

## Metoda cytometrii przepływowej w ocenie pleocytozy i różnicowaniu komórek płynu mózgowo-rdzeniowego – wyniki wstępne

### The usefulness of flow cytometry method in pleocytosis estimation in cerebrospinal fluid cells differentiation – preliminary results

Łukasz Kraszula<sup>1</sup>, Makandjou-Ola Eusebio<sup>1</sup>, Kinga Bartczak<sup>1</sup>,  
Magdalena Szyszka vel Syska<sup>1</sup>, Agnieszka Kobiela-Mednis<sup>1</sup>, Piotr Kuna<sup>2</sup>, Mirosława Pietruczuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup>Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

#### Streszczenie

Rutynowo pleocytoza PMR jest oznaczana metodą mikroskopową. Skrócenie czasu TAT badania ogólnego płynu mózgowo-rdzeniowego wymaga zastosowania metod automatycznych. Celem pracy było porównanie metody automatycznej z mikroskopową w oznaczaniu pleocytozy i rozdzieleniu krwinek białych na populacje w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Materiał do badań stanowił płyn mózgowo-rdzeniowy, pobrany od 89 pacjentów. Badania wykonano metodą mikroskopową z użyciem komory Fuchs-Rosenthala oraz automatyczną, fluorescencyjną cytometrią przepływową.

Nie wykazano znamiennej różnicy w grupie A (Pleocytoza <5 kom/μL) i B (Pleocytoza 5-600 kom/μL) dla parametru WBC. W grupie B wykazano znamiennej różnicę dla parametrów PMN-BF i MN-BF pomiędzy dwiema metodami (p<0,01). Dodatkowo wykazano, że w metodzie automatycznej występuje ujemne obciążenie (bias) dla parametru PMN-BF oraz dodatnie dla parametru MN-BF.

Wyniki badań wykazały, że oznaczanie pleocytozy płynu mózgowo-rdzeniowego metodą automatyczną i mikroskopową jest porównywalne. Zmiany jakościowe w krwinkach białych utrudniają rozdział komórek na populacje w metodzie automatycznej, co ogranicza jej rutynowe zastosowanie.

#### Abstract

Evaluation of CSF pleocytosis is routinely determined by microscopic examination. To shorten TAT automated methods are used.

The aim of this study was to compare the automatic and microscopic methods in the evaluation of pleocytosis and the differentiation of white blood cells in CSF.

Cerebrospinal fluid samples were collected from 89 patients. The examination was performed microscopically using the Fuchs-Rosenthal chamber and flow cytometry.

There were no significant differences in group A (Pleocytosis <5 cells/μL) and B (Pleocytosis 5-600 cells/μL) in the WBC parameter. In group B, a statistical difference was found in PMN and MN parameters between these two methods (p <0.01). Negative bias for the PMN parameter and positive for the MN parameter were found in group B.

The results showed that the determination of cerebrospinal fluid pleocytosis by an automatic and microscopic methods are comparable. Qualitative changes in white blood cells limited these differentiation by flow cytometry method, so microscopic examination is mandatory.

**Słowa kluczowe:** PMR, Pleocytoza, TAT

**Keywords:** CSF, Pleocytosis, TAT

#### Wstęp

Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) jest rutynowym badaniem zlecanym w patologiiach ośrodkowego układu nerwowego, do których najczęściej należy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych o etiologii bakteryjnej lub wirusowej. Oprócz zapalenia opon mózgowo rdzeniowych badanie PMR wykonywane

jest także w przypadku diagnostyki przerzutów nowotworowych do OUN, krwawień podpajęczynówkowych oraz chorób neurodegeneracyjnych [1].

W diagnostyce zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych istotnym parametrem jest pleocytoza, która dodatkowo jest użyteczna w określeniu stopnia ciężkości choroby. Rozdział populacji leuko-

cytów sugeruje potencjalny czynnik etiologiczny, co pozwala na podjęcie decyzji diagnostycznych i terapeutycznych. Dane literaturowe wskazują, że oznaczenie pleocytozy nie jest wystarczające do różnicowania zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych o etiologii bakteryjnej od pozostałych [2]. Złotym standardem diagnostycznym w tej jednostce chorobowej są metody mikrobiologiczne, które pozwalają na potwierdzenie obecności czynnika etiologicznego. Jednak czas od wydania zlecenia wykonania badania do uzyskania wyniku przez lekarza (TAT; *Time Around Time*) dla badań mikrobiologicznych wynosi aż 72 godziny, a nie zawsze ze względu na stan kliniczny pacjenta możliwe jest tak długie oczekiwanie na wynik badania mikrobiologicznego [3]. Dlatego oznaczenie pleocytozy z mikroskopową oceną preparatu jest często użytecznym elementem procesu diagnostycznego. Chociaż TAT dla oceny pleocytozy z oceną mikroskopową preparatu są krótsze w porównaniu do badania mikrobiologicznego, to jednak możliwość oznaczania liczby komórek PMR, jak i ich różnicowania w oparciu o automatyczne analizatory, znacznie skraca czas oczekiwania na wynik. Oznaczenie liczby krwinek białych w PMR (WBC-BF) z różnicowaniem na komórki wielojądrzaste (PMN-BF) i jednojądrzaste (MN-BF) wskazuje na potencjalną przyczynę procesu zapalnego oraz pozwala na szybkie wprowadzenie terapii z jednoczesnym oczekiwaniem na wynik badania mikrobiologicznego [1].

