

KOŇSKÉ ASTMA: TIPY A TRIKY PRO VYSOCE VYPOVÍDAJÍCÍ CYTOLOGICKOU DIAGNOSTIKU



Zdroj: Dr. Maria Christian

Správný postup v diagnostice onemocnění dýchacích cest koní spočívá v podrobné anamnéze, klinickém vyšetření, vyhodnocení endoskopického nálezu a funkčních testů plic, ale důležitými stavebními kameny diagnostického procesu jsou také laboratorní vyšetření jako cytologické vyšetření vzorku odebraného z dýchacích cest (TBS- tracheobronchiální sekret a BAL- bronchoalveolární laváž). Jako vždy je vypovídací schopnost laboratorních vyšetření závislá na správně zvoleném druhu

zaslaného vzorku a jeho optimálním zpracováním.

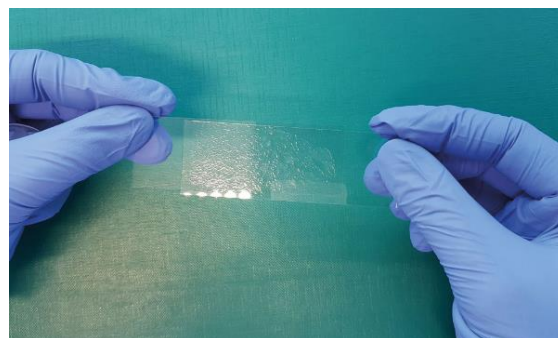
U klasických příznaků onemocnění dýchacích cest jako jsou kašel, patologické plicní ozvy, výtok z nosu a dyspnoe je doporučitelné vyšetření TBS a/nebo BAL. Ale také intolerance zátěže patří k indikacím u kterých by toto vyšetření mělo být provedeno, protože především u lehkého až středně těžkého stupně equinního astmatu (dříve: Inflammatory Airway Disease (IAD)) mohou být klinické symptomy velice subtilní.

Docela nedávno pan Schwarz a Kühn velice podrobně popsali praktické provedení TBS a BAL s nápomocnými tipy. Avšak kdy vyšetřovat TBS a kdy je lepší odebrat BAL? Jaká je vypovídací schopnost nálezu z různých odebraných vzorků? Pro bakteriologické vyšetření je vhodnější vzorek z trachey, proto je při podezření na bakteriální onemocnění (např. teplota) vždy vhodný odběr TBS. Pokud předpokládáme bakteriální pneumonii, je BAL dokonce kontraindikovaná. Pro cytologické vyšetření je však každopádně vhodnější BAL, protože nálezy z BAL na rozdíl od nálezů z TBS dobře korelují s patohistologií. Jelikož cytologický obraz z TBS navíc není reprezentativní pro dolní cesty dýchací, je BAL metodou volby při cytologickém vyšetření difuzních plicních onemocnění. V ideálním případě je vhodný odběr obou vzorků.

Správné zpracování vzorků je však pro úspěšnou diagnostiku stejně důležité jako jejich správný odběr. Bohužel buňky ve výplacích degenerují velmi rychle. Proto i když zasíláme vzorky do laboratoře, musí být preparáty pro cytologické vyšetření zhotoveny ihned po odběru vzorku. Pokud jsou roztěry na cytologické vyšetření prováděny až v laboratoři, velice často (již po pár hodinách transportu/uskladnění) jsou buňky nehodnotitelné a vypovídací schopnost cytologického nálezu rapidně klesá.

Pokud bylo možné provést TBS bez výplachu, je dobré provést otiskové preparáty přímo z hleny. Provádí se nanesením jedné kapky materiálu na podložní sklíčko, přes něj přeložíme druhé podložní sklíčko a bez použití tlaku rychle přejedeme jedním sklíčkem přes druhé. Další možností je položit obě sklíčka na sebe a tahem od sebe zhotovit preparát stejně jako když „mažeme

máslo na chleba“ (**obrázek 1**). Pokud jsme materiál z TBS získali výplachem, provedeme nejprve centrifugaci vzorku při nízkých otáčkách (200-300g), poté odstraníme tekutinu a nakonec naneseeme kapku sedimentovaného hleny na sklíčko a provedeme roztěr podle návodu výše.

