

xtra

Körperflüssigkeiten auf den Kopf gestellt

Das Vorhandensein von Flüssigkeiten in Körperhöhlen oder Hohlorganen kann sowohl physiologisch als auch pathologischen Ursprungs sein. Die Indikation zur Untersuchung der Körperflüssigkeiten umfasst ein weites Feld an Fragestellungen. Die labordiagnostische Untersuchung von Körperflüssigkeiten ist in viele Routinelaboratorien integriert. Die angeforderten Untersuchungen sind neben Zellzahl und Zelldifferenzierung auch klinisch-chemische Parameter, serologische Untersuchungen, Tumormarkerbestimmungen, Tumorzytologie, bakteriologische Untersuchungen und weitere Spezialuntersuchungen. Die häufigsten Fragestellungen bei Punktaten sind:

- Maligne oder benigne?
- Entzündlich oder nicht entzündlich?

Wichtig für die korrekte technische Validierung der Ergebnisse ist für das Labor die Kennzeichnung der Materialart. Bei Liquoranforderungen ist dies in der Regel immer gegeben. Bei anderen Punktionsmaterialien fehlt oft die genaue Materialzuordnung. Der Liquor spielt im Bereich der Körperflüssigkeiten eine gesonderte Rolle und ist in vielen Punkten von den übrigen Punktaten in der Bearbeitung zu unterscheiden. Ein wesentlicher Grund dafür ist die Art der Materialgewinnung und die oftmals geringe Menge als Untersuchungsgut.

Allgemein gilt für alle Körperflüssigkeiten, dass die Bearbeitung innerhalb von 2 Stunden erfolgen sollte. Dies gilt insbesondere für Zellpräparationen, die für die Differenzierung anzufertigen sind. Bestimmte Zelltypen, wie z.B. aktivierte Zellen leben weniger lange als andere Zelltypen [1].

Die allgemeinen Entnahmeempfehlungen für Punktate sind:

- Nativ: für klinisch-chemische und serologische Untersuchungen
- EDTA: für die Zählung und Differenzierung von Zellen in Punktaten (Blutbildröhrchen)

Ausnahmen können sein:

- Liquor: wird in der Regel ohne EDTA-Zusatz verwendet (Materialmenge oft zu gering, um ein zusätzliches Röhrchen mit EDTA abzunehmen)
- Synovialflüssigkeit: wird auch mit Na-Heparinat antikoaguliert, um Artefakte für die Kristallbeurteilung zu vermeiden [3]
- Heparin: zur Suche nach Tumorzellen
- Natriumfluorid: zur Lactatbestimmung

Ausnahme kann sein:

- Liquor wird in der Regel nativ eingesetzt (verfügbare Materialmenge)

Mit diesem Themenblatt möchten wir auf die Besonderheiten im Bereich der Zellzählung – und in diesem Zusammenhang auch auf die unterschiedlichen Zellarten – aufmerksam machen, die, je nach Materialart, sehr different sein können. Auf die klinisch-chemischen und serologischen Parameter wird in diesem Themenblatt nicht weiter eingegangen, ebenso auch nicht auf die bakteriologischen Untersuchungen.

Die Punktatflüssigkeiten im kompakten Überblick

1. Pleuraerguss

Die Pleura ist das sogenannte Brustfell, eine dünne seröse Haut, die die Lungen überzieht und die Brusthöhle von innen mit einer Mesothelschicht auskleidet. Zwischen diesen Mesothelschichten liegt die Pleurahöhle, in welcher sich physiologisch eine klare seröse Flüssigkeit <15 mL befindet. Zu einem Pleuraerguss kommt es, wenn sich vermehrt Flüssigkeit in der Pleurahöhle ansammelt. Die häufigsten Ursachen für die Entstehung eines Pleuraergusses sind Herzinsuffizienz, Malignome, Tumore und Entzündungen.

Differentialdiagnostisch wird bei Pleurapunktaten das Transsudat-Exsudat-Model angewendet, was entscheidenden Einfluss auf die Therapie hat. Die Einteilung in Transsudat und Exsudat hängt von den Ergebnissen der verschiedenen klinisch-chemischen, serologischen und hämatologischen Parameter ab. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgt nach sogenannten Cut-off-Grenzen (Entscheidungsgrenzen). Referenzwerte im eigentlichen Sinne, gibt es nicht [1].

