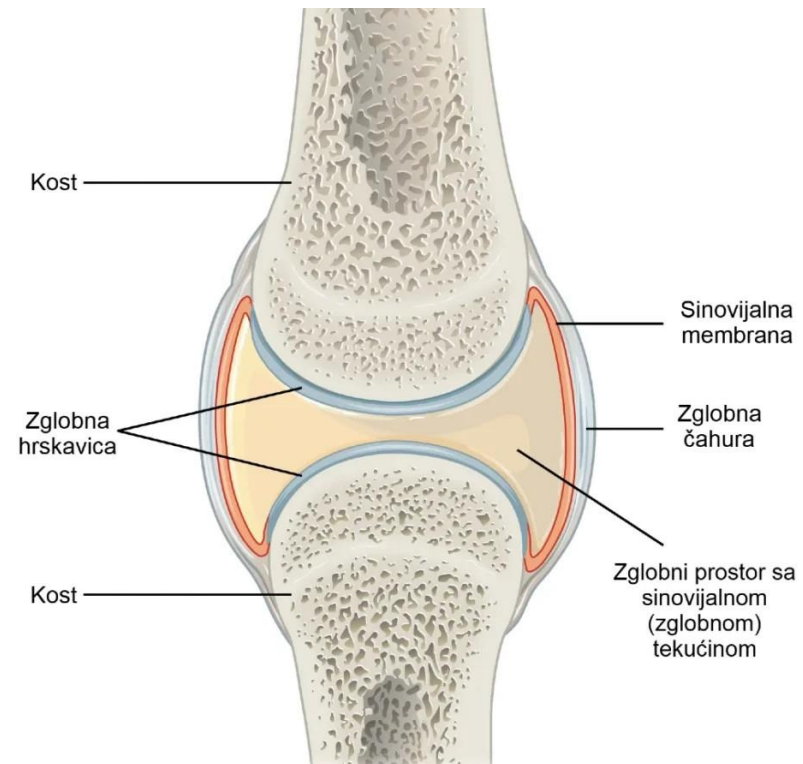


Analiza zglobne tekućine u laboratorijskoj medicini

Marija Božović

Klinički zavod za kemiju, KBC Sestre milosrdnice

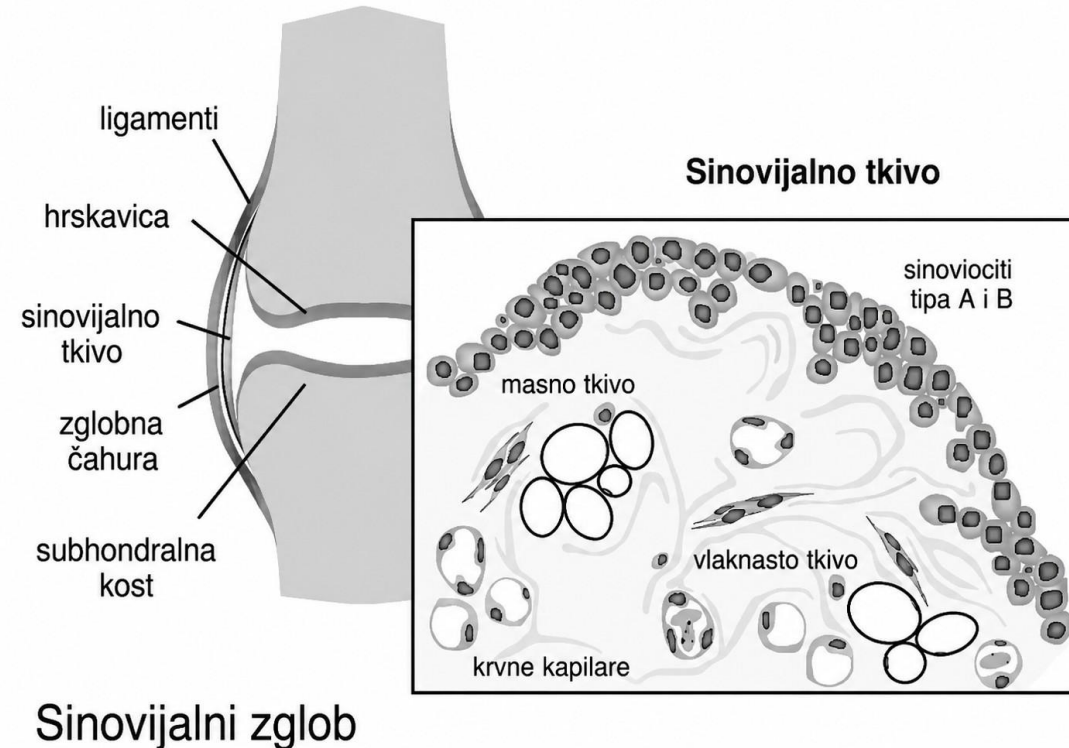
Zglobna šupljina



Slika 1. Zglobna šupljina - shematski prikaz zglobnog prostora sa zglobnom tekućinom i zglobnom čahurom. Slika uređena korištenjem ChatGPT alata prema https://www.physio-pedia.com/Synovium_%26_Synovial_Fluid

Sinovijalna membrana

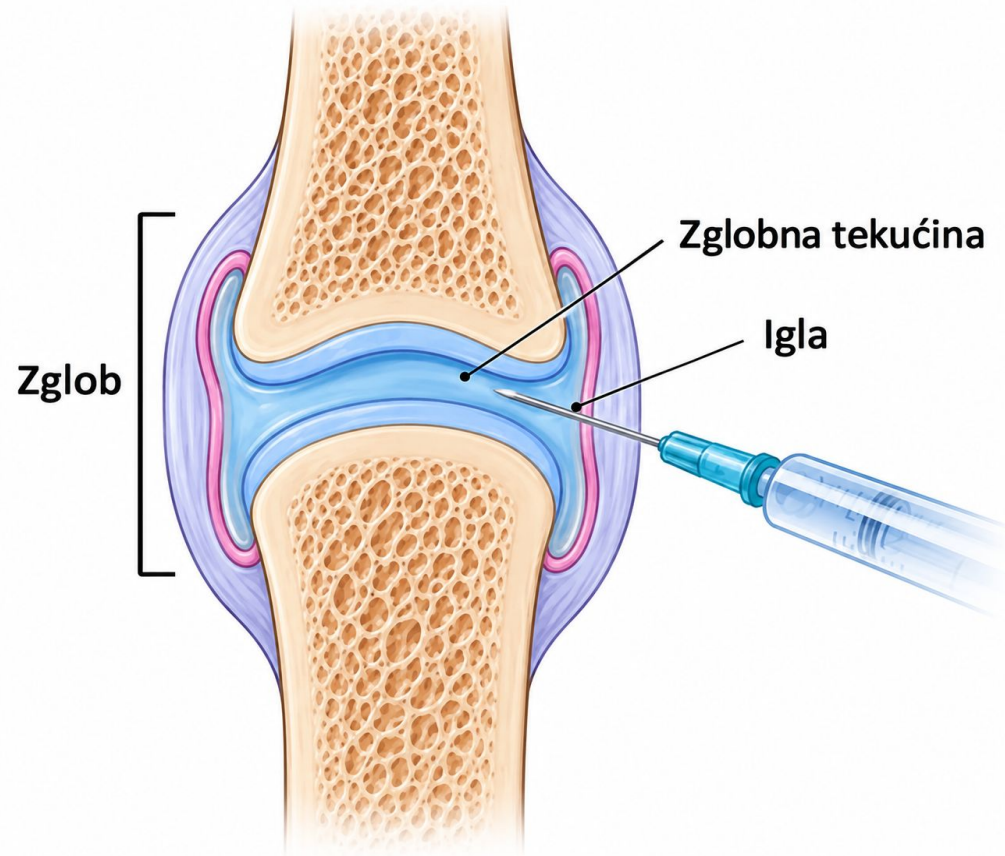
- ne sadrži epitelne stanice
- gusta mreža kapilara
- unutarnji sloj (intima):
 - sinovioцити tipa A
 - sinovioцити tipa B
- tip A - imunosni čistači
- tip B - sinteza hijaluronske kiseline



Slika 2. Struktura sinovijalne membrane, uređena korištenjem ChatGPT alata prema Jansen NWD. Blood-induced joint damage: from mechanisms to clinical practice [dissertation]. Utrecht: Utrecht University; 2008. ISBN: 978-90-3934-791-1

Artrocenteza

- ▶ punkcija zgloba koja može biti dijagnostičke naravi (dobivanje uzoraka za mikrobiološku, citološku i biokemijsku analizu) ili terapijske naravi (evakuacija izljeva, primjena lijeka)



