

SEED Tělní tekutiny



Vyšetření počtu buněk v tělních tekutinách – provedení a interpretace výsledků

Tělní tekutiny mohou být fyziologického i patologického původu a jsou běžně vyšetřovány ve většině laboratoří. Požadovaná vyšetření zahrnují stanovení počtu a diferenciaci buněk, biochemické parametry, sérologii, identifikaci nádorových markerů, cytologii, bakteriologii a další specializované analýzy. Analýza buněk v tělních tekutinách poskytuje důležité diagnostické informace potřebné pro vyhodnocení zdravotního stavu a diferenciální diagnostiku, například určení zánětlivých onemocnění nebo malignit.

Preanalytická fáze

Správná validace výsledku vyžaduje informaci o typu vyšetřovaného materiálu. Přesné informace o typu tělních tekutin, s výjimkou mozkomíšního moku (CSF – cerebrospinal fluid), laboratoři často chybějí. Mozkomíšní mok je specifickou tělní tekutinou, která ve srovnání s ostatními tělními tekutinami vyžaduje zvláštní přístup. Způsob jejího odběru často umožňuje získání pouze malého množství materiálu k analýze.

Obecně platí, že veškeré vzorky tělních tekutin by měly být zpracovány okamžitě, nejpozději během jedné až dvou hodin po odběru [1, 2]. To platí zejména pro zpracování vzorku

metodou cytopsinu určenou k diferenciaci buněk. Některé buňky, např. ty aktivované, se ve vzorku rozpadají ve srovnání s ostatními buňkami mnohem dříve [2].

Obecná doporučení pro odběr vzorků tělních tekutin:

- *nativní (zkumavka bez přísad): pro klinickou biochemii a sérologická vyšetření*
- *zkumavka s EDTA: pro stanovení počtu a diferenciaci buněk možné výjimky:*
 - *CSF: obvykle bez EDTA, protože CSF neobsahuje žádné koagulační faktory*
 - *synoviální tekutina: může být použit heparin sodný, zabraňuje tvorbě artefaktů při stanovení krystalů*
- *zkumavka s heparinem: detekce nádorových buněk*
- *zkumavka s fluoridem sodným: stanovení laktátu možné výjimky:*
 - *CSF: obvykle se používá nativní vzorek*

Tento článek se zaměřuje na vysvětlení nálezů při stanovení počtu a diferenciaci buněk v pleurální, ascitické a synoviální tekutině, v mozkomíšním moku a v kontinuálním ambulantním peritoneálním dialyzátu (CAPD – continuous ambulatory peritoneal dialysis). Tento článek se nezabývá biochemickými a serologickými parametry ani bakteriologickým vyšetřením.

Přehled tělních tekutin

1. Pleurální tekutina

Plicní pleura se skládá ze dvou tenkých serózních membrán, které obklopují plíce a lemují vnitřní stranu hrudní dutiny vrstvou mezotelu. Pleurální dutina leží mezi těmito vrstvami mezotelu a obsahuje fyziologicky čistou serózní tekutinu o objemu menším než 15 ml. Pleurální výpotek je důsledkem nadměrného hromadění tekutiny v pleurální dutině. Nejčastějšími příčinami pleurálního výpotku jsou kongestivní srdeční selhání, nádory včetně karcinomů a zánět [3].

Primární otázkou v diferenciální diagnostice pleurálního výpotku je rozlišení, zda se jedná o transudát nebo exsudát, což má rozhodující vliv na terapii. Určení transudátu nebo exsudátu závisí na výsledcích některých klinicko-chemických, sérologických a hematologických parametrů. Tabulka 1 uvádí hlavní rozhodovací kritéria [2]. Výsledky jsou vyhodnoceny podle tzv. *mezních limitů* (rozhodovacích limitů). Pro vyhodnocení nejsou stanoveny referenční hodnoty.

2. Ascitická tekutina

Fyziologický objem peritoneální tekutiny je velmi malý. Termín *ascites* označuje abnormální hromadění tekutiny v peritoneální dutině. Nahromaděná tekutina se častěji označuje jako *ascitická tekutina* než jako *peritoneální tekutina*.

Protože primární onemocnění může být jak benigní tak maligní, analýza ascitu má zásadní význam pro další diagnostický a terapeutický přístup. To platí také pro rozlišení mezi neinfikovanou a infikovanou ascitickou tekutinou [2].

