

SEED Płyny z jam ciała



Płyn mózgowo-rdzeniowy: materiał o szczególnych wymaganiach

Płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR) jako materiał do badań wymaga szczególnej uwagi przez cały czas – począwszy od przygotowania do pobrania próbki, przez transport, aż do właściwej diagnostyki laboratoryjnej. Gdy płyn mózgowo-rdzeniowy trafia do laboratorium powinien być zbadany tak szybko, jak to tylko możliwe, a personel powinien postępować ze szczególną ostrożnością. Punkcja lędźwiowa nie jest przyjemna dla pacjenta i nie należy go narażać na powtarzanie tego zabiegu. Ponadto wyniki mają kluczowe znaczenie dla lekarzy w ustaleniu dalszego sposobu leczenia.

Wskazania do badania płynu mózgowo-rdzeniowego

Analiza płynu mózgowo-rdzeniowego jest ważnym elementem w diagnozowaniu lub wykluczeniu:

- stanów zapalnych obejmujących ośrodkowy układ nerwowy (OUN)
- chorób autoimmunologicznych takich jak stwardnienie rozsiane (MS)
- wylewów podpajęczynówkowych
- nowotworów z prawdopodobnym naciekaniem OUN
- idiopatycznej epilepsji
- urazów

Pacjenci wykazujący ostre objawy wymagają natychmiastowej opieki. Wyniki badań laboratoryjnych płynu mózgowo-rdzeniowego odgrywają kluczową rolę, stanowiąc podstawę dla decyzji lekarzy. Dlatego badanie płynu w laboratorium powinno nastąpić jak najszybciej z zachowaniem najwyższych standardów jakości.

Przygotowanie i transport

Płyn mózgowo-rdzeniowy jest materiałem pobieranym w ograniczonej ilości. Do badań laboratoryjnych potrzeba średnio 5–10 ml, z czego około 4–5 ml do zliczania i różnicowania komórek, a także co najmniej 0,5 ml do badań biochemicznych (białko całkowite, albumina, mleczany oraz glukoza). Istnieją różne schematy analizy płynu mózgowo-rdzeniowego, które można podzielić na badania w trybie nagłym, podstawowe oraz badania specjalne. Diagnoza i pierwsze wyniki, takie jak liczba komórek lub wyniki badań biochemicznych, determinują wybór kolejnych parametrów wykraczających poza zakres badań podstawowych.

Płyn mózgowo-rdzeniowy powinien być pobrany do co najmniej dwóch sterylnych i szczelnych probówek (zalecane są probówki polipropylenowe, gdyż komórki wykazują wówczas mniejszą skłonność do adhezji do ścian naczyń), bez dodatku środka konserwującego. Takie probówki powinny być ponumerowane,

oznaczone danymi pacjenta i danymi na temat dokładnego czasu pobrania próbki. Zalecane jest przygotowanie instrukcji zawierającej szczegółowy schemat postępowania. Takie rozwiązanie stosowane jest w wielu ośrodkach.

Poniższe informacje dotyczą szczegółów diagnostyki płynu mózgowo-rdzeniowego w zakresie badań w trybie natłym i podstawowym, obejmujących ocenę wizualną, zliczanie i różnicowanie komórek oraz wybrane badania biochemiczne.

Ocena wizualna

Przed zliczeniem i różnicowaniem komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym, dokonuje się oceny makroskopowej próbki oraz testów paskowych, za pomocą których można jakościowo ocenić obecność hemoglobiny i stężenie białek. Jednakże jest to jedynie ocena półilościowa, niemal zawsze wykonywana w celach orientacyjnych, jako badanie przyłóżkowe (POCT).