W ostatnim czasie, na świecie, rola automatycznych analizatorów do oceny liczby komórek PMR wraz z ich rozdziałem, znacząco wzrosła. W Polsce, w większości medycznych laboratoriów diagnostycznych, badanie to wykonuje się metodą mikroskopową z wykorzystaniem komory Fuchsa-Rosenthala i mikroskopu świetlnego, która pozostaje „złotym standardem”. Na świecie oszacowano, że metoda mikroskopowa jest nie tylko czasochłonna, ale przede wszystkim kosztochłonna, bo wymaga udziału doświadczonego personelu [4]. Rosnąca liczba wykonywanych badań PMR, oraz oczekiwania klinicystów, aby wyniki otrzymywać w jak najkrótszym czasie powodują konieczność sięgania po metody automatyczne. Dlatego celem pracy było:

- porównanie automatycznej, fluorescencyjnej cytometrii przepływowej z metodą mikroskopową w oznaczaniu pleocytozy płynu mózgowo-rdzeniowego, z uwzględnieniem jej wielkości,
- porównanie rozdziału komórek płynu mózgowo-rdzeniowego na wielojądrzaste (PMN-BF) i jednojądrzaste (MN-BF), za pomocą automatycznej fluorescencyjnej cytometrii przepływowej i mikroskopowej w oparciu o charakterystykę metod,
- porównanie czasu TAT, dla metody mikroskopowej i automatycznej.

## **Materiał i Metody:**

### Materiał badany:

Materiał do badań stanowił płyn mózgowo-rdzeniowy, pobrany od 89 pacjentów Oddziału Klinicznego Neurologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Norberta Barlickiego w Łodzi, u których zlecono w trybie rutynowym wykonanie badania PMR. Od wszystkich pacjentów materiał został dostarczony do laboratorium w ciągu 30 minut od pobrania. Na wykorzystanie wyników do publikacji uzyskano zgodę Dyrekcji USK nr 1.

### Metody badawcze

Do oceny pleocytozy płynu mózgowo-rdzeniowego wykorzystano metodę mikroskopową (metoda referencyjna) oraz metodę automatyczną (fluorescencyjne cytometria przepływowa).

### Metoda mikroskopowa – procedura wykonania

Do oceny pleocytozy wykorzystano procedurę firmową producenta zestawu odczynników firmy AQUA-MED. Do 200 µl płynu mózgowo-rdzeniowego, dodano 20 µl odczynnika Samsona, w celu uzyskania hemolizy krwinek czerwonych, a także wybarwienia jąder komórkowych leukocytów. Po 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej nanoszono przygotowany PMR do komory Fuchsa-Rosenthala. Następnie zliczano liczbę komórek jądrzastych pod powiększeniem 400-krotnym z całej powierzchni siatki. Wynik wyliczano z wzoru:

$$\text{Pleocytoza } (\mu\text{L}) = a \times 11 / 3,2 \times 10$$

gdzie:

- a – liczba komórek zliczona z całej powierzchni siatki (256 kwadratów = 16 mm<sup>2</sup>)
- 3,2 mm<sup>3</sup> – objętość całej siatki; 16 mm<sup>2</sup> x 0,2 mm (głębokość komory)
- 11/10 = rozcieńczenie płynu mózgowo-rdzeniowego poprzez dodanie 1 objętości płynu Samsona do 10 objętości płynu mózgowo rdzeniowego

Obliczenie rozcieńczenia:

całkowita objętość (200µL PMR + 20µL Płynu Samsona) / objętość PMR (200µL) = 1,1

### Zasada wykonania preparatu PMR

W przypadku pleocytozy >5 komórek/µL wykonywano preparat cytologiczny. Preparat cytologiczny PMR przygotowywano przy użyciu cytowirówki MPW 223c oraz wkładki CYTO zgodnie z instrukcją producenta MPW. INSTRUMENTS. Preparaty po wyjęciu z cytowirówki i wysuszeniu, barwiono metodą MGG (*Maya-Grünwalda-Giemsy*) bez dodatkowego utrwalania komórek Cytofixem. Przygotowane preparaty płynu mózgowo-rdzeniowego, oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego pod powiększenie 1000-krotnym.

### Zasada oznaczania pleocytozy metodą automatyczną

W metodzie automatycznej badanie PMR wykonywano przy użyciu analizatora hematologicznego Sysmex XN 1000, z dedykowaną aplikacją dla płynów z jam ciała.

Zasada metody polega na wykorzystaniu fluorescencyjnej cytometrii przepływowej do różnicowania komórek jądrzastych w PMR. Po zastosowaniu odczynnika lizującego erytrocyty oraz wytwarzającego pory w błonie komórkowej leukocytów barwnik fluorescencyjny wnika do wnętrza komórek i barwi kwasy nukleinowe. Rozdział komórek na populacje oparty jest o ocenę intensywności fluorescencji, która jest proporcjonalna do zawartości kwasów nukleinowych oraz parametr rozproszenia bocznego światła laserowego (SSC), który odzwierciedla ilość ziarnistości wewnątrzkomórkowych. Komórki rozdzielane są na posiadające jądro monomorficzne (MN-BF)

jak monocyty i limfocyty oraz na komórki o jądrze polimorficznym (PMN-BF) czyli neutrofile, bazofile i eozynofile.