Transsudat:

- Gesamt-Zellzahl <1.000/μL = Leukozyten (WBC) + Nicht-Leukozyten (z. B. Mesothelzellen)
- Neutrophile Granulozyten <250/μL
- Erythrozyten <1.000/μL
- Weitere klinisch-chemische und serologische Parameter (nicht weiter aufgeführt):
Albumin, CEA, Gesamtprotein, α-Amylase, Cholesterin, LDH u. a.

Exsudat:

- Gesamt-Zellzahl >1.000/μL = Leukozyten (WBC) + Nicht-Leukozyten (z. B. Mesothelzellen)
- Neutrophile Granulozyten >500/μL
- Erythrozyten >10.000/μL
- Weitere klinisch-chemische und serologische Parameter (nicht weiter aufgeführt):
Albumin, CEA, Gesamtprotein, α-Amylase, Cholesterin, LDH u. a.

2. Aszites

- Aszites ist eine Ansammlung von Flüssigkeit in der freien Bauchhöhle
- Normalerweise ist kein Aszites vorhanden
- Aus therapeutischen Gründen wird unterteilt in
 - Maligne oder nicht maligne Grunderkrankungen [1]
 - Infizierte oder nicht infizierte Aszites
- Die häufigsten Ursachen für die Entstehung von Aszites sind Leberzirrhose (ca. 90 %) und Karzinose (ca. 10 %)
- Die Bewertung der Ergebnisse erfolgt anhand der Entscheidungsgrenzen (Cut-off-Werte)
Referenzwerte im eigentlichen Sinne gibt es nicht.

Einen Normal-Aszites gibt es nicht, daher wird als Orientierung für Cut-off-Werte der häufigste Fall – die Leberzirrhose – verwendet.

- Zusammensetzung der Zellen
 - Mononukleäre Zellen (MN) >80 %
 - Mesothelien, Makrophagen, Monozyten >70 %
 - Lymphozyten <18 %
 - Polymorphkernige Zellen (PMN) <7 % (neutrophile Granulozyten)
- Zellzahl <500/μL
- Erythrozyten <10.000/μL

Ein besonderes Augenmerk bei Aszites wird auf die Zahl der neutrophilen Granulozyten gerichtet. Der Cut-off-Wert für die neutrophilen Granulozyten liegt bei 250/μL.

- Befunde mit einer Neutrophilenzahl von $\leq 250/\mu\text{L}$ sprechen eher für ein benignes Geschehen
- Befunde mit einer Neutrophilenzahl von $\geq 250/\mu\text{L}$ sprechen eher für ein malignes/entzündliches Geschehen

Eine Zellzahl von $> 500/\mu\text{L}$ und eine neutrophile Granulozytenzahl von $> 250/\mu\text{L}$ ergeben einen deutlichen Hinweis auf eine bakteriellen Peritonitis.

3. Dialysat, CAPD

Einige dialysepflichtige Patienten können die kontinuierliche ambulante Bauchfelldialyse (CAPD = Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis) anwenden. Dabei wird in den Bauchraum über einen Katheder eine sterile Dialysierlösung eingefüllt, die dann über das Prinzip Osmose die harnpflichtigen Substanzen entfernt. Die Dialysierflüssigkeit wird alle 4–6 Stunden über einen Beutel gewechselt. Nach etwas Training kann der Patient dies selbstständig durchführen. Dieses Verfahren bringt den Dialysepatienten mehr Lebensqualität, da sie nicht ständig eine Dialysepraxis aufsuchen müssen, birgt aber die Gefahr einer Peritonitis durch den Kathederzugang. Die Patienten müssen sich i. d. R. 1 x im Monat beim Arzt zur Kontrolle vorstellen.

Eine Ursache für die Peritonitis können eingeschleppte Keime sein, eine andere Ursache kann eine allergische Reaktion sein, die dann zu einer sogenannten chemischen Peritonitis führt.

