

SYSMEX ПОВЫШЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ И РАЗВИТИЕ | октябрь 2019 г.

Жидкости организма SEED



Подсчет клеток в жидкостях организма – как проводить и интерпретировать результаты

Жидкости, находящиеся в полостях тела или полых органах, могут иметь физиологическое или патологическое происхождение. Показания к анализу биологических жидкостей охватывают широкий спектр диагностических причин и поэтому являются частью диагностической процедуры в большинстве обычных лабораторий.

Запрошенные анализы, наряду с подсчетом и дифференцировкой клеток, включают клинические химические параметры, серологические анализы, идентификацию опухолевых маркеров, цитологию опухолей, бактериологические анализы и дальнейшие специализированные анализы. Клеточный анализ жидкостей организма предоставляет важную диагностическую информацию, необходимую для оценки различных заболеваний, таких как воспалительные заболевания или злокачественные новообразования.

Преаналитический этап

Знание типа материала важно для лаборатории, чтобы обеспечить правильное техническое подтверждение результатов. В случае образцов спинномозговой жидкости (СМЖ) тип материала обычно сообщается в лаборатории. Однако для других жидкостей организма точная классификация материалов часто отсутствует.

СМЖ представляет собой совершенно особый тип жидкости организма, и по сравнению с другими жидкостями организма ее обработка в некоторых отношениях должна осуществляться иначе.

Основное отличие заключается в способе получения жидкости и, как следствие, в ее часто очень небольшом объеме, который поступает в лабораторию в качестве образца.

Как правило, все жидкости организма необходимо обрабатывать немедленно, возможно, в течение одного или двух часов после сбора [1, 2]. Это особенно справедливо для препаратов цитоспина, необходимых для целей дифференцировки. Определенные типы клеток, например активированные клетки, не выживают так долго, как другие типы [2].

Общие рекомендации по отбору проб биологических жидкостей:

- *Нативный (пробирка без добавок): для клинической химии и серологических анализов.*
- *Пробирка с ЭДТА: для подсчета и дифференциации клеток.*
Исключениями могут быть:
 - *СМЖ: обычно используется без добавки ЭДТА (поскольку СМЖ не содержит факторов свертывания крови). Синовиальная жидкость:*
 - *также может быть антикоагулирована гепарином натрия, чтобы избежать артефактов при оценке кристаллов.*
- *Гепариновая трубка: поиск опухолевых клеток*
- *Пробирка с фторидом натрия: определение лактата*
Исключениями могут быть:
 - *CSF: обычно используется в нативной форме.*

Целью данной статьи SEED является объяснение полученных результатов с точки зрения количества и дифференцировки клеток в плевральной, асцитической, спинномозговой и синовиальной жидкости, а также при непрерывном амбулаторном перитонеальном диализате (ПАПД). В этой статье не будут рассматриваться ни клинико-химические и серологические показатели, ни бактериологические анализы.

Жидкости организма в компактном обзоре

1. Плевральная жидкость

Легочные плевры представляют собой две тонкие серозные оболочки, окружающие легкие и выстилающие внутреннюю часть грудной полости слоем мезотелия. Плевральная полость расположена между этими слоями мезотелия и содержит физиологически прозрачную серозную жидкость объемом менее 15 мл. Плевральный выпот возникает в результате избыточного скопления жидкости в плевральной полости. Наиболее частыми причинами плеврального выпота являются застойная сердечная недостаточность, опухоли, включая карциномы, и воспаление [3].

При обнаружении плеврального выпота главный вопрос заключается в том, является ли это транссудатом или экссудатом, поскольку дифференциальный диагноз имеет решающее значение для терапии. Классификация на транссудат или экссудат зависит от результатов различных клинико-химических, серологических и гематологических показателей. В таблице 1 перечислены основные критерии принятия решения [2]. Результаты оцениваются в соответствии с так называемыми «границами отсекаемости» (лимитами принятия решений). Как таковых эталонных значений нет.

2. Асцитическая жидкость

Физиологически объем перитонеальной жидкости невелик. Термин «асцит» относится к аномальному скоплению жидкости в брюшной полости, и эту жидкость обычно называют «асцитической жидкостью», а не «перитонеальной жидкостью».

Поскольку основное первичное заболевание может быть доброкачественным или злокачественным, дифференциация асцита имеет решающее значение для дальнейшей диагностики и лечения. Это касается и дифференциации неинфицированной и инфицированной асцитической жидкости [2].