Ocena ilościowa komórek

Przyjmując, że płyn mózgowo-rdzeniowy dociera do laboratorium niezwłocznie po pobraniu i w odpowiednich warunkach transportu (tj. w kontrolowanej temperaturze), komórki w płynie powinny zostać policzone bez żadnych opóźnień. Dopuszczalny czas od pobrania do analizy wynosi 2 godziny. Mimo to niektóre komórki (zwłaszcza neutrofile) mogą ulec lizie w ciągu pierwszej godziny od pobrania, co może zaniżyć wynik zliczania. Zmniejszona żywotność komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym, szczególnie granulocytów, jest charakterystyczna m.in. dla znacząco niskiego stężenia białek. Okres przeżycia granulocytów *in vitro* może również skrócić ekspozycja na światło lub kontakt próbki z powietrzem [1]. W kontakcie z powietrzem płyn mózgowo-rdzeniowy uwalnia cząsteczki dwutlenku węgla. W przypadkach gdy zawartość białek i komórek w płynie jest niska, płyn może utracić swoje właściwości buforowe utrzymujące pH na odpowiednim poziomie. W ten sposób pH może się zmienić z 7,32–7,63 do bardziej zasadowego pH 7,8 w ciągu kilku sekund, co prowadzi do dalszych uszkodzeń komórek i ich lizy [2].

Gdy nie jest dostępna zautomatyzowana metoda liczenia komórek, zlicza się je za pomocą specjalnych komór. W praktyce laboratoryjnej powszechnie wykorzystuje się komorę Fuchs-Rosenthala, do której potrzebna jest większa objętość płynu, niż do komory Neubauera, co jest korzystne w przypadku płynów o niskiej cytozie. Komora powinna być umyta i wysuszona oraz nie powinna zawierać pyłków. Szkiełko nakrywkowe powinno być umieszczone w taki sposób aby widoczne były pierścienie Newtona. Tylko wówczas przestrzeń pomiędzy szkiełkiem nakrywkowym a dnem

komory będzie wynosić 0,2 μm . Po ostrożnym wymieszaniu płynu mózgowo-rdzeniowego w plastikowej probówce, jest on umieszczany w komorze za pomocą pipety. Siły kapilarne zapewniają odpowiednie rozprowadzenie płynu w komorze. Należy się upewnić, że w komorze znajduje się odpowiednia ilość płynu i nie dostały się tam pęcherzyki powietrza, oraz że płyn nie rozlewa się poza krawędzie komory.

Płyn mózgowo-rdzeniowy może być umieszczony w komorze bez uprzedniego barwienia. Po krótkim okresie sedymentacji (zalecana jest wilgotna komora, zapobiegająca wysychaniu komórek) można rozpocząć zliczanie komórek. W trakcie takiego zliczania krwinki białe (WBC) i czerwone (RBC) są liczone bez dodatkowego różnicowania populacji krwinek białych. Różnicowanie pomiędzy krwinkami białymi i czerwonymi czasami również może być utrudnione, zwłaszcza gdy naturalne zabarwienie RBC jest słabo widoczne, a komórki nie przedstawiają typowego obrazu, np. gdy komórki są napęczniałe lub obkurczone lub ulegają początkowym procesom autolizy.

Alternatywnym rozwiązaniem jest wybarwienie PMR i analiza mikroskopowa po dodaniu lodowatego kwasu octowego (stosunek 1:9), który powoduje lizę RBC, dzięki czemu zliczenie WBC jest bardziej precyzyjne. W niektórych przypadkach lodowaty kwas octowy nie powoduje lizy RBC lub dotyczy ona tylko części komórek, co stanowi dodatkową trudność w prawidłowym zliczeniu WBC. Różnicowanie między WBC i RBC bywa szczególnie trudne, gdy kwas octowy powoduje pęcznienie i blaknięcie RBC.

Dodanie roztworów barwiących, takich jak 0,2% fiolet krystaliczny lub błękit metylenowy może ułatwić zliczenie WBC, jednak odnotowano nieliczne przypadki, w których RBC również zaabsorbowały barwnik, zwłaszcza gdy doszło w nich do zainicjowania procesów litycznych. Te trudności mogą wpływać na korektę WBC, zależną od ilości RBC (odjęcie 1 WBC/ μl na 1000 RBC/ μl).