Daher ist die häufigste Fragestellung bei der Untersuchung von CAPD-Proben:

- Entzündlich oder nicht entzündlich?
 - Anzahl der neutrophilen Granulozyten
 - Anzahl der eosinophilen Granulozyten

Die Zusammensetzung der Zellarten ist vergleichbar mit der von Aszites, da sich die Dialysierlösung im Bauchraum befindet (Mesothelien, Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten = mononukleäre Zellen und den polymorphnukleären Zellen (PMN)).

Als Cut-off-Werte werden eingesetzt [4]:

- Gesamtzellzahl $< 300/\mu\text{L}$
- WBC $< 100/\mu\text{L}$
- Eosinophile Gran. $< 10\%$
- Neutrophile Gran. $< 50\%$
- RBC $< 10.000/\mu\text{L}$

Befunde mit einer erhöhten Gesamtzellzahl von $> 300/\mu\text{L}$ und WBC $> 100/\mu\text{L}$ mit $> 50\%$ neutrophile Granulozyten spricht für eine bakterielle Peritonitis. Ist hingegen der Anteil der eosinophilen Granulozyten $> 10\%$ bei weniger als 50% neutrophilen Granulozyten, liegt der Verdacht nahe, dass es sich um eine chemische Peritonitis handeln könnte. WBC $> 1.000/\mu\text{L}$ deuten auf eine bakterielle Peritonitis hin.

4. Synovialflüssigkeit

Die Untersuchung von Synovialflüssigkeit (SF) hat ihre Indikation in der Differenzierung von nicht entzündlichen und entzündlichen Erkrankungen. Oft wird sie auch zur Feststellung einer Ausschlussdiagnose herangezogen. Sie ist aber auf jeden Fall ein wichtiges direktes diagnostisches Kriterium bei Gicht, Pseudogicht, anderen Kristalldositionen und der septischen Arthritis. Da neben Zellzahl und Zelldifferenzierung auch das Beurteilen von Kristallen im Punktat ein wichtiger Untersuchungsschritt ist, wird als Antikoagulantia Na-Heparinat empfohlen [5]. Andere Antikoagulantien wie Li-Heparinat, EDTA oder Oxalat führen zu Artefakten beim Kristallnachweis [3].

- Im Normalfall ist etwas Gelenkflüssigkeit vorhanden
 - Im Knie befinden sich ca. 3,5 mL Gelenkflüssigkeit
 - Die Farbe ist hell bis strohgelb und klar
 - Die Gelenkflüssigkeit ist normalerweise sehr viskös
 - Die Flüssigkeit setzt sich aus Fett, Eiweiß, Wasser, Glukose, Hyaluronsäure und Zellen zusammen (Mucin)
 - Die Funktion von SF ist, eine »Gelenkschmiere« zu bilden und den Knorpel zu ernähren

Die Viskosität der SF wird durch den Gehalt an hochpolymerisiertem Hyaluronan geprägt. Ist die Viskosität sehr hoch, kann dies zu Schwierigkeiten bei der Zellzahlbestimmung führen. Die Proben können mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt werden oder mit Hilfe von Hyaluronidase (400 Einheiten auf 1 mL SF, 10 min bei 37°C inkubieren) behandelt werden [2].

Beurteilung der Leukozytenzahl:

- Im normalen Gelenk:
 - WBC < 100/μL
 - > 80% mononukleäre Zellen (MN)
 - < 10% polymorphnukleäre Zellen (PMN)
 - Keine Erythrozyten
- Arthrosen: WBC < 500/μL
- Aktivierte Arthrosen: WBC 1.000 – 5.000/μL
- Arthritis, Gicht: WBC > 5.000 – 30.000/μL
- Septische Arthritis: WBC > 40.000 – 350.000/μL
- Bei Trauma zusätzlich RBC > 5.000/μL

Von praktischem Interesse ist der Anteil von PMN an der Gesamtzellzahl. Bei entzündlichen Formen kann er bis zu > 70% ansteigen, bei septischen Arthritiden bis zu 95%.

