Imunofenotypizace mozkomíšního moku

RNDr. Pavlína Tinavská, Ph.D.

Velké Karlovice, 4.-6.10.2026

CL LKCHI Pracoviště imunologie, tinavska.pavlina@nemcb.cz, 387 87 3621

Mozkomíšní mok (likvor)

- je čirá tělesná tekutina, která **obklopuje mozek a míchu**
- **n**achází se v mozkových komorách a v prostoru kolem centrálního nervového systému



Složení:

- je **čirá, bezbarvá tekutina**, která obsahuje hlavně:

💧 **vodu** – přibližně 99 %
elektrolyty – hlavně Na^+, Cl^-, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}
glukózu – přibližně 2/3 koncentrace glukózy v krvi
bílkoviny – jejich množství je výrazně nižší než v krvi
buňky – za normálních okolností jen velmi málo a to převážně lymfocyty
malé množství dalších látek, např. **laktátu, aminokyselin a metabolitů**

Jeho hlavní funkce jsou:

- **ochrana** mozku a míchy před mechanickými nárazy
- **nadlehčování** mozku
- **transport živin a odpadních látek**
- podíl na udržování **stálého prostředí pro nervové buňky**



likvor = hlavně **voda + ionty + glukóza + malé množství bílkovin a buněk**.

Lumbální punkce je lékařský výkon, při kterém se **tenkou jehlou odebere mozkomíšní mok (likvor) z bederní části páteřního kanálu**, nejčastěji mezi obratli **L3–L4 nebo L4–L5**.

Standardní vyšetření mozkomíšního moku

Fyzikální a biochemické vyšetření **- s**leduje se vzhled, barva, celková bílkovina, albumin, glukóza a laktát v likvoru i séru, albuminový kvocient (stav hematolikvorové bariéry)

Imunologické vyšetření – stanovuje se hladina imunoglobulinů (IgA, IgG, IgM) s vypočítáním jejich intrathekální syntézy, apolipoprotein B, CXCL13

Mikrobiologické vyšetření - hledají se původci infekcí, např. **bakterie, viry, paraziti nebo houby** pomocí mikroskopie, kultivace nebo **PCR** nebo nepřímým stanovením specifických protilátek přímo v likvoru (KE, borelióza)

Cytologické - počítají se buněčné elementy a hodnotí se přítomnost a typ bílých či červených krvinek. V případě podezření na maligní původ buněk se využívá imunofenotypová analýza pomocí průtokové cytometrie.

Preanalytická fáze vyšetření mozkomíšního moku

Odběr likvoru – do standardních zkumavek bez aditiv nejlépe sterilních polypropylenových a souběžně také odběr krve do zkumavek bez antikoagulačních prostředků (separační gel, akcelerátory srážení).

Transport do laboratoře a zpracování – ihned, nejpozději do 2 hodin po odběru

Skladování - centrifugovaný likvor a sérum lze skladovat pro dodatečné analýzy (zejména stanovení specifických proteinů):
– při teplotě +4 až +8°C likvor 1 týden;
– při teplotě -20°C likvor i sérum 1 rok, opakovaně nerozmrazovat;
– při teplotě -70°C likvor i sérum >1 rok, opakovaně nerozmrazovat.

Mrázová K., Zeman D., Bořecká K., Ženková J., Brož P., Mareš J., Hanzalová J., Král V., Krbková L., 2017: Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku, Klin. Biochem. Metab., 25 (46), 2017, No. 1, p. 43–47

Kala M., Mareš J., 2008: Lumbální punkce a mozkomíšní mok, ISBN 978-80-7262-568-0

Zpracování mozkomíšního moku pro FACS analýzu

Odebraný likvor by měl být odeslán do laboratoře ihned po odběru! ve sterilní polypropylenové zkumavce bez aditiv.

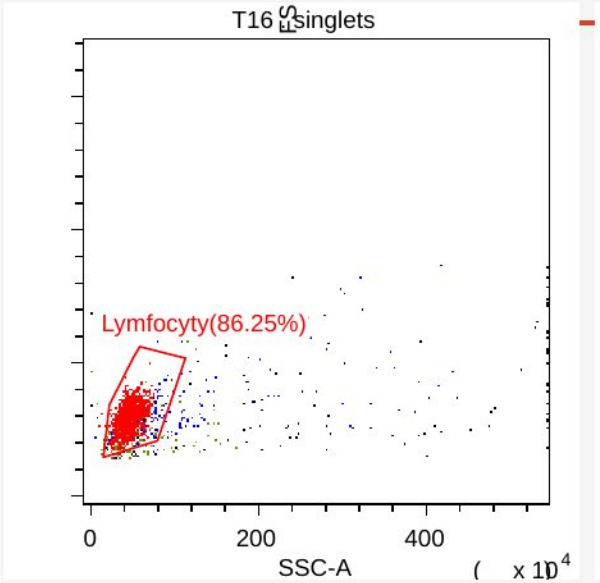
Zpracování likvoru co nejdříve nejlépe do 1 hodiny od odběru!

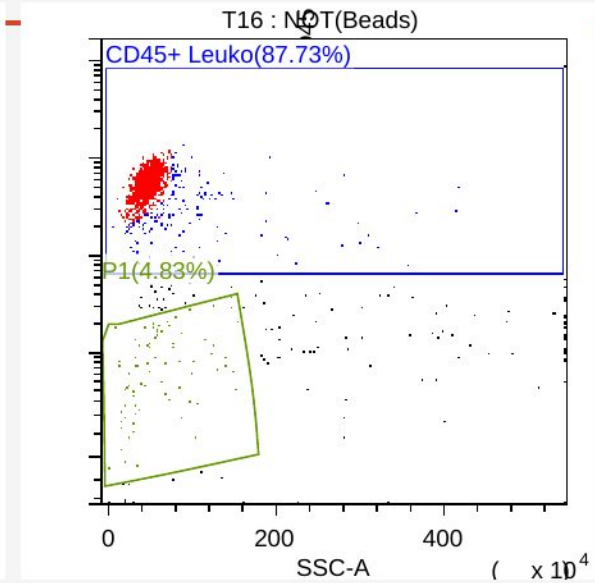
Pracovní postup přípravy likvoru pro imunofenotypizaci: dle SOP PIMU

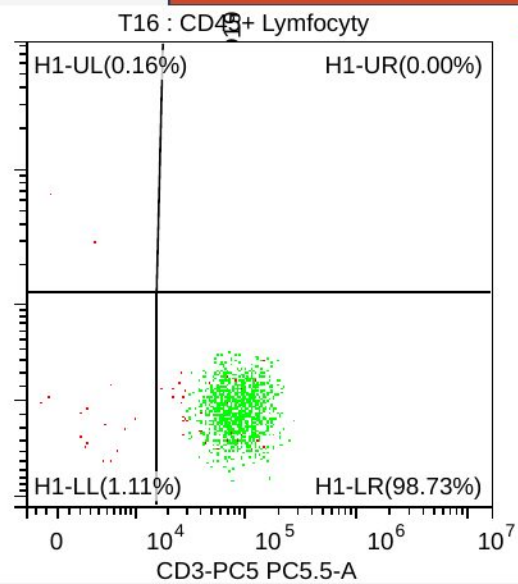
- centrifugace 4 min při 1700 ot./min., ponecháme cca 1 ml likvoru a resuspendujeme (zbytek supernatantu (likvoru) stáhneme a uchováváme při 4 °C)
- 100 µl resuspendovaných buněk v původním likvoru barvíme 15 min. koktejlem MAbs dle protokolu
    - CD45-KO/CD19-ECD/CD3-PC5.5/CD4-APC AF750/CD8-PC7/CD16(CD56)-PE
    - CD45-KO/CD14-PE/CD15-PB
    - CD45-KO/CD5-PC5.5/CD19-ECD/CD3-FITC/HLADR-PE
    - CD45-KO/CD19-ECD/CD20-PE/CD10-PC5.5
- promytí PBS a centrifugace 4 min při 1700 ot./min.
- resuspendace sedimentu buněk v 0,5 ml lyzačního roztoku
- ihned měříme

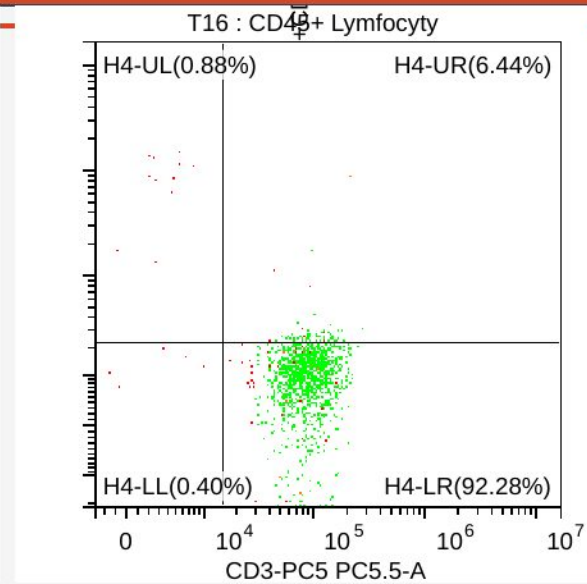
Obraz serózního zánětu C

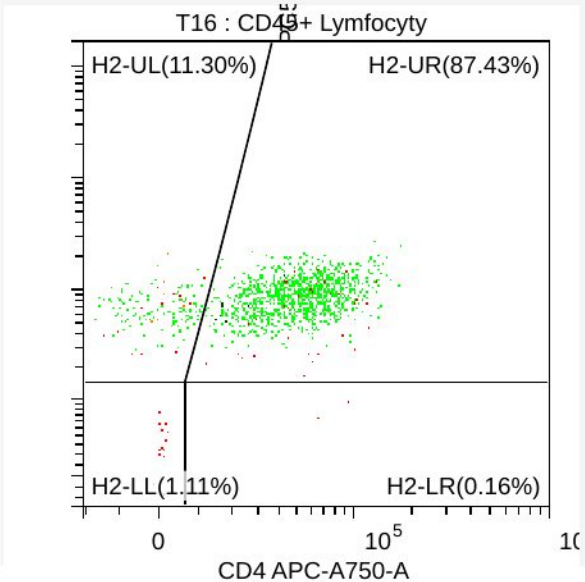
Žena, 1952, dg. B029 (pásový opar bez komplikací)
Intekční oddělení

