

Cytologie a energetika jako důležité atributy vyšetření likvoru

P. Kelbich^{1,2,3,4}, A. Hejčl^{5,6}, J. Procházka⁷, E. Hanuljaková^{2,4,8}, J. Peruthová^{1,4}, J. Špička²

¹ Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Kadaň s.r.o.

² Oddělení klinické biochemie, Krajská zdravotní, a.s. - Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

³ Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

⁴ Laboratoř pro likvorologii a neuroimunologii - Topelex s.r.o., Praha

⁵ Neurochirurgická klinika Univerzity J. E. Purkyně, Krajská zdravotní, a.s. - Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

⁶ Mezinárodní centrum klinického výzkumu, Brno

⁷ Oddělení intenzivní medicíny, Krajská zdravotní, a.s. - Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

⁸ Oddělení klinické biochemie, Krajská zdravotní, a.s. - Nemocnice Most, o.z.

SOUHRN

Cíl studie: Zhodnocení významu společného cytologického vyšetření likvoru a energetických poměrů v likvorovém kompartmentu pro detekci a určení charakteru zánětlivého procesu v centrálním nervovém systému.

Typ studie: Retrospektivní studie.

Název a sídlo pracoviště: Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Kadaň s.r.o.; Oddělení klinické biochemie, Krajská zdravotní, a. s., Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o. z.; Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze; Laboratoř pro likvorologii a neuroimunologii - Topelex s.r.o., Praha; Neurochirurgická klinika Univerzity J. E. Purkyně, Krajská zdravotní, a. s. - Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.; Mezinárodní centrum klinického výzkumu, Brno; Oddělení intenzivní medicíny, Krajská zdravotní, a.s. - Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.; Oddělení klinické biochemie, Krajská zdravotní, a.s. - Nemocnice Most, o.z.

Materiál a metody: Vyšetřili jsme 437 vzorků likvoru pacientů se serózními záněty centrálního nervového systému (170), s purulentními záněty centrálního nervového systému (121), se záněty s oxidačním vzplanutím makrofágů v centrálním nervovém systému (25) a pacientů bez postižení centrálního nervového systému (121). Pro statistické hodnocení energetických poměrů v likvorovém kompartmentu jsme použili Fisherův F-test a Studentův t-test a pro společné hodnocení cytologických obrazů likvoru a energetických poměrů v likvorovém kompartmentu jsme použili výpočtu specificit, senzitivit a diagnostických účinností.

Výsledky: Mezi uvedenými skupinami pacientů jsme zjistili statisticky vysoce významné rozdíly ($p < 0,001$) rozptylů i průměrů hodnot koeficientu energetické bilance. Při společném hodnocení cytologických obrazů CSF a energetických poměrů v likvorovém kompartmentu jsme dospěli k velmi dobrým výsledkům ve skupině pacientů se serózními záněty CNS infekční etiologie (specifická = 100,0 %, senzitivita = 97,1 % a diagnostická účinnost = 98,9 %), ve skupině pacientů s purulentními záněty CNS bakteriální etiologie (specifická = 100,0 %, senzitivita = 96,7 % a diagnostická účinnost = 99,1 %), ve skupině pacientů s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS infekční etiologie (specifická = 98,6 %, senzitivita = 100,0 % a diagnostická účinnost = 98,6 %) i ve skupině pacientů s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS nádorové etiologie (specifická = 98,8 %, senzitivita = 100,0 % a diagnostická účinnost = 98,9 %).

Závěr: V našem souboru vyšetřených pacientů vedlo společné hodnocení cytologických obrazů likvoru a energetických poměrů v likvorovém kompartmentu ke spolehlivé diferenciaci postižení centrálního nervového systému na serózní záněty, na purulentní záněty a na záněty s oxidačním vzplanutím makrofágů. Následně byly tímto způsobem umožněny efektivnější specifikace příslušných patogenních agens a v některých případech odhalení nádorové infiltrace mening.

Klíčová slova: Cytologický obraz CSF, koeficient energetické bilance, serózní zánět CNS, purulentní zánět CNS, oxidační vzplanutí makrofágů v CNS

SUMMARY

Kelbich P., Hejčl A., Procházka J., Hanuljaková E., Peruthová J., Špička J.: Cerebrospinal fluid cytology and energy balance as important attributes of cerebrospinal fluid examination

Objective: Evaluate the significance of combined cytology and energy balance in the cerebrospinal fluid compartment for the detection and characterization of the inflammatory processes in the central nervous system (CNS).

Design: Retrospective study.

Settings: Department of Clinical Biochemistry, Haematology and Immunology, Hospital Kadaň; Department of Clinical Biochemistry, Masaryk Hospital in Ústí nad Labem; Institute of Clinical Immunology and Allergy, Faculty of Medicine Hradec Králové, Charles University Prague; Laboratory for Liquorology and Neuroimmunology Topelex, Prague; Department of Neurosurgery, J. E. Purkyně University, Masaryk Hospital in Ústí nad Labem; International Clinical Research Center, Brno; Department of Intensive Care Medicine, Masaryk Hospital in Ústí nad Labem; Department of Clinical Biochemistry, Hospital Most.

Material and Methods: We examined 437 cerebrospinal fluid (CSF) specimens in patients with serous inflammations of infectious etiology in the CNS (170), purulent inflammations bacterial etiology in the CNS (121), inflammations with oxidative burst of macrophages of infectious and tumorous etiology in the CNS (25) and in patients without CNS impairment (121). We used the Fisher's F-test and the Student's t-test for the statistical evaluation of the energy balance in the cerebrospinal fluid compartment. We subsequently counted the specificities, sensitivities and diagnostic efficiencies for the combined evaluation of the cytological picture of the CSF and energy balance in the CSF compartment.