Nejčastější příčinou ascitu je jaterní cirhóza (přibližně 80 %), přičemž zbývajících 20 % je způsobeno kongestivním srdečním selháním, tuberkulózou, nádorovým onemocněním, nebo jinými příčinami [3].

Výsledky jsou vyhodnoceny na základě rozhodovacích limitů (mezních hodnot). Přítomnost ascitu je vždy patologická, k vyhodnocení výsledků se používají mezní limity nejběžnější příčiny – jaterní cirhózy.

Skladba buněk v ascitické tekutině [4]:

- počet leukocytů (WBC – white blood cell) < 500/μl
 - běžně se vyskytují: mononukleáry (MN) jako lymfocyty a monocyty/makrofágy, ale také mezoteliální buňky (non-WBC)
 - polymorfonukleáry (PMN) jsou méně časté a měly by být pod 10 %
- počet erytrocytů (RBC – red blood cell) < 10 000/μl

Počty WBC a PMN jsou důležité zejména při detekci spontánní bakteriální peritonitidy (SBP). Počet PMN ≥ 250 buněk/μl při absenci zjevného nitrobřišního zdroje infekce potvrzuje diagnózu SBP [5] a ošetřující lékař by měl okamžitě zahájit empirickou léčbu antibiotiky.

3. Dialyzát, CAPD

U části dialyzovaných pacientů je možné využívat kontinuální ambulantní peritoneální dialýzu (CAPD). Během dialýzy se naplní peritoneální dutina přes katetr sterilním dialyzačním roztokem. Látky, které by byly normálně z těla vyloučeny ledvinami, přecházejí na základě osmózy do dialyzační tekutiny, která se vyměňuje každých 4–6 hodin. Pacienti jsou schopni po krátkém tréninku provádět dialýzu bez cizí pomoci, což jim poskytuje lepší kvalitu života, protože nemusejí na dialýzu soustavně docházet. Nevýhodou je možné riziko vzniku peritonitidy zanesením infekce přes přístupový katetr. Kontrola u lékaře probíhá za normálních okolností jednou měsíčně.

Tabulka 1 Charakteristika pleurálního výpotku – hlavní rozhodovací kritéria

Transudát	Exsudát
Celkový počet buněk < 1 000/μl = WBC + non-WBC (např. mezoteliální buňky)	Celkový počet buněk > 1 000/μl = WBC + non-WBC (např. mezoteliální buňky)
Neutrofilní granulocyty < 250/μl	Neutrofilní granulocyty > 500/μl
RBC < 1 000/μl	RBC > 10 000/μl

Další zohledněné klinicko-chemické a sérologické parametry: albuminový gradient sérum/pleurální tekutina, karcinoembryonální antigen, celkový protein, celkový protein sérum/pleurální tekutina, α -amyláza, cholesterol, laktátdehydrogenáza, glukóza a další

Příčinou peritonitidy způsobené CAPD jsou bakterie zavlečené např. kontaminovanou dialyzační nebo prodlužovací hadičkou v místě vstupu katetru, nebo tunelové infekce. Mezi další možné příčiny patří alergické reakce pacientů na některé složky dialyzační tekutiny nebo spojovací systémy na začátku CAPD, které pak vedou k takzvané *eozinofilní peritonitidě*.

Nejčastěji kladené otázky během vyšetření CAPD jsou:

- zánětlivý nebo nezánětlivý dialyzát?
 - počet neutrofilních granulocytů
 - počet eozinofilních granulocytů

Buněčné složení CAPD tekutiny je srovnatelné se složením ascitické tekutiny (tj. mezoteliální buňky, makrofágy, monocyty, lymfocyty a polymorfonukleární buňky), protože dialyzační roztok prochází peritoneální dutinou. Počet buněk v dialyzátu částečně závisí na délce trvání dialýzy [6].

Mezinárodní společnost pro peritoneální dialýzu (ISPD) doporučuje stanovit diagnózu peritonitidy vždy, pokud jsou splněna alespoň dvě z následujících kritérií:

- (1) klinické příznaky, které jsou typické pro peritonitidu, tj. bolest břicha anebo zakalená dialyzační tekutina
- (2) dialyzační tekutina s WBC > 100/μl (po dobu trvání dialýzy alespoň 2 hodiny), s PNM > 50 %
- (3) pozitivní kultivace odpadního dialyzačního roztoku [6]

Eozinofilní peritonitida je definována přítomností WBC > 100/μl, přičemž eozinofily tvoří > 10 % celkového počtu leukocytů.