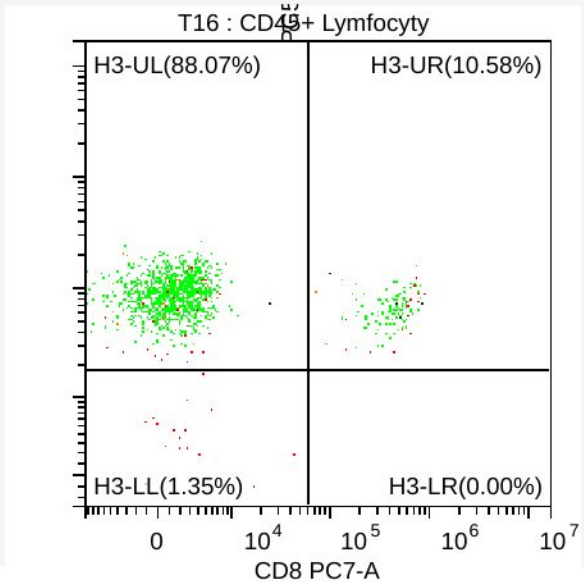












FACS:
Počet analyzovaných elementů:
7 351 ly, 10 000 leuko, 11 000 elem

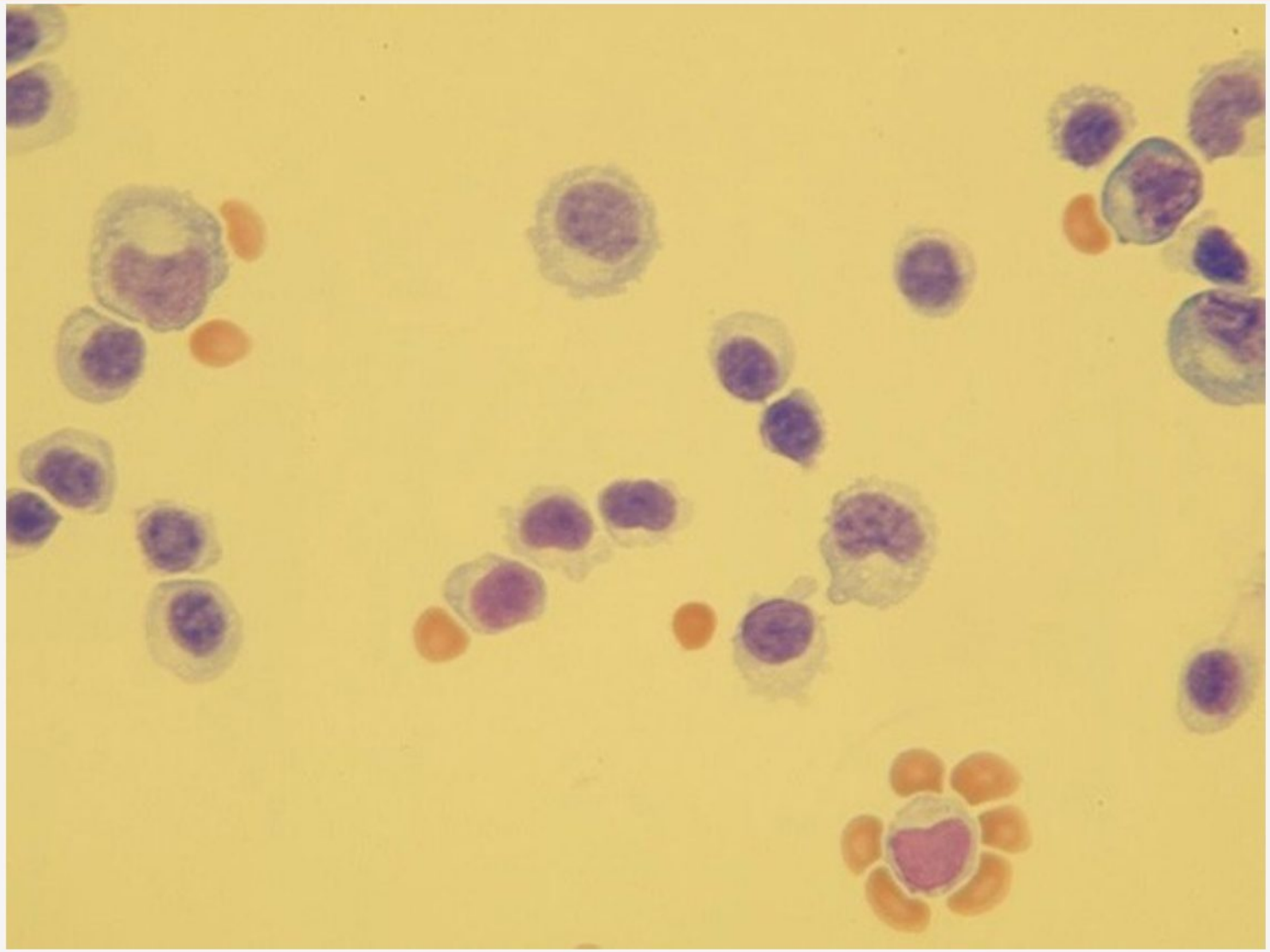
↑ lymfocyty CD3+CD4+

Obraz serózního zánětu CNS

Parametr	Hodnoty v CFS	Referenční mez
Albuminový kvocient	5,79	0,00 – 9,00
IgA	6,96 ↑	0,20 – 3,40 mg/l
IgG	51,7 ↑	< 40,00 mg/l
IgM	0,65	< 1,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgA	1,72 ↑	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgG	7,35 ↑	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgM	0,00	< 0,00 mg/l
KEB	30,2	28,0 – 38,0
Apolipoprotein B	1,5	0,5 – 2,0 mg/l
CXCL13	73,0 ↑	0,0 – 40,0 ng/l
elementy	112 ↑ CD3+CD4+HLADRdim	< 10 ks/3 µl
Mikrobiologický nález	poz PCR na DNA VZV (Varicella zoster virus)	

Závěr: mírně probíhající serózní zánět CNS u pacientky s pásovým oparem, původce lidský herpes zoster

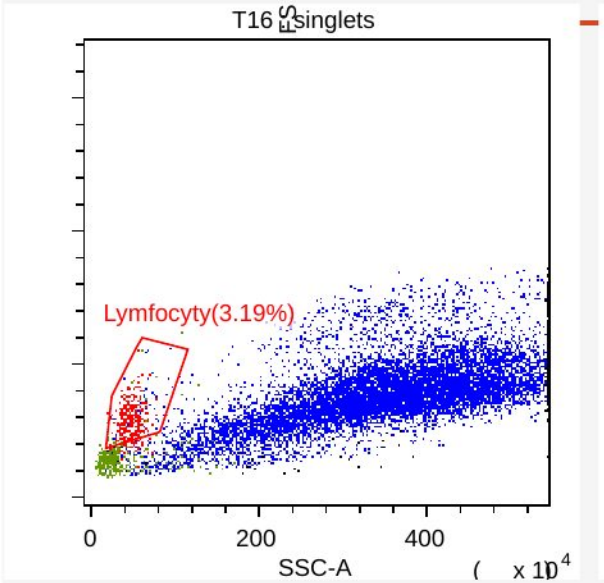
Lymfocytární pleocytóza, zvětšeno 400x

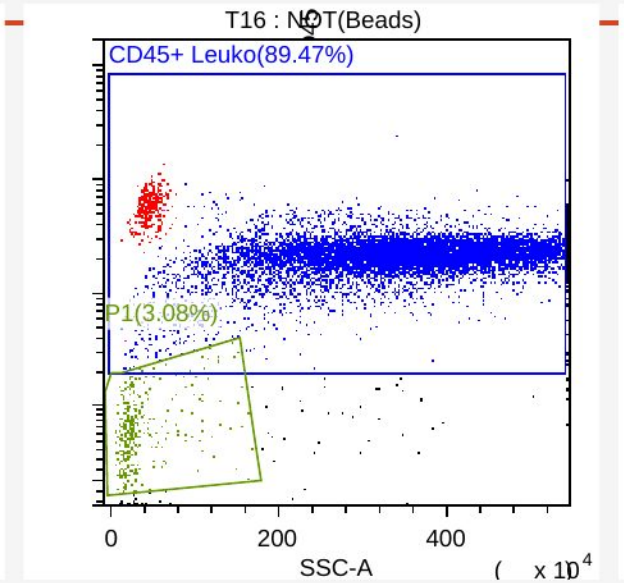


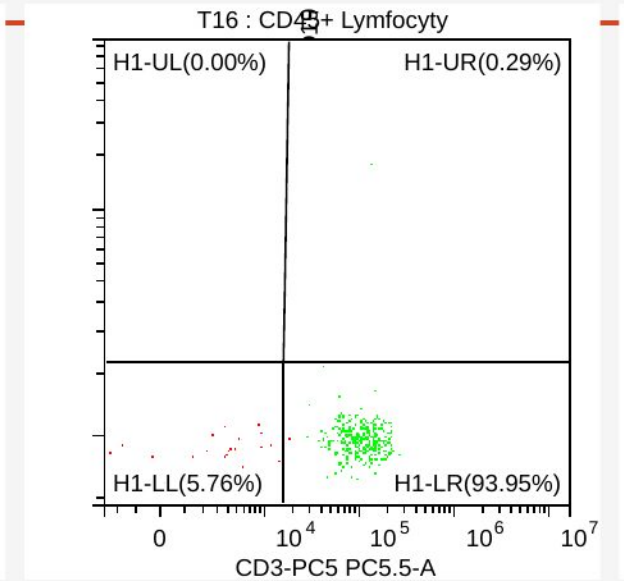
Zdroj: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2017/BLKLK051c/um/vysetreni_mozkomisniho_moku/pages/04-cytologicke-vysetreni.html

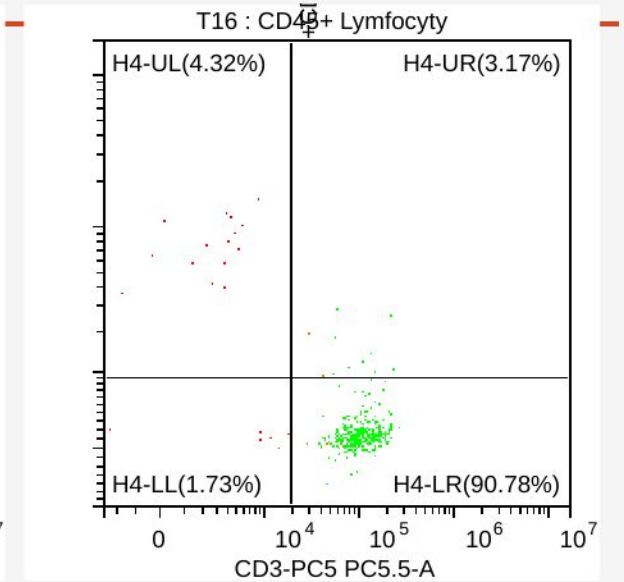
Obraz iniciální fáze serózního zánětu

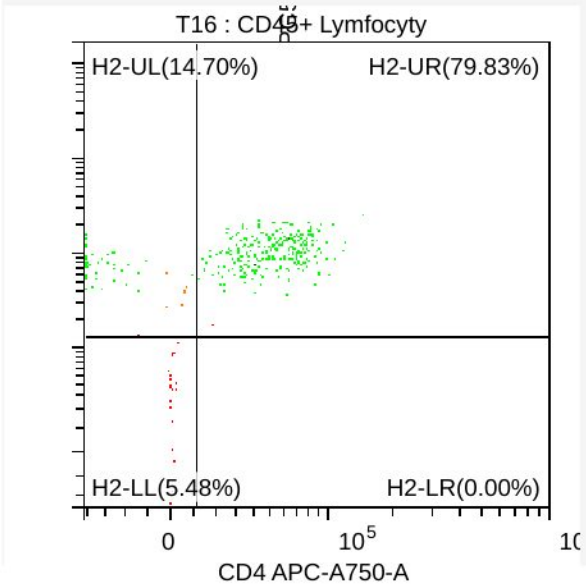
Muž, 1997, dg. R51 (nespecifikovaná bolest hlavy), CUP neurologie

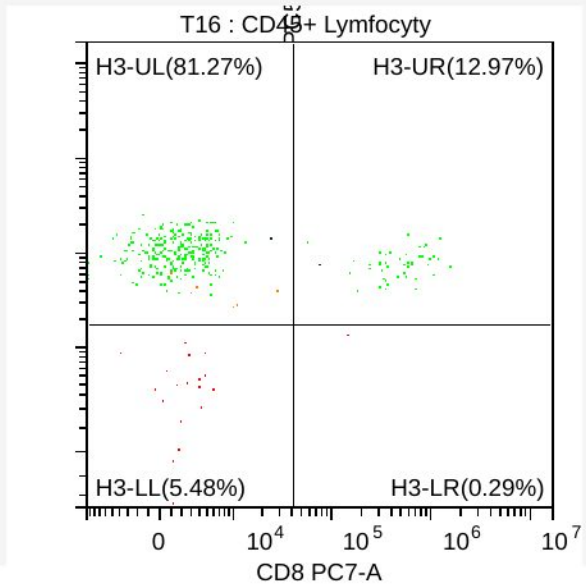


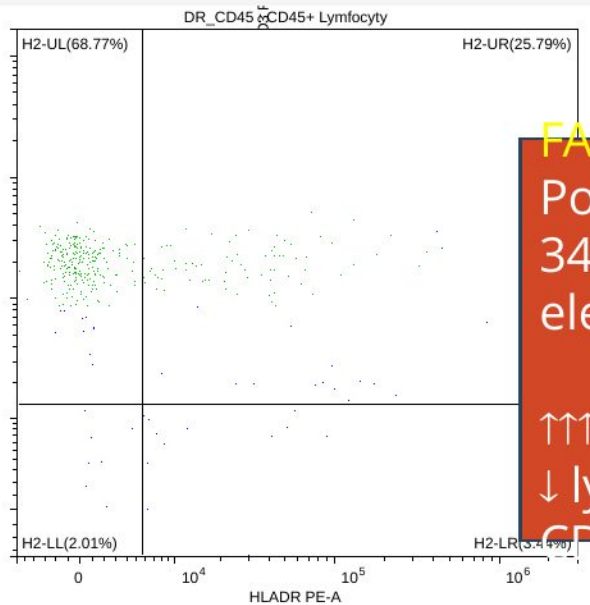












FACS:

