

SEED Płynty z jam ciała



Płyn stawowy – część 2: ocena laboratoryjna

W pierwszej części artykułu opisano anatomię i skład płynu stawowego, wskazania do jego analizy oraz porady na temat postępowania i pobierania. Druga część artykułu poświęcona jest najczęściej stosowanym badaniom laboratoryjnym.

Ocena laboratoryjna

Analiza laboratoryjna płynu stawowego jest podobna do analizy innych płynów z jam ciała i obejmuje następujące kroki:

1. Badanie fizyczne
2. Analiza komórkowa – metodą automatyczną bądź mikroskopową
3. Badania biochemiczne
4. Badania mikrobiologiczne
5. Badania serologiczne

1. Badanie fizyczne

Kolor i przejrzystość

Ogólny opis wyglądu płynu jest istotnym elementem jego analizy. Fizjologicznie płyn stawowy jest przejrzysty i posiada kolor od bezbarwnego do bladożółtego (ryc. 1 lewa strona obrazka). W przypadku obecności wysięku niezapalnego przyjmuje odcienie ciemnej żółci (ryc. 1 środek obrazka) i może dochodzić do zielonkawego w przypadku infekcji bakteryjnych (ryc. 1 prawa strona obrazka).

W przypadku obecności krwi płyn przybiera kolor w zakresie pomiędzy czerwonym a brązowym lub żółtawym. Ważnym jest, aby rozróżnić krwawe zabarwienie spowodowane występującym zapaleniem stawu od krwawienia wynikającego z traumatycznego pobrania. Można to osiągnąć przede wszystkim prowadząc obserwację podczas pobierania materiału – nierównomierne rozłożenie krwi pojawia się w próbkach pochodzących z traumatycznego pobrania.

Mętność jest ważnym wskaźnikiem stanów zapalnych. Próbkę mętną o żółtym zabarwieniu wskazują na zapalenie głównie ze względu na obecność białych krwinek (WBC); jednakże, resztki komórkowe oraz fibryna także mogą być przyczyną mętności. Płyn może przybierać kolor białawy lub mleczny, gdy obecne są w nim kryształki.



Ryc. 1 Wygląd płynu stawowego

Lepkość

Lepkość płynu stawowego wynika z polimeryzacji kwasu hialuronowego i jest istotna dla właściwego smarowania powierzchni stawów. Artretyzm oddziałuje zarówno na produkcję kwasu hialuronowego jak i jego zdolność do polimeryzacji, tym samym zmniejszając lepkość płynu. Dostępnych jest kilka metod umożliwiających zmierzenie lepkości płynu. Najprostsza z nich to obserwacja zdolności rozciągania się kropli płynu z końcówki strzykawki. Jeśli kropla może rozciągnąć się od 4 do 6 cm to lepkość uznajemy za prawidłową. Test ten można wykonać przy łóżku pacjenta.

Stosując „test Ropesa” można dokonać półilościowej oceny precypitacji mucyny. Odbyna się to poprzez dodanie do roztworu 25% kwasu octowego kilku kropel płynu stawowego. Prawidłowy płyn tworzy zbity strą otoczony klarownym płynem. Wraz ze spadkiem zdolności kwasu hialuronowego do polimeryzacji strą staje się luźniejszy a otaczający płyn staje się mętniejszy. Wynik testu wydawany jest jako „dobry” (mocno zbity osad), „zadowolający” (lekko zbity osad), „niezadowolający” (luźny osad) i „słaby” (brak osadu). Test precypitacji mucyny nie jest już rutynowo wykonywany, ponieważ każdy rodzaj artretyzmu powoduje zmniejszenie lepkości, w związku z czym przydatność diagnostyczna testu jest niska. Zjawisko formowania się strątu mucyny może za to być użyte przy potwierdzeniu identyfikacji nieznanego płynu jako stawowy.

Bardzo lepkie płyny do dalszej diagnostyki mogą wymagać dodania 400 jednostek hialuronidazy do 1 ml płynu i inkubacji w 37°C przez 10 min [1].