W celu policzenia krwinek białych i czerwonych, komórki są zliczane w co najmniej pięciu grupowych (dużych) kwadratach komory Fuchs-Rosenthala. Jeśli jest mniej niż 20 komórek w kwadracie grupowym, komórki powinny być zliczone w całej komorze (3,2 μl), w celu polepszenia jakości badania [3]. Należy jednak pamiętać, że zliczone komórki, przeliczone na μl w pewnym stopniu mogą się różnić od rzeczywistej cytozy płynu mózgowo-rdzeniowego, nawet gdy została policzona cała komora. Oznacza to, że nawet przy założeniu że próbka została przygotowana w optymalny sposób, a zliczenie WBC przebiegło bez trudności, policzenie 4 komórek we wszystkich 5 kwadratach grupowych (odpowiednik 1 μl) może się różnić o 50 % od rzeczywistego stężenia WBC w PMR (ryc. 1).

W przypadku zliczania i różnicowania komórek płynie mózgowo-rdzeniowym w komorze Fuchs-Rosenthala można zastosować rozkład Poissona. Odchylenie standardowe (SD) i współczynnik zmienności (CV) są definiowane jako:

Odchylenie standardowe średniej ze zliczeń x:	$s(x) = \sqrt{x}$
Odchylenie standardowe całkowitej liczby komórek n:	$s(n) = \sqrt{n}$
Współczynnik zmienności średniej ze zliczeń x:	$CV(x) = 1/\sqrt{x}$
Współczynnik zmienności całkowitej liczby komórek n:	$CV(n) = 1/\sqrt{n}$

Jeśli w 5 dużych kwadratach w komorze Fuchs-Rosenthala znaleziono łącznie 4 komórki, to współczynnik zmienności wyniesie $CV(4) = 1/\sqrt{4}$. Oznacza to, że wynik może się różnić od wartości rzeczywistej o 50 %.

Jest tak przy założeniu jednolitego i optymalnego rozkładu krwinek białych w komorze, co nie zawsze ma miejsce w rzeczywistości. Każda dodatkowa objętość lub każde dodatkowe zliczenie prowadzi do zwiększenia wiarygodności wyniku.

Dla wskaźnika zmienności:	1%	2,5%	5%	10%	20%
minimalna ilość zliczonych komórek musi wynosić:	100 000	1600	400	100	25

Ryc. 1 Statystyczna dokładność zliczania cytozy, w zależności od liczby policzonych komórek

Morfologia komórek

Kolejnym ważnym etapem badania płynu mózgowo-rdzeniowego po ustaleniu cytozy, jest różnicowanie komórek występujących w płynie oraz mikroskopowe wykrycie obecności bakterii i grzybów, które przeprowadzane jest zazwyczaj na pracowni mikrobiologicznej i stanowi nieodłączną część podstawowego programu badań płynu mózgowo-rdzeniowego. W przygotowaniu preparatu mikroskopowego ważne jest, aby w polu widzenia widoczne były wszystkie populacje komórek obecne w płynie mózgowo-rdzeniowym, z zachowaniem rzeczywistych proporcji. Oznacza to, że wygląd komórek nie może ulec znaczącym zmianom, a komórki muszą być zebrane na możliwie małej powierzchni i tworzyć pojedynczą warstwę. Nie powinny na siebie nachodzić, co może się zdarzyć w przypadku dużej liczby RBC. Spełnienie tych wymagań nie zawsze jest łatwe.

Dwie podstawowe metody wykorzystywane w celu przygotowania preparatów do mikroskopowego różnicowania komórek to komora SAYK lub cytowirówka.

Metoda SAYK

Karta z filtrem do cytopreparatu jest umieszczana na czystym szkiełku. Na nią zakłada się odpowiednio wyważoną komorę, którą napełnia się płynem mózgowo-rdzeniowym. Po około 20–30 minutach płyn wsiąka w filtr, a komórki pozostają na dnie komory. Oznacza to, iż supernatant nie może być wykorzystany do dalszej analizy biochemicznej. Zwykle komora napełniana jest około 200 µl płynu mózgowo-rdzeniowego.