Počet analyzovaných elementů: 347 ly, 10 200 leuko, 13 500 elem

↑↑↑ CD15+CD16+ granulocytů

↓ lymfocyty

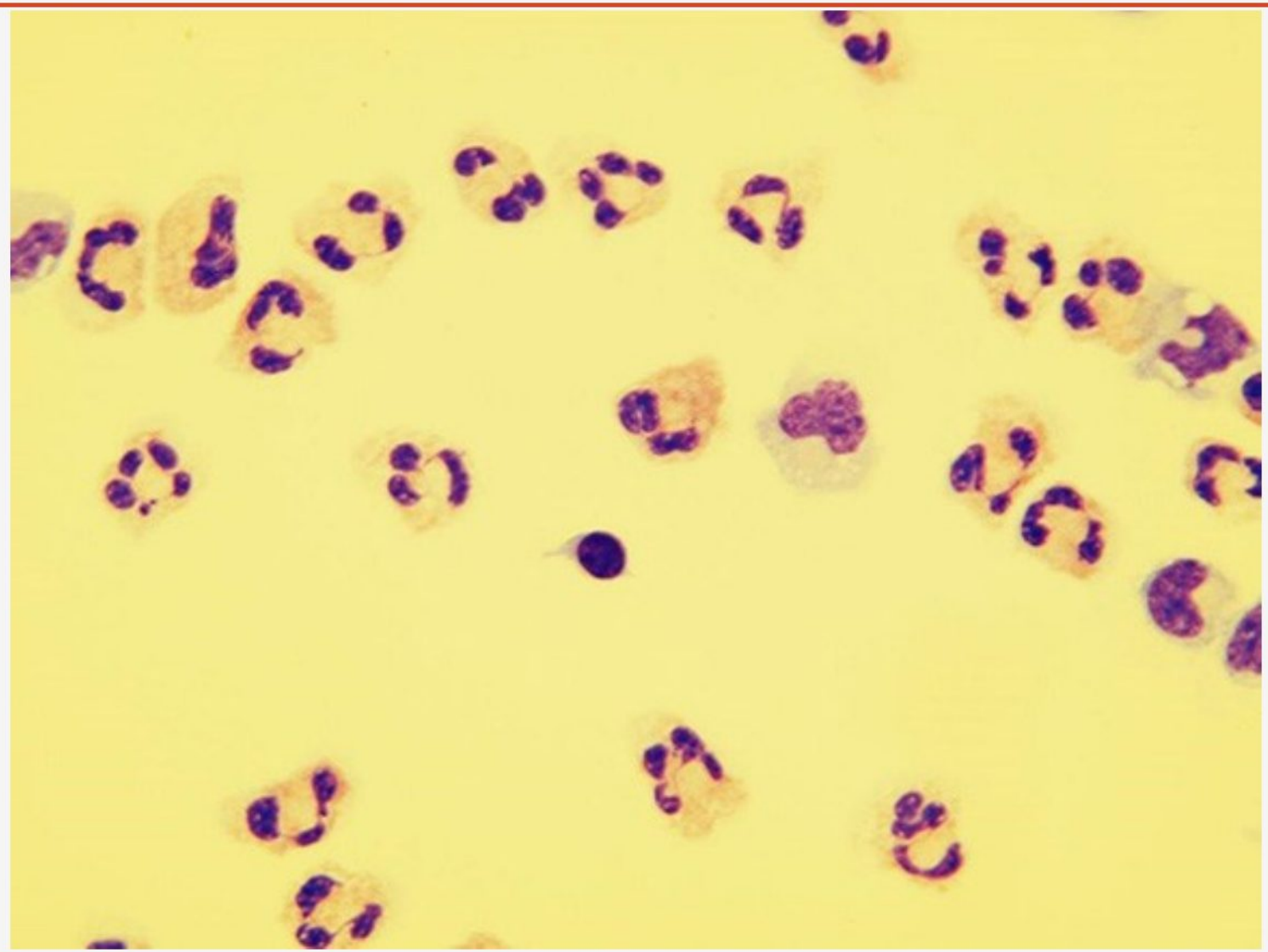
CD3+CD4+HLADRdim

Obraz iniciální fáze serózního zánětu CNS

Parametr	Hodnoty v CFS	Referenční mez
Albuminový kvocient	4,04	0,00 – 9,00
IgA	5,65 ↑	0,20 – 3,40 mg/l
IgG	29,8	< 40,00 mg/l
IgM	1,4 ↑	< 1,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgA	1,67 ↑	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgG	2,85 ↑	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgM	0,31 ↑	< 0,00 mg/l
KEB	26,8 ↓	28,0 – 38,0
Apolipoprotein B	1,5	0,5 – 2,0 mg/l
CXCL13	< 0,1	0,0 – 40,0 ng/l
elementy	416 ↑ (68 % PMN, 32 % mononukleáry, CD3+CD4+HLADRdim)	< 10 ks/3 µl
Mikrobiologický nález	poz PCR na RNA	

Závěr: masivní převaha CD15+CD16+ neutrofilních granulocytů s mírně sníženým KEB odpovídá iniciální fázi serózního zánětu CNS, průkaz RNA Enteroviru

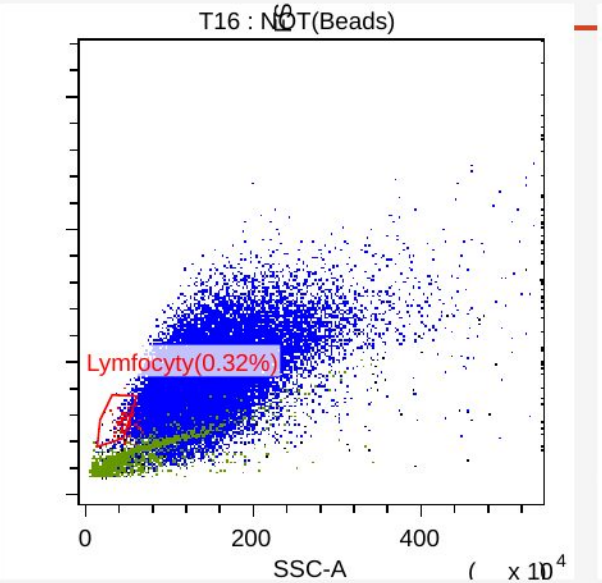
Granulocytární pleocytóza, zvětšeno 400x

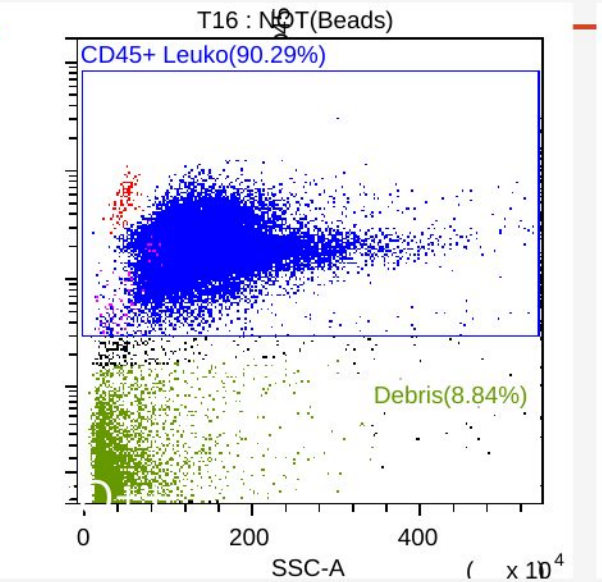


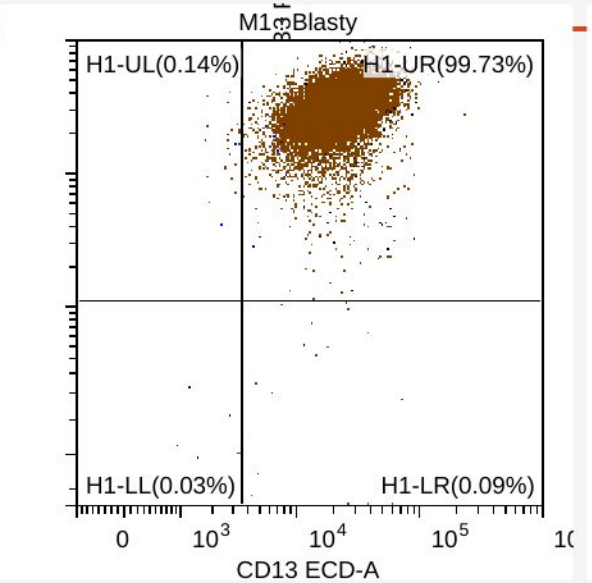
Zdroj: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2017/BLKLK051c/um/vysetreni_mozkomisniho_moku/pages/04-cytologicke-vysetreni.html

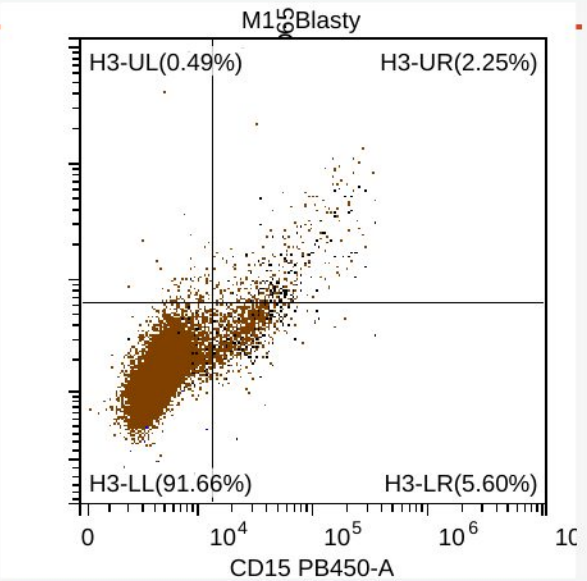
Obraz infiltrace CNS blasty A

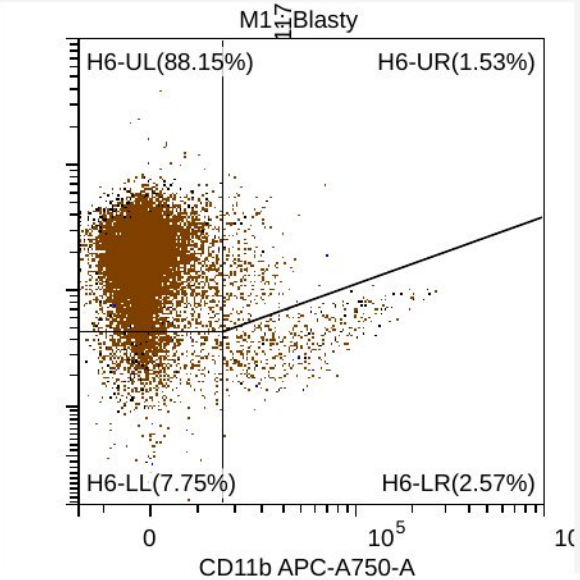
Žena. 1964, dg. G409 (nespecifikovaná epilepsie), neurologie JIP