Results: We found highly statistically significant differences ($p < 0.001$) between the variations and the mean values of coefficients of energy balance in all our groups of patients. We achieved very good results in combined evaluations of cytological pictures and the energy balance in the CSF compartment in the group of patients with serous inflammations in the CNS of infectious etiology (specificity = 100.0 %, sensitivity = 97.1 % and diagnostic efficiency = 98.9 %), in the group of patients with purulent inflammation in the CNS bacterial etiology (specificity = 100.0 %, sensitivity = 96.7 % and diagnostic efficiency = 99.1 %), in the group of patients with oxidative burst of macrophages in the CNS infectious etiology (specificity = 98.6 %, sensitivity = 100.0 % and diagnostic efficiency = 98.6 %) and also in the group of patients with oxidative burst of macrophages in the CNS of tumorous etiology (specificity = 98.8 %, sensitivity = 100.0 % and diagnostic efficiency = 98.9 %).

Conclusion: Combined evaluation of the cytological pictures and energy balance in the CSF compartment led to reliable differentiation of the CNS impairment into the serous inflammations, the purulent inflammations and the inflammations with oxidative burst of macrophages in our group of patients. It was subsequently possible to specify the correct pathogens more effectively and to identify tumour infiltration of meninges in some cases.

Key words: cytological picture of the CSF, coefficient of energy balance, serous inflammation in the CNS, purulent inflammation in the CNS, inflammation with oxidative burst of macrophages in the CNS

Úvod

Centrální nervový systém (CNS) je vystaven působení vnějších a vnitřních faktorů, které by mohly vést k porušení jeho integrity. Proti těmto tendencím působí obranné mechanismy. Pokud jejich intenzita překročí určitou mez, hovoříme o zánětu. Zánětlivý proces probíhající v CNS se obvykle promítá do složení likvoru (CSF, z angl. cerebrospinal fluid = mozkomíšni mok). Naším cílem je CSF analyzovat, zánětlivý proces v CNS detekovat a určit jeho charakter. Určení charakteru zánětlivé reakce pak může významně usnadnit odhalení příčiny postižení CNS. Na úrovni základního vyšetření CSF provádíme určení charakteru zánětlivého procesu v CNS pomocí cytologického vyšetření CSF a vyšetření energetických poměrů v likvorovém kompartmentu [15, 16].

Za normálního stavu CNS je v CSF přítomno do 10 leukocytů/3 μ l, resp. do 4 leukocytů/1 μ l, s převahou lymfocytů nad monocytů [1, 3, 8]. V CSF je také rozpuštěno dostatečné množství kyslíku umožňující produkci energie převážně aerobním způsobem, tzn. s vysokou produkcí adenosintrifosfátu (ATP) vyjádřenou vysokou hodnotou koeficientu energetické bilance (KEB > 28,0) [15, 16].

Zánětlivá odpověď v CNS obvykle vede ke kumulaci a aktivaci imunokompetentních buněk v CSF. To má za následek zvýšenou spotřebu glukózy a kyslíku, a tím pádem zvýšený rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu [6]. Anaerobní metabolismus je energeticky málo efektivní, a proto při jeho zvyšujícím se rozsahu dochází ke snížení produkce ATP vyjádřené snížením hodnoty KEB. Popsaný stav bývá typický pro tzv. serózní zánětlivé procesy v CNS. Jejich příčina může být infekční (viry, *Borrelia sp.*, *Treponema pallidum* atd.), autoimunitní či reparační a regenerační ve smyslu úklidových reakcí. Podstatou serózního zánětu může být např. Th2 imunitní reakce vedoucí k produkci protilátek, reakce s dominujícím účinkováním cytotoxických elementů atd. Převážně se tedy jedná o zapojení složek specifické imunity do zánětlivého procesu s dominujícím postavením lymfocytárních elementů [11, 12, 17, 18]. Typickým cytologickým obrazem CSF pacientů se serózními záněty CNS je proto lymfocytární pleocytóza. V časných stadiích infekce CNS ale spočívá těžiště zánětlivé odpovědi na složkách nespecifické imunity. V takových případech je obvyklým cytologickým nálezem neutrofilní granulocytární pleocytóza (N granulocytární pleocytóza) [1, 3, 16].

Velmi vysoký rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu vyjádřený nízkou hodnotou KEB lze pozorovat při razantních zánětech v CNS s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů. Podstatou tohoto procesu je aktivace NADPH-oxidázy vedoucí k produkci volných kyslíkových radikálů [10]. Těmi fagocyty likvidují pohlcená infekční agens. Při oxidačním vzplanutí dochází k vysoké spotřebě kyslíku a k intenzivnímu rozvoji anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu. V případě oxidačního vzplanutí neutrofilních granulocytů (mikrofágů) se jedná o purulentní zánětlivý proces. Ten bývá obvykle iniciován extracelulárními bakteriemi [5, 12, 14, 17]. Je ale popsána i jeho neinfekční příčina u některých pacientů s ischemizací tkáně mozku následkem vasospasmů po atace subarachnoidálního krvácení [9, 20, 22, 23]. Pro purulentní zánět infekční i neinfekční příčiny je typická N granulocytární pleocytóza v cytologickém obraze CSF [1, 3].