4. Synoviální tekutina

Analýza synoviální tekutiny je klíčovým nástrojem pro stanovení diagnózy u pacientů s kloubním výpotkem a rozlišení tekutiny na nezánětlivou, zánětlivou nebo septickou. Často slouží ke stanovení diagnózy vylučovací metodou. V každém případě je analýza synoviální tekutiny důležitým přímým diagnostickým kritériem pro dnu, pseudodnu, jiné depozice krystalů a septickou artritidu. Jako antikoagulant se doporučuje heparin sodný, protože, kromě počtu a diferenciací buněk, je důležitým analytickým krokem vyhodnocení krystalů ve vzorku. Použití jiných antikoagulancií, jako je heparin lithný, EDTA nebo oxalát, může vést při detekci krystalů k přítomnosti artefaktů [1].

Charakteristika synoviální tekutiny

Fyziologické množství synoviální tekutiny je malé, v kolenu dospělého člověka přibližně 3,5 ml.

- je světlá až slámově žlutá a čirá
- běžně se jedná o velmi viskózní tekutinu
- biochemické složení je podobné složení plazmy díky obsahu lipidů, bílkovin, vody a glukózy; dále obsahuje kyselinu hyaluronovou a buněčnou složku
- funkcí synoviální tekutiny je omezit tření, umožnit absorpci nárazů a zajistit transport živin a odpadu

Viskozita synoviální tekutiny je dána polymerací kyseliny hyaluronové. Velmi vysoká viskozita může vést k obtížnému stanovení počtu buněk. To lze vyřešit buď naředěním vzorku fyziologickým roztokem, nebo přidáním hyaluronidázy (400 jednotek na 1 ml synoviální tekutiny, poté inkubujte po dobu 10 minut při 37 °C) [1].

Současné stanovení počtu WBC a PMN je z diagnostického hlediska důležité pro okamžité rozlišení nezánětlivého, zánětlivého a infekčního původu.

- Synoviální tekutina ve zdravém kloubu obsahuje
 - WBC < 200/μl
 - PMN < 25 %
 - žádné RBC

Následující tradiční klasifikační systém byl sestaven Americkou revmatologickou asociací (American Rheumatism Association) [3]:

- nezánětlivý původ: WBC < 2 000 × 10⁶/l, PMN < 25 %
- zánětlivý původ: WBC 2 000 – 50 000 × 10⁶/l, PMN > 50 %
- septický původ: WBC > 50 000 × 10⁶/l, PMN > 75 %

Důležitý je poměr PMN k celkovému počtu WBC – u zánětlivého původu může dosahovat více než 70 % a u septických artritid až 95 %.

Podrobněji se o synoviální tekutině píše ve dvou vyhrazených článcích SEED. Část 1 vysvětluje hlavní charakteristiky a složení synoviální tekutiny, část 2 se zaměřuje na laboratorní vyšetření a popisuje diagnosticky nezbytné testy. Oba články si můžete přímo stáhnout z webových stránek Sysmex Europe: [Synovial fluid – part 1: main characteristics](#) a [Synovial fluid – part 2: laboratory evaluation](#).

5. Mozkomíšní mok (CSF – cerebrospinal fluid)

Tento materiál představuje největší výzvu pro všechny zúčastněné – od odběru vzorků až po jeho zpracování v laboratoři. Obsah následujícího textu se vztahuje na vzorky mozkomíšního moku dospělých pacientů.

Indikace k vyšetření CSF pokrývá velmi široké spektrum.

Možné důvody jsou následující:

- zánět
- nádorová onemocnění
- dysfunkce bariér
- infekce
- krvácení

Lumbální punkce se provádí pro diagnostické i terapeutické účely.

Referenční meze počtu buněk:

- CSF získaný lumbální punkcí: WBC < 5/μl [3]
- fyziologicky se mohou vyskytovat lymfocyty nebo monocyty
- žádné granulocyty
- žádné RBC

V závislosti na zdravotním stavu může CSF obsahovat i nehematopoetické buňky (např. nádorové buňky, astrocyty,

oligodendrocyty atd.). Hematologický analyzátor řady XN může poskytnout rychlou odpověď díky předběžné informaci o přítomnosti PMN nebo MN.