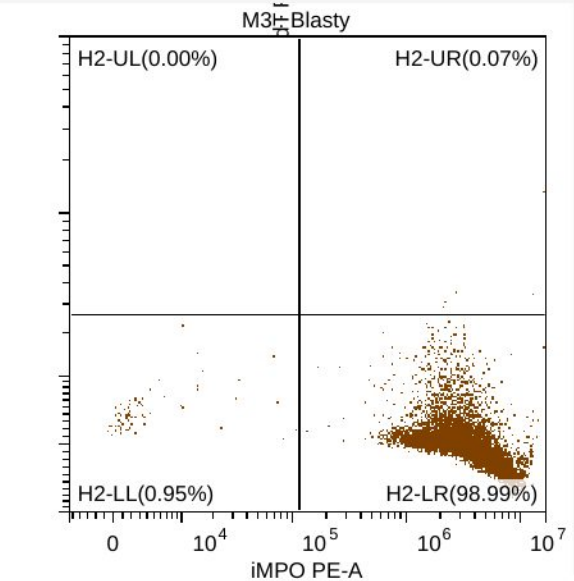


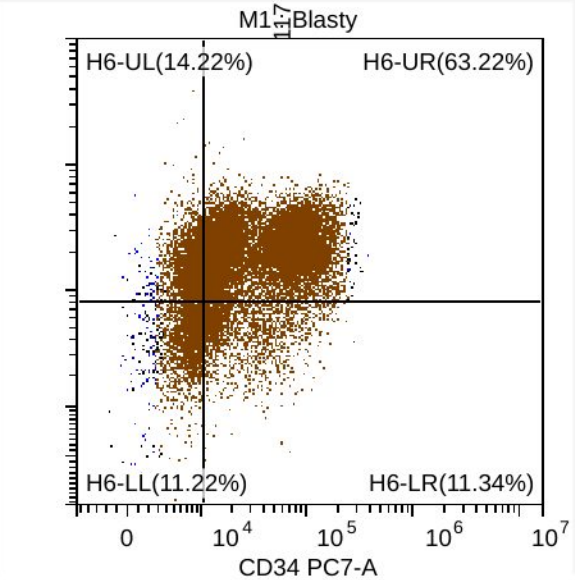












FACS:
Počet analyzovaných elementů:
83 ly, 41 798 leuko, 46293 elem

↑CD33+CD13+CD117+iMPO+ +CD34dimHLADR-
↓ Lymfocyty CD3+CD4+

Obraz infiltrace CNS blasty AML

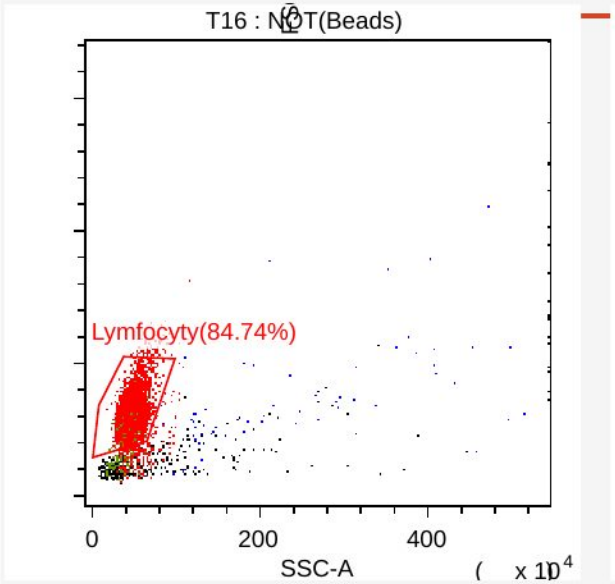
Parametr	Hodnoty v CFS	Referenční mez
Albuminový kvocient	5,90	0,00 – 9,00
IgA	1,67	0,20 – 3,40 mg/l
IgG	26,40	< 40,00 mg/l
IgM	0,17	< 1,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgA	0,21 ↑	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgG	0,00	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgM	0,00	< 0,00 mg/l
KEB	20,5 ↓	28,0 – 38,0
Apolipoprotein B	1,5	0,5 – 2,0 mg/l
CXCL13	10,7	0,0 – 40,0 ng/l
elementy	4208 ↑↑ (100 % mononukleáry, CD33+CD13+CD117+iMPO+ +CD34dimHLADR-)	< 10 ks/3 μl
Mikrobiologický nález	negativní	

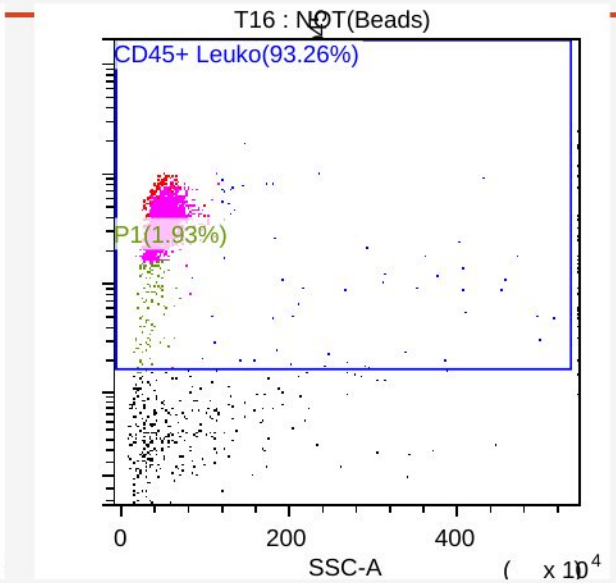
Závěr: tumorózní pleocytóza – nádorová infiltrace mening hematogenní etiologie se sníženou energetikou, dle FACS se jedná o myeloidní blasty k vyloučení M3

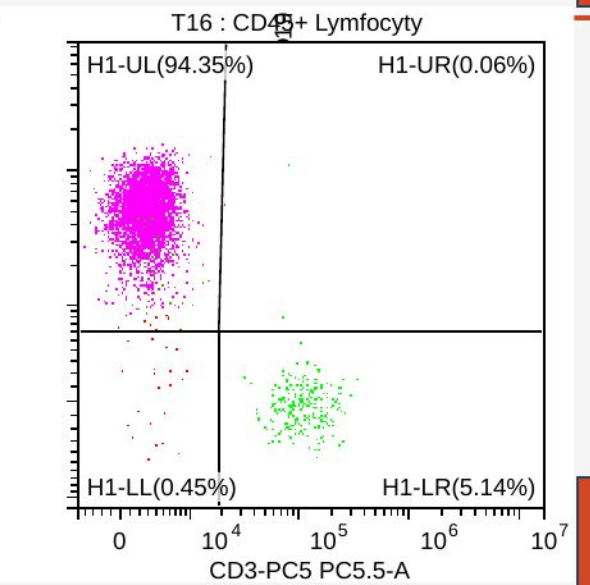
PK i KO bez přítomnosti blastů

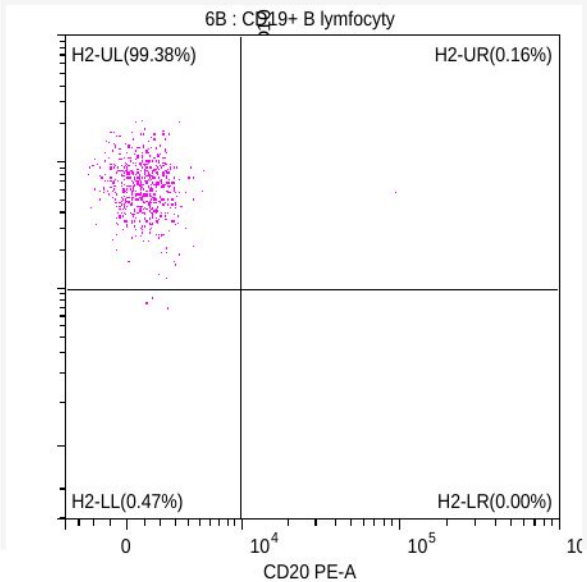
Obraz infiltrace CNS buňkami B-N

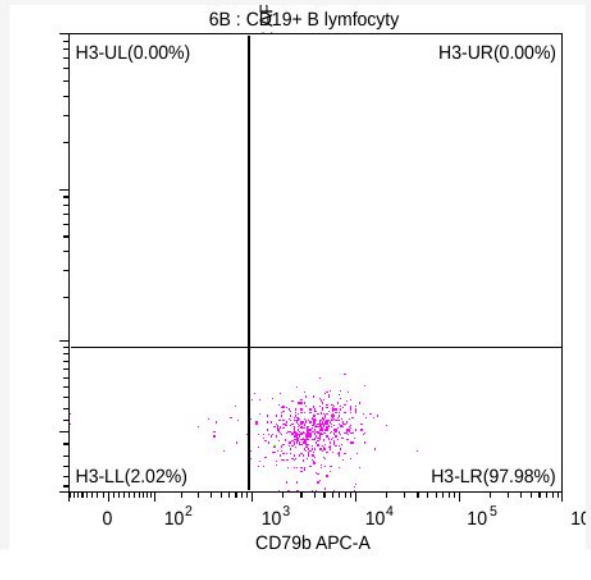
Žena , 1957, dg. C833 (DLBCL), neurologie

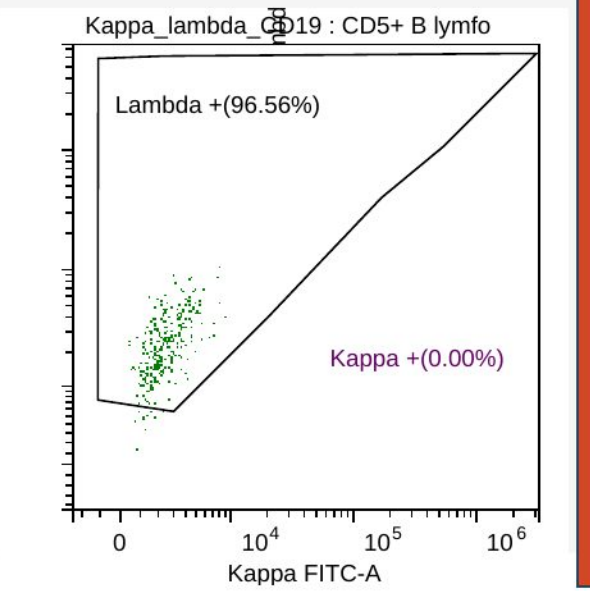












FACS:

Počet analyzovaných elementů:
3 700 ly, 4 800 leuko, 5 100 elem

↑↑↑ Lymfocyty
CD19+CD79+CD10+CD22dim
CD5-CD20-CD23-CD200-
Lambda+

IRI (CD4+/CD8+) = 1,8

Obraz infiltrace CNS buňkami B-NHL

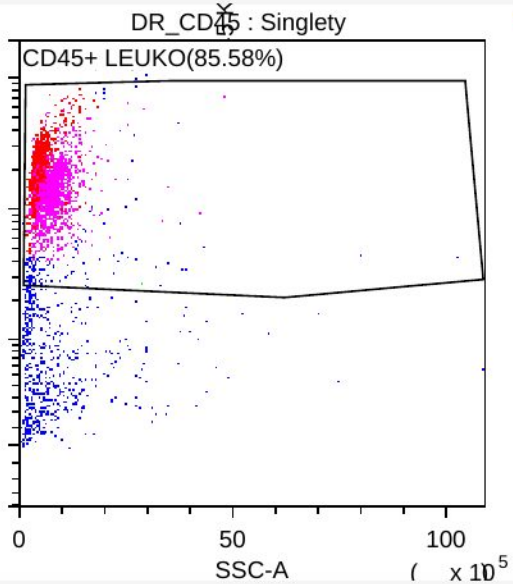
Parametr	Hodnoty v CFS	Referenční mez
Albuminový kvocient	18,91 ↑	0,00 – 9,00
IgA	----	0,20 – 3,40 mg/l
IgG	92 ↑	< 40,00 mg/l
IgM	----	< 1,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgA	----	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgG	0,00	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgM	----	< 0,00 mg/l
KEB	- 12,2 ↓↓	28,0 – 38,0
Apolipoprotein B	----	0,5 – 2,0 mg/l
CXCL13	325,3 ↑↑	0,0 – 40,0 ng/l
elementy	544 ↑ (100 % mononukleáry, CD19+CD79+CD10+CD22dimCD5-CD20-CD23-CD200-Lambda+)	< 10 ks/3 µl
Mikrobiologický nález	----	