Oxidační vzplanutí též bývá jedním z projevů aktivovaných makrofágů. Klíčovou roli při iniciaci tohoto zánětlivého procesu hrají buňky specifické imunity, konkrétně Th1 lymfocyty (CD4+) produkující interferon- γ , kterým aktivují makrofágy. Tento zánětlivý proces bývá vyvolán přítomností intracelulárních bakterií, kvasinek či plísní a může mít též neinfekční příčinu v podobě nádorového procesu [4, 7, 12, 19, 21, 25]. Při postižení CNS zánětem tohoto charakteru také dochází k vysokému rozsahu anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu a zároveň k dominujícímu výskytu jiných elementů nežli neutrofilních granulocytů v cytologickém obraze CSF [16].

Materiál a metody

Soubor 437 pacientů byl rozdělen do 4 skupin na pacienty bez známek postižení CNS ($n = 121$), na pacienty se serózním zánětlivým postižením CNS virové či boreliové etiologie ($n = 170$), na pacienty s purulentním zánětlivým postižením CNS s extracelulárními bakteriemi v patogenezi ($n = 121$) a na pacienty s oxidačním vzplanutím makrofágů ($n = 25$) s intracelulárními bakteriemi a mykotickými agens v patogenezi ($n = 9$) a s nádorovou infiltrací mening ($n = 16$).

U všech pacientů bylo provedeno vyšetření permeability hematollikvorové bariéry stanovením koncentrace „celkové bílkoviny“ v CSF, vyšetření buněčnosti CSF ve

Fuchsově-Rosenthalově komůrce, vyšetření buněčné skladby CSF odečtením trvalého cytologického preparátu CSF připraveného cytosedimentační či cytocentrifugační technikou a obarveného dle Maye-Grünwalda a Giemsa-Romanovského a vyšetření energetických poměrů v likvorovém kompartmentu stanovením koncentrací glukózy a laktátu v CSF a výpočtem koeficientu energetické bilance:

$$KEB = 38 - 18 * \frac{[laktát_{CSF}]}{[glukóza_{CSF}]}$$

Ten vyjadřuje průměrný počet molekul adenosintri-fosfátu vyprodukovaných za aktuálních energetických poměrů v likvorovém kompartmentu z jedné molekuly glukózy [13].

Stanovení koncentrací „celkové bílkoviny“ v CSF bylo ve všech případech provedeno pyrogallolovou červení, stanovení koncentrací glukózy v CSF bylo provedeno enzymatickými metodami s glukózooxidázou a peroxidázou a s hexokinázou a stanovení koncentrací laktátu v CSF bylo provedeno enzymatickou metodou s laktát oxidázou a peroxidázou.

Pro porovnání shody energetických poměrů v likvorovém kompartmentu ve výše uvedených skupinách pacientů byly použity Fisherův F-test a Studentův

t-test. Dále byl proveden výpočet specifit, senzitivit a diagnostických účinností cytologických obrazů CSF a energetických poměrů v likvorovém kompartmentu ve výše uvedených skupinách pacientů.

Výsledky a diskuse

Stanovení koncentrací „celkové bílkoviny“ v CSF patří mezi parametry základní likvorologie a bylo tudíž provedeno u všech pacientů našeho souboru. Ve všech skupinách, vyjma kontrolní skupiny pacientů bez postižení CNS, jsou patrné výrazné rozptyly výsledných hodnot tohoto parametru (Tabulka 1). Na vysokých koncentracích „celkové bílkoviny“ v CSF se zcela jistě podílí změna permeability endotelu cév chorioidálního plexu a mozkových kapilár při zánětlivém postižení CNS. Tento jev obvykle označujeme jako zvýšenou permeabilitu hematolikvorové bariery. Ta může být zapříčiněna též periferní přítomností zánětlivého procesu. Na zvýšených koncentracích „celkové bílkoviny“ v CSF se ale u řady pacientů podílí též zhoršená cirkulace CSF [2, 24]. Koncentraci „celkové bílkoviny“ v CSF sice považujeme za důležitý ukazatel změn v likvorovém kompartmentu, ale z výše uvedených důvodů nikoliv za spolehlivý marker zánětlivého postižení CNS a při dalším hodnocení s ním neuvažujeme.

Table 1: The results of the examination of CSF in 4 groups of patients.

CSF	K	S	P	M	M - infections	M - tumors
number of specimens	121	170	121	25	9	16
total protein in CSF – average value [mg.l ⁻¹]	320.0	950.0	5 778.0	3 198.0	3 188.0	3 204.0
total protein in CSF – minimal value [mg.l ⁻¹]	140.0	137.0	620.0	411.0	1 419.0	411.0
total protein in CSF – maximal value [mg.l ⁻¹]	484.0	13 025.0	28 900.0	8 609.0	6 926.0	8 609.0
average number of nuclear elements/3 µl	3.6	823	11 386	490	463	506
minimal number of nuclear elements/3 µl	0	2	35	1	46	1
maximal number of nuclear elements/3 µl	10	7 168	94 720	3 328	822	3 328
average frequency of lymphocytes [%]	58.4	61.8	5.9	42.6	75.1	25.7
average frequency of monocytes [%]	40.5	22.7	16.5	37.9	30.5	44.6
average frequency of neutrophile granulocytes [%]	1.2	15.0	77.5	1.9	3.3	1.0
average frequency of eosinophile granulocytes [%]	0.0	0.5	0.2	0.4	0.6	0.3
average frequency of tumorous elements [%]	0.0	0.0	0.0	23.8	0.0	30.5
glucose in CSF – average value [mmol.l ⁻¹]	3.56	3.25	1.11	1.96	1.87	2.01
lactate in CSF – average value [mmol.l ⁻¹]	1.42	2.23	9.95	6.65	6.18	6.92
KEB – average value	30.71	25.27	-3 727.0	-54.0	-37.77	-62.38
KEB –minimal value	28.52	11.45	-66 112.0	-305.69	-91.34	-305.69
KEB – maximal value	34.92	33.22	5.20	8.80	8.80	8.56
KEB – standard deviation	1.15	4.14	9 792.57	73.62	85.43	41.14