#### Zasada obliczania czasu TAT (Time around Time)

Czas TAT obliczono na podstawie danych pochodzących z wyników badania ogólnego płynów mózgowo-rdzeniowych. TAT obliczono jako różnicę pomiędzy datą i godziną pobrania materiału do badań a datą i godziną zatwierdzenia wyniku.

#### Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą programu Statistica 12.0 PL (Statsoft, USA) oraz wersji testowej programu MedCalc wersja 18.5. Istotność różnic między dwiema metodami obliczano przy użyciu testu kolejności par Wilcoxon. Liniowa zależność pomiędzy metodą mikroskopową a automatyczną, została przeprowadzona dzięki wykorzystaniu analizy regresji Passing-Bablok w programie MedCalc. Graficznym potwierdzeniem liniowości regresji a także uwidocznieniem różnic między stosowanymi w doświadczeniu metodami był wykres Bland-Altmana. Za poziom istotności przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

#### Wyniki

Wyniki precyzji parametrów WBC-BF, PMN-BF i MN-BF otrzymano na podstawie pomiarów dwóch poziomów materiałów kontrolnych (BF1 i BF2), tabela I. Uzyskane współczynniki zmienności prawie dla wszystkich parametrów były niższe od 5%. Jedynie w przypadku parametru MN-BF dla pierwszego poziomu kontroli współczynnik zmienności przekroczył 5%. Jednak wszystkie wyniki mieściły się w granicach ustalonego przez laboratorium współczynnika zmienności (8%). W badanych próbkach dokonano analizy parametrów WBC-BF, PMN-BF i MN-BF w dwóch podgrupach (A i B), dla dwóch zakresów pleocytozy. Podgrupa A zawierała próbki z liczbą komórek od 0 do 5 – wartości prawidłowe, podgrupa B od 6 do 600 kom/μL – wartości patologiczne. Wyniki jednoczesowego

porównania obu metod przedstawiono w tabeli II. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w grupie A (Pleocytoza < 5 kom/μL) dla parametru WBC-BF. W grupie B (Pleocytoza 5-600 kom/μL) również nie wykazano istotnych statystycznie różnic dla tego parametru jednak w przypadku parametrów PMN-BF i MN-BF różnice pomiędzy dwiema metodami były znamienne statystycznie  $p < 0,01$  (tabela II). Metoda automatyczna charakteryzowała się znamienne niższą wartością parametru PMN-BF natomiast znamienne wyższą MN-BF w porównaniu do metody mikroskopowej. W grupie A zależność dla parametru mierzona jako wartość współczynnika korelacji  $r$  dla WBC-BF była umiarkowana,  $r = 0,582$ ;  $p < 0,001$  (tabela III). Natomiast dla parametrów WBC-BF i PMN-BF, w grupie B wartość współczynnika korelacji  $r$  wykazała bardzo silną zależność pomiędzy referencyjną metodą mikroskopową a automatyczną,  $r = 0,972$ ;  $p < 0,001$  i  $r = 0,912$ ;  $p < 0,001$  oraz dość

Tabela I. Wyniki precyzji parametrów WBC-BF, PMN-BF i MN-BF w metodzie automatycznej (Sysmex XN1000).

Materiał kontrolny (n=20)	Wartość nominalna	Średnia	SD	CV%
<b>BF 1 WBC – BF</b>	0,077	0,073	0,003	2,7
<b>BF 1 PMN kom/μL</b>	0,057	0,050	0,003	-3,2
<b>BF 1 MN kom/μL</b>	0,020	0,023	0,02	6,9
<b>BF 2 WBC – BF</b>	0,330	0,321	0,023	2,2
<b>BF 2 PMN kom/μL</b>	0,242	0,233	0,009	3,5
<b>BF 2 MN kom/μL</b>	0,088	0,081	0,011	4,5

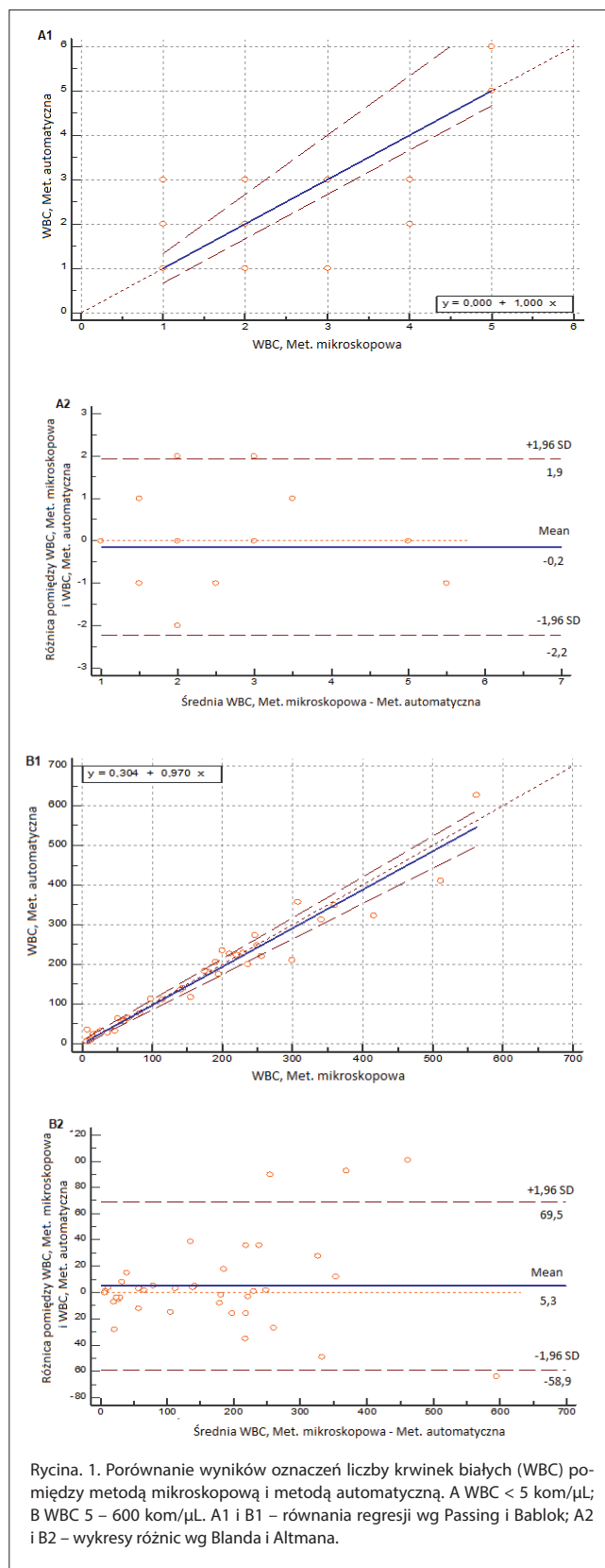
Tabela II. Porównanie wyników oznaczeń liczby leukocytów (WBC), liczby komórek wielojądrzastych (PMN) i jednojądrzastych (MN), pomiędzy metodą mikroskopową i metodą automatyczną (Sysmex XN1000).