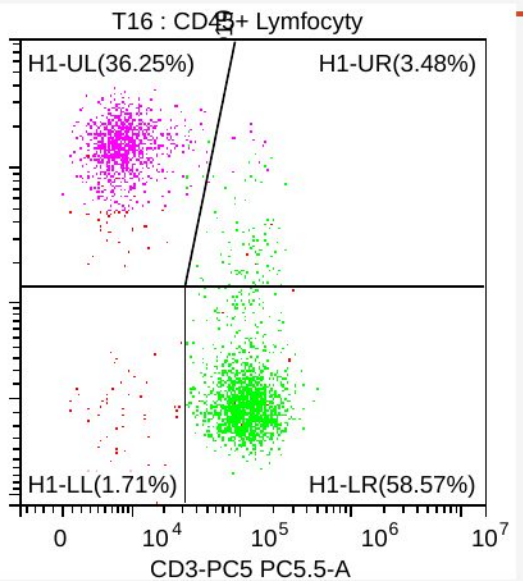
Závěr: tumorózní pleocytóza – nádorová infiltrace CNS hematogenní etiologie s výrazně sníženou energetikou, dle FACS se jedná o klonální B lymfocyty, které odpovídají buňkám B-NHL (v. s. DLBCL)

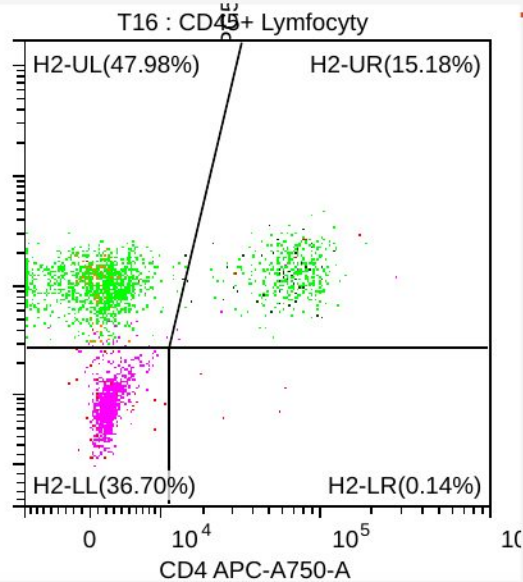
PK i KD negativní

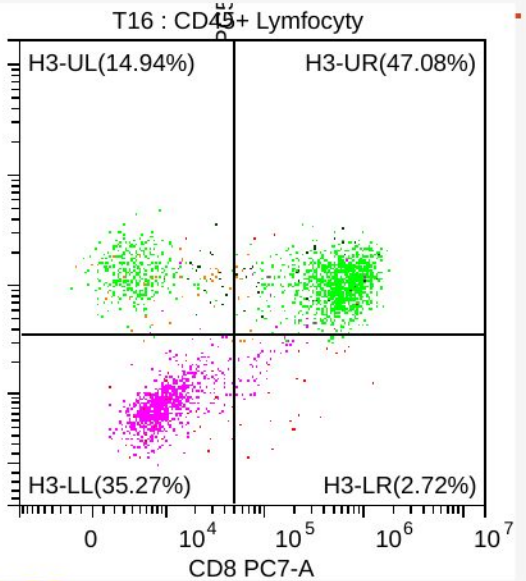
Obraz infiltrace CNS buňkami B-

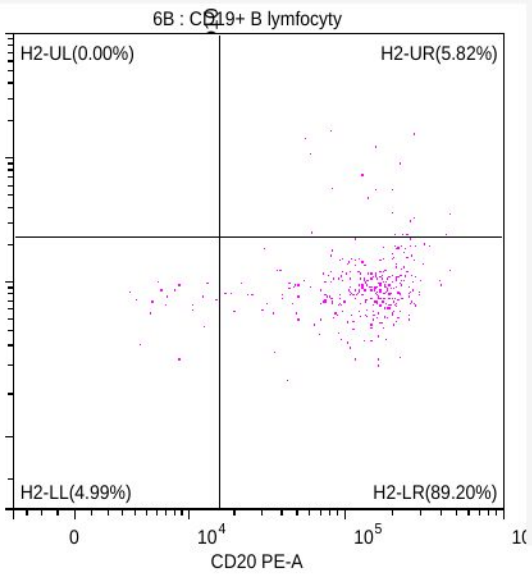
Muž, 1972, dg. G98 (jiné choroby nervové soustavy), OUP neurologie

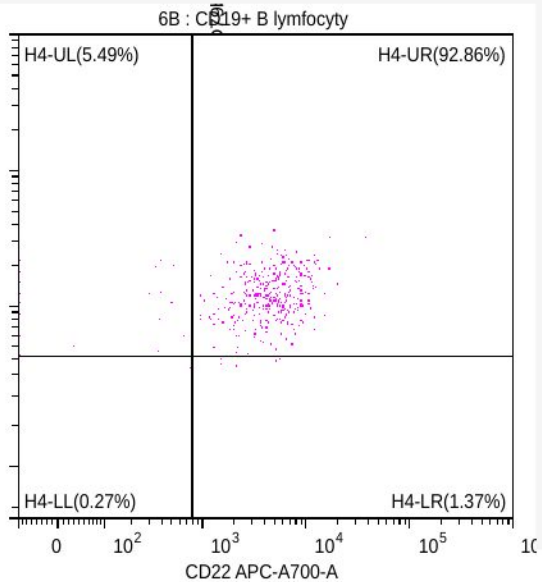


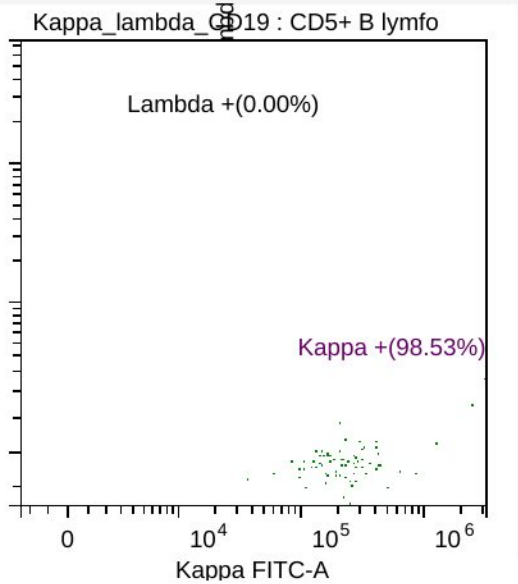












FACS:

Počet analyzovaných elementů:
4 100 ly, 4 333 leuko, 5 100 elem

↑↑ lymfocyty - cca 1/3 (36,3 %)
CD19+CD20+CD22+CD79+CD23+CD200+CD5-CD10-

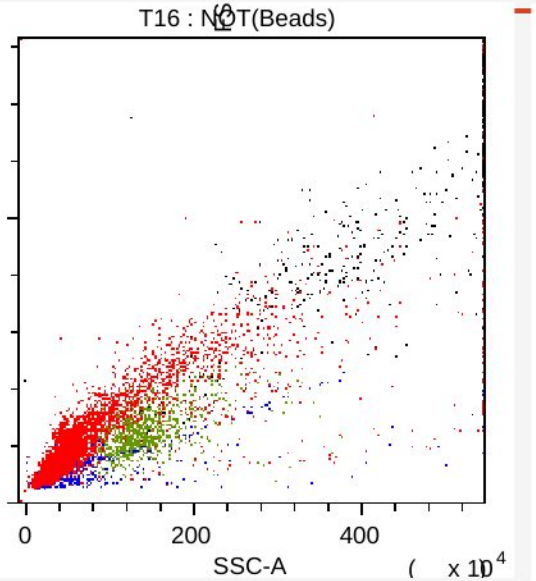
Obraz infiltrace CNS buňkami B-NHL

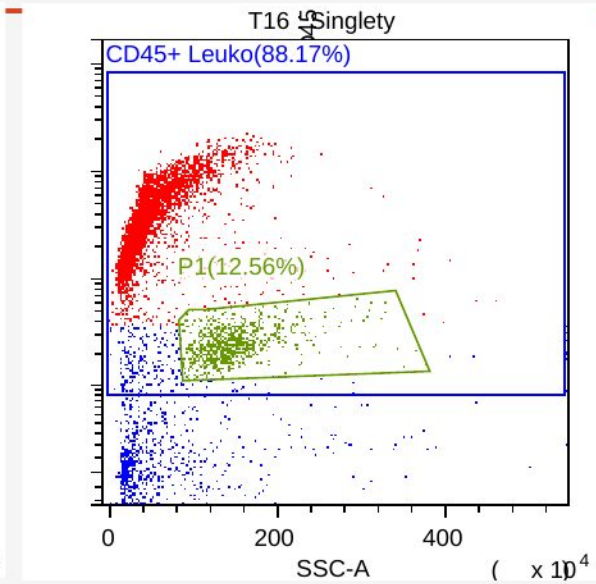
Parametr	Hodnoty v CFS	Referenční mez
Albuminový kvocient	13,69 ↑	0,00 – 9,00
IgA	----	0,20 – 3,40 mg/l
IgG	78 ↑	< 40,00 mg/l
IgM	----	< 1,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgA	----	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgG	0,00	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgM	----	< 0,00 mg/l
KEB	6,8 ↓↓	28,0 – 38,0
Apolipoprotein B	----	0,5 – 2,0 mg/l
CXCL13	< 500 ↑↑↑	0,0 – 40,0 ng/l

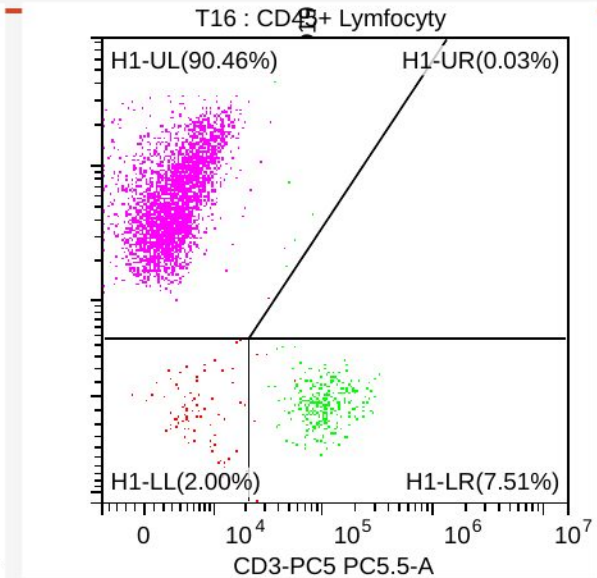
Závěr: tumorózní pleocytóza – nádorová infiltrace CNS hematogenní etiologie s výrazně sníženou energetikou, dle FACS se jedná o klonální B lymfocyty, které odpovídají buňkám B-NHL – 2025 relaps onemocnění v CNS, PK bez lymfomových buněk, dg. v roce 2023 z UZL a KD