Наиболее распространенной причиной асцита является цирроз печени (около 80%), а остальные 20% обусловлены застойной сердечной недостаточностью, туберкулезом, раком или другими причинами [3].

Результаты оцениваются на основе пределов принятия решений (пороговых значений). Поскольку «нормального асцита» не существует, наиболее распространенный случай – цирроз печени – используется в качестве ориентира для пороговых значений.

Состав клеток асцитической жидкости [4]

- Количество лейкоцитов < 500/мкл
 - Обычно присутствуют: мононуклеарные клетки (МН), такие как лимфоциты и моноциты/макрофаги, а также мезотелиальные клетки (не лейкоциты).
 - Полиморфно-ядерные клетки (ПМЯ) встречаются реже, их количество должно быть ниже 10%.
- Количество эритроцитов < 10 000/мкл

Числа лейкоцитов и ПМН обращают на себя особое внимание при выявлении спонтанного бактериального перитонита (СБП). Количество ПМЯ ≥ 250 клеток/мкл подтверждает диагноз СБП при отсутствии очевидного интраабдоминального источника инфекции [5], и лечащий врач должен немедленно начать эмпирическое лечение антибиотиками.

3. Диализат, ПАПД

Некоторые пациенты, нуждающиеся в диализе, могут использовать непрерывный амбулаторный перитонеальный диализ (ПАПД). Брюшную полость заполняют стерильным диализным раствором через катетер. Затем посредством осмоса жидкость выводит из организма те вещества, которые обычно выводятся через почки. Диализирующий раствор заменяется каждые 4–6 часов через мешок. Пациенты могут делать это самостоятельно после небольшой тренировки. Эта процедура повышает качество жизни пациентов, находящихся на диализе, поскольку им не нужно постоянно посещать диализную клинику; однако существует риск заражения перитонитом через доступ к катетеру. Обычно пациенты должны посещать врача один раз в месяц для осмотра.

Причинами перитонита ПАПД являются микробы, проникшие, например, через загрязненные диализные трубки или расширение места выхода катетера, или туннельные инфекции. К другим возможным причинам относятся аллергические реакции пациентов на некоторые компоненты диализирующего раствора или системы связи в начале ПАПД, которые затем приводят к так называемому «эозинофильному перитониту».

Таблица 1 Основные критерии решения для характеристики плеврального выпота

Транссудат	Экссудат
Общее количество клеток < 1000/мкл = лейкоциты (лейкоциты) + не-лейкоциты (например, мезотелиальные клетки)	Общее количество клеток > 1000/мкл = лейкоциты + не-лейкоциты (например, мезотелиальные клетки)
Нейтрофильные гранулоциты < 250/мкл	Нейтрофильные гранулоциты > 500/мкл
Эритроциты (RBC) < 1000/мкл	РБК > 10 000/мкл

Дополнительные клинико-химические и серологические параметры, принимаемые во внимание: градиент альбумина в сыворотке/плевральной жидкости, РЭА, общий белок, общий белок сыворотки/плевральной жидкости, α -амилаза, холестерин, ЛД, глюкоза и другие.

Таким образом, наиболее частый вопрос при исследовании жидкостей ПАПД:

- Воспалительный или невоспалительный?
 - Количество нейтрофильных гранулоцитов
 - Количество эозинофильных гранулоцитов

Клетки, обнаруженные в жидкости ПАПД, сопоставимы с клетками в асцитической жидкости (т.е. мезотелиальные клетки, макрофаги, моноциты, лимфоциты = мононуклеарные клетки и полиморфно-ядерные клетки), поскольку диализный раствор также находится в брюшной полости. Количество клеток в диализате будет частично зависеть от продолжительности пребывания [6].

Международное общество перитонеального диализа (ISPD) рекомендует всегда диагностировать перитонит при наличии хотя бы двух из следующих критериев:

- (1) клинические признаки, соответствующие перитониту, т.е. боль в животе и/или мутные диализные выделения;
- (2) диализный поток с содержанием лейкоцитов > 100/мкл (после времени пребывания не менее 2 часов) с > 50% полиморфно-ядерных клеток; и
- (3) положительная культура диализных стоков [6].

Эозинофильный перитонит определяется наличием лейкоцитов > 100/мкл, при этом эозинофилы составляют > 10% от общего количества лейкоцитов.