Automatizovaná analýza tělních tekutin

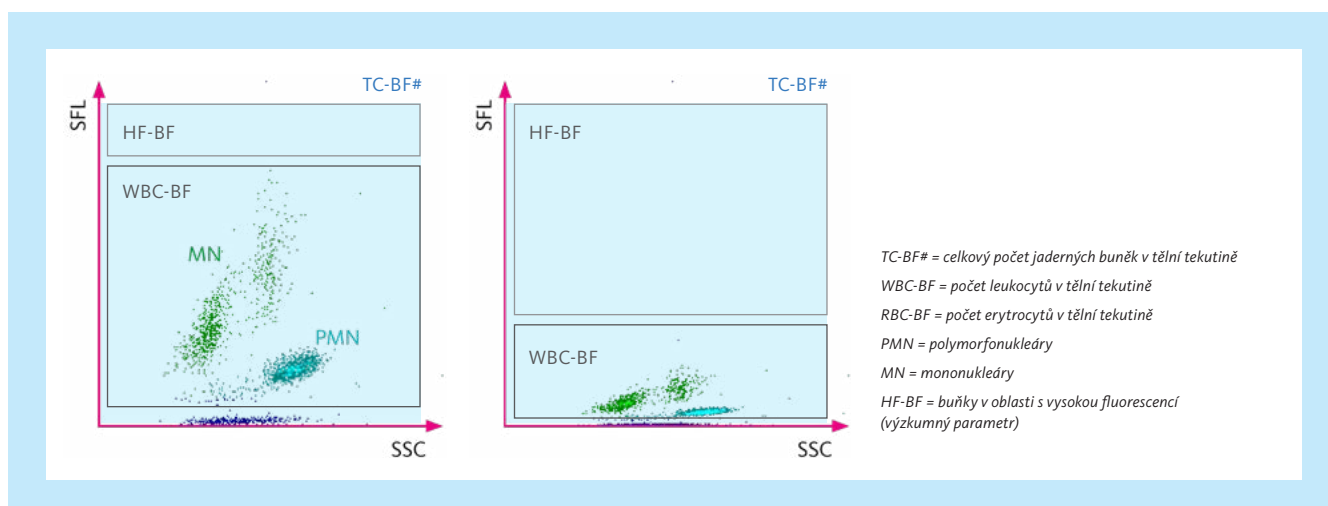
Za zlatý standard stanovení počtu a diferenciaci buněk ve vzorcích tělních tekutin se považuje počítání v komůrce a barvení vzorku po předchozí cytocentrifugaci. Stanovení počet buněk však lze dnes provádět jak manuálně tak automaticky [1, 3], je důležité znát limity obou metod.

Stanovení počtu buněk v tělních tekutinách se tradičně provádí manuálním mikroskopickým počítáním RBC a jaderných buněk/WBC v počítací komůrce. Přesnost této metody silně závisí na řadě proměnných, včetně správného objemu vzorku, náležitém ředění a počtu počítaných čtverců a buněk. Navíc je to subjektivní a extrémně náročný proces vyžadující vysokou úroveň odbornosti. V mnoha laboratořích navíc klesá počet technických odborníků. Se zvyšujícím se pracovním zatížením mají nyní laboratoře možnost automatizovat počítání buněk pomocí automatizovaných hematologických nebo močových analyzátorů. Jsou navrženy tak, aby byly rychlejší, přesnější a snadněji použitelné ve srovnání s manuálními metodami. Analyzují větší objem vzorku než počítací komůrka, což zvyšuje preciznost a správnost vyšetření. Tabulka 2 porovnává výhody a nevýhody počítacích komůrek a analyzátorů Sysmex [3].

Tabulka 2 Souhrn výhod a nevýhod různých metod stanovení počtu buněk v tělních tekutinách (upraveno podle [3])

