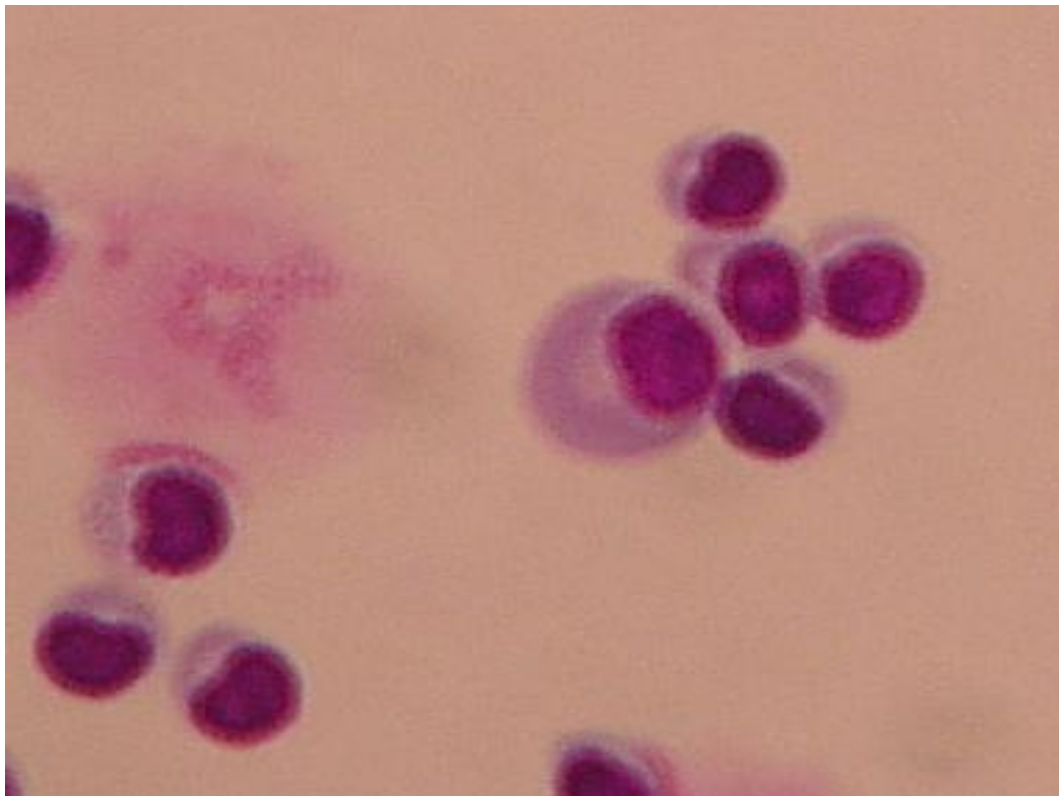
1. Počáteční, neutrofilní stádium virového zánětu - neutrofilní granulocyty, monocyty, makrofágy, eozinofilní granulocyty