4. Синовиальная жидкость (СЖ)

Анализ СФ является важным инструментом для диагностики пациентов с суставным выпотом и классификации жидкости как невоспалительной, воспалительной или септической. Его также часто используют для установления диагноза методом исключения. В любом случае это важный прямой диагностический критерий подагры, псевдоподагры, других кристаллических отложений и септического артрита. Гепарин натрия рекомендуется в качестве антикоагулянта, поскольку, помимо подсчета и дифференцировки клеток, важным аналитическим этапом является оценка кристаллов в образце. Использование других антикоагулянтов, таких как литий-гепарин, ЭДТА или оксалат, может привести к артефактам при обнаружении кристаллов [1].

Характеристики синовиальной жидкости

Обычно в колене взрослого присутствует небольшое количество SF, например около 3,5 мл.

- Цвет от бледного до соломенного,
- прозрачный. SF обычно очень вязкий.
- Биохимический состав аналогичен составу плазмы, содержит жир, белок, воду и глюкозу. Но он содержит также гиалуроновую кислоту и клетки.
- Функции SF заключаются в уменьшении трения, амортизации ударов и транспортировке питательных веществ и отходов.

Вязкость SF возникает в результате полимеризации гиалуроновой кислоты. Если вязкость очень высока, это может привести к трудностям при определении количества клеток. Эту проблему можно решить, приготовив разведение физиологическим раствором или добавив к образцу гиалуронидазу (400 единиц на 1 мл синовиальной жидкости, затем инкубировать в течение 10 минут при 37°C) [1].

Оценка количества лейкоцитов и ПМН в сочетании диагностически важна для немедленной диагностики невоспалительных, воспалительных и инфекционных заболеваний.

- В нормальном суставе СФ содержит
 - Лейкоциты < 200/мкл,
 - ПМН <25% и
 - нет эритроцитов.

Следующая традиционная система классификации была составлена Американской ассоциацией ревматологов [3]:

- Невоспалительный: лейкоциты < 2000 x 10⁶/л, PMN < 25%
- Воспалительный: лейкоциты 2000–50 000 x 10⁶/л, PMN > 50%
- Септик: лейкоциты > 50 000 x 10⁶/л, PMN > 75%

Практический интерес представляет соотношение ПМН к общему количеству лейкоцитов. При воспалительных типах она может повышаться до >70%, а при септических артритах - до 95%.

Более подробная информация о синовиальной жидкости обсуждается в двух специальных статьях SEED. В части 1 объясняются основные характеристики и состав СФ, тогда как часть 2 посвящена лабораторному исследованию и описывает различные тесты, необходимые для диагностики. Эти две статьи можно скачать напрямую с веб-сайта Systex Europe: '[Синовиальная жидкость – часть 1: основные характеристики](#)' и '[Синовиальная жидкость – часть 2: лабораторная оценка](#)'

5. Спинномозговая жидкость (СМЖ)

Этот материал представляет собой самую большую проблему для всех участников, от сбора проб до обработки в лаборатории. Утверждения, сделанные в следующем тексте, относятся к образцам спинномозговой жидкости взрослых пациентов.

Показания к анализу ликвора охватывают очень широкий спектр. Возможные проблемы:

- Воспаление
- Опухоли
- Барьерные дисфункции
- Инфекционное заболевание
- Кровотечение

Спинномозговая пункция проводится как по диагностическим, так и по терапевтическим показаниям.

Контрольный диапазон количества клеток

- ЦСЖ, полученная при помощи люмбальной пункции: лейкоциты < 5/мкл
- [3] В норме могут встречаться лимфоциты или моноциты. Гранулоциты отсутствуют.
- Нет эритроцитов

В зависимости от состояния здоровья спинномозговая жидкость может также содержать некровотворные клетки (например, опухолевые клетки, астроциты, олигодендроциты и т. д.). Результат автоматического подсчета клеток с использованием гематологического анализатора, предварительная дифференциация

между PMN и MN может обеспечить быстрое и полезное представление о распределении клеток.

Автоматизированный анализ жидкости организма

Комбинация гемоцитометрии и окрашенного цитоцентрифугирования считается золотым стандартом для подсчета и дифференциации клеток в образцах биологических жидкостей. Однако в настоящее время подсчет клеток можно проводить как вручную, так и автоматически [1, 3], и важно знать, в чем заключаются пределы и ограничения обоих методов.