K = control group of the patients without disability of the CNS; S = the patients with serous inflammation of infectious etiology in the CNS; P = the patients with purulent inflammation of bacterial etiology in the CNS; M = the patients with oxidative burst of macrophages of infectious and tumorous etiology in the CNS

Za dominující ukazatele na úrovni základního vyšetření CSF tedy považujeme buněčnou skladbu CSF, která odhaluje imunokompetentní elementy, podílející se na příslušné zánětlivé odpovědi v CNS, a energetické poměry v likvorovém kompartmentu, které vypovídají o funkčním stavu těchto elementů v CNS.

Statisticky vysoce významné rozdíly rozsahů anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu, vyjádřeného hodnotami KEB, mezi všemi vyšetřovanými skupinami pacientů a rozmanité cytologické obrazy CSF u těchto pacientů svědčí o rozmanitosti zánětlivých procesů v CNS (obr. 1, Tabulka 2).

ve smyslu lymfocytární či monocytární oligocytózy nasvědčovaly reaktivním změnám v likvorovém kompartmentu indukovaným periferními záněty. Jeden případ granulocytární oligocytózy byl zapříčiněn arteficiální příměsí krve (obr. 1, Tabulka 1, 3).

Typickým cytologickým obrazem CSF pacientů se serózními záněty CNS infekční etiologie (S) je lymfocytární pleocytóza [1, 3]. Zároveň lze v likvorovém kompartmentu takto postižených pacientů předpokládat zvýšený rozsah anaerobního metabolismu na úrovni odpovídající zvýšeným energetickým nárokům aktivovaného imunitního systému v CNS (obr. 1, Tabulka 1, 3). V rámci našeho soubo-

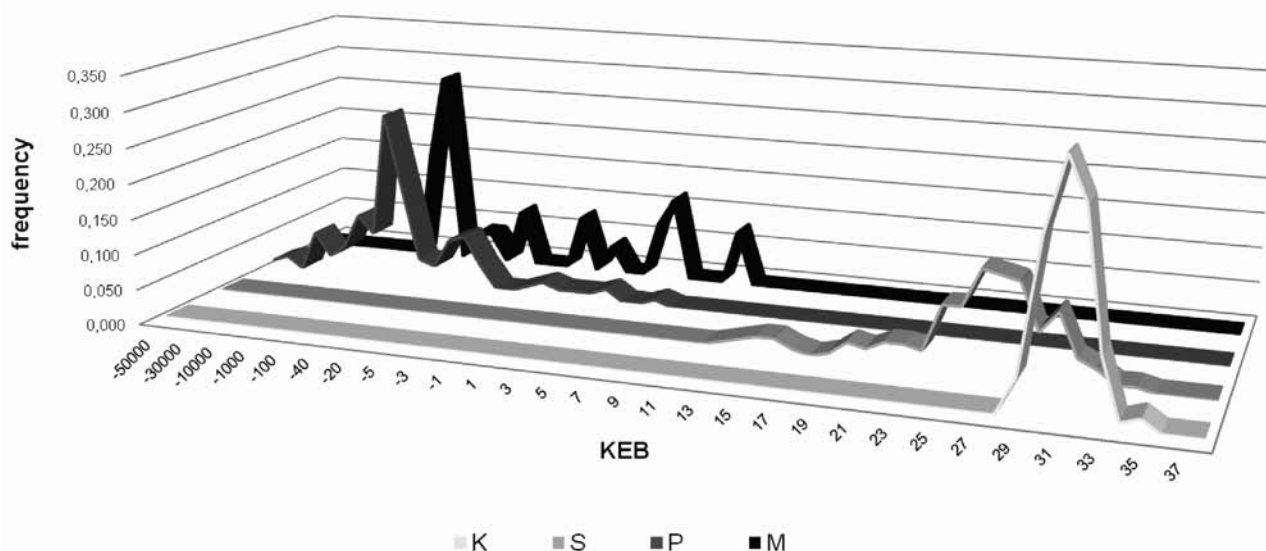


Fig. 1: Frequencies of values of KEB in 4 groups of examined patients.

K = control group of patients without CNS impairment; S = patients with serous inflammation of infectious etiology of the CNS; P = patients with purulent inflammation of bacterial etiology of the CNS; M = patients with oxidative burst of macrophages of infectious and tumorous etiology of the CNS

Table 2: Testing concordance of variances and mean values of KEB among the 4 groups of examined patients (Fisher's F-test/Student's t-Test).