Uloge zglobne tekućine

Izgled

1. Podmazivanje i smanjenje trenja
 2. Dostava hranjivih tvari
 3. Uklanjanje otpadnih metabolita
- ▶ Svijetla, blijedožuta, bistra
 - ▶ Izrazite viskoznosti
 - ▶ Sastav sličan sastavu krvne plazme



Slika 3. Izgled zglobne tekućine. Preuzet iz Oliviero F, Mandell BF. Synovial fluid analysis: Relevance for daily clinical practice. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2023;37(1):101848. doi:10.1016/j.berh.2023.101848

Laboratorijska analiza

- ▶ Fiziološki: volumen < 3,5 ml
- ▶ Cilj: razlikovati upalne, neupalne, traumatske bolesti nakupljanja
- ▶ Indikacija: upale zglobova različitih etiologija, sumnja na akutnu infekciju, dijagnostika artritisa
- ▶ Dijagnostika kristala: razlikovanje gihta od pseudogihta
- ▶ Hitna laboratorijska dijagnostika ključna za brzo razlikovanje upalnih od neupalnih stanja te usmjeravanje terapijskog pristupa bolesniku

Predanalitička faza

- ▶ Redoslijed uzorkovanja:
 1. Spremnik za biokemijske analize
 2. Spremnik za određivanje kristala
 3. Spremnik za određivanje broja stanica
 4. Spremnik za mikrobiološku analizu
- ▶ Preporučeni volumen uzorka u spremniku 3-5 ml
- ▶ Ukoliko je volumen manji od 1 ml - pripaziti na uzorak s antikoagulansom (tekućim) - može doći do propadanja stanica

Analitička faza

1. Makroskopski pregled
2. Biokemijska analiza
3. Određivanje i diferencijalna analiza stanica
4. Mikroskopski pregled kristala

1. Makroskopski pregled

- ▶ Uključuje:
 - ▶ Određivanje ukupnog uzorkovanog volumena
 - ▶ Procjena boje i izgleda (prije centrifugiranja uzorka)
 - ▶ Procjena viskoznosti
- ▶ Na patološko stanje upućuje:
 - ▶ Volumen $>3,5$ ml
 - ▶ Gubitak viskoznosti
 - ▶ Promjena boje i izgleda

2. Biokemijske analize

- ▶ Određivanje nakon centrifugiranja uzorka
- ▶ Provjeriti kvalitetu uzorka prije postavljanja na analizator
- ▶ Najčešće se određuju:
 - ▶ Glukoza
 - ▶ Ukupni proteini
 - ▶ Laktat-dehidrogenaza
 - ▶ Laktat
 - ▶ Mokraćna liselina

Odjel za medicinsku biokemiju

Uzorak	Biokemijske pretrage
vS	Glukoza
vS	LD
vS	Proteini, ukupni

Uzorak	Zglobna tekućina
pn	Izgled zglobne tekućine (*)
pn	Boja zglobne tekućine (*)
pn	Glukoza u zglobnoj tekućini
pn	Laktat-dehidrogenaza u zglobnoj tekućini
pn	Ukupni proteini u zglobnoj tekućini
pn	Kristali mokraćne kiseline u zglobnoj tekućini
pn	Kristali pirofosfata u zglobnoj tekućini



- ▶ **Glukoza:**
 - ▶ konc. slična onoj u plazmi
 - ▶ Idealno odrediti unutar sat vremena od uzorkovanja
 - ▶ Razlika glukoze u serumu i zglobojnoj tekućini $\leq 0,6$ mmol/L
- ▶ **Ukupni proteini:**
 - ▶ Nespecifičan pokazatelj upale
 - ▶ Normalno: 11-22 g/L, albumini: 12 g/L
 - ▶ ↑ koncentracije → povećana propusnost membrane ili povećana sinteza unutar zgloba
- ▶ **Laktat dehidrogenaza:**
 - ▶ Pokazatelj upale
 - ▶ Normalno: < 280 U/L
- ▶ **Laktat:**
 - ▶ Sumnja na septični artritis (> 9,0 mmol/L)
 - ▶ Normalno: 1,0 - 1,8 mmol/L
- ▶ **Mokraćna kiselina:**
 - ▶ Sumnja na giht
 - ▶ konc. slična onoj u serumu