Традиционно подсчет жидкости в организме проводится путем ручного подсчета эритроцитов и ядросодержащих клеток/лейкоцитов под микроскопом с использованием гемоцитометра (также называемого «счетной камерой»). Точность этого устройства сильно зависит от ряда переменных, включая правильную загрузку объема образца, соответствующие разведения и количество подсчитанных квадратов и клеток. Кроме того, это субъективный и чрезвычайно трудоемкий процесс, требующий высокого уровня знаний. Более того, во многих лабораториях количество технических специалистов сокращается, а с увеличением рабочей нагрузки лаборатории теперь имеют возможность автоматизировать подсчет клеток с помощью автоматических гематологических анализаторов или анализаторов мочи. Они разработаны так, чтобы быть более быстрыми, точными и простыми в использовании по сравнению с ручными методами. Кроме того, они аспирируют больший объем образца, чем вмещает счетная камера, что приводит к подсчету большего количества клеток и, в свою очередь, повышает точность и аккуратность. В таблице 2 суммированы преимущества и недостатки гемоцитометрических анализаторов и анализаторов Systex [3].

Таблица 2 Краткое изложение преимуществ и недостатков различных методов, модифицированное из Fleming C et al. [3]

Метод	Преимущества	Недостатки	Рекомендации
Ручная счетная камера	<ul style="list-style-type: none"> - бюджетный - нужен только небольшой объем образца - Количество TNC/WBC/RBC 	<ul style="list-style-type: none"> ■ высокая неточность ■ высокая вариабельность между наблюдателями ■ требует много времени 	<p>Использовать только</p> <p>а) при возникновении сомнений в результатах автоматизированного анализа и</p> <p>б) для образцов с подозрением на злокачественность.</p>
Гематологические анализаторы Серия XN и серия XN-L в режиме XN-BF	<ul style="list-style-type: none"> - пониженный TAT - без подготовки проб - небольшой объем пробы - низкий предел обнаружения - Дифференциал WBC из 2 частей (PMN и MN) - исследовательский дифференциал WBC из 4 частей - расширенный счетный объем - один флаг для уведомления об аномалиях - Материал для контроля качества имеется в продаже 	<ul style="list-style-type: none"> ■ наименьшее регистрируемое значение эритроцитов: 1000 клеток/мкл* ■ ограничения в обнаружении злокачественных клеток 	<p>Критически просмотрите скаттерграммы и гистограммы, чтобы обнаружить отклонения и принять меры ручным методом. Рассмотрите каждый образец.</p>
Анализаторы анализа мочи UF-4000/5000 в режиме жидкости организма	<ul style="list-style-type: none"> - Режим BF всегда на борту (WBC, RBC, EC, TNC, BACT) - Дифференциал WBC из 2 частей (PMN и MN) - низкие пределы обнаружения лейкоцитов, эритроцитов и бактерий - без подготовки проб 	<ul style="list-style-type: none"> ■ требуется больший объем образца, в настоящее время атипичные клетки не обнаруживаются 	<p>ТНК = WBC + EC</p>

* Это относится к диапазону отображения RBC-BF (от 0,000 до 99,999 x 10⁶/мкл). Для получения подробной информации о технических характеристиках всегда обращайтесь к инструкциям по использованию соответствующего анализатора.