Jednakże jeśli analizie poddawany jest płyn o niskiej liczbie komórek, personel medyczny może napotykać problemy takie jak duża utrata komórek (aż do 90 %), a co za tym idzie trudności w znalezieniu wystarczającej ilości komórek do oceny mikroskopowej lub problemy przy badaniu płynów o niskiej komórkowości. Wydaje się, że do badania płynu ubogokomórkowego można użyć większą objętość płynu, jednak może to być trudne, ponieważ jeśli komora SAYK zostanie napełniona większą ilością płynu, zachodzi ryzyko, iż filtr nie będzie w stanie go zaabsorbować w całości. W ten sposób nie uzyska się dobrego preparatu mikroskopowego. Innym rozwiązaniem jest odwirowanie płynu przed umieszczeniem go w komorze. Należy się jednak liczyć ze zmianami morfologicznymi komórek spowodowanymi wirowaniem, szczególnie gdy materiał zawiera niewielką liczbę komórek. Dla poprawienia jakości wyglądu komórek do płynu przed wirowaniem można dodać albuminę, aby zapobiec procesom szybkiej autolizy.

Zagęszczanie ubogokomórkowego płynu mózgowo-rdzeniowego ma na celu niedopuszczenie do pominięcia komórek nowotworowych, co ma ogromne znaczenie w przypadku chorób, takich jak: ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) oraz ostra białaczka szpikowa (AML). W celu uzyskania preparatu o lepszej jakości do wstępnego wirowania należy użyć co najmniej 5 ml płynu, po uprzednim dodaniu środka konserwującego.

W przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego o wysokiej cytozie, do komory SAYK należy dodać mniejszą objętość płynu.

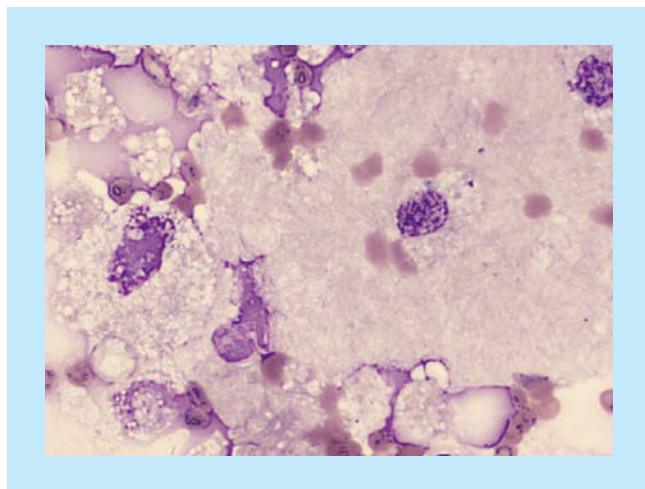
Zaletą tej metody jest, że gdy komórki nie ulegają procesom autolizy, w preparacie po wybarwieniu uzyskuje się komórki o niemal niezmienionej morfologii.