2. Analiza komórkowa

Liczenie komórek

Aby określić ilość komórek, próbka powinna być wymieszana z antykoagulantem heparynowym lub EDTA. Zliczenie całkowitej liczby białych krwinek (WBC) jest najczęstszym badaniem wykonywanym w płynie stawowym. Zliczenie czerwonych krwinek (RBC) jest rzadziej wykonywane. Doniesienia literaturowe ukazują, że ogólna liczba WBC spada wraz z upływem czasu co może doprowadzić do wydania fałszywego wyniku i postawienia niewłaściwej diagnozy [2]. Dlatego tak ważnym jest, aby przeprowadzić analizę płynu jak najszybciej po pobraniu i unikać wszelkich opóźnień. Pozwala to zapobiec wydaniu fałszywego wyniku. Jest to szczególnie istotne przy zliczaniu i różnicowaniu WBC, które powinny być wykonane w świeżej próbce.

Manualne zliczanie komórek w płynie jest przeprowadzane z użyciem komory Neubauera w taki sam sposób jak płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR). Płyny przejrzyste zwykle mogą być liczone bez wcześniejszego ich rozcieńczania, jednakże jest ono konieczne jeżeli płyn jest mętny lub zawiera krew. Jeśli zachodzi potrzeba lizy

RBC przed liczeniem to odpowiednimi roztworami są hipotoniczny roztwór soli (0,3%) lub roztwór soli zawierający saponinę. Dodanie błękitu metylenowego do hipotonicznego roztworu soli wybarwia jądra WBC pozwalając na odróżnienie ich od RBC w materiale zawierającym krew.

Pomimo, że technika mikroskopowa wciąż jest metodą referencyjną dla zliczania WBC to nadal podkreślanych jest wiele wad tej metody. Dotyczą one: wysokich kosztów, niskiej wydajności liczenia, długiego czasu realizacji, braku międzylaboratoryjnej harmonizacji, wysokiej nieprecyzyjności (szczególnie przy próbkach z leukopenią) oraz potrzeby posiadania wyspecjalizowanego personelu przeprowadzającego analizę [3, 4].

Najnowsze oceny wydajności potwierdzają tezę, że automatyczne liczenie WBC w płynie stawowym daje bardzo dobre rezultaty. Tym samym czyni je wiarygodną i praktyczną alternatywą dla zliczania mikroskopowego [3–5]. Zdecydowana większość producentów dostępnych aparatów dostarcza także kontrolę jakości pozwalającą na weryfikację wysokiej precyzji ich pomiarów.

Różnicowanie

Różnicowanie WBC jest przeprowadzane głównie ze zwirowanych próbek lub na cienko rozmazanych szkiełkach, które zostały wybarwione metodą Maya-Grünwalda-Giemsy.

Średnio 50% wszystkich komórek jądrzastych to monocyty, 25% stanowią limfocyty, a pozostałe komórki to neutrofile, makrofagi i komórki produkujące płyn stawowy. Dowody dotyczące wykorzystania zliczania i różnicowania WBC w płynie stawowym są zróżnicowane. Literatura i środowisko naukowe posiadają różne zdania na ten temat, jednak większość książek i publikacji podkreśla, że połączenie zliczania WBC i polimorfonuklearów (PMN) jest ważnym markerem diagnostycznym dla szybkiego różnicowania stanów zapalnych od niezapalnych i zaburzeń septycznych. Jednak same parametry WBC i PMN mają ograniczone zastosowanie w różnicowaniu pomiędzy specyficznymi kategoriami chorób. Wiele książek i publikacji odnosi się obecnie do systemu klasyfikacji stworzonego przez Amerykańskie Stowarzyszenie Reumatyczne [4] (American Rheumatism Association):

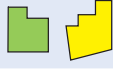
- Prawidłowy: WBC < 200 x 10⁶/l, PMN < 25%
- Niezapalny: WBC < 2000 x 10⁶/l, PMN < 25%
- Zapalny: WBC 2000 – 50000 x 10⁶/l, PMN > 50%
- Septyczny: WBC > 50000 x 10⁶/l, PMN > 75%

Najczęściej napotkane komórki i wtręty w płynie stawowym zostały wymienione w tabeli 1 [6]. Przy weryfikacji mikroskopowej próbek prawidłowej lub nieprawidłowej należy pamiętać, że komórki tam występujące mogą posiadać większą ilość wakuoli niż ma to miejsce w rozmazie krwi obwodowej.