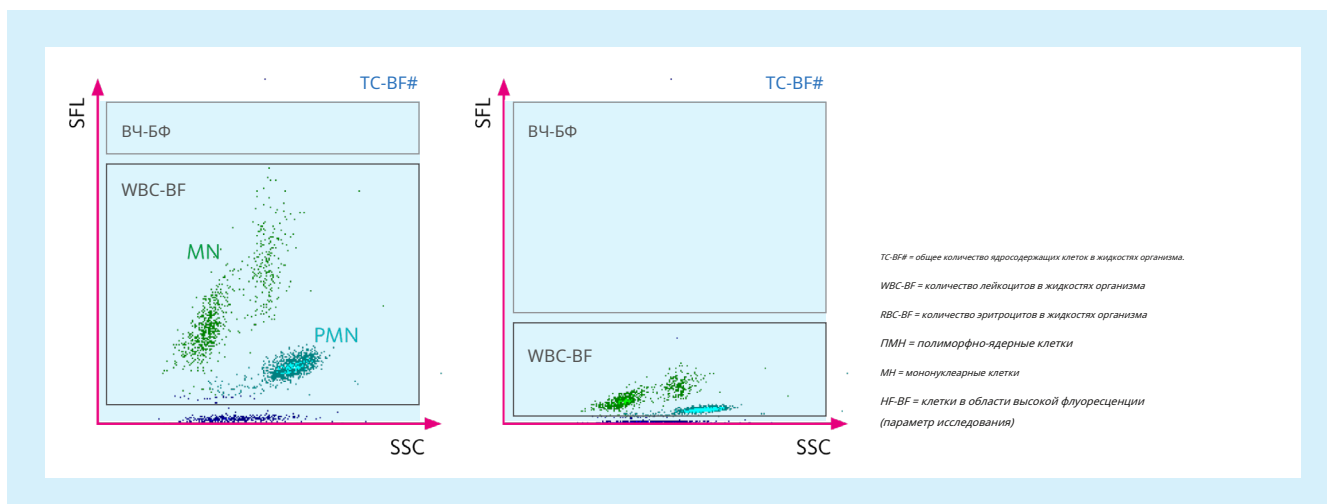


рисунок 1 Параметры жидкости организма на диаграмме рассеяния WDF (слева) и расширенной диаграмме рассеяния WDF (справа)

Приборы Systex серий XN и XN-L предлагают специальный режим измерения для анализа жидкостей организма — режим жидкости организма (режим XN-BF).

При выборе режима XN-BF проверка данных выполняется автоматически. Используемые каналы измерения

- канал WDF и
- Канал РБК/ПЛТ.

Без какой-либо специальной подготовки образец измеряется после ручной аспирации. В устройстве проводится различие между PMN и MN, и на основе количества лейкоцитов (WBC-BF) предоставляются абсолютные (#) и относительные (%) подсчеты для этих клеток. Поскольку различные жидкости организма также могут содержать лейкоциты, не являющиеся лейкоцитами, как пояснялось в предыдущем тексте, также необходимы данные об общем количестве клеток (TC-BF). Параметры scatterграммы поясняются на рис. 1.

Параметр TC-BF# включает все ядросодержащие клетки, обнаруженные в канале WDF. Лейкоциты представлены в области WBC-BF, тогда как другие клетки можно увидеть в области высокой флуоресценции (HF-BF). Например, мезотелиальные клетки, которые намного крупнее лейкоцитов, имеют более высокое содержание РНК/ДНК и поэтому могут проявляться в диапазоне высокой флуоресценции диаграммы рассеяния WDF. Опухолевые клетки в равной степени могут появляться в этой области из-за содержания в них РНК/ДНК и их размера, как показано в примере на рис. 2.

При интерпретации области HF-BF необходимо учитывать тип материала, а также клинический контекст. Например, мезотелиальные клетки регулярно обнаруживаются в образцах плевральной жидкости, и при измерении на анализаторе можно ожидать их появления в области ВЧ-БФ. Если же клетки обнаружены

в области HF-BF при измерении спинномозговой жидкости это ненормальный результат, и его необходимо уточнять путем микроскопии препарата цитоспина. Публикации подтверждают, что отсутствие высокофлуоресцентных клеток жидкости организма (HF-BF) можно использовать для исключения злокачественных состояний в образцах серьезных жидкостей [7-9]. Эти примеры ясно показывают, что информацию из области HF-BF следует оценивать по-разному в зависимости от основного клинического вопроса и типа материала.

Для поддержки интерпретации результатов, полученных гематологическими анализаторами Systex, используется специальный набор правил для жидкостей организма, который является частью РасширенныйРУ, можно использовать. Принимаются во внимание различные критерии технической проверки результатов, разделенные по типу материала (т.е. две категории: (1) CSF и (2) все остальные).

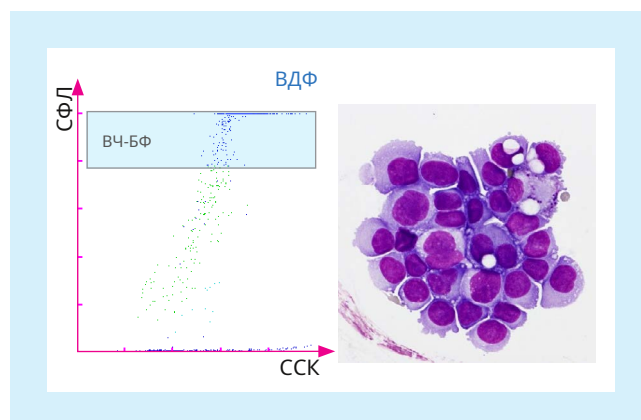


Рис. 2 Диаграмма рассеяния WDF (слева) с увеличенным количеством клеток в области HF-BF и изображением цитоспина (справа, полученное с помощью Systex DI-60), показывающее группы клеток опухолевых клеток в спинномозговой жидкости пациента с раком молочной железы.