5. Liquor, CSF

Das Material mit der größten Herausforderung für alle. Angefangen bei der Probengewinnung bis zur Verarbeitung im Labor. Im Folgenden wird sich auf Liquorproben von Erwachsenen bezogen.

Die Indikation zur Untersuchung von Liquor umfasst ein sehr großes Spektrum. Als mögliche Fragestellung kann in Betracht kommen:

- Entzündungen
- Tumore
- Schrankenfunktionsstörungen
- Infektionen
- Blutungen

Liquorpunktionen werden sowohl mit diagnostischer Indikation als auch mit therapeutischer Indikation durchgeführt.

Referenzbereich Zellzahl:

- Lumbal 0 – 4 Zellen/μL
- Normal können Lymphozyten oder Monozyten (mononukleäre Zellen MN) vorkommen
- Keine Granulozyten (polymorphnukleäre Zellen PMN)
- Keine Erythrozyten

Je nach Krankheitsvorliegen können sich auch nicht hämatopoetische Zellen im Liquor aufhalten (z. B. Tumorzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten, etc.). Bei der automatisierten Zellzählung mit einem Hämatologieanalyser kann die Vor-differenzierung in PMN und MN einen schnellen und hilfreichen Hinweis auf die Zellgruppenverteilung geben.

Zusammenfassung Körperflüssigkeiten:

- Die Referenzbereiche und Cut-off-Bereiche für Zellen in Körperflüssigkeiten sind sehr different.
 - CSF bis 4 Zellen/ μL
 - CADP bis 100 WBC/ μL
 - Pleura bis 1.000 Zellen/ μL
 - Aszites bis 500 Zellen/ μL
 - Synovia bis 100 WBC/ μL
- Der Befundparameter, ob Zellzahl oder WBC, ist abhängig von der Materialart und sollte berücksichtigt werden. In Abhängigkeit von der Körperflüssigkeit können neben hämatopoetischen Zellen (Leukozyten) auch Nicht-Leukozyten vorhanden sein (Makrophagen, Mesothelien, Tumorzellen, etc.). Zellzahl und WBC sind nicht immer identisch.
- Das Verhältnis von Leukozyten zu Nicht-Leukozyten kann dabei einen wichtigen Hinweis auf pathogene Veränderungen geben
- Das Vorhandensein von Erythrozyten zu bewerten, ist abhängig von der Materialart
- Für die technische Validierung der Ergebnisse von Körperflüssigkeitsmessungen ist die Angabe der Materialart erforderlich

Der BF-Modus für die automatisierte Messung von Körperflüssigkeiten

Die Zellzahlbestimmungen können sowohl manuell als auch automatisiert durchgeführt werden [2]. Bei beiden Methoden ist es wichtig zu wissen, wo die Grenzen und Limitationen der Methoden liegen.

Die Analysensysteme von Sysmex XE-5000, XT-4000i und die XN-Serie bieten zur Analyse von Körperflüssigkeiten einen speziellen Messmodus an – den Body Fluid Modus (= BF-Modus).

Wird der BF-Modus angewählt, erfolgt eine automatische Leerwertkontrolle. Die verwendeten Messkanäle sind:

- DIFF-Kanal
- RBC-Kanal

Die Probe wird ohne spezielle Probenvorbereitung über den manuellen Ansaugweg gemessen. Die Differenzierung der Zellen in PMN und MN in absolut (#) und relativ (%) basiert am Gerät auf der Grundlage der gemessenen Leukozyten vom WBC-BF. Da, wie im vorangegangenen Text dargestellt, in diversen Körperflüssigkeiten auch Nicht-Leukozyten vorhanden sind, wird die Information der Gesamtzellzahl ebenso benötigt.

Der Parameter TC-BF (Total-Count = Gesamtzahl) erfasst alle kernhaltigen Zellen im DIFF-Kanal. Leukozyten befinden sich dabei im WBC-BF, andere Zellen können in den hochfluoreszierenden Bereich HF-BF gelagert sein. Mesothelzellen z. B., die deutlich größer als Leukozyten sind, weisen einen höheren DNA-/RNA-Gehalt auf und liegen daher im HF-Bereich des DIFF-Scattergramms. Tumorzellverbände können ebenfalls aufgrund von ihrer Größe und Gehalt an DNA/RNA im HF-Bereich liegen.