Tabela 1 Komórki i inkluzje widoczne w płynie stawowym

Komórka / inkluzja	Opis	Podwyższony poziom w:
Komórki chrząstek	Duże, wielojądrzaste komórki	Choroba zwyrodnieniowa stawów
Krople tłuszczu	Refrakcyjne wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe kulki, które można wybarwić Sudanem	Bolesny uraz i przewlekłe zapalenie
Hemosyderyna	Wtręty pomiędzy grupami komórek błony maziowej	Barwnikowe kosmkowo-guzkowe zapalenie błony maziowej
Komórki LE	Neutrofile zawierające charakterystyczne sfagocytowane „okrągłe ciała”	Toczeń rumieniowaty układowy
Limfocyty	Białe krwinki o jądrze monomorficznym	Zapalenie nieseptyczne
Makrofagi (monocyty)	Duże białe krwinki z jądrem niepodzielnym, mogą zawierać wakuole	Infekcje wirusowe
Neutrofile	Białe krwinki z jądrem wielopłetowym	Sepsa o podłożu bakteryjnym, zapalenie spowodowane kryształami
Komórki Reitera	Makrofagi z wchłoniętymi neutrofilami i posiadające wakuole	Syndrom Reitera zapalenie nieseptyczne
Komórka reumatoidalnego zapalenia stawów (ragocyt)	Fagocyty z jądrem wielopłetowym i ciemną cytoplazmatyczną ziarnistością zawierającą: zagregowane immunoglobuliny, fibrynę, czynnik dopełniacza i czynnik reumatoidalny	Reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie na tle immunologicznym
Ciała ryżowe	Makroskopowo podobne do ziaren ryżu, zawierają kolagen i fibrynę	Gruźlica, septyczne i reumatoidalne zapalenie stawów
Komórki błony maziowej	Podobna do makrofaga, ale może być wielojądrzasta	Zawsze w stanach fizjologicznych

Tabela 2 Charakterystyka kryształów obecnych w płynie stawowym

Kryształ	Kształt	Przyczyna
Moczan monosodowy	 Igły	Dna moczanowa
Pirofosforan wapnia	 Romby, pałeczki	Dna rzekoma
Cholesterol	 Ząbkowane, rombiczne płyty	Wysoki poziom cholesterolu we krwi
Kortykosteroidy	 Płaskie, różnokształtne płyty	Zastrzyki
Szczawiany wapnia	 Koperty	Dializa nerek
Apatyty (fosforany wapnia)	 Małe cząstki, trumienki	Choroba zwyrodnieniowa stawów

Identyfikacja kryształów

Ważnym testem diagnostycznym w artretyzmie jest mikroskopowa ocena płynu stawowego z użyciem światła spolaryzowanego celem wykrycia obecności kryształów. Formowanie się ich w stawach jest wielokrotnie powodem ostrego, bolesnego zapalenia, które może przejść w stan przewlekły. Do formowania się kryształów dochodzi w wyniku zaburzeń metabolizmu, zmniejszenia tempa wydalania nerkowego powodującego wzrost stężenia związków krystalizujących we krwi, zwyrodnienia chrząstki i kości, iniekcji leków do stawów (np. kortykosteroidów). Tabela 2 [6] przedstawia najczęściej spotykane kryształy w płynie maziowym.

3. Badania biochemiczne: glukoza, białko, kwas moczowy

Najczęściej zlecanym badaniem biochemicznym jest ocena stężenia glukozy, którego obniżenie wskazuje na stany zapalne lub septyczne. W prawidłowych warunkach stężenie glukozy w płynie stawowym koreluje ze stężeniem w krwi. W związku z tym pobranie krwi powinno każdorazowo towarzyszyć pobraniu płynu stawowego. Pacjent powinien być na czczo przez 8 godzin, tak aby stężenie glukozy w obydwu płynach było w stanie równowagi. W wyżej wymienionych warunkach prawidłowy poziom glukozy w płynie nie powinien być niższy niż 10 mg/dl poniżej poziomu oznaczonego w surowicy. Próbkę powinna być zbadana w ciągu godziny od pobrania lub materiał powinien być pobrany na fluorek sodu, tak aby zapobiec fałszywemu zaniżeniu wyniku przez glikolizę [6].

Płyn stawowy zawiera wszystkie białka obecne w surowicy z wyjątkiem tych o wysokiej masie cząsteczkowej takich jak: fibrynogen, beta-2-makroglobulina i alfa-2-makroglobulina. W celu zbadania stężenia białka w płynie można posłużyć się najczęściej używanymi do tego celu procedurami. Zakres wartości prawidłowych dla białka w płynie stawowym wynosi 1 – 3 g/dl [6]. Podwyższony poziom białka obserwuje się w stanach zapalnych i krwawieniach, jednak badanie stężenia białka w płynie nie dostarcza diagnostycznie istotnych informacji pomocnych przy ich rozróżnianiu.