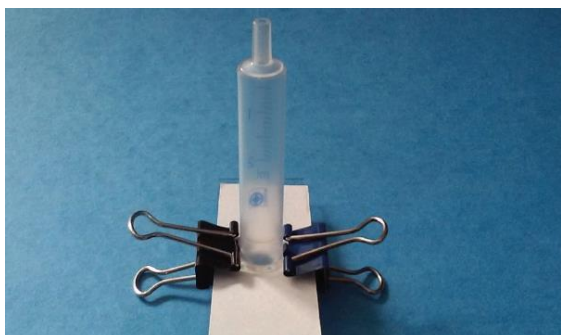


Obrázek 1: otiskový preparát
Zdroj: LABOKLIN

Tekutina z BAL je vždy chudá na buňky, proto musí být před cytologickým vyšetřením provedeno obohacení vzorku. Nejjednodušší metodou je příprava roztěrových preparátů ze sedimentu: část vzorku dáme, stejně jako u výplachů z trachey, centrifugovat při nízkých otáčkách. Většinu tekutiny slijeme a zbytek tekutiny resuspendujeme s buněčným sedimentem a provedeme roztěr technikou krevního roztěru: malou kapku suspenze naneseeme na jeden konec podložního sklíčka. Druhé podložní sklíčko přiložíme ke kapce pod úhlem 45° a čekáme, dokud se tekutina nerozloží po celém okraji sklíčka. Nakonec kapku roztěříme pomocí plynulého tahu přes podložní sklíčko na jeho druhý konec. Návod od Laboklinu na provedení krevního roztěru najdete na Youtube: (<https://t1p.de/e9iqc>).

Nejhodnotnější preparáty k posouzení tekutin chudých na buňky získáváme pomocí cytocentrifugace. Pro některé centrifugy se

za tímto účelem prodávají speciální nástavce, jejichž pořízení se však vyplatí pouze při jejich častém použití. Je však možné si zhotovit vlastní „sedimentační komůrku“ pomocí levných pomůcek (**obrázek 2**): pomocí silných svorek přicvakneme 2 ml stříkačku k filtračnímu papíru, který je položený na podložním sklíčku. Ve filtračním papíru je díra odpovídající velikosti díry stříkačky. Přes konus stříkačky nanese na sklíčko odebraný vzorek. Filtrační papír pomalu nasakuje tekutinu a buňky z odebraného vzorku se shromažďují v místě díry ve filtračním papíru umístěném na podložním sklíčku. Abychom zabránili in-vitro pomnožení bakterií, je vhodné po dobu sedimentace umístit sedimentační komůrku do lednice.



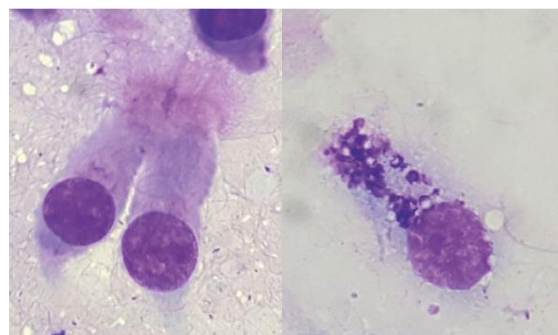
Obrázek 2: sedimentační komůrka, vytvořená z jednoho podložního sklíčka, jednoho filtračního papíru s dírou, 1 stříkačky a dvou silných svorek
Zdroj: LABOKLIN

Aby došlo k dobré konzervaci vzorku, je důležité, aby preparáty co nejrychleji uschly. Především u hustších vzorků můžeme proces schnutí urychlit vložením do inkubátoru nebo umístěním vzorku na teplý povrch. Možné je také opatrné fénování vzorku mírně teplým vzduchem. Do laboratoře zasíláte suchá, neobarvená sklíčka uskladněná v přepravních tubách. Spolu se sklíčky zašlete reprezentativní aliquot ode-

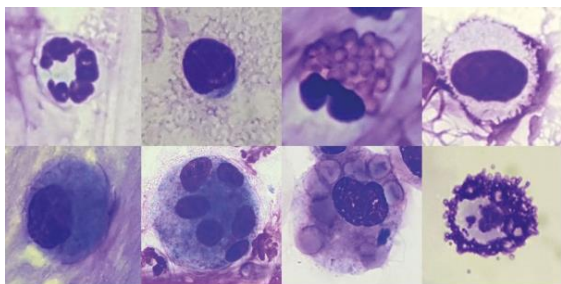
braného vzorku ve sterilní těsnící zkušovací trubce bez média. Tekutý vzorek by měl být do laboratoře zaslán co nejdříve a ve zchladeném stavu (ev. lze použít chladicí sáčky).