3. Određivanje broja i diferencijalna analiza stanica

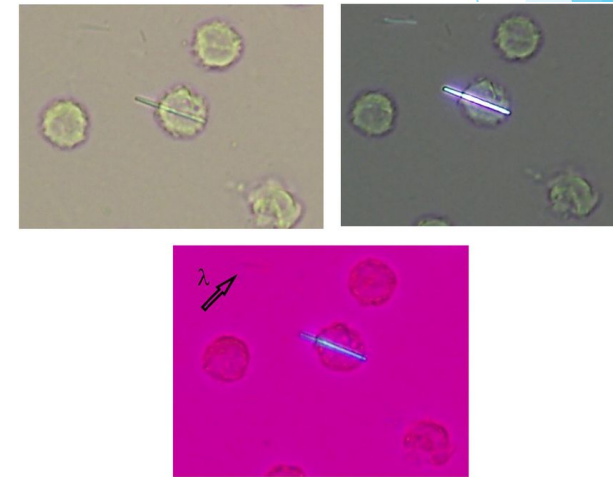
- ▶ Automatizirani hematološki brojači uz poseban softverski modul
- ▶ Fiziološki:
 - ▶ gotovo acelulerna
 - ▶ Leukociti: $< 200 \times 10^6/L$
 - ▶ Eritrociti: $< 2000 \times 10^6/L$
 - ▶ Diferencijalna slika:
 - ▶ 60-70% mononuklearne stanice (monociti i tkivni makrofagi)
 - ▶ 20-30% limfociti
 - ▶ $< 10\%$ polimorfonuklearni neutrofili (PMN)
- ▶ Neupalna stanja:
 - ▶ Leukociti $200-2000 \times 10^6/L$
 - ▶ Prevladavaju mononukleari uz niske PMN
- ▶ Upalna stanja:
 - ▶ Leukociti $2000-50000 \times 10^6/L$
 - ▶ Udio PMN prelazi 50%

Odjel za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju

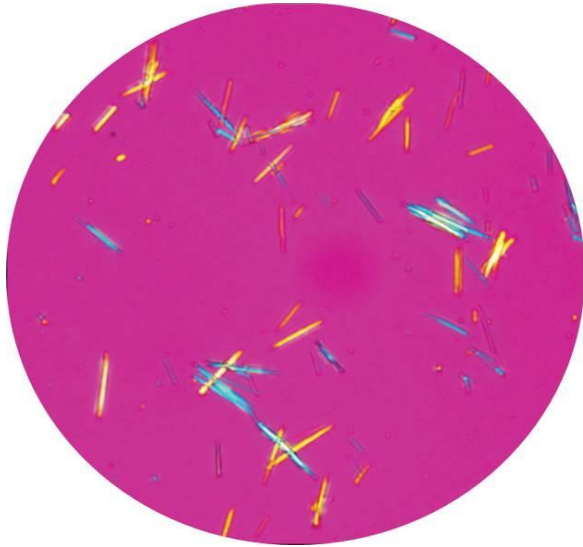
Uzorak	Ostale hematološke pretrage	
pn	Eritrociti u zglobojnoj tekućini	
pn	Leukociti u zglobojnoj tekućini	
pn	Polimorfonukleari u zglobojnoj tekućini (%)	
pn	Mononukleari (%) u zglobojnoj tekućini	

4. Mikroskopski pregled kristala

- ▶ Postavljanje dijagnoze kristalima induciranih artropatija, giht i pseudogiht
- ▶ Primjena kompenziranog polarizacijskog mikroskopa
- ▶ Smještaj kristala:
 - ▶ Slobodni (izvanstanično)
 - ▶ Unutar citoplazme neutrofilnih granulocita (unutarstanično)
- ▶ 2 najčešće vrste kristala:
 - ▶ Kristali natrijeva monourata
 - ▶ Kalcijeva pirofosfat-dihidrata
- ▶ Mogu se pronaći i kristali kolesterola, kalcijeva oksalata, kortikosteroida