Powszechnie obserwowany jest podwyższony poziom kwasu moczowego w surowicy w dniu moczanowej. Z tego też powodu podwyższony poziom kwasu w płynie stawowym może być wykorzystany przy potwierdzaniu diagnozy dny, szczególnie gdy w płynie nie są widoczne kryształki. Badanie stężenia kwasu moczowego w surowicy jest często przeprowadzane jako pierwsze przy podejrzeniu dny moczanowej.

4. Badania mikrobiologiczne [6]

Infekcja może pojawić się jako wtórne powikłanie przy zapaleniu wywołanym urazem lub w wyniku rozsiania zapalenia układowego. Dlatego też barwienie Grama i hodowla bakteryjna są dwoma najważniejszymi badaniami przeprowadzanymi w płynie stawowym. Zaleca się, aby obydwa badania przeprowadzone były na wszystkich pobranych próbkach, gdyż niektóre mikroorganizmy mogą zostać pominięte jeśli wykona się samo barwienie Grama. Najczęściej spotykane są infekcje bakteryjne, mimo że zakażenia wirusowe lub grzybicze także występują. Jeżeli są one podejrzewane, należy zastosować specjalne procedury posiewów. Historia pacjenta oraz inne objawy mogą pomóc w zleceniu dodatkowych badań.

Standardowy posiew powinien być przeprowadzony na wzbo-gaconym podłożu, np. agarze czekoladowym, ponieważ oprócz *Staphylococcus* i *Streptococcus* powszechnymi szczepami, które infekują płyn stawowy to wymagający *Haemophilus* i *Neisseria gonorrhoeae*.

5. Badania serologiczne [6]

Zwyrodnienia stawów często powiązane są z komponentą immunologiczną, dlatego badania serologiczne odgrywają ważną rolę w diagnostyce tych zaburzeń. Jednakże większość testów przeprowadzana jest w surowicy, a badanie płynu stawowego używa się jedynie w celu potwierdzenia w przypadkach trudnych do zdiagnozowania. Choroba autoimmunologiczna jaką jest reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) i toczeń rumieniowaty układowy (SLE) powodują bardzo poważne zapalenie stawów. Ich diagnostyka

opiera się na wykazywaniu obecności specyficznych przeciwciał w surowicy pacjenta. Jeśli zachodzi taka potrzeba te same przeciwciała mogą także być oznaczane w płynie stawowym. Artretyzm jest częstą komplikacją boreliozy. Z tego też powodu wykazanie obecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w surowicy pacjenta może służyć jako potwierdzenie przyczyny. Stopień rozwoju zapalenia może być określony poprzez oznaczenie wskaźników ostrej fazy takich jak fibrynogen i CRP.

Wnioski

- Badanie laboratoryjne płynu stawowego jest procedurą skomplikowaną i wymaga zaangażowania wykwalifikowanego personelu. Niskie standardy badań płynu stawowego mogą częściowo wynikać z nieuwzględniania go w rutynowej diagnostyce jak i relatywnie niskiego zapotrzebowania na taką analizę w większości laboratoriów.
- Automatyzacja procedur laboratoryjnych może przyczynić się do poprawienia standardów wykonywanych badań i skrócić ich czas wykonania oraz uniknięcia błędów przy ich przepisaniu [3, 4, 7].

Bibliografia

- [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] **Kerolus G et al.** (1989): *Is it mandatory to examine synovial fluids promptly after arthrocentesis? Arthritis and Rheumatism.* 32 : 271 – 78.
- [3] **Paris A et al.** (2010): *Performance evaluation of the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000 series automated hematology analyzer.* *Int J Lab Hematol.* 32:539.
- [4] **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.
- [5] **Mundt LA et al.** (2016): *Graff's Textbook of Urinalysis and Body Fluids. Third Edition.* © 2016 Wolters Kluwer.
- [6] **King Strasinger S et al.** (2008): *Urinalysis and Body Fluids. Fifth Edition.* © 2008 F. A. Davis Co.
- [7] **de Jonge R et al.** (2004): *Automated counting of white blood cells in synovial fluid.* *Rheumatology.* 43 : 170 – 73