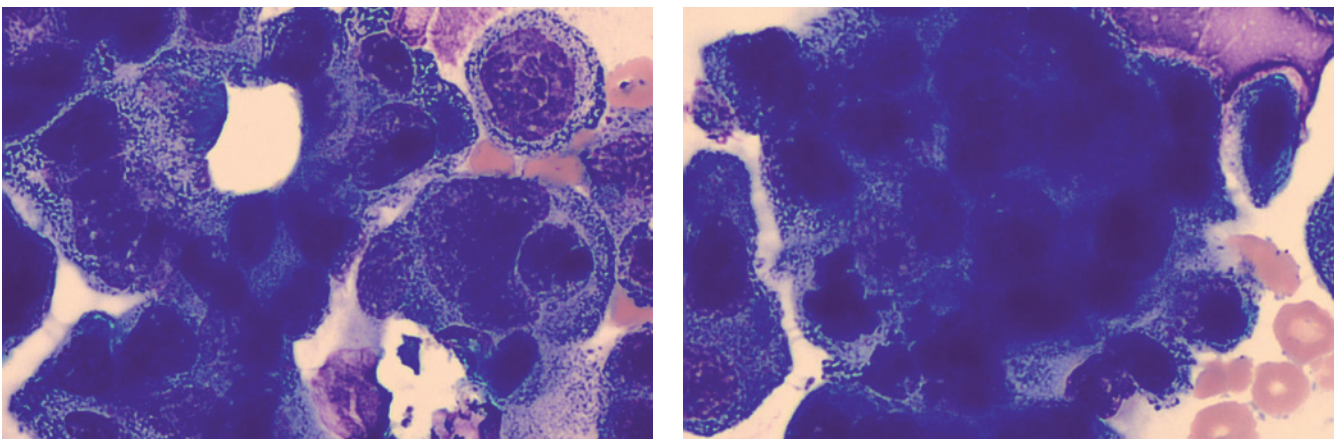
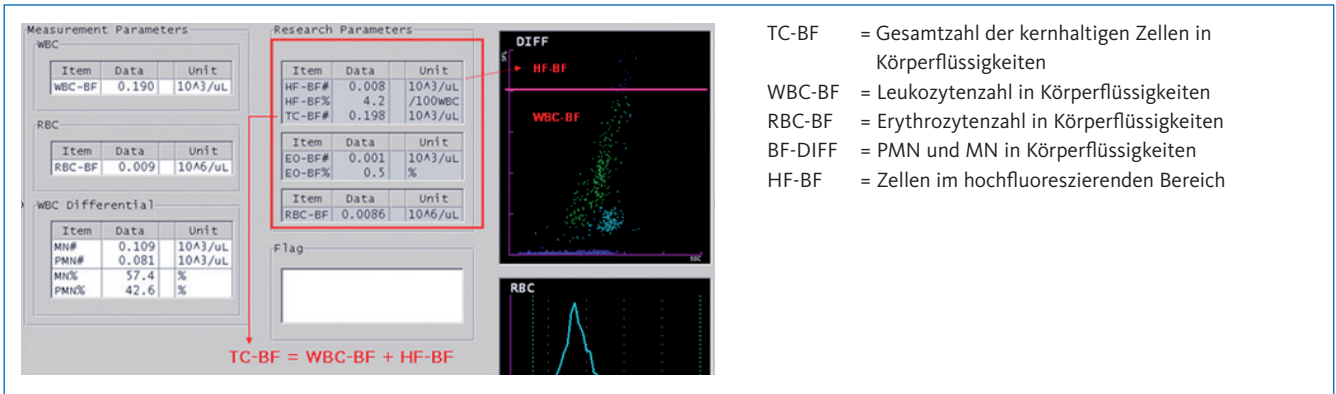


Abbildung 1: Cytospin, Zellverbände mit Verdacht auf Tumorzellen (CellaVision® DM96)

Mesothelzellen sind im Pleurapunktat regelmäßig anzutreffen. Bei Pleura wird die Differenzierung der Zellen in PMN und MN auf Basis aller kernhaltigen Zellen angegeben.