Cytowierowanie

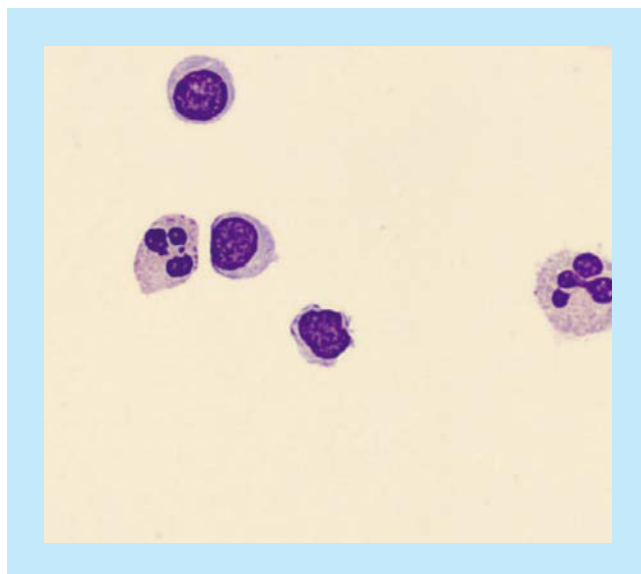
W tej metodzie wykorzystuje się dołączone do wirówki specjalne przyrządy o różnych średnicach (wybór odpowiedniej średnicy jest uzależniony od komórkowości płynu mózgowo-rdzeniowego i zaleceń producenta wirówki). Przyrządy te umieszcza się na czystym szkiełku, na którym znajduje się specjalny filtr. Płyn mózgowo-rdzeniowy dodaje się do komory za pomocą pipety. Objętość dodawanego płynu zależy od komory, jej średnicy, pojemności oraz komórkowości płynu, dzięki czemu na preparacie znajduje się warstwa o wystarczającej liczbie komórek. Przy wirówkach często znajdują się zalecenia producenta dotyczące objętości płynu i rodzaju komory jaką należy użyć.

Pomimo że utrata komórek w cytowirówce nie jest aż tak duża, jak w przypadku komory SAYK, nie zawsze udaje się uzyskać preparat, który umożliwia poprawną analizę morfologiczną komórek. Nawet jeśli zostanie zastosowana zalecana siła odśrodkowa, w preparacie możemy uzyskać komórki większe lub zdeformowane na skutek wirowania. Na przykład jądro limfocytów może być silniej zarysowane, co utrudnia różnicowanie prawidłowych limfocytów od komórek złośliwych. Ponieważ odnalezienie komórek w cytopreparacie może być utrudnione przez wiele czynników, takich jak utrata komórek w trakcie sedymentacji, niewłaściwe rozmieszczenie w preparacie, zmiany morfologiczne lub różnice w objętości użytego płynu, wynik różnicowania komórek podaje się jedynie jako wartości procentowe.

Zliczanie komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym i ich różnicowanie jest uzupełniane o wyniki badań biochemicznych.



Ryc. 2 Przykład preparatu, w którym komórki nie zostały dobrze utrwalone



Ryc. 3 Przykład preparatu z dobrze zachowanymi komórkami

Badania biochemiczne (mokra chemia)

Mleczany i glukoza

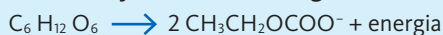
U zdrowych osób kwas mlekowy obecny w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzi z tkanki mózgowej oraz osocza. Wartości referencyjne tego parametru zależą od wieku.

Stężenie kwasu mlekowego w płynie mózgowo-rdzeniowym wzrasta w przypadku chorób neurologicznych. Jeśli wzrostowi poziomu kwasu mlekowego towarzyszy spadek glukozy (z uwzględnieniem poziomu glukozy w surowicy, który również powinien być oznaczony), można podejrzewać zakażenie bakteryjne lub grzybicze OUN. Większość mikroorganizmów (oprócz wirusów) przy niedoborze tlenu, który jest niezbędny do prawidłowych procesów oddychania komórkowego, zaczyna korzystać z procesu glikolizy. Glikoliza może zachodzić w środowisku tlenowym jak i bez obecności tlenu. Główne etapy rozpadu glukozy do pirogronianu w procesie glikolizy w warunkach tlenowych i beztlenowych to:

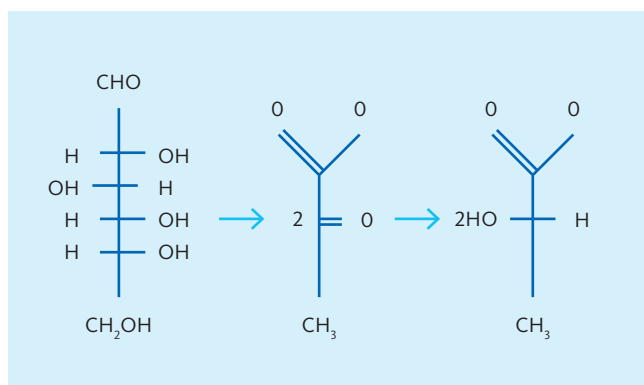
- aktywacja glukozy przez glukozo-6-fosforan do fruktozo-1,6-bisfosforanu, a następnie podział 6 węglowego związku na dwie fosfotriozy
- dehydratacja do aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GADP) i fosfodihydroksyacetonu (DHAP)
- przekształcenie aldehydu 3-fosfoglicerynowego do pirogronianu (kwasu pirogronowego).