		Mediana	dolny – górny kwartył	minimum – maksimum	p
WBC < 5 kom/μL	<b>WBC (met. mikroskopowa)</b>	2	1-3	1-5	NS
	<b>WBC (met. automatyczna)</b>	2	1-3	1-6	
WBC 5 – 600 kom/μL	<b>WBC (met. mikroskopowa)</b>	165	49-242	6-563	NS
	<b>WBC (met. automatyczna)</b>	158	46-228	6-627	
	<b>PMN (met. mikroskopowa)</b>	44	5-105	1-389	<b>p &lt; 0,01</b>
	<b>PMN (met. automatyczna)</b>	27	7-69	1-398	
	<b>MN (met. mikroskopowa)</b>	73	26-134	3-193	<b>p &lt; 0,01</b>
	<b>MN (met. automatyczna)</b>	91	36-162	4-229	

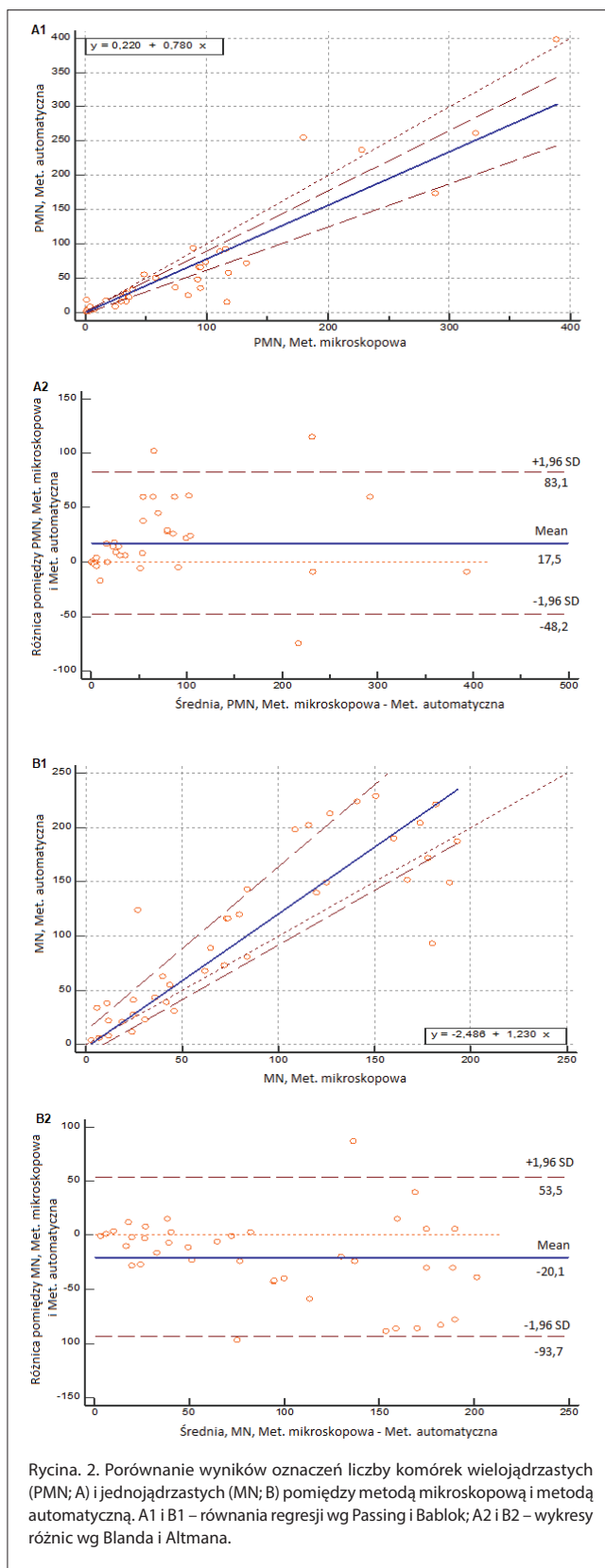
Tabela III. Porównanie wyników oznaczeń liczby leukocytów (WBC), liczby komórek wielojądrzastych (PMN) i jednojądrzastych (MN) pomiędzy metodą mikroskopową i metodą automatyczną (Sysmex XN1000).