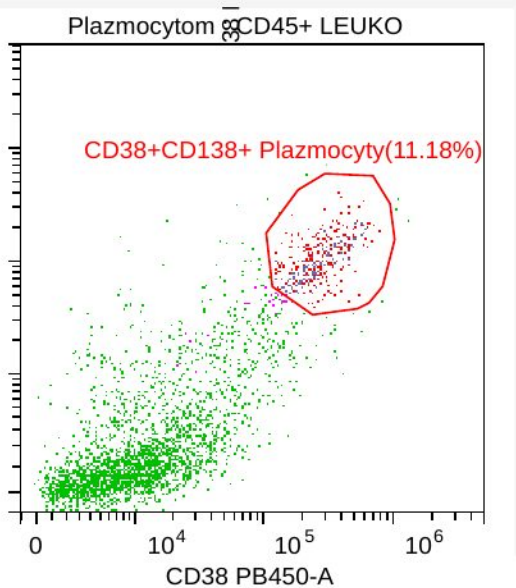
Obraz infiltrace CNS myelomovými buňkami

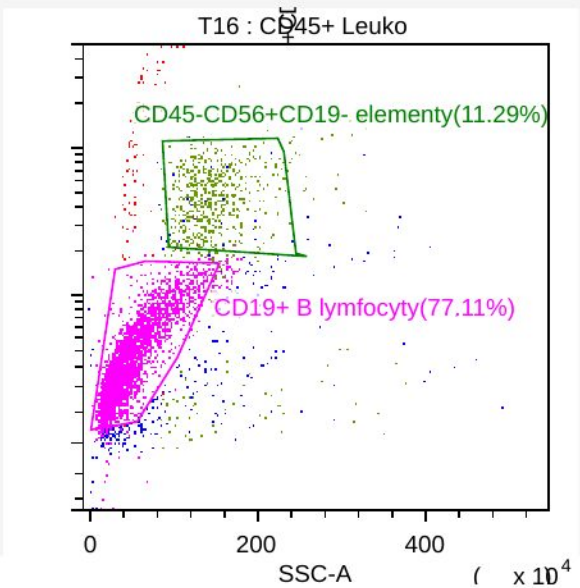
Muž, 1970, dg. J128 (jiná virová pneumonie)

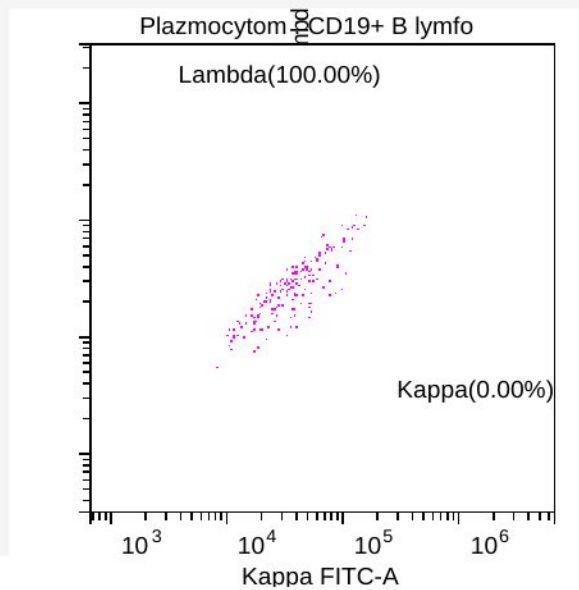










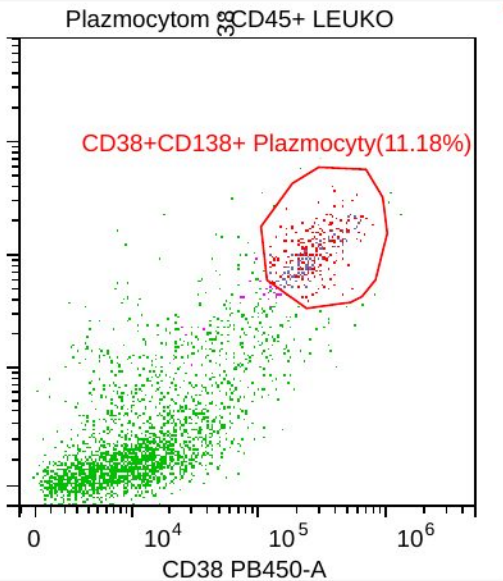


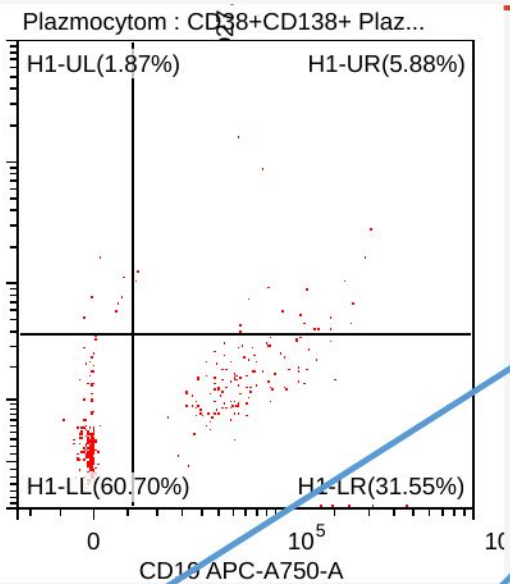
FACS:
Počet analyzovaných elementů:
7 309 ly, 8 613 leuko, 9 247 elem

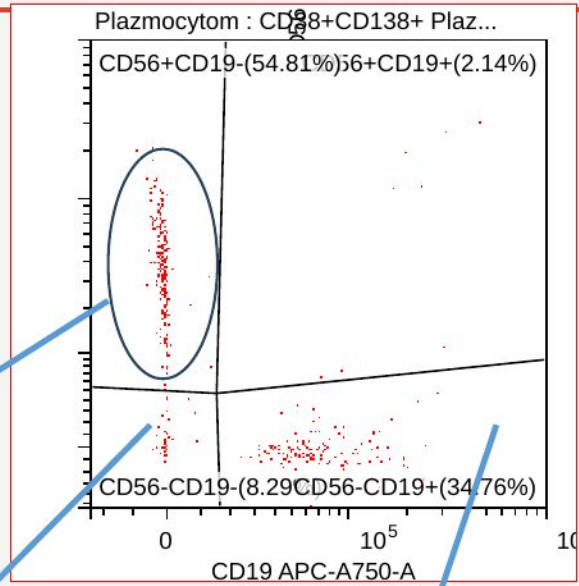
↑↑↑ lymfocyty CD19+CD20-CD27-CD38dimCD138-CD56-CD45++lambda+

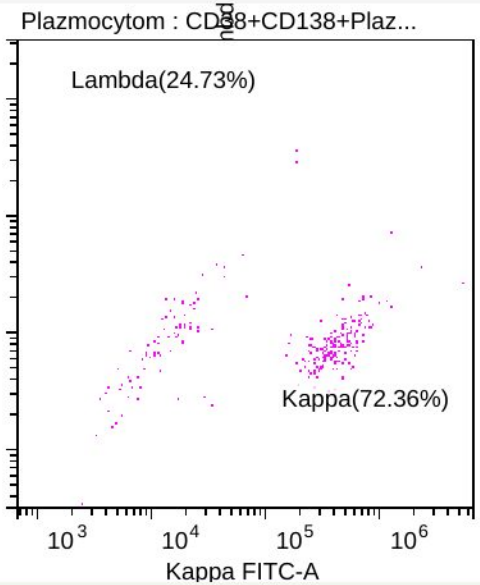
Obraz infiltrace CNS myelomovými buňkami

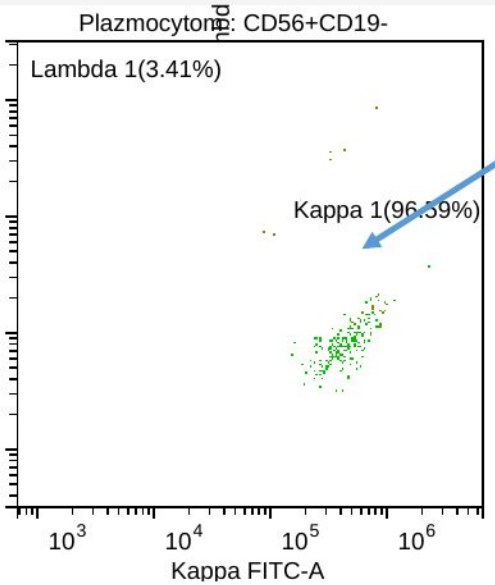
Muž, 1970, dg. J128 (jiná virová pneumonie)

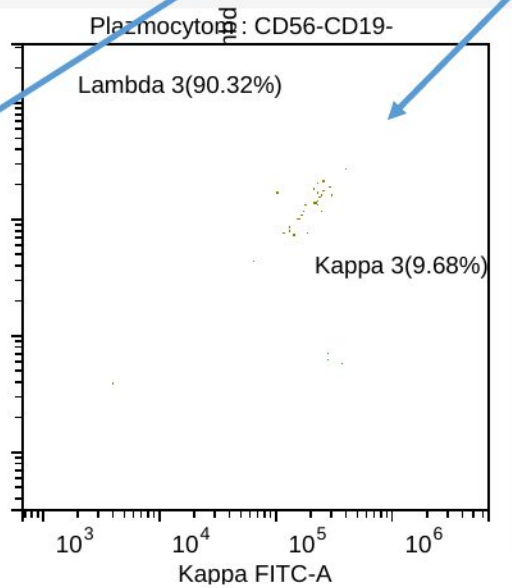


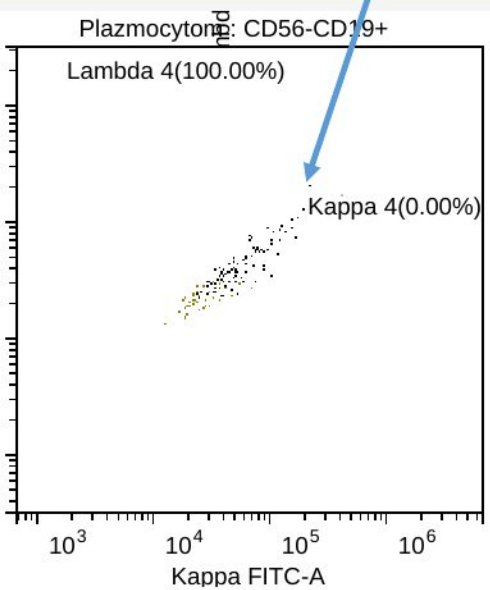












FACS:
Počet analyzovaných elementů: 1477 CD38+/CD138+

cca 11,2 % CD38+CD138+CD45-
ckappa/clambda = 2,9:

7,1 % CD56+CD27-CD19-ckappa+
3,1 % CD56-CD27+CD19+clambda+

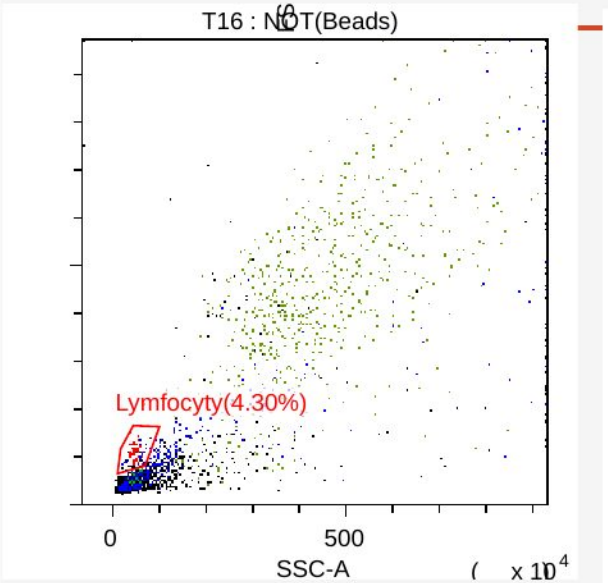
Obraz infiltrace CNS myelomovými buňkami