W warunkach beztlenowych, jakie panują w płynie mózgowo-rdzeniowym, powstały pirogronian jest redukowany do kwasu mlekowego przez dehydrogenazę mleczanową. Ostatecznym produktem glikolizy w warunkach beztlenowych jest prawoskrętna sól kwasu mlekowego [4].

Fermentacja kwasu mlekowego:



Nie tylko mikroorganizmy powodują wzrost mleczanów i zmniejszenie stężenia glukozy w płynie mózgowo-rdzeniowym. Krwinki czerwone i granulocyty również uzupełniają swoje zapotrzebowanie energetyczne poprzez beztlenową glikolizę. Dlatego należy położyć wysoki nacisk na szybkość wykonania analizy, by zapewnić jak najwyższą jakość. Jeśli nie jest to możliwe, należy rozważyć możliwość dodania do płynu inhibitorów glikolizy.



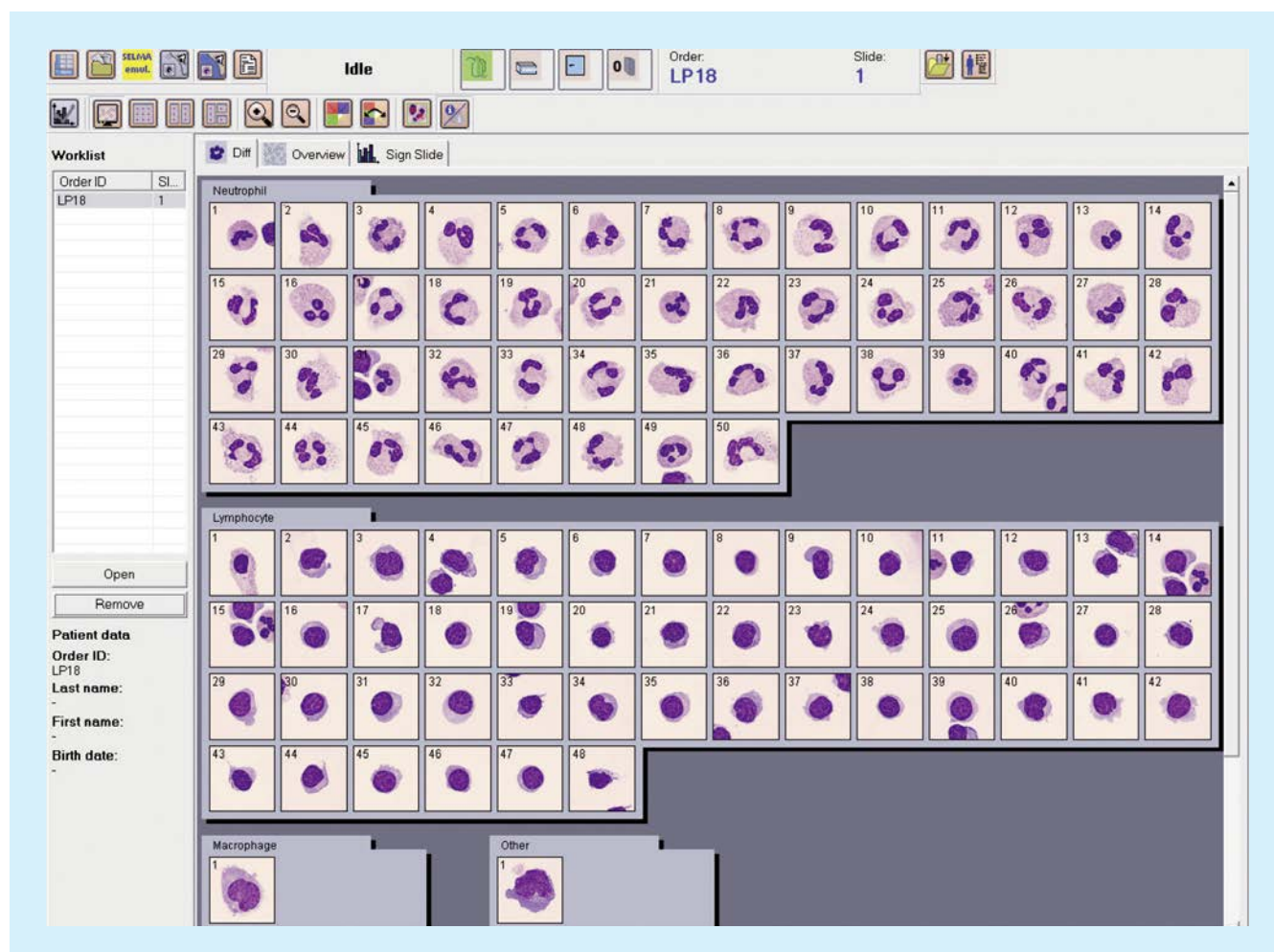
Ryc. 4 Glikoliza w warunkach beztlenowych