	Współczynnik korelacji $r$	Metoda Passing Bablok	
		Intercept 0 a (95%CI)	Slope 1 b (95%CI)
WBC < 5 kom/μL	<b>WBC (met. mikroskopowa)</b>	0	1
	<b>WBC (met. automatyczna)</b>	0,582	(-0,333 – 0)
WBC 5 – 600 kom/μL	<b>WBC (met. mikroskopowa)</b>	0,972	-0,313 (-9,864 – 4,035)
	<b>WBC (met. automatyczna)</b>		1,031 (0,972 – 1,121)
	<b>PMN (met. mikroskopowa)</b>	0,912	0,780
	<b>PMN (met. automatyczna)</b>		(0,633 – 0,878)
	<b>MN (met. mikroskopowa)</b>	0,880	-2,486
	<b>MN (met. automatyczna)</b>		(-9,909 – 13,020)

Intercept 0 – punkt przecięcia a, stanowi systematyczną różnicę między dwiema metodami.

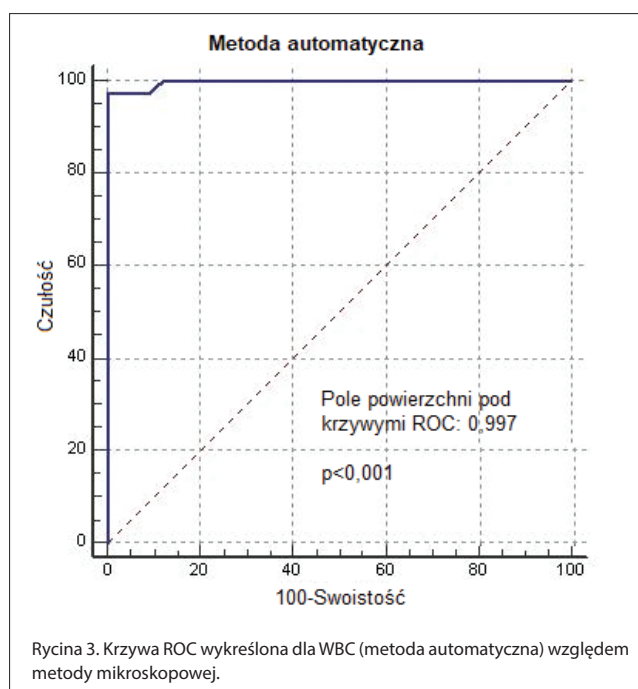


silną zależność dla parametru MN-BF,  $r=0,880$ ;  $p<0,001$  (tabela III). Analizę wyników regresji Passing-Bablok dla porównania metody automatycznej z metodą manualną przedstawiono w tabeli III i ryc 1, 2. Na podstawie analizy regresji Passing-Bablok wykazaliśmy, że metoda automatyczna jest porównywalna z metodą mikroskopową zarówno w grupie A jak i B dla wszystkich porównywanych parametrów.



Porównując manualną metodę mikroskopową z metodą automatyczną w stosunku do średnich z obu metod, wykres Bland-Altmana wykazał, że w grupie A gdzie liczba komórek jest prawidłowa występuje nieistotne obciążenie (bias) pomiędzy metodami (ryc.1). W przypadku grupy B zaobserwowano ujemne obciążenia (bias) dla parametrów WBC i PMN oraz dodatnie dla parametru MN dla metody automatycznej (ryc. 1, 2).





W przypadku grupy badanej z pleocytozą  $>5$  komórek, analiza krzywej ROC wykazała, że pole powierzchni pod krzywą wynosi 0,997 (AUC). Czułość diagnostyczna wyniosła 98% natomiast swoistość diagnostyczna 91% dla metody automatycznej w odniesieniu do „złotego standardu” tzn. metody mikroskopowej (ryc. 3). Czas TAT dla badania ogólnego PMR, z oceną rozdziału komórek wyniósł 8 godzin dla metody mikroskopowej, był znacząco dłuższy od metody automatycznej ( $p < 0,001$ ). TAT dla badania PMR z automatycznym rozdziałem komórek wyniósł 1 godzinę i 36 minut.

## Dyskusja

W medycznych laboratoriach diagnostycznych, do oceny pleocytozy PMR oraz różnicowania krwinek białych na populację, rutynowo stosuje się dwie metody: automatyczną i mikroskopową. Metoda mikroskopowa, jako metoda referencyjna polega na optycznej ocenie preparatu [5]. Rodzaj stosowanej metody automatycznej jest zależny od typu analizatora, jednak najczęściej jest to fluorescencyjna cytometria przepływowa [6]. W przypadku innych materiałów niż krew obwodowa, do których należy płyn mózgowo-rdzeniowy zalecane jest stosowanie dedykowanej aplikacji. Nie wszystkie rodzaje analizatorów hematologicznych posiadają taką funkcję. Praktyka rutynowa pokazuje jednak użyteczność i konieczność wdrożenia metod automatycznych do diagnostyki innych materiałów biologicznych niż krew obwodowa.