Metoda	Výhody	Nevýhody	Doporučení
Manuální počítání v komůrce	<ul style="list-style-type: none"> ✓ nízké náklady ✓ malý objem vzorku ✓ počet TNC/WBC/RBC 	<ul style="list-style-type: none"> ■ vysoká nepřesnost ■ vysoká variabilita výsledků ■ časová náročnost 	použijte v případech a) pro ověření výsledků z hematologického analyzátoru b) u vzorků s podezřením na malignitu
Hematologické analyzátor řady XN a XN-L s BF módem	<ul style="list-style-type: none"> ✓ zkrácení TAT ✓ bez nutnosti přípravy vzorků ✓ malý objem vzorku ✓ nízký limit detekce ✓ 2populační diferenciál WBC (PMC a MN) ✓ výzkumný 4populační diferenciál ✓ větší analyzovaný objem ✓ hláška informující o abnormalitách ✓ komerčně dostupný QC materiál 	<ul style="list-style-type: none"> ■ nejnižší reportovatelná hodnota RBC 1 000 buněk/μl* ■ limitace v detekci maligních buněk 	v případě abnormalit zkontrolujte scattergramy a histogramy a případně doplňte manuální metodou
Močové analyzátor UF-4000/5000	<ul style="list-style-type: none"> ✓ BF mód vždy součástí analyzátoru (WBC, RBC, EC, TNC, BACT) ✓ 2populační diferenciál WBC (PMC a MN) ✓ nízký limit detekce WBC, RBC a bakterií ✓ bez nutnosti přípravy vzorku 	<ul style="list-style-type: none"> ■ větší objem vzorku ■ v současnosti bez detekce atypických buněk 	TNC = WBC + EC

*Týká se zobrazeného rozsahu RBC-BF (0,000 až 99,999 × 10⁶/μl). Podrobné informace o výkonových specifikacích si prosím vždy přečtěte v návodu na použití příslušného analyzátoru



Obr. 1 Parametry tělních tekutin ve WDF scattergramu (vlevo) a rozšířeném (extended) WDF scattergramu (vpravo)

Analyzátory Sysmex řady XN a XN-L nabízejí speciální mód pro analýzu tělních tekutin – mód tělních tekutin (XN-BF mód).

Po výběru XN-BF módu se automaticky provede kontrola pozadí. Používané měřicí kanály jsou:

- WDF kanál
- impedanční RBC/PLT kanál

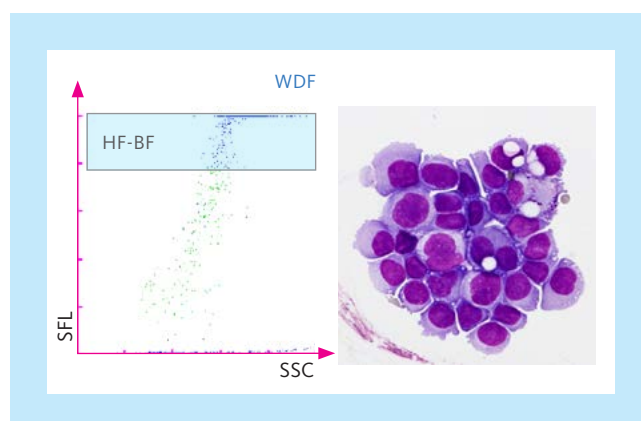
Vzorek se měří v manuálním módu bez jakékoli speciální přípravy. V analyzátoru dochází k rozlišení mezi PMN a MN. Absolutní (#) a relativní (%) počty těchto buněk vycházejí z počtu WBC (WBC-BF). Pokud vzorek tělní tekutiny obsahuje i jiné buňky než WBC, jak je vysvětleno v předchozím textu, je důležitá i hodnota parametru celkového počtu buněk (TC-BF). Parametry analýzy vycházející ze scattergramu jsou vysvětleny na obrázku 1.

Parametr TC-BF# zahrnuje všechny jaderné buňky detekované ve WDF kanálu. Leukocyty jsou zastoupeny v oblasti WBC-BF, zatímco jiné buňky v oblasti s vysokou fluorescencí (HF-BF). Jedná se například o mezoteliální buňky, které jsou mnohem větší než leukocyty a mají vyšší obsah RNA/DNA. Nádorové buňky se mohou také objevovat v této oblasti díky vyššímu obsahu RNA/DNA a jejich velikosti, jak je ukázáno v příkladu na obrázku 2.

Při interpretaci oblasti HF-BF je třeba vzít v úvahu typ materiálu i klinické souvislosti. Například mezoteliální buňky zanamenané v oblasti HF-BF se mohou běžně nacházet ve vzorcích pleurální tekutiny. Pokud se naopak buňky vyskytují v oblasti HF-BF u vzorků CSF, nejedná se o normální nález a musí být vyjasněn mikrosko-

pickým vyšetřením preparátu. Na základě některých publikací by mohla být nepřítomnost buněk v oblasti s vysokou fluorescencí (HF-BF) použita k vyloučení maligních stavů ve vzorcích serózních tekutin [7–9]. Tyto příklady jasně ukazují, že informace z oblasti HF-BF musí být hodnoceny v závislosti na klinických souvislostech a typu materiálu.