Эти правила включают следующее:

- Решение WBC Абна Скаттерграма
- Показания HF-BF для групп клеток с высокой флуоресценцией
- Показания EO-BF для эозинофильных гранулоцитов при ПАПД
- Проверьте возможные помехи эритроцитов

Для некоторых жидкостей организма лаборатории предпочитают сообщать общее количество клеток, тогда как для других предпочтительным является количество лейкоцитов. Дифференциал анализатора WBC всегда связан с количеством WBC-BF. В случае, если TC-BF# выбран для отчетности в *Расширенный* IPU также рассчитывает PMN и MN, включая параметры исследования (например, HF-BF, EO-BF, NE-BF, LY-BF, MO-BF), на основе TC-BF#.

Согласно рекомендациям руководства [1], макроскопическое исследование (в т.ч. цвет, прозрачность, образование сгустков, вязкость) является неотъемлемой частью анализа биологических жидкостей. С *Расширенный* IPU (начиная с версии 4.6) теперь есть четыре новых параметра, которые позволяют вводить эти характеристики образца во время проверки результатов.

Правила предусматривают указания на вмешательства и рекомендации по действиям, которые необходимо выполнить, например, подсчет камер или подготовка цитоспина.

Благодаря простому, стандартизированному и автоматизированному измерению жидкостей организма в сочетании с дополнительным набором правил, посвященных жидкостям организма, Sysmex предлагает даже менее опытному лабораторному персоналу оптимальный уровень безопасности и уверенности, когда эти критические образцы поступают в лабораторию и требуют немедленного вмешательства. внимание.

Краткое содержание

- Референтные диапазоны и пороговые значения для клеток в жидкостях организма сильно различаются в зависимости от рассматриваемого материала.
- Ключевой эталонный параметр – общее количество клеток или количество лейкоцитов – зависит от типа материала, который следует учитывать. В зависимости от типа жидкости организма наряду с кровяными клетками (лейкоцитами) могут также присутствовать не-лейкоциты (например, мезотелиальные клетки, опухолевые клетки и т. д.). Это означает, что общее количество клеток и количество лейкоцитов не всегда идентичны.
- Автоматизированное измерение жидкостей организма и соответствующая техническая проверка результатов помогают улучшить качество результатов и сократить время их представления.

Рекомендации

- [1] *Институт клинических и лабораторных стандартов*(2006): Анализ жидкости организма на предмет клеточного состава. Утвержденное руководство. Документ CLSI H56-A [ISBN: 1-56238-614-X].
- [2] *Томас Л.*(2007): Клиническая лабораторная диагностика. Использование и оценка результатов клинических лабораторных исследований. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH
- [3] *Флеминг С и др.*(2015): Клиническая значимость и современные методы подсчета клеток крови в жидкостях организма при подозрении на воспалительное заболевание. *Клин Химическая Лаборатория Мед.* 53(11):1689.
- [4] *Кинг Штрейзингер С и др.*(2008): Анализ мочи и жидкости организма. Пятое издание. © 2008 FA Davis Co.
- [5] *Оуи РС и др.*(2016): Диагностическое обследование больных асцитом: современные рекомендации и перспективы. *Нет Дж. Мед.* октябрь; 74(8):330-35.
- [6] *Кам-Тао Ли П и др.*(2016): Руководящие принципы/рекомендации ISPD. Рекомендации ISPD по перитониту: обновленная информация о профилактике и лечении 2016 г. *Международный институт перитонеального диализа.* Том. 36, стр. 481-508.
- [7] *Лабазер Д. и др.*(2015): Обнаружение злокачественных клеток в серозных жидкостях организма путем подсчета высокофлуоресцентных клеток на гематологическом анализаторе Sysmex XN-2000. *Int J Lab Гематол.* 37(5):715.
- [8] *Сюй В и др.*(2016): Оценка гематологического анализатора Sysmex XN-1000 для подсчета клеток и скрининга злокачественных клеток серозного выпота. *Медицина (Балтимор).* 96(27):e7433.
- [9] *Чо Ю и др.*(2015): Клеточный анализ жидкостей организма с использованием автоматического гематологического анализатора Sysmex XN-2000: акцент на злокачественных образцах. *Int J Lab Гематол.* 37(3):346.