TC-BF = Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen in Körperflüssigkeiten
 WBC-BF = Leukozytenzahl in Körperflüssigkeiten
 RBC-BF = Erythrozytenzahl in Körperflüssigkeiten
 BF-DIFF = PMN und MN in Körperflüssigkeiten
 HF-BF = Zellen im hochfluoreszierenden Bereich

Abbildung 2: Registerkarte Body Fluid Zusatzinformation am XE-5000

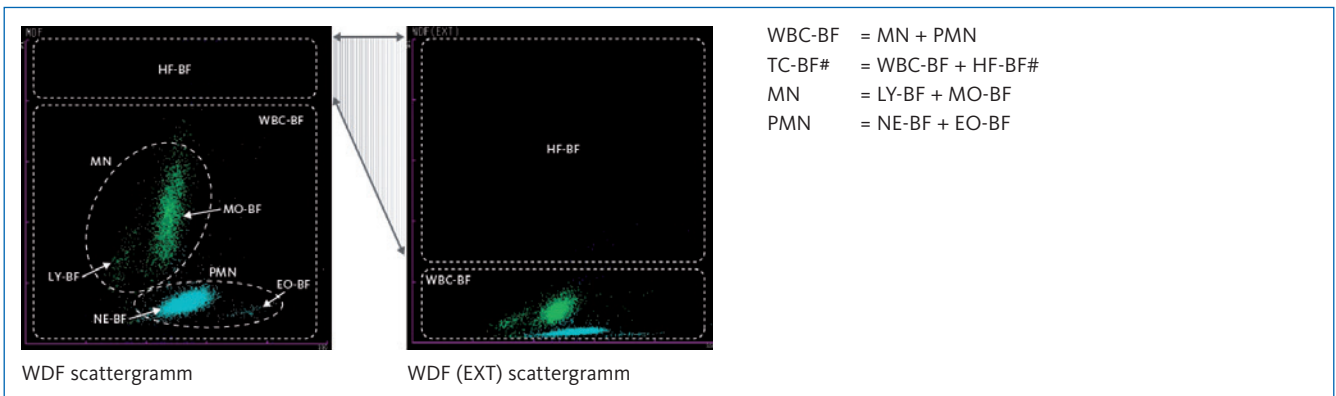


Abbildung 3: Scattergramm Body Fluid, XN-Serie

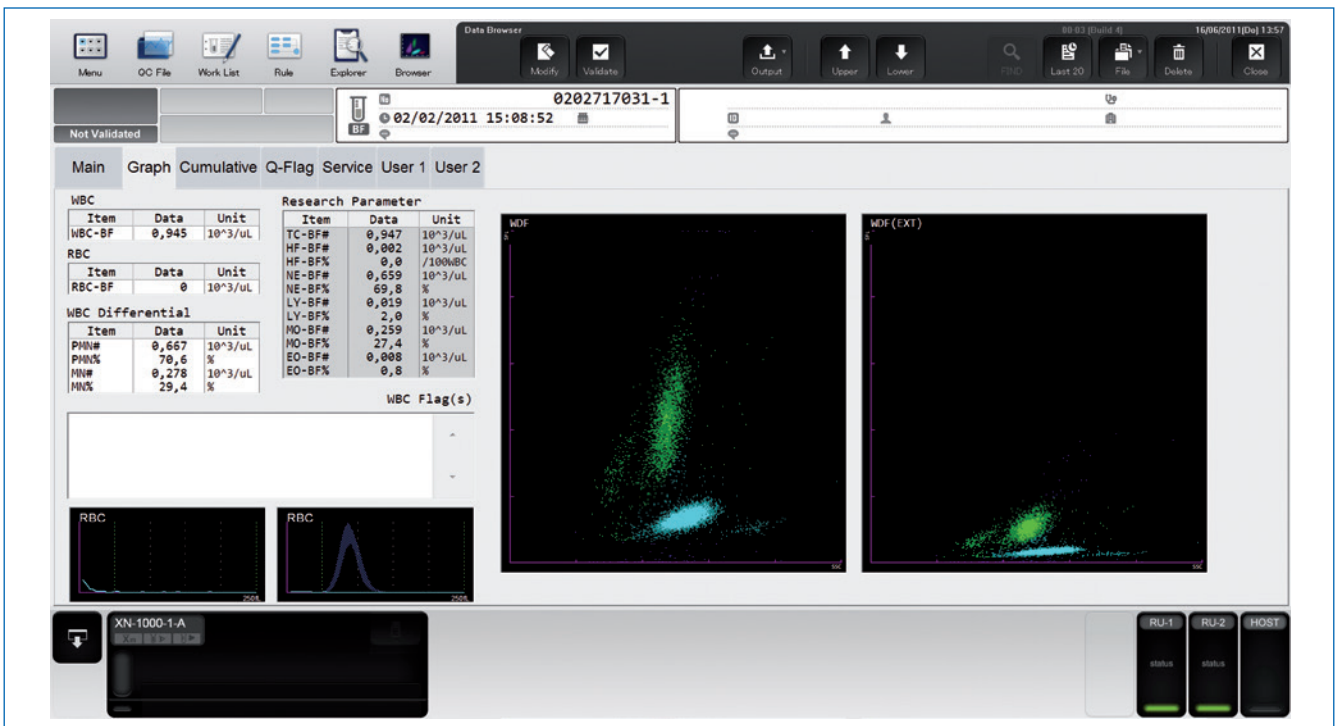


Abbildung 4: Registerkarte XN, Body Fluid

Wird hingegen bei der Messung von Liquor im HF-Bereich eine Zellgruppe gefunden, so ist dies in der Regel kein Normalbefund und sollte mikroskopisch im Cytospin-Präparat unbedingt abgeklärt werden. Dies zeigt deutlich, dass die Information aus dem Bereich HF-BF je nach Materialart unterschiedlich zu bewerten ist.

Das spezielle Regelwerk für Körperflüssigkeiten, welches Bestandteil von SIS und *Extended* IPU ist, unterstützt dabei die verschiedenen Kriterien für die technische Validierung der Ergebnisse.

Im Regelwerk sind abhängig von der Materialart hinterlegt:

- Referenzbereiche
- Cut-off-Bereiche
- PMN- und MN-Beurteilung
- EO-BF-Hinweise für eosinophile Granulozyten
- HF-BF-Hinweise für hochfluoreszierende Zellgruppen
- Berechnung von PMN und MN auf Basis von TC-BF oder WBC-BF