Pro podporu interpretace výsledků z hematologických analyzátorů Sysmex lze využít speciální pravidla pro tělní tekutiny, která jsou součástí middleware *Extended IPU*. Zohledňují různá kritéria validace výsledků podle typu materiálu (tj. dvě kategorie: (1) CSF a (2) všechny ostatní).



Obr. 2 WDF scattergram (vlevo) se zvýšeným počtem buněk v oblasti HF-BF a cytospinový obraz (vpravo, pořízený digitální morfologií Sysmex DI-60) ukazující nádorové buňky v CSF od pacientky s rakovinou prsu

Tato pravidla zahrnují:

- aktivaci hlášky WBC *Abn Scattergram*
- klasifikaci HF-BF pro vysoce fluorescenční buňky
- klasifikaci EO-BF pro eozinofilní granulocyty v CAPD
- ověření suspektní interference RBC při odběru

U některých tělních tekutin laboratoře upřednostňují vydání výsledku celkového počtu buněk, zatímco u jiných dávají přednost počtu WBC. Diferenciální rozpočet WBC vždy souvisí s počtem WBC-BF. V případě, že je vydáván výsledek TC-BF#, Extended IPU vypočítá na základě TC-BF# také PMN a MN, včetně výzkumných parametrů (např. HF-BF, EO-BF, NE-BF, LY-BF, MO-BF).

Podle doporučení [1] je makroskopické vyšetření (včetně barvy, čirosti, tvorby sraženiny, viskozity) nezbytnou součástí analýzy tělních tekutin. Díky *Extended IPU* (od verze 4.6) jsou nyní k dispozici čtyři nové parametry, které umožňují zadávání těchto charakteristik během validace výsledku.

Pravidla také upozorňují na interference a doporučují další postupy (např. mikroskopická kontrola).

Díky snadnému, standardizovanému a automatizovanému měření tělních tekutin v kombinaci s pravidly pro validaci výsledků tělních tekutin (*Extended IPU*) nabízí Sysmex dostupnost a validní výsledky během celodenního i pohotovostního provozu laboratoře.

Souhrn

- Referenční meze a mezní limity výsledků vzorků tělních tekutin se liší v závislosti na vyšetřovaném materiálu.
- V závislosti na vyhodnocovaném typu materiálu je nutné rozlišovat celkový počet buněk a počet WBC. Ve vzorku mohou být přítomny i jiné buňky než WBC (např. mezoteliální buňky, nádorové buňky atd.), které nejsou zahrnuty v počtu WBC. To znamená, že celkový počet buněk a počet WBC nebývá vždy totožný.
- Automatizované měření tělních tekutin a standardizovaná validace výsledků pomáhají zlepšit kvalitu a rychlost analýzy.

Literatura

- [1] **Clinical and Laboratory Standards Institute** (2006): *Body Fluid Analysis for Cellular Composition. Approved Guideline. CLSI document H56-A* [ISBN: 1-56238-614-X].
- [2] **Thomas L** (2007): *Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH*
- [3] **Fleming C et al.** (2015): *Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. Clin Chem Lab Med. 53(11):1689.*
- [4] **King Strasinger S et al.** (2008): *Urinalysis and Body Fluids. Fifth Edition. © 2008 F. A. Davis Co.*
- [5] **Oey RC et al.** (2016): *The diagnostic work-up in patients with ascites: current guidelines and future prospects. Neth J Med. Oct; 74(8):330-35.*
- [6] **Kam-Tao Li P et al.** (2016): *ISPD Guidelines/Recommendations. ISPD Peritonitis Recommendations: 2016 Update on Prevention and Treatment. Peritoneal Dialysis International. Vol. 36, pp. 481–508.*
- [7] **Labaere D et al.** (2015): *Detection of malignant cells in serous body fluids by counting high-fluorescent cells on the Sysmex XN-2000 hematology analyzer. Int J Lab Hematol. 37(5):715.*
- [8] **Xu W et al.** (2016): *Evaluation of Sysmex XN-1000 hematology analyzer for cell count and screening of malignant cells of serous cavity effusion. Medicine (Baltimore). 96(27):e7433.*
- [9] **Cho YU et al.** (2015): *Body fluid cellular analysis using the Sysmex XN-2000 automatic hematology analyzer: focusing on malignant samples. Int J Lab Hematol. 37(3):346.*