	K	S	P
S	p<0.001/ p<0.001	x	
P	p<0.001/ p<0.001	p<0.001/ p<0.001	x
M	p<0.001/ p<0.001	p<0.001/ p<0.001	p<0.001/ p<0.001

K = control group of patients without CNS pathology; S = patients with serous inflammation of infectious etiology in the CNS; P = patients with purulent inflammation of bacterial etiology in the CNS; M = patients with oxidative burst of macrophages of infectious and tumorous etiology in the CNS

Kontrolní skupina pacientů bez postižení CNS (K) je charakterizována normální permeabilitou hemato-likvorové bariery a vysokými hodnotami KEB (>28,0) vyjadřujícími normální energetické poměry v likvorovém kompartmentu. Počet buněk v CSF odpovídá nutnému imunitnímu dozoru v této lokalitě při absenci patologického procesu v CNS. Převažuje nález lymfocytárních elementů nad elementy monocytárními. Mírné alterace v cytologických obrazech CSF pacientů této skupiny

ru jsme skutečně zjistili ve skupině pacientů se serózními záněty vysokou specificitu (97,0 %), ale méně uspokojivou senzitivitu (74,1 %) cytologických obrazů odpovídajících lymfocytární pleocytóze (Tabulka 4). Příčinou snížené senzitivity byl především nezanedbatelný počet pacientů s N granulocytárními pleocytózami (v jednom případě oligocytózou) ve velice časných stadiích postižení, kdy bezprostřední reakci na infekční postižení CNS zajišťují složky nespecifické imunity, tedy i neutrofilní granulocyty. Naopak další část skupiny tvořili pacienti v pozdějším stadiu onemocnění a s převažujícím výskytem monocytárních elementů v cytologickém obraze CSF (Tabulka 3).

Co se týká jak energetických poměrů v likvorovém kompartmentu u pacientů se serózními záněty CNS, tak oblasti hodnot KEB>10,0, mezi nimiž jsme nezaregistrovali žádný případ pacienta se zánětem s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů v CNS, odpovídala velmi vysoká senzitivita 100,0 %. Neuspokojivé úrovně ale dosáhla specificita (54,7 %). Tento stav byl způsoben současným výskytem pacientů kontrolní skupiny bez postižení CNS v této oblasti hodnot KEB. Při vymezení rozsahu hodnot KEB od 10,0 do 28,0 jsme tyto pacienty eliminovali a dosáhli jsme tak 100,0 % specificitu pro skupinu pacientů se serózními záněty CNS, ovšem za cenu poklesu senzitivity (77,1 %) (Tabulka 4).

Table 3: Numbers and frequencies of the cytological findings in the CSF in the 4 groups of patients.

number (frequency [%])	K	S	P	M	M - infections	M - tumors
normal finding	61 (50.4)	0	0	0	0	0
lymphocytic oligocytosis	17 (14.1)	3 (1.8)	0	0	0	0
monocytic oligocytosis	42 (34.7)	1 (0.6)	0	1 (4.0)	0	1 (6.25)
neutrophile granulocytic oligocytosis	1 (0.8)	1 (0.6)	0	0	0	0
tumorous oligocytosis	0	0	0	1 (4.0)	0	1 (6.25)
lymphocytic pleocytosis	0	126 (74.1)	1 (0.8)	7 (28.0)	7 (77.8)	0
monocytic pleocytosis	0	13 (7.6)	3 (2.5)	4 (16.0)	2 (22.2)	2 (12.5)
neutrophile granulocytic pleocytosis	0	26 (15.3)	117 (96.7)	0	0	0
tumorous pleocytosis	0	0	0	12 (48.0)	0	12 (75.0)

K = control group of patients without CNS pathology; S = patients with serous inflammation of infectious etiology in the CNS; P = patients with purulent inflammation of bacterial etiology in the CNS; M = patients with oxidative burst of macrophages of infectious and tumorous etiology in the CNS

Table 4: Specificities, sensitivities and diagnostic efficiencies of cytological findings in the CSF and values of KEB in the 3 groups of patients with CNS pathology.

		S	P	M	M-infections	M - tumors
lymphocytic pleocytosis	specificity [%]	97.0	x	70.1	70.6	x
	sensitivity [%]	74.7	x	28.0	77.8	x
	dg. efficiency [%]	88.3	x	66.6	71.9	x
neutrophile granulocytic pleocytosis	specificity [%]	x	91.8	x	x	x
	sensitivity [%]	x	96.7	x	x	x
	dg. efficiency [%]	x	93.1	x	x	x
tumorous oligocytosis or pleocytosis	specificity [%]	x	x	100.0	x	100.0
	sensitivity [%]	x	x	52.0	x	81.3
	dg. efficiency [%]	x	x	97.3	x	99.3
KEB >10.0	specificity [%]	54.7	x	x	x	x
	sensitivity [%]	100.0	x	x	x	x
	dg. efficiency [%]	72.3	x	x	x	x
KEB >10.0 and <28.0	specificity [%]	100.0	x	x	x	x
	sensitivity [%]	77.1	x	x	x	x
	dg. efficiency [%]	91.9	x	x	x	x
KEB <10.0	specificity [%]	x	92.1	70.6	68.0	69.1
	sensitivity [%]	x	100.0	100.0	100.0	100.0
	dg. efficiency [%]	x	94.3	72.3	68.6	70.3

S = patients with serous inflammation of infectious etiology in the CNS; P = patients with purulent inflammation of bacterial etiology in the CNS; M = patients with oxidative burst of macrophages of infectious and tumorous etiology in the CNS

Nejpříznivější diagnostické situace ve skupině pacientů se serózními záněty CNS infekční etiologie tak bylo dosaženo až při společném hodnocení lymfocytární, nebo N granulocytární, nebo monocytární pleocytózy v cytologickém obraze CSF při současných energetických poměrech v likvorovém kompartmentu charakterizovaných hodnotou KEB>10,0, kdy specifita dosáhla hodnoty 100,0 % a senzitivita 97,1 % (Tabulka 5).