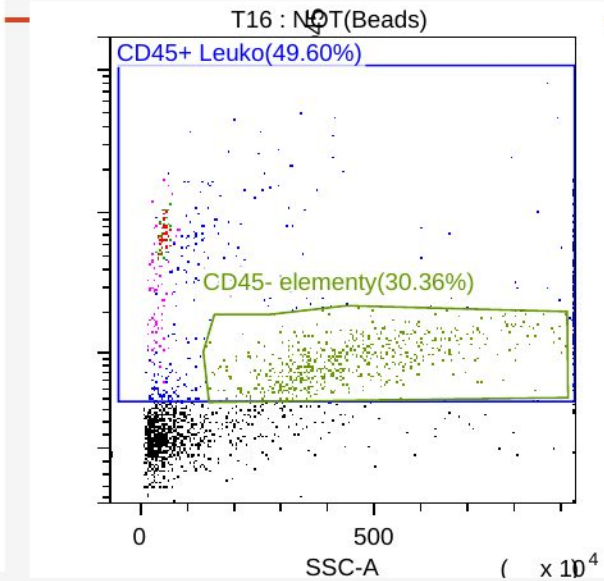
Parametr	Hodnoty v CFS	Referenční mez
Albuminový kvocient	68,13	0,00 – 9,00
IgA	8,75 ↑	0,20 – 3,40 mg/l
IgG	3150,00 ↑↑↑	< 40,00 mg/l
IgM	0,00	< 1,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgA	0,00	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgG	2533,03 ↑↑↑	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgM	----	< 0,00 mg/l
KEB	25,4 ↓	28,0 – 38,0
Apolipoprotein B	2,3	0,5 – 2,0 mg/l
CXCL13	121,5 ↑	0,0 – 40,0 ng/l
elementy	81 ↑ (88 % mononukleáry	< 10 ks/3 µl

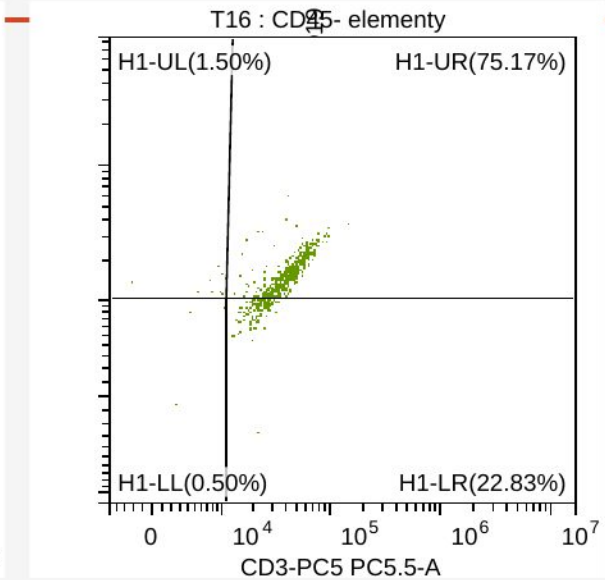
Závěr: tumorózní pleocytóza s těžkou poruchou HLB a mírně sníženou energetikou – nádorová infiltrace mening, atypické elementy hematogenní řady, dle FACS cca 11,2 % klonální plazmatické buňky, většina přítomných buněk klonální CD19+CD45+CD38+ atypické plazmatické nebo lymfomové buňky
2025 relaps onemocnění s postižením CNS, v roce 2023 dg. leukemizující MM s postižením KD i PK
2026 remise onemocnění

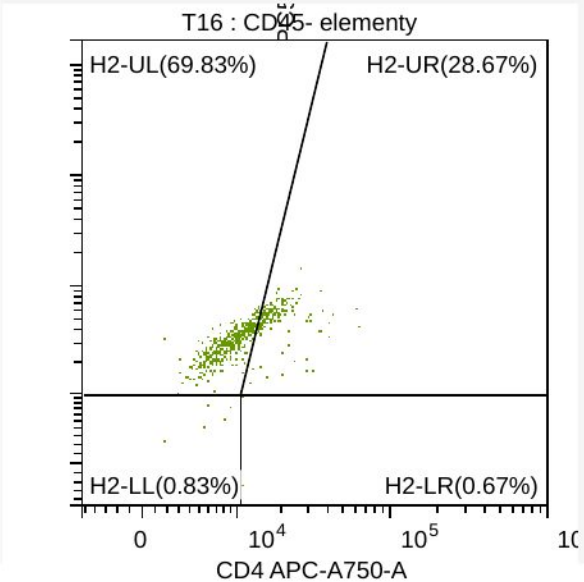
Obraz infiltrace CNS buňkami karci

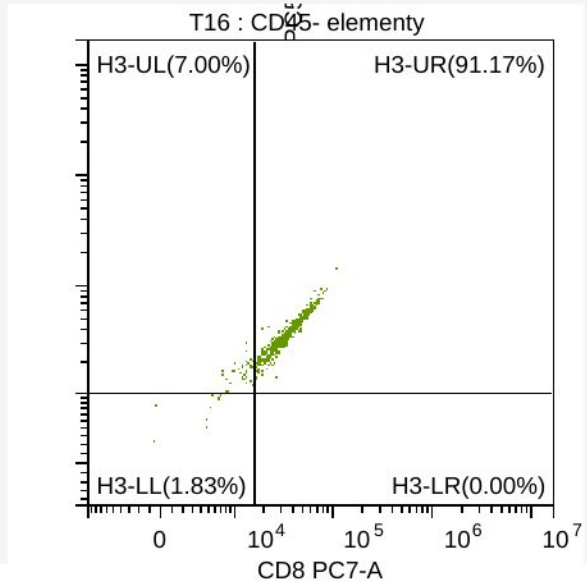
Žena, 1970, dg. R55 (malátnost a zhroucení), interní oddělení JIP

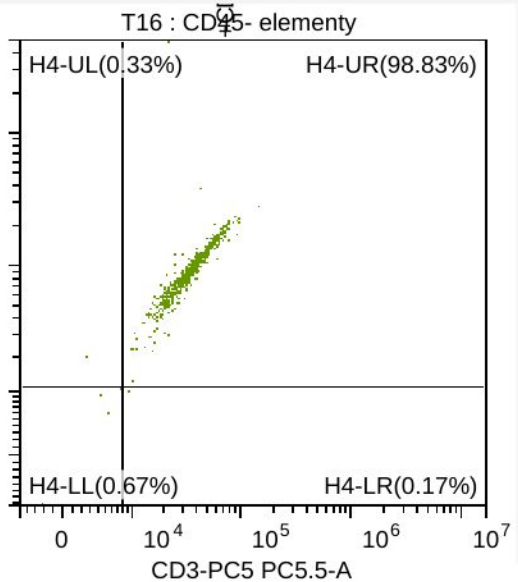












FACS:
Počet analyzovaných elementů:
55 ly, 222 leuko, 1976 elem

Většina přítomných CD45- elementů s vysokým FS/SS vykazuje nespecifický přesvit ve všech FL kanálech

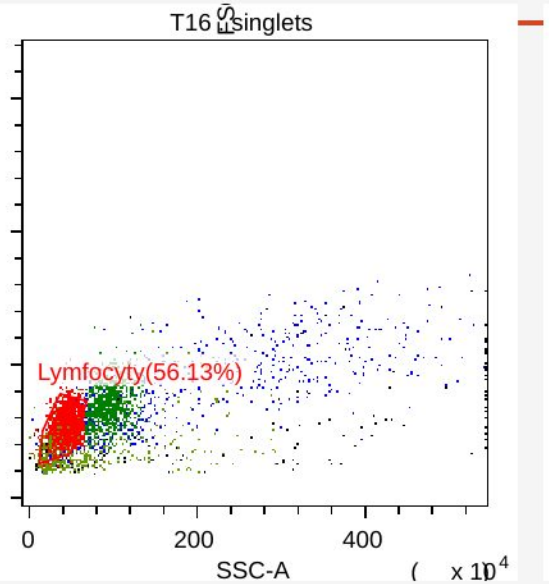
Obraz infiltrace CNS buňkami karcinomu

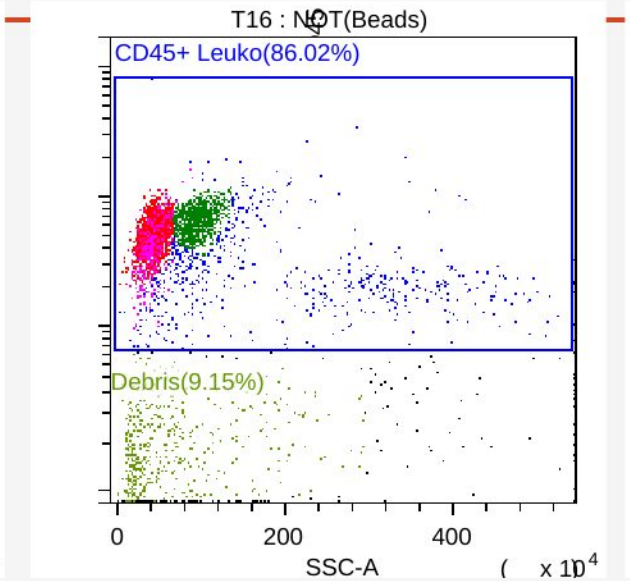
Parametr	Hodnoty v CFS	Referenční mez
Albuminový kvocient	8,66	0,00 – 9,00
IgA	----	0,20 – 3,40 mg/l
IgG	69 ↑	< 40,00 mg/l
IgM	----	< 1,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgA	----	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgG	0,00	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgM	----	< 0,00 mg/l
KEB	- 83,8 ↓↓↓	28,0 – 38,0
Apolipoprotein B	----	0,5 – 2,0 mg/l
CXCL13	< 500 ↑↑↑	0,0 – 40,0 ng/l

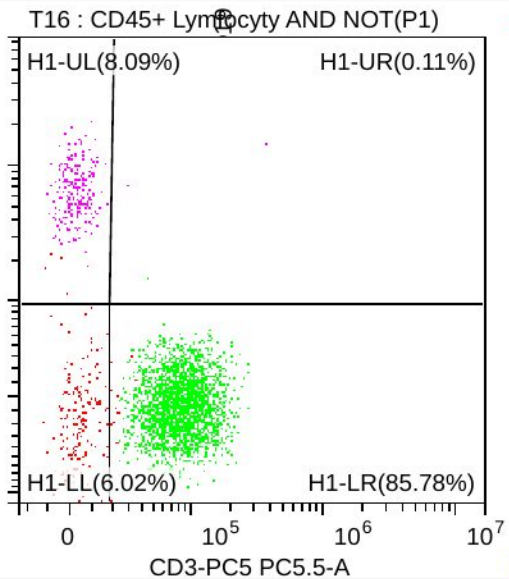
Závěr: tumorózní pleocytóza – obraz maligního postižení mozkomíšních plen v.s. karcinomatóza s výrazně sníženou energetikou, dle FACS se jedná o neleukocytární elementy CD45- s ↑↑↑ FS/SS a nespecifickým přesvitem ve všech FL kanálech = metastázy adenokarcinomu původem ze zažívacího traktu v UZL, pleurálním výpotku