Albumina i białko całkowite

Oznaczenie białka całkowitego pozwala na wstępną ocenę działania bariery krew-mózg. Wzrost białka całkowitego w płynie mózgowo-rdzeniowym jest nieswoistym wskaźnikiem chorób OUN. Dodatkowe oznaczenie albuminy, która jest wytwarzana wyłącznie przez wątrobę, dostarcza więcej informacji na temat potencjalnych chorób przebiegających z dysfunkcją bariery krew-mózg. Diagnostyka oparta na tych parametrach jest utrudniona w przypadkach, gdy krew dostała się do płynu w trakcie pobrania. RBC i/lub hemoglobina zawyżają poziom białka, a przy obecności erytrocytów powyżej 3000/μl wynik należy uznać za niewiarygodny [5].

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę potencjalne problemy wymienione powyżej, które występują dość powszechnie, staje się jasne, że procesy fizjologiczne zachodzące w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz inne trudności diagnostyczne, mogą doprowadzić do wtórnych zmian w liczbie komórek, ich morfologii oraz zmian w parametrach biochemicznych. Dodatkowo różnice w wynikach mogą powstać również później – począwszy od problemów w zliczaniu komórek lub na skutek zmian zachodzących w komórkach w czasie przylegania (jak opisano w podstawowych metodach np. cytowirowaniu) lub mogą być spowodowane zmianami podczas barwienia. Biorąc pod uwagę wszystkie te aspekty, zależność jakości wyniku od procesów przedanalizy, szybkości postępowania i metody oznaczeń jest jednym z powodów, dla których automatyzacja i standaryzacja analizy płynu mózgowo-rdzeniowego jest pożądana, nawet po uwzględnieniu wszystkich dostępnych zaleceń.



Ryc. 5 Przykład różnicowania komórek płynu mózgowo-rdzeniowego przy użyciu CellaVision® DM1200

Źródła

- [1] Zettl U, Mix E, Lehmitz R. (2005): *Klinische Liquordiagnostik*. De Gruyter publisher's 2nd edition (German).
- [2] Kluge H et al. (2007): *Atlas of CSF Cytology*. Thieme publisher's 1st edition.
- [3] Wildemann B et al. (2010): *Laboratory Diagnosis in Neurology*. Thieme publisher's 1st edition.
- [4] Horton R et al. (2006): *Principles of Biochemistry*. Pearson Store 4th updated version.
- [5] Halbach J. (2006): *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*. Thieme publisher's 2nd edition (German).