Tyto výsledky evokují úvahu o rozmanitých klinických projevech serózních zánětů v CNS infekční etiologie, a tudíž rozmanité potřebě pacientů vyhledat odbornou pomoc a absolvovat diagnostický odběr CSF. V této skupině pacientů se tak můžeme setkat s velice včasným záchytem neutrofilních granulocytů, přes pozdější odběr CSF, kdy již došlo k plné aktivaci složek specifické imunity představované lymfocytárními

mi elementy až po delší prodlevu mezi začátkem onemocnění a vyšetřením CSF, kdy již můžeme registrovat nastupující pozánětlivou úklidovou reakci s dominujícím zastoupením monocytárně-makrofagických elementů. Pro všechny případy je ale společný normální nebo jen mírně zvýšený rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu na úrovni odpovídající zvýšeným energetickým nárokům aktivovaného imunitního systému v CNS.

Pro purulentní záněty v CNS bakteriální etiologie (P) je typická N granulocytární pleocytóza v cytologickém obraze CSF a velmi vysoký rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu odpovídající oxidačnímu vzplanutí neutrofilních granulocytů [1, 2, 3, 15, 16]. Tomu nasvědčují i výsledky vyšetření CSF v našem souboru pacientů (obr. 1, Tabulka 1, 3). Neuro-

Table 5: Specificities, sensitivities and diagnostic efficiencies of combined evaluations of cytological findings in the CSF and values of KEB in the 3 groups of patients with CNS pathology.

		S	P	M	M-infections	M - tumors
lymphocytic or monocytic or N granulocytic pleocytosis and KEB>10.0	specificity [%]	100.0	x	x	x	x
	sensitivity [%]	97.1	x	x	x	x
	dg. efficiency [%]	98.9	x	x	x	x
N granulocytic pleocytosis and KEB<10.0	specificity [%]	x	100.0	x	x	x
	sensitivity [%]	x	96.7	x	x	x
	dg. efficiency [%]	x	99.1	x	x	x
lymphocytic or monocytic pleocytosis and KEB<10.0	specificity [%]	x	x	99.0	98.6	x
	sensitivity [%]	x	x	44.0	100.0	x
	dg. efficiency [%]	x	x	95.9	98.6	x
monocytic or tumorous oligocytosis or pleocytosis and KEB<10.0	specificity [%]	x	x	99.3	x	98.8
	sensitivity [%]	x	x	72.0	x	100.0
	dg. efficiency [%]	x	x	98.2	x	98.9

S = patients with serous inflammation of infectious etiology in the CNS; P = patients with purulent inflammation of bacterial etiology in the CNS; M = patients with oxidative burst of macrophages of infectious and tumorous etiology in the CNS

filní granulocytární pleocytóza v cytologickém obraze CSF představovala v této skupině pacientů 91,8 % specificitu a 96,7 % senzitivitu (Tabulka 4). Příčinou mírně snížené specificity byl nález již zmíněných N granulocytárních pleocytóz u pacientů s včasnými záchyty serózních zánětů CNS. Příčinou mírně snížené senzitivity je pak několik chronicky postižených pacientů s dominující přítomností lymfocytárních či monocytárně-makrofagických elementů při purulentním zánětu a současně probíhající úklidové reakci. Velmi vysoký rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu vyjádřený hodnotami KEB < 10,0 pak vykazoval v této skupině pacientů vysokou specificitu 92,1 % a velmi vysokou senzitivitu 100,0 % (Tabulka 4). To, že specificita nedosáhla 100,0 % je zapříčiněno současným výskytem hodnot KEB < 10,0 u pacientů se záněty s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS. Při společném hodnocení neutrofilní granulocytární pleocytózy v cytologickém obraze CSF a vysokého rozsahu anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu vyjádřeného hodnotami KEB < 10,0 v našem souboru vyšetřených pacientů jsme dospěli k velmi vysoké úrovni specificity (100,0 %) i senzitivity (96,7 %) (Tabulka 5), což odpovídá podstatě tohoto typu zánětlivého procesu spočívající ve zcela dominujícím postavení neutrofilních granulocytů a jejich oxidačním vzplanutím.

Poslední skupinu tvoří pacienti se **záněty s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS infekční** (*Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Cryptococcus neoformans*) a nádorové etiologie (nádorové infiltrace mening). Malý počet vyšetření je zapříčiněn nižším výskytem těchto závažných postižení v populaci. Společným jevem pro tuto skupinu pacientů je vysoký rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu vyjádřený hodnotami KEB<10,0 (obr. 1, Tabulka 1). Cytologické obrazy CSF bylo ale nutné hodnotit v obou podskupinách samostatně i za cenu snížené validity výsledků z důvodu malého počtu vyšetřených pacientů. V našem souboru pacientů s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS infekční etiologie převažují v cy-