Przeprowadzone badania wykazały brak znaczących różnic w ocenie pleocytozy między obiema zastosowanymi metodami, mikroskopową i automatyczną, zarówno w grupie pacjentów z pleocytozą w zakresie od 0 do 5 jak i powyżej 5 komórek. Porównywalność obu metod w ocenie pleocytozy płynu mózgowo-rdzeniowego, potwierdziła analiza regresji Passing Bablok z wykresem Bland-Altmana. Analizy te sugerują, że obie metody mogą być stosowane zamiennie. Umiarkowana wartość korelacji dla pleocytozy  $<5$  komórek może być związana z mniejszą precyzją obu metod przy niższej liczbie komórek. Do podobnych wniosków doszli Sandhaus L i wsp. w swoich badaniach [7].

Znamienne różnice pomiędzy metodami wykazaliśmy natomiast porównując rozdział komórek na populację PMN i MN. Analiza wykresu Bland Altmana wykazała, że występuje ujemne obciążenie (bias) dla parametru PMN i dodatnie dla parametru MN dla metody automatycznej. Zarówno analiza krzywej regresji Passing Bablok jak i wykres Bland-Altmana wykazały porównywalność parametrów PMN i MN w obu metodach. Trzeba jednak zaznaczyć, że 95% przedziały ufności dla systematycznej (punkt a) i proporcjonalnej różnicy (punkt b) między dwiema metodami są szerokie, co w przypadku wykazanych znamienych różnic pomiędzy metodami może mieć znaczenie kliniczne.

Inni badacze uzyskali odmienne od naszych wyniki. Fleming i wsp. wykazali dodatnie obciążenie dla parametrów WBC a zwłaszcza PMN podczas porównania wyników metody automatycznej (Sysmex XN-1000) z metodą mikroskopową [8]. Kolejne badanie wykonane na analizatorze Sysmex XN 1000 ale oceniające aplikację naukową (hsA, Research Mode) przez Fleming i wsp. potwierdziło wcześniejsze wyniki związane z dodatnim obciążeniem dla parametrów WBC i PMN oraz wykazało ujemne obciążenie dla populacji MO (monocytów) [5].

Uzyskane wyniki badań potwierdzają, że ze względu na porównywalność obu metod w ocenie pleocytozy, istnieje możliwość zastosowania metody automatycznej, jako równoważnej z metodą mikroskopową do oceny tego parametru. Jednocześnie otrzymane wyniki badań sugerują bardzo ważne pytanie, czy w związku z wykazaniem błędów systematycznych w rozdziale komórek na populację można w pełni implementować metodę automatyczną. Na różnice w rozdziale komórek pomiędzy metodą mikroskopową i automatyczną wpływa wiele czynników. W metodzie mikroskopowej komórki różnicuje się w oparciu o sumę ich cech takich jak: wielkość, wybarwienie cytoplazmy, wybarwienie jądra komórkowego oraz obecność ziarnistości. Ze względu na rodzaj materiału, jakim jest płyn mózgowo-rdzeniowy może dochodzić do powstania skrzepu lub hemolizy komórek w próbce, co skutkuje zmianą morfologii komórek, np. powstają komórki obkurczone. Utrudnia to znacznie ich różnicowanie pomiędzy limfocytami a monocytami oraz monocytami i neutrofilami. Analiza komórek zależy, więc od umiejętności diagnosty laboratoryjnego dokonującego oceny mikroskopowej. W metodzie cytometrii przepływowej stosowanej w analizatorach automatycznych po lizie erytrocytów, płytek krwi oraz wybarwieniu kwasów nukleinowych w krwinkach białych ich różnicowanie opiera się o wielkość i ziarnistość komórek oraz zawartość kwasów nukleinowych. Dzięki temu możliwy jest podział na komórki monomorficzne i polimorficzne. Komórki patologiczne, często młodsze i większe niż prawidłowe leukocyty ulegają także wybarwieniu, ale ze względu na większą zawartość kwasów nukleinowych, prezentują wyższą fluorescencję. Wydawałoby się, więc, że podstawowy rozdział krwinek białych na analizatorze hematologicznym powinien mieć przewagę nad metodą optyczną, tak jak ma to miejsce w przypadku oceny ilościowej krwinek białych we krwi obwodowej.

W przeprowadzonych przez nas badaniach, w metodzie automatycznej, różnicowanie krwinek białych analizowane było w oparciu o algorytmy bramkowania wprowadzone przez producenta testu. W 5 przypadkach na 89 pacjentów stwierdzono różnice w paramet-

trach PMN-BF i MN-BF, bez zachowania kierunku zmian w poszczególnych populacjach. Różnice w ocenianych parametrach mogły wynikać ze zmian jakościowych w komórkach np. obecności zmian wodniczkowych w neutrofilach, czy atypowych limfocytów z ziarnistościami, co utrudnia kwalifikowanie komórek do odpowiednich przedziałów w metodzie automatycznej. Potwierdzają to wyniki naszych analiz gdzie u 5 pacjentów: w dwóch płynach obecne były zmiany wodniczkowe w neutrofilach, w dwóch limfocyty atypowe z ziarnistościami natomiast w jednym makrofagi i monocyty z ziarnami hemosyderyny i hematoidyny.