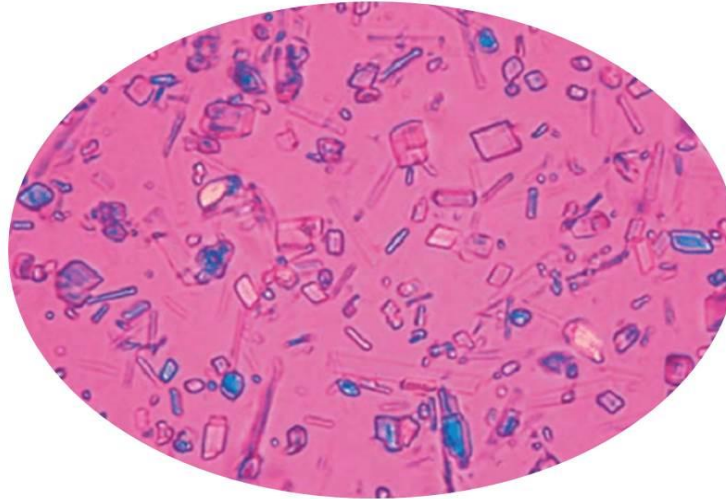


Slika 4. Preuzeto iz: Sivera F, Andres M, Dalbeth N. A glance into the future of gout. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2022;14:1759720X221114098. doi:10.1177/1759720X221114098.



Kristali natrijeva monourata

- Giht
- Tanke, oštre iglice
- Negativna dvolomnost
- Žute boje kada su poravnati s optičkom osi crvenog kompenzatora
- Plave boje pri okomitom zakretanju osi



Kristali kalcijeva pirofosfat-dihidrata

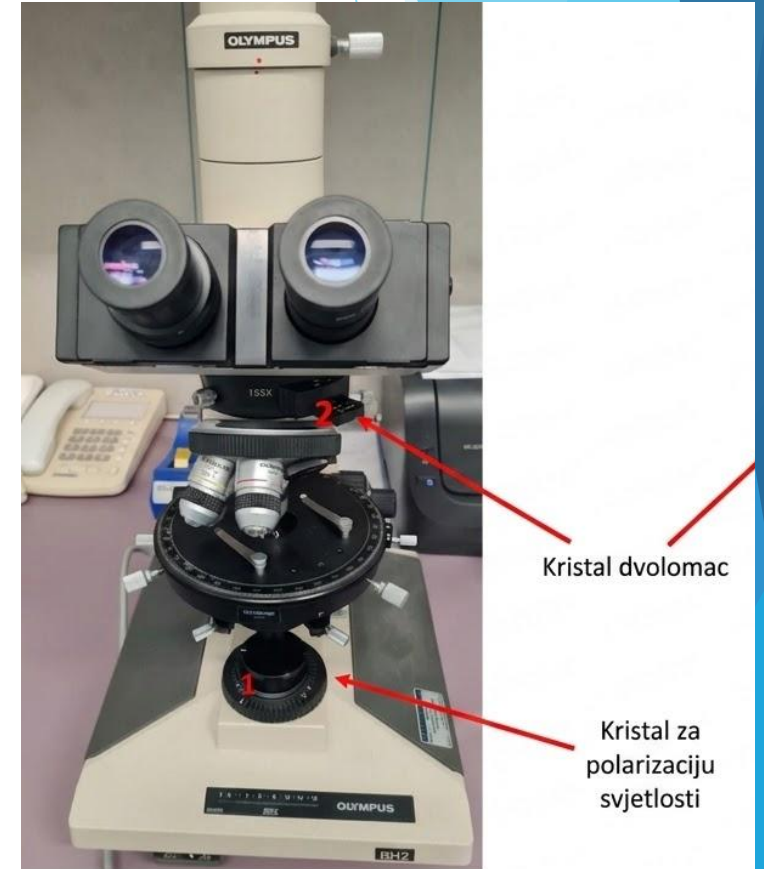
- pseudogiht
- Rombovi, kvadri ili kratki štapići
- Slaba pozitivna dvolomnost
- Plave boje kada su poravnati s optičkom osi crvenog kompenzatora
- Žute boje pri okomitom zakretanju osi

Tablica 1. Usporedba fiziološke zglobne tekućine s vrijednostima analita u najčešćim patološkim stanjima