tologických obrazech CSF nálezy lymfocytární pleocytózy (Tabulka 3). Vzhledem k etiopatogenezi tohoto zánětu lze předpokládat, že se jedná převážně o Th1 lymfocyty. Ty ale nelze světelnou mikroskopií morfologicky odlišit od dalších subtypů lymfocytárních elementů, s nimiž se setkáváme v cytologických obrazech CSF pacientů se serózními záněty CNS, a které tím pádem podstatně snižují specificitu nálezu lymfocytární pleocytózy ve skupině pacientů se záněty s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS infekční etiologie (70,6 %) (Tabulka 4). Odlišit tyto dvě skupiny pacientů se podařilo společným hodnocením cytologických obrazů CSF a energetických poměrů v likvorovém kompartmentu. Akceptováním lymfocytární a monocytární pleocytózy (u protrahovaně probíhajících postižení) v cytologických obrazech CSF a vysokých rozsahů anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu jsme u pacientů s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS infekční etiologie v našem souboru dosáhli velmi vysoké specificity (98,6 %) i senzitivity (100,0 %) (Tabulka 5).

Nález tumorózní oligocytózy či pleocytózy v cytologickém obraze CSF je spolehlivým ukazatelem nádorové infiltrace mening [1,2,3]. V podskupině pacientů s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS nádorové etiologie našeho souboru jsme tuto situaci zaregistrovali v 81,25 % případů. Ve zbývajících případech se jednalo o monocytární oligocytózu a pleocytózu bez nálezu nádorových elementů v cytologickém obraze CSF (Tabulka 3). Ve všech těchto případech přispěl současně vysoký rozsah anaerobního metabolismu s hodnotami KEB<10,0 k odlišení cytologického nálezu s dominující přítomností monocytárních elementů v této podskupině pacientů s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS od kontrolní skupiny pacientů bez postižení CNS a pacientů se serózními záněty CNS infekční etiologie (Tabulka 5).

V souvislosti s našimi nálezy považujeme za důležité konstatovat, že zánětlivý proces s oxidačním vzplanutím makrofágů je podmíněn aktivací složek specifické imunity [12, 17]. Tzn., že se v plném rozsahu může projevit až s určitým časovým odstupem. V případech těž-

kých imunitních deficitů s výraznou insuficiencí CD4+ Th1 lymfocytů (např. při AIDS) pak k němu nemusí dojít vůbec. Z toho vyplývá, že normální (KEB>28,0) nebo jen mírně zvýšený rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu (KEB=10,0 až 28,0) ve všech případech spolehlivě nevyloučí závažné postižení CNS s účastí intracelulárních bakterií či mykotických agens v patogenezi nebo nádorovou infiltrací mening. Naproti tomu ale iniciace oxidačního vzplanutí makrofágů v CNS s vysokým rozsahem anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu (KEB<10,0) při absenci nebo jen minoritním zastoupení neutrofilních granulocytů v cytologickém obraze CSF může k odhalení těchto závažných postižení CNS úspěšně dovést.

Závěr

Cílem základního vyšetření CSF je detekce a určení charakteru zánětlivé odpovědi v CNS, které umožňují vymežit užší okruh možných příčin nebo určit konkrétní příčinu postižení CNS. Za klíčové považujeme společné hodnocení cytologických obrazů CSF popisující především přítomnost konkrétních imunokompetentních buněk typických pro konkrétní zánětlivou odpověď v CNS a úroveň energetických poměrů v likvorovém kompartmentu specifikující funkční stav těchto buněk. V kontrolní skupině pacientů bez postižení CNS jsme ve všech případech zjistili normální buněčnost CSF a vysoký rozsah aerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu vyjádřený hodnotami KEB>28,0. Mírné alterace cytologických obrazů u některých pacientů této skupiny byly způsobeny vlivem periferních zánětlivých změn a v jednom případě arteficiální příměsí krve. U pacientů se serózními záněty CNS infekční etiologie jsme nacházeli rozmanitou buněčnou skladbu CSF, závislou na stadiu onemocnění, tzn. od časných záchytů s převládající přítomností neutrofilních granulocytů, přes stadium plně rozvinuté specifické imunitní zánětlivé odpovědi s převahou lymfocytárních elementů až po nastupující pozánětlivou úklidovou reakci s dominujícím zastoupením monocytárně-makrofagických elementů. U všech pacientů této skupiny jsme zjistili energetické poměry v likvorovém kompartmentu na úrovni odpovídající zvýšeným energetickým nárokům aktivovaného imunitního systému (KEB=10,0 až 28,0), nebo na úrovni normální (KEB>28,0). Ve skupině pacientů s purulentními záněty CNS bakteriální etiologie byla s vysokou diagnostickou účinností potvrzena neutrofilní granulocytární pleocytóza v cytologických obrazech CSF a současně velmi vysoký rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu (KEB<10,0) odpovídající podstatě tohoto zánětlivého procesu, tedy oxidačnímu vzplanutí neutrofilních granulocytů. Současný nález vysokého rozsahu anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu (KEB<10,0) s absencí nebo s minoritním zastoupením neutrofilních granulocytů v cytologických obrazech CSF pak umožnil záchyt závažných postižení CNS u méně početné skupiny pacientů s oxidačním vzplanutím makrofágů v CNS s účastí intracelulárních bakterií nebo mykotických agens v patogenezi a s nádorovou infiltrací mening.

Literatura

1. **Adam, P.** *Cytologie likvoru*. 1st ed. Pardubice, Stapro, 1995.
2. **Adam, P., Táborský, L., Sobek, O. et al.** Cerebrospinal Fluid. In: Spiegel HE, Nowacki G, Hsiao K-J (eds). *Advances in Clinical Chemistry*. Volume 36. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press, 2001, p. 1-62.
3. **Adam, P., Táborský, L., Sobek, O., Kelbich, P.** *Cytology of Cerebrospinal Fluid*. 1st ed. Praha: Medica News Publishers, 2003, p. 3-80. ISBN 80-86284-35-2.
4. **Bhattacharyya, N., Pal, A., Patra, S., Haldar, A. K., Roy, S., Ray, M.** Activation of macrophages and lymphocytes by methylglyoxal against tumor cells in the host. *Int Immunopharmacol.*, 2008; 8(11), p. 1503-1512.
5. **Bogdan, Ch.** Oxidative burst without phagocytes: the role of respiratory proteins. *Nature immunology*, 2007; 8(10), p. 1029-1031.
6. **Brett, M. M.** Approach to the Patient with Abnormal Cerebrospinal Fluid Glucose Content. In: Irani, D. N. *Cerebrospinal fluid in clinical practice*. Philadelphia (PA): Saunders Elsevier, 2009, p. 282-284.
7. **VanderVen, B. C., Yates, R. M., Russell, D. G.** Intraphagosomal measurement of the magnitude and duration of the oxidative burst. *Traffic*, 2009 April; 10(4): 372-378.
8. **De Graaf, M. T., Smitt, P. A., Luitwieler, R. L. et al.** Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin Cytom.*, 2011; 80(1), p. 43-50.
9. **Fassbender, K., Hodapp, B., Rossol, S. et al.** Inflammatory cytokines in subarachnoid haemorrhage: association with abnormal blood flow velocities in basal cerebral arteries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2001; 70(4), p. 534-537.
10. **Forman, H. J., Torres, M.** Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. Respiratory burst in Macrophage Signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002; 166 (12), p. S4-S8.
11. **Hořejší, V.** T lymfocyty: signalizace a mezibuněčné interakce. In: Tlaskalová-Hogenová, H., Holáň, V., Bilej, M. (eds). *Buněčné a molekulární základy imunologie*. Praha: Česká imunologická společnost, 2007, p. 25-34.
12. **Hořejší, V., Bartůňková, J.** *Základy imunologie*. 4th ed. Praha: Triton, 2009, p. 33-195. ISBN 978-80-7387-280-9.
13. **Kelbich, P., Slavík, S., Jasanská, J. et al.** Hodnocení energetických poměrů v likvorovém kompartmentu pomocí vyšetřování vybraných parametrů metabolismu glukosy v CSF. *Klin. Biochem. Metab.*, 1998; 6(27), p. 213-225.
14. **Kelbich, P., Šimečková, M., Adam, P. et al.** Likvorové nálezy u pacienta s bakteriální meningitidou – kazuistika. *Klin. Biochem. Metab.*, 2002; 10(31), p. 54-68.
15. **Kelbich, P., Koudelková, M., Machová, H. et al.** Význam urgentního vyšetření mozkomíšního moku pro včasnou diagnostiku neuroinfekcí. *Klin mikrobiol inf lék*, 2007; 13(1), p. 9-20.
16. **Kelbich, P., Adam, P., Sobek, O. et al.** Základní vyšetření likvoru v diagnostice postižení centrálního nervového systému. *Neurol. pro praxi*, 2009; 10(5), p. 285-289.
17. **Krejsek, J., Kopecký, O.** *Klinická imunologie*. 1st ed. NUCLEUS HK, 2004, p. 385-570. ISBN 80-86225-50-X.
18. **Le Bien, T. W., Tedder, T. F.** B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 2008; 112(5), p. 1570-1580.

19. **Luo, Y., Han, R., Evanoff, D. P., Chen, X.** Interleukin-10 inhibits Mycobacterium bovis bacillus Calmette–Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Exp Immunol*, 2010 June; 160(3): p. 359–368.
 20. **Machová, H., Kelbich, P.** Je laboratorní obraz purulentního zánětu při vyšetření likvoru v souvislosti se SAK? Konference 5. den pro laboratorní aspekty likvorologie a neuroimunologie; 18.-19. 11. 2005; Kadaň, Česká republika. *Alergie*, 2006; 8(4), p. 345.
 21. **Nordenfelt, P., Tapper, H.** Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.*, 2011; 90(2): p. 271-284.
 22. **Procházka, J., Kelbich, P., Hejčl, A., Vachata, P.** Cerebrospinal Fluid changes in inflammatory affection after subarachnoidal haemorrhage. 22nd Annual Congress of ESICM; 2009 Oct 11-14; Vienna, Austria. *Intens Care Med*, 2009; 35: (Suppl 1), p. S254.
 23. **Provencio, J. J., Fu, X., Siu, A., Rasmussen, P. A., Hazen, S. L., Ransohoff, R. M.** CSF neutrophils are implicated in the development of vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.*, 2010; 12(2), p. 244-251.
 24. **Reiber, H.** Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta*, 2001; 310, p. 173-186.
 25. **Slauch, J. M.** How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol*, 2011; 80(3): 580-583.
- Práce byla realizována s podporou specifického výzkumného projektu SVV 262902 Ministerstva školství a tělovýchovy ČR.*
- Do redakce došlo 9. 12. 2011

*Adresa pro korespondenci
RNDr. Ing. Petr Kelbich
oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie
Nemocnice Kadaň s.r.o.
Golovinova 1559
432 01 Kadaň
e-mail: kelbich@nemkadan.cz*