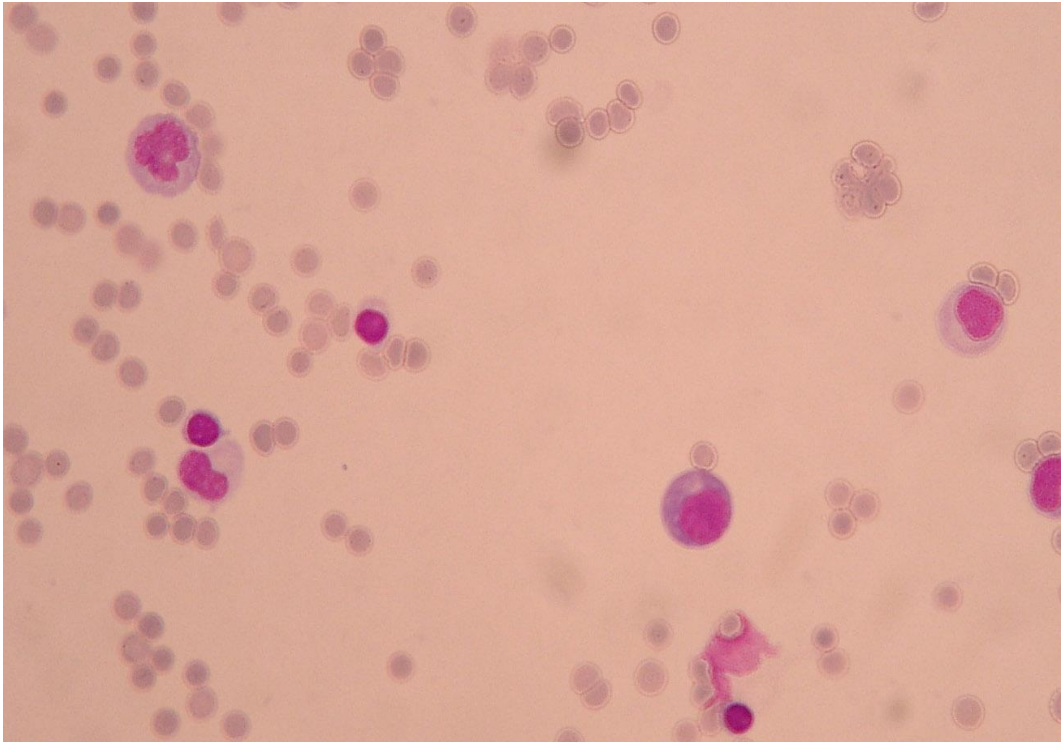
2. Lymfocyty v různém stádiu aktivace



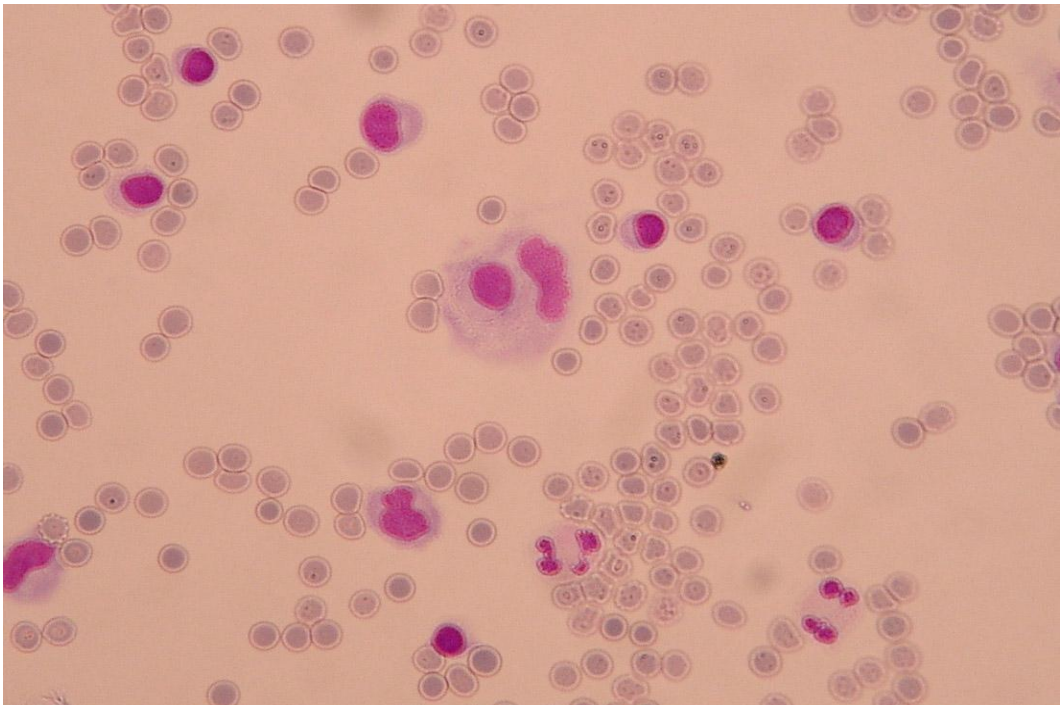
3.Lymfoplazmocyty



4.Plasmocyt a aktivované lymfocyty



5. Aktivace likvorových buněk – uprostřed plazmocyty, nahoře počínající monocytární mitóza



6. Úklidová fáze – lymfobág