Preparáty lze barvit běžnými barvivy Giemsa-Romanovského typu. Ale minimálně jedno sklíčko se barví barvivem na mastocytární granula jako např. toluidinová modř. Ve vzorcích z dýchacích cest jsou totiž mastocyty velmi snadno přehlédnutelné, přestože jsou diagnosticky velmi důležité (**obrázek 4**).

Fyziologický obraz buněk z TBS a BAL zrcadlí anatomické struktury jednotlivých úseků dýchacích cest. U zdravých zvířat jsou cytologické preparáty na buňky chudé, s malým množstvím tkáňových buněk (řasinkový epitel a pohárkové buňky, **obrázek 3**) a nepatrným množstvím zánětlivých buněk (především makrofágy a lymfocyty, méně neutrofilů, lymfocyty a mastocytární buňky, **obrázek 4**). Přehled buněčného složení z TBS a BAL u asymptomatických koní je znázorněn v tabulce 1.



Obrázek 3: vlevo: řasinkový epitel, vpravo pohárková buňka, barvení Giemsa-Romanovski
Zdroj: LABOKLIN



Obrázek 4: zánětlivé buňky: nahoře zleva: neutrofil, lymfocyt, eozinofil, mastocyt (barvení Giemsa-Romanovsky); dole zleva do prava: inaktivovaný makrofág, několikajaderný makrofág, erytrofagocytóza, mastocyt (toluidinová modř)
Zdroj: LABOKLIN

V literatuře se skoro nevyskytují referenční hodnoty buněčného složení z TBS. Také často citovaný údaj, že >20 % neutrofilů poukazuje na zánětlivý proces, je potřeba vidět kriticky.

Studie ukázaly, že za určitých okolností mohou mít i klinicky zdraví koně v TBS výrazně zvýšený podíl neutrofilních granulocytů. Jako příčina je diskutováno mimo jiné krmení senem ve formě balíků, pobyt venku ve studeném počasí a intenzivní trénink. Buněčné složení z BAL mnohem méně podléhá venkovním vlivům a je proto vhodnější k diagnostikování diseminovaných onemocnění, především dolních cest dýchacích. Největší vypovídací hodnotu mají samozřejmě výsledky ze souběžného vyšetření TBS i BAL.

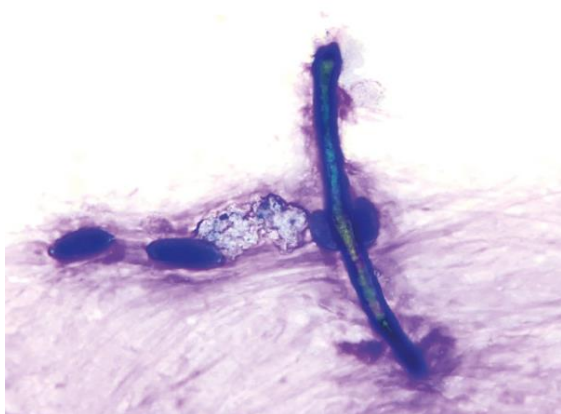
U onemocnění dýchacích cest se mění obsah/množství buněk a také poměr jednotlivých buněk. Během cytologického vyšetření hledáme také vdechnuté plísňové struktury (**obrázek 5**) a pyly (**obrázek 5**) nebo původce infekcí jako jsou např. bakterie. Curschmanovy spirály (**obrázek 6**) jsou výpotkem z dolních cest dýchacích se zahuštěným hlenem a poukazují na nedostatečný mukociliární clearance.

DRUH BUŇKY	TBS FYZIOLOGICKÉ	BAL FYZIOLOGICKÉ
řasinkový epitel	velké množství	ojediněle
makrofágy	79,6 +/- 8,2%	50 – 70%
<u>lymfocyty</u>	9,3 +/- 5,8%	30 – 50%
<u>neutrofily</u>	9,3 +/- 4,9%	< 5%
<u>eosinofily</u>	0,2 +/- 0,6%	< 0,1%
<u>mastocyty</u>	0%	< 2%

Tabulka 1: fyziologické zastoupení buněk u TBS a BAL
z Cian et al. 2015

DRUH BUŇKY Z BAL	LEHKÉ AŽ STŘEDNĚ TĚŽKÉ EQUINNÍ ASTMA (IAD)	TĚŽKÁ FORMA EQUINNÍHO ASTMATU (RAO)
<u>neutrofilly</u>	5 – 20%	> 25%
<u>eosinofily</u>	> 0,1%	< 0,1%
<u>mastocyty</u>	> 2%	< 2%

Tabulka 2: zastoupení buněk z BAL u equinního astmatu z Cian et al. 2015



Obrázek 5: podlouhlá, dvoustěnná plísňová hyfa a 4 zrníčka pylu, barvení Giemsa-Romanovski
Zdroj: LABOKLIN

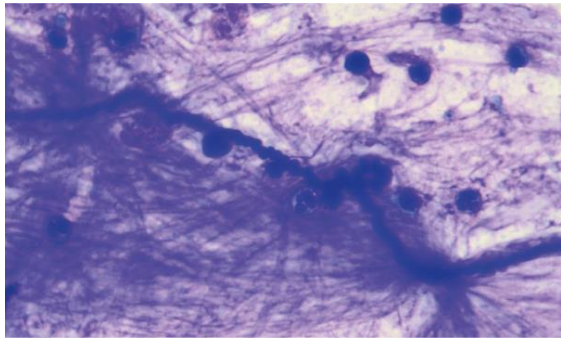
Vyšetření buněčného složení z BAL je nápomocné především při diferenciaci sterilních zánětů jako jsou lehký až střední stupeň astmatu (dříve: IAD) a těžký stupeň equinního astmatu (dříve: Recurrent Airway Obstruction (RAO)) (**tabulka 2**). Obě formy astmatu způsobují zvýšení podílu neutrofilních granulocytů ve vzorcích.

U lehkého až středně těžkého stupně equinního astmatu je jejich zvýšení jen velmi malé (5-20 % neutrofilů), mimo to se mohou ve zvýšené míře vyskytovat mastocyty (>2 %) a eozinofily (>0,1 %). Těžká forma equinního astmatu je spojená s výrazným zvýšením množství neutrofilních granulocytů (>25 %), v mnoha případech nacházíme pouze neutrofilní granulocyty.

Septické záněty způsobují zpravidla velmi vysoké množství buněk, rovněž s velmi vysokým podílem neutrofilních granulocytů. Bez průkazu fagocytovaných bakterií, proto může nález vypadat jako obraz těžkého stupně equinního astmatu. Je tedy nutné, aby byly cytologické nálezy vždy interpretovány v kombinaci s anamnézou a klinickým obrazem. Máme-li při klinickém vyšetření podezření na bakteriální onemocnění, mělo by být vždy provedeno bakteriologické vyšetření z TBS.

Makrofágy s obsahem fagocytovaných erytrocytů (**obrázek 6**) nebo jejich derivátů (hemosiderin nebo hematoidin), poukazují

na přítomnost krvácení do plic. Lehké krvácení může doprovázet různá onemocnění plic a může být způsobeno např. těžkými záchvaty kašle. Výrazná příměs krve může ale také poukazovat na přítomnost zátěží indukovaného krvácení do plic (EIPH (Exercise-induced pulmonary haemorrhage)). Samozřejmě musíme odlišit krvácení do plic od příměsi krve způsobené odběrem vzorku. To zjistíme vyhodnocením preparátů z čerstvě získaného vzorku. Pokud jsou ve vzorku přítomny také známky odbourávání erytrocytů, jedná se o krvácení do plic.



Obrázek 6: Curshmanovy spirály, barvení Giemsa-Romanovski
Zdroj: LABOKLIN

U některých raritních onemocnění plic, jako např. equinní multinodulární pulmonální fibróza (EMPF) je pro stanovení diagnózy nezbytné patohistologické vyšetření plicní

tkáně, jelikož cytologické nálezy z BAL jsou nespecifické. Z BAL můžeme každopádně pomocí PCR vyšetřit přítomnost EHV-5, který je asociován s EMPF.

Cytologie z TBS a BAL nám poskytuje nejen cenné informace ke stanovení diagnózy plicního onemocnění, nýbrž nám také poskytuje informace o stupni onemocnění a o terapeutickém úspěchu. Výběr vhodného vzorku a vyhotovení dobře hodnotitelných cytologických preparátů je rozhodující pro vysokou vypovídací schopnost nálezu.

Literatura:

Schwarz B, Kühn H. Durchführung und Probenaufbereitung von Tracheobronchialsekret und Bronchoalveolarlavage in der Pferdepraxis und die häufigsten Fehlerquellen. TU Pferd & Nutztier 2020; 75 (4): 6 – 12

Cian F, Monti P, Durham A. Cytology of the lower respiratory tract in horses: An updated review. Equine Vet Educ 2015; 27 (10): 544 – 553