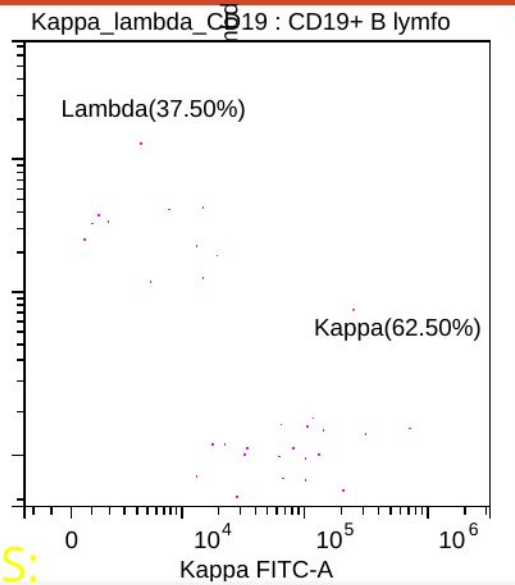
Obraz infiltrace CNS buňkami karc

Žena, 1953, dg. G98 (jiné poruchy nervové soustavy), neurologie

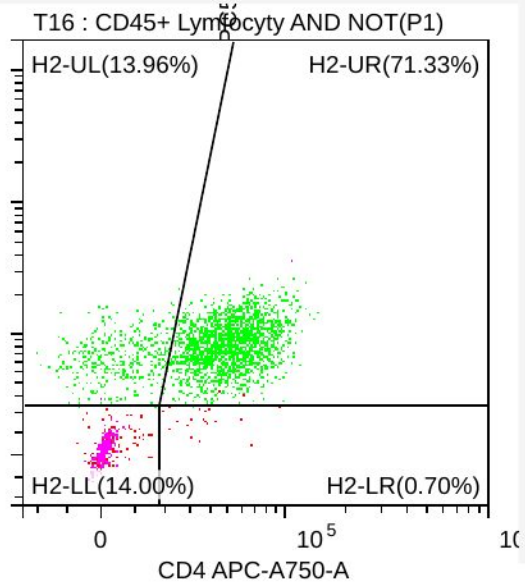


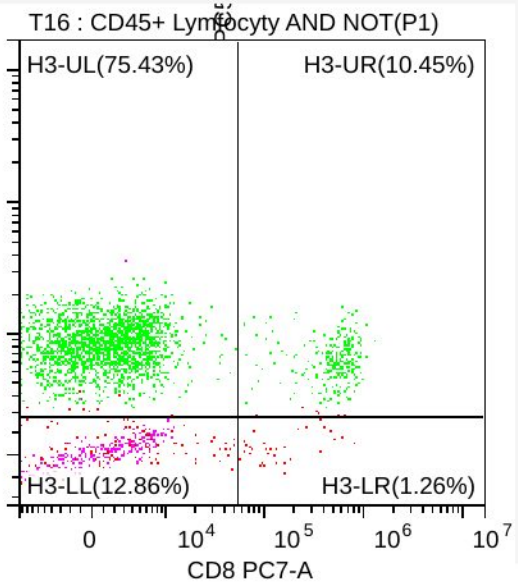


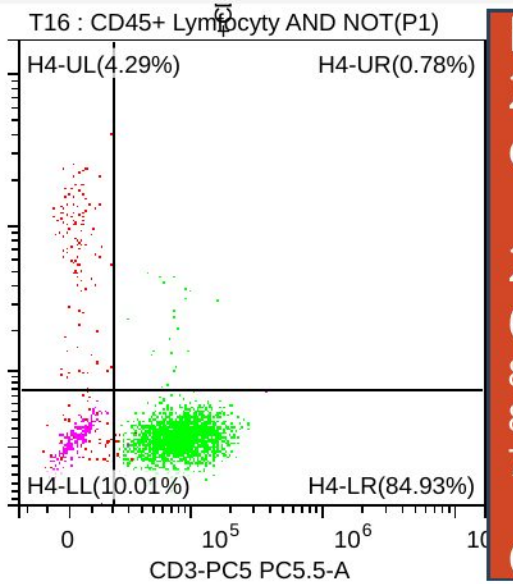




FACS:







Počet analyzovaných elementů: 2 800 ly, 4 400 leuko, 6 100 elem

20 % CD14+ monocyty
64,4 % lymfocyty
8,1 % CD19+CD20+CD5-CD10- κ/λ = 1,5
86,7 % CD3+CD5+HLADRdim T ly s IRI = 7,4

Cca 20 % CD45- spíše nižší

Obraz infiltrace CNS buňkami karcinomu

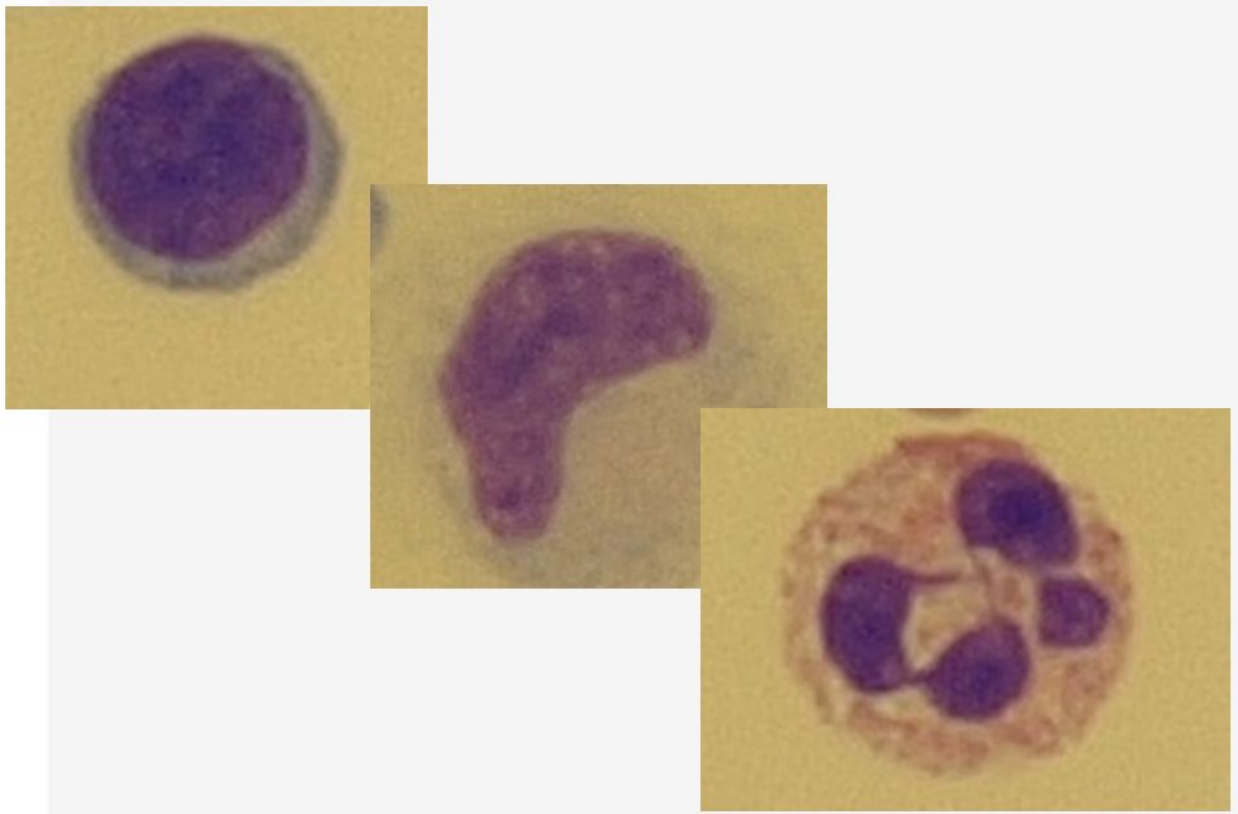
Parametr	Hodnoty v CFS	Referenční mez
Albuminový kvocient	34,9 ↑↑	0,00 – 9,00
IgA	61,8 ↑↑	0,20 – 3,40 mg/l
IgG	234 ↑↑	< 40,00 mg/l
IgM	9,71 ↑↑	< 1,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgA	0,00	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgG	0,00	< 0,00 mg/l
Intrathek. syntéza IgM	0,00	< 0,00 mg/l
KEB	12,8↓↓	28,0 – 38,0
Apolipoprotein B	4,1	0,5 – 2,0 mg/l
CXCL13	125 ↑↑	0,0 – 40,0 ng/l
elementy	102 ↑ (100 % mononukleáry,	< 10 ks/3 µl

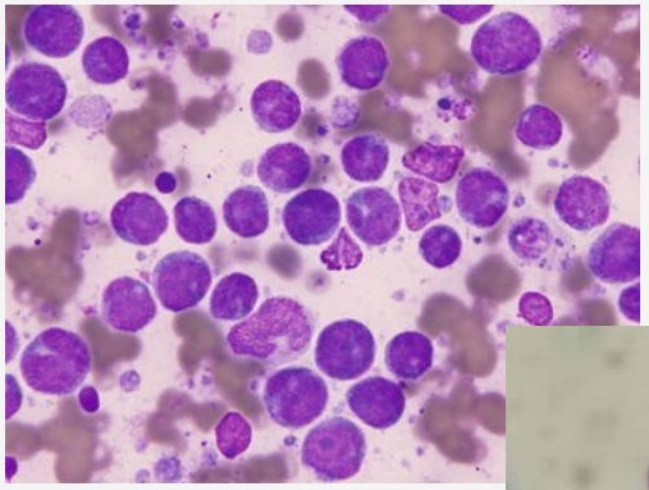
Závěr: tumorózní pleocytóza – se sníženou energetikou, elevací celkové bílkoviny a těžkou poruchou HLB a tkáňovou destrukcí – obraz karcinomatózy mozkomíšních plen,
dle FACS dominují leukocytární buňky s převahou fenotypově normálních lymfocytů, CD45- populaci tvoří cca 20 % elementů se spíše nižším FS/SS, nelze vyloučit přítomnost maligních buněk neleukocytárního původu

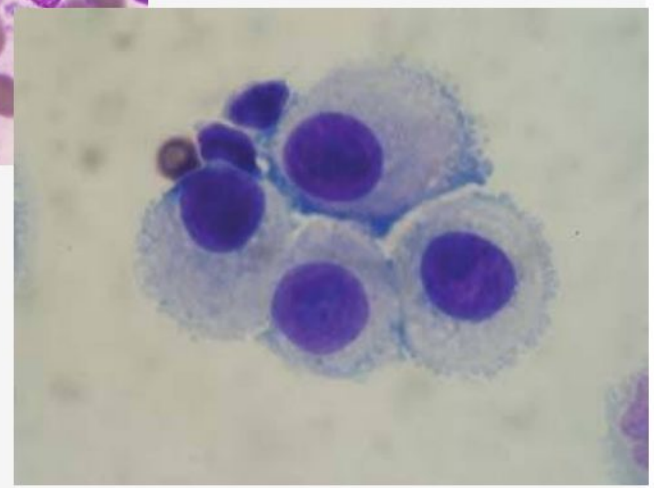
Závěr

- **Průtoková cytometrie likvoru je citlivá metoda** umožňující detailní imunofenotypizaci buněčných populací v CNS.
- Má význam zejména při **průkazu a charakterizaci leukemické či lymfomové infiltrace** centrálního nervového systému.
- Umožňuje **rychlou identifikaci aberantních a klonálních buněčných populací**, často i při velmi nízké celularitě vzorku.
- Klíčovým faktorem je **správná preanalytická fáze** – rychlé doručení a šetrné zpracování likvoru.
- Výsledek je nutné vždy hodnotit **v kontextu klinického obrazu, cytologického nálezu a dalších laboratorních vyšetření** (biochemie, imunologie, mikrobiologie).
- Průtoková cytometrie tak představuje **důležitý pomocný nástroj pro diagnostiku, diferenciální diagnostiku a monitorování onemocnění CNS**.

Děkuji za pozornost







Zdroj: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2017/BLKLK051c/um/vysetreni_mozkomisniho_moku/pages/04-cytologicke-vysetreni.html
https://www.leukemia-cell.org/atlas/index.php?pg=images--mature-b-cell-neoplasms--dlbcl--common-morphological-variants--immunoblas