Dlatego wydaje się, że żeby w pełni wdrożyć metodę automatyczną do rutynowej diagnostyki niezbędne jest wprowadzenie możliwości zastosowania elastycznych algorytmów bramkowania, które uwzględnią zmienność biologiczną i ocenę indywidualną uzyskanych wyników. Drugim ważnym elementem, niezbędnym, aby w pełni zastosować automatyczne analizatory w rutynowej diagnostyce jest zastosowanie systemu Flag (na wzór badania krwi obwodowej), który umożliwi zakwalifikowanie próbki PMR do oceny metodą mikroskopową.

Zarówno metoda mikroskopowa jak i automatyczna mają swoje zalety i ograniczenia. Wykonanie preparatu PMR wraz z jego oceną przy zastosowaniu metody mikroskopowej i oznaczenie pozostałych parametrów wchodzących w skład badania ogólnego PMR może trwać nawet kilka godzin. Dlatego metoda automatyczna, w znacznie krótszym czasie, pozwala na wykonanie badania ogólnego wraz z oznaczeniem pleocytozy płynu mózgowo-rdzeniowego i rozdziałem komórkowym. Wyniki badań pokazały, że mediana TAT dla tej metody wyniosła 1 godzinę i 36 minut. Jest to kluczowe dla pacjentów, ponieważ znaczne skrócenie czasu TAT umożliwi szybsze wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego lub diagnostycznego.

Objętość PMR do analizy, jest ważnym aspektem w kontekście wiarygodności wyniku. Do wykonania pleocytozy PMR metodą automatyczną zużywa się, większą objętość PMR (88  $\mu\text{L}$ ), w stosunku do metody mikroskopowej (3,2  $\mu\text{L}$ ) a jednocześnie znacznie mniejszą niż przy wykonaniu badania na aplikacji hematologicznej (130 – 150  $\mu\text{L}$ ). Dzięki temu otrzymany wynik jest bardziej wiarygodny, niż przy oznaczaniu pleocytozy płynu mózgowo-rdzeniowego metodą mikroskopową gdzie badana jest próbka o dużo mniejszej objętości. Jednocześnie objętość próbki użyta do badania na aplikacji dla płynów jest znacząca mniejsza w porównaniu do aplikacji hematologicznej, co jest szczególnie istotne podczas badania PMR, ponieważ jest to próbka trudna do pozyskania [8].

Metoda automatyczna jest dużo wydajniejsza, ponieważ można oznaczyć znacznie większą liczbę pleocytoz w porównaniu do metody mikroskopowej. Metoda ta cechuje się dużo lepszą powtarzalnością.

Jednak ograniczeniem metody automatycznej jest wielkość analizowanej komórki. Największą komórką, jaką analizator może rozpoznać i sklasyfikować jest komórka blastyczna. W płynie mózgowo-rdzeniowym, mogą znaleźć się również komórki nowotworowe w tym np. komórki przerzutowe, najczęściej raka piersi i płuc [9]. Wykonanie pleocytozy metodą automatyczną płynu mózgowo-rdzeniowego w tym przypadku, nie da nam żadnych

informacji o ich obecności. Wykrycie i identyfikacja tych komórek jest możliwa, dzięki zastosowaniu metody mikroskopowej, po wykonaniu preparatu cytologicznego w cytowirówce. Po wybarwieniu komórek, pod mikroskopem, doświadczony diagnosta może wykryć komórki nowotworowe i inne typy komórek, których analizator nie jest w stanie zróżnicować prawidłowo [10]. Otrzymane wyniki oceny mikroskopowej w takich przypadkach są jednym z kluczowych badań, które pozwalają lekarzowi na podjęcie decyzji o dalszym sposobie postępowania z pacjentem. Metoda mikroskopowa w porównaniu do automatycznej, wydaje się być lepszą metodą do oceny komórek w płynach mętnych. Pobrany płyn mózgowo-rdzeniowy, zwłaszcza przy infekcjach bakteryjnych wywołujących ropne zapalenie jest bardzo mętny [11]. Analizatory w takich przypadkach mogą dostarczyć fałszywie ujemnych wyników, ze względu na stosowaną metodę oceny komórek. W analizatorach wykorzystuje się fluorescencyjną cytometrię przepływową, która polega na przejściu wiązki światła przez płyn mózgowo-rdzeniowy i wzbudzeniu fluorochromów, które wysyłają sygnał analizowany na odpowiednich detektorach. Wysoka mętność, utrudnia przejście wiązki światła i odbieranie sygnału przez detektory, dlatego otrzymany wynik może być fałszywie obniżony. W metodzie mikroskopowej duża mętność płynu mózgowo-rdzeniowego, nie jest aż takim dużym utrudnieniem w ocenie pleocytozy.

Dużym problemem metody automatycznej przy infekcjach bakteryjnych, jest brak możliwości oceny obecności bakterii oraz komórek żernych i ich przeładowania bakteriami. Jest to bardzo ważne w ocenie stopnia infekcji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Po wykonaniu preparatu PMR w metodzie mikroskopowej, możemy zobaczyć i ocenić aktywowane komórki żerne oraz bakterie. Ten sam problem występuje w przypadku infekcji grzybiczych czy też pasożytniczych [12].