Analit/pretraga	Osteoartritis (neupalni izljev)	Reumatoidni artritis (upalni izljev)	Septički artritis (infektivni izljev)	Giht (kristalni izljev)
Volumen (koljeno)	Povećan (> 3,5 mL)	Izrazito povećan	Povećan	Povećan
Boja	Žuta (boja slame)	Tamnožuta do zlatna	Žuto-zelena	Mliječnobijela do žuta
Izgled	Bistra / prozirna	Zamućena	Izrazito mutna (gnojna)	Zamućena / opalescentna
Viskoznost	Visoka	Niska (vodenasta)	Vrlo niska	Niska
Broj leukocita ($\times 10^6/L$)	200 - 2000	2000 - 50.000	> 50.000 (često >100.000)	2000 - 50.000
Udio neutrofila (%)	< 25%	> 50%	> 75% (često >90%)	> 50%
Kristali	Nisu prisutni	Nisu prisutni	Nisu prisutni	Prisutni kristali monourata (iglice)
Glukoza (vs. plazma)	Jednaka plazmi	Blago snižena	Drastično snižena (< 50%)	Blago snižena ili normalna
Laktati	Normalni	Blago povišeni	Ekstremno visoki	Blago povišeni
Mikrobiološka kultura	Negativna	Negativna	Pozitivna (izoliran uzročnik)	Negativna

Priprema uzorka za mikroskopsku analizu

- ▶ Priprema vlažnog preparata iz nativnog uzorka
- ▶ Jedna kap svježe, dobro homogenizirane zglobne tekućine
- ▶ Pregled počinje malim povećanjem (100x) te se podiže do 400x
- ▶ Preparat se mora pogledati odmah nakon izrade
- ▶ Utjecaj temperature i pH
 - ▶ Umjetno taloženje in vitro
 - ▶ Otapanje postojećih kristala



Interferencije u analitičkoj fazi

- ▶ Pojava mikroskopskih artefakata → oponašaju patološke kristale (talk ili škrob s rukavica prilikom artrocenteze)
- ▶ Antikoagulans u prahu (kalijev oksalat ili litijev heparin) → pozitivna dvolomnost
- ▶ Prisutnost fibrinogena → stvaranje ugruška → lažno sniženi broj leukocita
- ▶ Hemolitični uzorci (traumatska punkcija) → spektrofotometrijska interferencija

Poslijeanalitička faza

- ▶ Izvještavanje i tumačenje svih nalaza u odnosu na referentne intervale ili granice odluke
- ▶ Mjerne jedinice trebaju biti jednake kao u uzorcima seruma
- ▶ HDMBLM izdalo smjernice za analizu zglobne tekućine u kojima se navode referentni intervali
- ▶ Prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Referentni intervali klinički značajnih pretraga

Analit/pretraga	Referentni interval	Napomena prema smjernicama
Ukupni volumen (mL) (koljeno)	< 3,5	Vrijedi za odrasle osobe bez znakova izljeva
Boja	Bezbojna do blijedožuta	Često se u laboratoriju opisuje kao boja slame
Izgled	Bistra/Prozirna	Kroz epruvetu se mora nesmetano čitati tekst
Viskoznost (cm)	Visoka (nit 4-6)	Određuje se "string testom" istiskivanjem iz štrcaljke
Leukociti ($\times 10^6/L$)	< 200	Osnovni citološki parametar za isključenje upale
Eritrociti ($\times 10^6/L$)	< 2000	Veći broj uglavnom ukazuje na traumu pri punkciji
Udio neutrofila (%)	< 25	Udio od ukupnog broja leukocita (dominiraju makrofazi)
Glukoza (mmol/L)	3,3 - 5,3	Ekvivalentno plazmi (razlika može biti $\leq 0,6$ mmol/L)
Laktat (mmol/L)	1,0 - 1,8	Koristan marker; izrazito raste kod bakterijske upale
Ukupni proteini (g/L)	< 30	Rezultat neselektivne filtracije plazme kroz membranu
Mokraćna kiselina	Podjednaka koncentraciji u plazmi	Koristi se isključivo za usporedbu s krvnom plazmom
Kristali	Nisu prisutni	Pregled se obavlja obavezno polarizacijskim mikroskopom

Novi biljezi

- ▶ Cilj: biljeg koji omogućuje ranu dijagnostiku i precizno praćenje progresije bolesti
- ▶ Potencijalni novi biljezi:
 - ▶ Oligomerni matriksni protein hrskavice (COMP, engl. cartilage oligomeric matrix protein)
 - ▶ Specifični aminokiselinski ARGS fragmenti agrekana
 - ▶ mRNA
 - ▶ Proupalni citokini - interferon alfa-2, antitijela poput antivitronektina i antikalmodulina
 - ▶ Lipidni medijatori marezini

Hvala na pažnji!