Zusätzlich werden über das Regelwerk Hinweise auf Interferenzen (Zelltrümmer) angezeigt. Darüber hinaus gibt das Regelwerk Hinweise und Empfehlungen auf durchzuführende Aktionen, wie z. B. Kammerzählung oder die Erstellung von Cytospins.

Mit der Durchführung einer standardisierten und automatisierten Messung von Körperflüssigkeiten in Kombination mit einem unterstützenden Regelwerk speziell für Körperflüssigkeiten, bieten wir auch dem weniger erfahrenen Laborpersonal ein Optimum an Sicherheit.

Literatur

- [1] **Thomas L.** (2007): *Labor und Diagnose*. 6. Auflage.
- [2] **Szamosi DI.** (2009): *Body Fluid Analysis for Cellular Composition. Approved Guideline. CLSI document H56-A, Vol. 26, No. 26.*
- [3] **Adam O, Sponer U.** (2003): *Synovia-Analyse, Diagnostik und Analytik im Gelenkpunktat*. Hoppenstedt-Verlag Darmstadt.
- [4] **Kam-Tao Li P.** (2010): *ISPD Guidelines/Recommendations. Peritoneal Dialysis International*. 30:393–423.
- [5] **De Jonge et al.** (2004): *Automated counting of white blood cells in synovial fluid. Rheumatology*. 43:170–173. <http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/43/2/170.full.pdf+html>
- [6] **Tanaka et al.** (2016): *Performance Evaluation of the XN-550 Automated Hematology Analyzer Body Fluid Mode - Considerations for Operational Conditions for Cell Counting with Cerebrospinal and Synovial Fluids. Sysmex Journal International, Vol. 26, No. 1.*