Podczas stosowania leków przez pacjenta w procesie leczenia, może dojść do rozpadu komórek i powstania licznych cieni komórkowych. Przy zastosowaniu metody automatycznej analizator nie jest w stanie policzyć uszkodzonych komórek, wytworzone skupiska komórkowe czy liczne cienie komórkowe, co może dać fałszywie zaniżony wynik pleocytozy, podczas gdy komórek jest znacznie więcej. Zastosowanie metody mikroskopowej w tym przypadku, jest wskazane ze względu na możliwość oceny zaawansowania rozpadu komórek, obecności skupisk komórkowych a także cieni komórkowych. Dzięki temu wydany wynik, ma większą wartość kliniczną i obciążony jest znacznie mniejszym błędem [13].

Opisane wyżej zalety i wady obu metod stosowanych do oceny płynu mózgowo-rdzeniowego i analiza uzyskanych wyników potwierdzają, że metoda automatyczna w najbliższym czasie nie będzie mogła definitywnie zastąpić metody mikroskopowej. Oczywiście metoda automatyczna ma bardzo dużo praktycznych zalet, dzięki którym otrzymanie wyniku oceny ilościowej komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym jest znacznie szybsze i dokładniejsze. Jednak w niektórych przypadkach klinicznych, to metoda mikroskopowa, mimo że żmudna i czasochłonna, jest kluczowym badaniem decyzyjnym w rozpoznaniu patologii ośrodkowego układu nerwowego. Dlatego znaczenie metody mikroskopowej w ocenie płynu mózgowo-rdzeniowego jest bardzo duże.

Należy zaznaczyć, że liczba diagnostów laboratoryjnych, którzy specjalizują się w analizie płynu mózgowo-rdzeniowego jest bardzo mała. Często na dyżurach nie ma kadry, która sprawnie i w jak najkrótszym czasie dostarczy kompletny wynik badania płynu mózgowo-rdzeniowego klinicyście. Dlatego wprowadzenie metody automatycznej, która jest równocenna w ocenie pleocytozy z metodą mikroskopową, a zarazem charakteryzują się dużym krótszym czasem oznaczenia, jest dużym ułatwieniem w pracy diagnosty i korzyścią dla lekarza.

### Wnioski

1. Oznaczanie pleocytozy płynu mózgowo-rdzeniowego metodą automatyczną i mikroskopową jest porównywalne i obie metody charakteryzują się wysoką czułością oraz swoistością diagnostyczną.
2. Metoda automatyczna i mikroskopowa nie są w pełni porównywalne w ocenie rozkładu krwinek białych na wielojądrzaste (PMN-BF) i jednojądrzaste (MN-BF), w przypadkach ich zmian jakościowych.
3. Pełna implementacja metody automatycznej do rutynowej praktyki laboratoryjnej będzie mogła nastąpić przy zastosowaniu systemu „flag”, który wskaże płyn wymagający wykonania preparatu cytologicznego w cytowirówce i oceny pod mikroskopem.

Praca finansowana z programu finansowania badań młodych pracowników nauki i studentów studiów doktoranckich nr: 502-03/1-095-05/502-14-327

### Piśmiennictwo

1. Fleming C, Russcher H, Lindemans J, et al. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. *Clin Chem Lab Med.* 2015; 53: 1689-1706.
2. Mahieu S, Vertessen F, Van der Planken M. Evaluation of ADVIA 120 CSF assay (Bayer) vs. chamber counting of cerebrospinal fluid specimens. *Clin Lab Haematol.* 2004; 26: 195-199.
3. Khater WS, Elabd SH. Identification of Common Bacterial Pathogens Causing Meningitis in Culture-Negative Cerebrospinal Fluid Samples Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Int J Microbiol.* 2016; 2016: 4197187.
4. Boer K, Deufel T, Reinhoefer M. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. *Clin Biochem.* 2009; 42: 684-691.
5. Fleming C, Russcher H, Brouwer R, et al. Evaluation of Sysmex XN-1000 High-Sensitive Analysis (hsA) Research Mode for Counting and Differentiating Cells in Cerebrospinal Fluid. *Am J Clin Pathol.* 2016; 145: 299-307.
6. Craig FE, Ohori NP, Gorrill TS, et al. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135: 22-34.
7. Sandhaus LM, Ciarlini P, Kidric D, et al. Automated cerebrospinal fluid cell counts using the Sysmex XE-5000: is it time for new reference ranges? *Am J Clin Pathol.* 2010; 134: 734-738.
8. Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, et al. Validation of the body fluid module on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med.* 2012; 50: 1791-1798.

9. Weston CL, Glantz MJ, Connor JR. Detection of cancer cells in the cerebrospinal fluid: current methods and future directions. *Fluids Barriers CNS.* 2011; 8: 14.
10. Jung S, Chae H, Lim J, et al. Differential blast counts obtained by automated blood cell analyzers. *Korean J Lab Med.* 2010; 30: 540-546.
11. Fitch MT, van de Beek D. Emergency diagnosis and treatment of adult meningitis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 191-200.
12. Viallon A, Botelho-Nevers E, Zeni F. Clinical decision rules for acute bacterial meningitis: current insights. *Open Access Emerg Med.* 2016; 8: 7-16.
13. Zimmermann M, Ruprecht K, Kainzinger F, et al. Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. *Int J Lab Hematol.* 2011; 33: 629-637.

### Autor do korespondencji:

dr n. med. Łukasz Kraszula  
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej  
II Katedra Chorób Wewnętrznych  
90-153 Łódź, Kopcińskiego 22  
tel. +48 42 6776981  
e-mail: lukasz.kraszula@umed.lodz.pl

Otrzymano: 5.11.2018

Akceptacja do druku: 19.12.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów

